
EPREUVE ECRITE DE BIOLOGIE**ENS : PARIS - LYON - CACHAN***Durée : 6 heures***Coefficients : PARIS** : Option Biologie : 7 / Option Géologie : 4**LYON** : Option Biologie : 8 / Option Sciences de la terre : 4**CACHAN : 8****MEMBRES DU JURY : D. BUSTI, N. CAUDRON, M.-H. KRYSZKE, S. LE CROM, G. LOUF, G. PEYROCHE, P. PLA, B. SCHNEIDER, J.-N. VOLFF**

L'épreuve écrite de biologie comportait trois parties distinctes (une composition de synthèse et deux études de documents) centrées sur l'importance biologique du cytosquelette des cellules animales. Les trois principaux constituants du cytosquelette (filaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules) faisaient chacun l'objet d'une partie. Les questions posées permettaient d'aborder la problématique à différentes échelles (des macromolécules à la physiologie de l'organisme) par la combinaison d'approches expérimentales variées.

Sujet de synthèse : Organisation et contraction des cellules musculaires striées.

Ce sujet demandait aux candidats de mobiliser des connaissances figurant dans différentes parties du programme et de les organiser. Le jury n'attendait pas une présentation factuelle des données (il ne s'agit pas d'une épreuve de récitation) et a valorisé les copies révélant un véritable effort de synthèse et dont la trame était soutenue par des démarches expérimentales pertinentes.

Il était indispensable de définir au préalable les cellules musculaires puis de limiter le sujet aux cellules musculaires striées contractiles : les cellules striées squelettiques et les cellules striées cardiaques. La composition pouvait alors s'organiser sous la forme d'une comparaison entre myocytes squelettiques et cardiaques, mettant ainsi en relief les similitudes et les particularités de chacune de ces cellules contractiles. L'énoncé suggérait fortement aux candidats d'établir un lien entre l'organisation et les propriétés mécaniques de ces cellules. La discussion détaillée de l'origine embryonnaire ou des mécanismes de différenciation était peu pertinente compte tenu de l'intitulé du sujet.

On pouvait commencer la démonstration par la présentation des organisations comparées des différents types de cellules musculaires au repos, en passant progressivement du niveau des cellules à celui des molécules. Après avoir comparé les morphologies des cellules (formes, tailles, invaginations de sarcolemme formant des tubules transverses), il était possible de présenter l'élément commun à ces cellules : les stries ; un schéma était l'occasion de présenter la notion de sarcomère et de décrire précisément cette striation (myofilaments fins et épais, stries Z, bandes A, H et I). Il était alors judicieux de décrire l'organisation du cytosquelette, commune aux deux types de myocytes, en détaillant la structure des filaments d'actine et de myosine. L'importance d'autres protéines structurales, comme la titine, l' α -actinine ou la dystrophine, a été mentionnée dans un certain nombre de copies. On pouvait enfin souligner

la présence, dans le muscle cardiaque, d'une striation supplémentaire, les stries scalariformes, zones de contact entre cardiomyocytes, riches en jonctions d'ancrage et en jonctions communicantes.

