
ÉPREUVE ÉCRITE DE BIOLOGIE

ENS : PARIS LYON CACHAN

Coefficients : **PARIS** : Option Biologie : 7 / Option Géologie : 4
LYON : Option Biologie : 8 / Option Sciences de la Terre : 4
CACHAN : 8

MEMBRES DU JURY : S. BURY-MONE, D. BUSTI, N. CAUDRON, A. CORBIN, G. CRISTOFARI, C. DUBACQ, J.-P. DUBACQ, G. LOUF, G. PEYROCHE, P. RIALLAND-LEFEVRE, A. ROUMIER, J.-N. VOLFF.

L'épreuve de biologie de cette année, d'une durée totale de 6 h, comportait un sujet de synthèse d'une durée conseillée de 2 h ainsi que deux sujets d'analyse de documents d'une durée conseillée de 2 h chacun, construits autour d'une thématique commune : les microorganismes.

Une bonne gestion du temps était déterminante pour pouvoir aborder convenablement les différentes parties du sujet. C'est pourquoi le jury recommande une nouvelle fois aux candidats de respecter au mieux les durées conseillées. Si le jury tient à saluer la performance des quelques candidats qui ont réussi à bien traiter chacune des parties, celui-ci regrette qu'une part importante des candidats n'ait pas (ou très peu) traité le sujet de synthèse ('Les microorganismes : place dans le vivant et diversité des métabolismes trophiques').

Le sujet d'analyse a permis une bonne sélection des candidats :

- le sujet A ('Interactions cellules eucaryotes – *Plasmodium*') a été très largement abordé, à l'exception des dernières questions plus difficiles. Pour ce sujet, le jury a été particulièrement attentif à la rigueur de l'analyse.
- le sujet B ('Le génome de l'hépatite D et sa réplication') s'est révélé être très discriminant, puisqu'un certain nombre de candidats n'ont pas compris certaines questions difficiles des parties B1 et B2. La partie B3, relativement accessible, a rarement été traitée. Pour ce sujet, le jury a été particulièrement attentif à la compréhension globale des résultats même si tout le détail de l'analyse n'était pas là.

Comme chaque année, nous souhaitons donner quelques conseils pour les sujets d'analyse :

- Lisez bien l'énoncé de façon à ne pas laisser de côté des informations indispensables pour une bonne interprétation des résultats. Par exemple, la plupart des candidats qui ont abordé les questions 47 à 49 du sujet B n'ont pas compris que les ARN cellulaires, génomique et antigénomique de la légende de la figure 22 correspondent aux ARN fixés à la membrane du dot-blot et non aux ARN radioactifs éventuellement hybridés à ces derniers.
- Sachez faire la différence entre des résultats significatifs et des résultats qui ne le sont pas.
- Comprenez l'intérêt