À partir de ces éléments structuraux (à l'échelle cellulaire et moléculaire), il était possible de montrer l'unicité des bases moléculaires de la contraction des sarcomères. On pouvait, dans un premier temps, comparer la structure de sarcomères relâchés et de sarcomères contractés, de manière à mettre en évidence que la contraction est produite par un glissement des filaments fins le long des filaments épais. Ceci permettait d'introduire la notion de « coup de force », puis de décrire le fonctionnement du moteur « à quatre temps » constitué par la myosine interagissant avec l'actine. Le rôle de l'ATP dans le relâchement, ainsi que le rôle de la libération du phosphate inorganique dans le coup de force, devaient être explicités ; l'importance de la flexibilité structurale des têtes de myosine était essentielle. On pouvait alors se replacer à l'échelle du muscle, en présentant un diagramme de la tension développée en fonction de la longueur dans le cas d'une contraction isométrique, qui était l'occasion de souligner une différence majeure entre myocytes squelettiques et cardiaques. Les premiers ont une longueur au repos permettant un recouvrement optimal des filaments fins et épais ; le recouvrement des filaments fins et épais n'est pas optimal dans les myocytes cardiaques au repos, un étirement préalable du muscle est nécessaire pour développer une tension maximale (fondement biochimique de la loi du cœur de Starling). Il était enfin important de souligner que le cycle de contraction débute par l'interaction actine-myosine, interaction qui est rendue impossible dans les cellules musculaires au repos en raison du positionnement des complexes troponine-tropomyosine sur les filaments d'actine. Ceci permettait d'achever cette partie par la mise en évidence et la présentation des bases biochimiques du déclenchement de la contraction par le calcium. Cette partie était l'occasion de présenter une expérience, par exemple la mise évidence du rôle de l'ATP ou du calcium.

En exploitant les informations présentées dans les deux premières parties sur les structures impliquées et le mécanisme de contraction, il était possible de terminer la composition par la confrontation des mécanismes de contrôle de la contraction à l'échelle du myocyte. Après avoir indiqué que les cellules musculaires striées sont des cellules excitables, il était judicieux de comparer les mécanismes de couplage excitation-contraction dans les myocytes striés squelettiques et les cardiomyocytes. L'origine de la vague calcique (*ie* l'augmentation puis la diminution de la concentration cytosolique d'ions calciques) devait être clairement présentée, et les propriétés des différents types de canaux RyR comparées. Il était alors possible d'expliquer le contrôle de la contractilité des cellules musculaires striées par la noradrénaline d'origine sympathique.

La principale erreur, commise par une trop forte proportion des candidats, a été de ne pas définir précisément les contours du sujet. Elle pouvait être évitée en prenant le temps, dans l'introduction, de bien définir les termes de l'énoncé. Trop souvent, les candidats se sont privés d'une véritable démarche synthétique en se limitant à la présentation de la contraction des cellules musculaires striées squelettiques, sans prendre en compte la relation structure-fonction et, surtout, en omettant les cardiomyocytes. En revanche, les étudiants ayant correctement cerné le sujet ont proposé des plans variés, souvent pertinents ; on soulignera toutefois qu'il était peu judicieux de présenter le contrôle de la contraction avant le

mécanisme de la contraction, ce qui aboutit inévitablement à des redites chronophages (plutôt qu'un plan chronologique, il est souvent préférable de décrire les mécanismes puis, seulement dans un deuxième temps, les moyens de contrôle). Dans la plupart des copies, les développements ont été judicieusement illustrés par des schémas ; on regrettera que, trop souvent, les échelles n'aient pas été précisées, ce qui était pourtant essentiel en raison des différents niveaux auxquels s'effectuait l'analyse. Peu de candidats ont étayé leur propos par des expériences pertinentes.

Sur le fond, la structure des filaments d'actine et de myosine a souvent été présentée de manière peu satisfaisante, et sa restitution dans le cadre de l'organisation d'un sarcomère s'est fréquemment révélée incompatible avec un raccourcissement symétrique du sarcomère. Le moteur à quatre temps a rarement été décrit correctement, l'origine du coup de force ne l'a été qu'exceptionnellement. Il est surprenant que certains considèrent, encore aujourd'hui, que l'hydrolyse de l'ATP est directement responsable du coup de force, alors qu'il est maintenant bien établi qu'il y a découplage entre l'hydrolyse de l'ATP (qui permet le pivotement et la fixation de la tête de myosine) et le coup de force induit par la libération du phosphate inorganique (mouvement de la tête de myosine après fixation sur un filament d'actine, permettant donc le raccourcissement du sarcomère). Quelques rares copies ont présenté, correctement exploité et justifié les diagrammes tension-longueur des myocytes cardiaques et squelettiques. De manière surprenante, une proportion excessive des copies ne faisait aucune distinction entre les mécanismes de couplage excitation-contraction, en passant sous silence le phénomène de CICR (*calcium-induced calcium release*) propre aux cellules cardiaques, phénomène qui prend toute son importance quand on le met en relation avec le potentiel d'action à plateau des cardiomyocytes contractiles. Le rôle du réticulum sarcoplasmique dans l'augmentation de la concentration calcique cytosolique était souvent bien présenté, mais son implication dans le contrôle temporel de la contraction par le repompage des ions Ca^{2+} était généralement oubliée.

Partie B : Filaments intermédiaires et migration cellulaire.

Dans une approche expérimentale de biologie cellulaire et moléculaire, cette partie de l'épreuve amenait les candidats à comprendre l'implication des filaments intermédiaires du cytosquelette dans les processus de migration cellulaire qui accompagnent la transition épithélium-mésenchyme associée à la réparation physiologique d'une blessure tissulaire ou à l'acquisition pathologique de propriétés invasives par des cellules tumorales. Les capacités de migration de divers types de cellules adhérentes, en réponse à différents signaux, étaient analysées à l'aide d'un modèle de réparation de blessure en culture *in vitro*, ou, pour la partie B-3, grâce à un dispositif classiquement utilisé dans ce type d'étude, la chambre de Boyden. De nombreux résultats étaient obtenus par observation microscopique des cellules, en lumière blanche ou en fluorescence après marquage spécifique.

Dans un premier temps, des observations microscopiques simples montraient qu'une brèche créée dans un tapis cellulaire confluent est comblée par les cellules qui la bordent, deux processus physiologiques pouvant contribuer à ce phénomène : la prolifération et la migration cellulaires.

Des expériences plus élaborées faisant appel à la vidéomicroscopie permettaient de préciser que, tandis que toutes les cellules prolifèrent comme l'indique l'incorporation de bromodésoxyuridine dans l'ADN en cours de réplication, seules les cellules situées à proximité immédiate de la lésion se déplacent et se mettent à synthétiser de la vimentine. Le comblement de la lésion repose donc sur la migration des cellules, à laquelle est associée l'expression de la vimentine. Des expériences d'hybridation *in situ* et de *Northern blot* montraient que la présence de vimentine dans les cellules est corrélée à la présence de l'ARNm correspondant. Deux hypothèses pouvaient alors être émises : l'induction de la synthèse de vimentine dans les cellules en migration est due, soit à une activation de la transcription du gène de la vimentine, soit à une inhibition de la dégradation de l'ARNm codant la vimentine (qui serait synthétisé de façon constitutive dans toutes les cellules). La seconde hypothèse n'a, hélas, pratiquement jamais été évoquée dans les devoirs.

La question 8 permettait d'ajouter une information importante : empêcher la synthèse de vimentine dans les cellules diminue significativement leur capacité à migrer, ce qui implique que la vimentine est nécessaire à la migration des cellules.

La question 9 permettait de comprendre le fonctionnement de la chambre de Boyden. Des cellules invasives déposées sur une membrane poreuse sont capables de la traverser en se déplaçant à sa surface et en passant à travers les pores. Puisque, dans ces conditions, il n'est techniquement pas possible de dénombrer la totalité des cellules présentes à la fin de l'expérience, on a recours au dénombrement des cellules présentes à la fin d'une expérience comparable effectuée avec une membrane non poreuse, ce qui permet de prendre en compte les variations introduites par les mitoses et par la mort cellulaire intervenant, pendant la durée de l'incubation, dans la population analysée. L'expérience réalisée sur les fibroblastes confirmait, de manière quantitative, que la vimentine est nécessaire à la migration des cellules, constitutive ou induite par un stimulus chimiotactique (PDGF, fibronectine). Les questions 11 et 12 amenaient à conclure que la vimentine est nécessaire et suffisante à la migration de cellules cancéreuses.

La partie B-4, inspirée de données toutes récentes de la recherche sur le cytosquelette, permettait d'aller un peu plus loin et de proposer un modèle selon lequel, au cours de la migration cellulaire, des particules ribonucléoprotéiques contenant l'ARNm de la vimentine pourraient s'associer aux filaments cytoplasmiques de vimentine, la traduction de l'ARNm conduisant à la synthèse de nouvelles molécules de vimentine susceptibles d'être directement incorporées dans le réseau de filaments intermédiaires en cours de réorganisation. Il s'agirait là d'un nouvel exemple de traduction locale de l'ARNm.

Dans ce sujet, comme dans toute analyse de documents, il était attendu que les candidats rédigent des réponses précises : ainsi, des expressions comme « a un effet » ou « joue un rôle important » ne sont pas satisfaisantes ; « est suffisant », « est nécessaire », « augmente », « inhibe » sont par exemple beaucoup plus informatifs. Les réponses doivent toujours être justifiées par l'analyse des documents (même dans une question aussi simple que la question 3, pour laquelle, de ce fait, trop de candidats sont loin d'avoir obtenu le maximum des points), sans négliger l'interprétation qui donne une portée biologique aux observations faites, mais en évitant d'aller plus loin que les résultats expérimentaux n'y autorisent. Un

commentaire s'impose concernant le schéma attendu à la question 15, qui devait décrire le devenir de la fraction protéique n°2 et non se contenter de figurer de manière partielle quelques aspects très généraux. À sa suite, l'immunodétection sur membrane a été interprétée de façon tout à fait incohérente dans de nombreuses copies.

Considérée dans son ensemble, la partie B a été relativement bien comprise par les candidats, quoiqu'on ait pu constater une baisse de la qualité des réponses au fil des questions. Le jury a apprécié, dans un nombre honorable de compositions, la discussion de la significativité des différences observées sur les graphes et l'évocation d'expériences témoins pertinentes.

Partie C : Mise en évidence du cycle de tyrosylation-détyrosylation de la tubuline alpha.

Le but de cette partie était de confronter les candidats à des expériences de biochimie pour les amener à élucider un mécanisme de modification post-traductionnelle de la tubuline α ($T\alpha$). Débutant par une analyse *in vivo* dans les érythrocytes, l'étude se poursuivait par une série d'expériences de chromatographies d'affinité et d'électrophorèses permettant de révéler la diversité structurale de $T\alpha$ et l'existence d'enzymes de conversion. Il était alors demandé aux candidats d'imaginer des modifications post-traductionnelles compatibles avec les données expérimentales ; cette phase du devoir était très ouverte, plusieurs schémas plausibles pouvant être élaborés, et l'on attendait des candidats qu'ils échafaudent l'un des scénarii possibles. Le dernier volet de l'étude offrait une ouverture vers l'exploitation de ces données fondamentales en cancérologie clinique.

Dans la première expérience, des globules rouges étaient incubés en présence de tyrosine radioactive, lysés et les protéines solubles retenues spécifiquement sur des filtres. On mettait ainsi en évidence que, même en présence d'un inhibiteur de la traduction (la cycloheximide), la fraction protéique était radioactive. Ce résultat suggérait l'existence d'un mécanisme d'addition de la tyrosine à des chaînes polypeptidiques par un processus indépendant de la traduction, donc nécessairement post-traductionnel. Une analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes permettait de révéler une seule bande radioactive, suggérant que ce processus est spécifique d'une protéine, ou d'un ensemble de protéines de masses moléculaires proches (non séparées lors de l'électrophorèse).

Dans une deuxième série d'expériences, des anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de $T\alpha$ étaient utilisés pour étudier sa diversité structurale. Ces anticorps étant fixés de manière covalente à une résine chromatographique, leur interaction avec une protéine entraînait l'immobilisation de cette dernière sur la résine (grâce à la stabilité des complexes antigène-anticorps) ; un changement brutal de la concentration ionique du tampon de chromatographie provoquait ensuite l'élution des protéines retenues. Cette méthode permettait, dans un premier temps, de montrer que les anticorps utilisés ne reconnaissent pas l'extrémité C-terminale de $T\alpha$ si la tyrosine C-terminale est retirée grâce à l'action de la carboxypeptidase A. Il était ensuite possible de démontrer qu'une partie seulement de $T\alpha$ purifiée à partir de cerveaux de porc est retenue sur la colonne d'anticorps, suggérant qu'une proportion de $T\alpha$ comporte une extrémité C-terminale modifiée (puisque non reconnue par l'anticorps). L'étude de la conversion entre les différentes formes de $T\alpha$ montrait que deux protéines (appelées X et Z

dans l'énoncé), agissant de manière sous-stœchiométrique et donc vraisemblablement de manière catalytique, sont capables de convertir *in vitro* la forme complète en forme modifiée (X) et *vice-versa* (Z). Une analyse des interactions protéines-protéines grâce à un agent pontant bifonctionnel amenait à la conclusion que, bien que modifiant T α , la protéine X est également capable d'interagir avec la tubuline β .

La protéine Z exerçant son effet en présence d'ATP et de tyrosine, et la tyrosine C-terminale étant essentielle à la reconnaissance de T α par l'anticorps, une hypothèse simple consistait à proposer qu'au moins une proportion de T α est dépourvue de tyrosine C-terminale, et que Z est capable de tyrosiler ces formes tronquées de T α (X étant au contraire capable d'éliminer la tyrosine C-terminale). Cette hypothèse était cohérente avec les données de la première expérience : on pouvait en effet proposer alors que la bande de protéine radioactive correspond à T α retyrosylée par la protéine Z à partir de T α détyrosylée, grâce à la tyrosine radioactive ajoutée dans le milieu de culture des globules rouges.

Une analyse détaillée de l'activité de la protéine Y amenait à la conclusion qu'une partie des T α tronquées n'est pas convertible en T α complète, suggérant l'existence d'au moins deux formes distinctes de T α dont une seule est modifiable par Z.

Enfin, les mêmes anticorps que précédemment étaient utilisés pour comparer l'abondance relative des différentes formes de T α dans des cellules humaines normales et cancéreuses. Cette analyse était rendue possible par l'identité de séquence des 12 résidus C-terminaux des T α humaine et porcine. L'étude montrait que T α complète prédomine dans les cellules saines ou dans les cellules prélevées sur des tumeurs bénignes, alors que les formes modifiées de T α sont majoritaires dans les cellules prélevées sur des tumeurs malignes, et d'autant plus lorsque le pronostic est létal ; ni l'âge des malades, ni la taille des tumeurs n'influencent significativement le taux de T α modifiée. Il était par conséquent possible de proposer que l'analyse des proportions des différentes formes de T α à l'aide de l'anticorps considéré, puisse être utile (mais bien évidemment non suffisante) au diagnostic d'un cancer.

La partie C de l'épreuve a souvent été à peine abordée, probablement par manque de temps. Les candidats l'ayant traité ont eu des succès variés, certains présentant des analyses remarquables jusqu'au terme de la démonstration, mais la plupart progressant avec difficulté. Peu de candidats ont abouti par exemple à la conclusion d'une incorporation de la tyrosine indépendante de la traduction, la plupart préférant invoquer un manque d'efficacité de la cycloheximide. D'autres, confondant tyrosine et thymidine, ont fait intervenir la réplication de l'ADN. L'écart entre les résultats des graphes a et b de la figure 15 a été mal interprété car les candidats n'ont pas vu que les conditions expérimentales étaient différentes (*in vivo versus in vitro*). Certains candidats sont parvenus à des hypothèses plausibles concernant le rôle des protéines X et Z, mais beaucoup ont interprété les chromatogrammes avec difficulté, parfois sans aucune logique. Très peu de candidats ont répondu à la question portant sur le principe d'une dialyse, qui avait pourtant pour objectif, non de les piéger, mais au contraire de les aider à entrer dans la stratégie expérimentale.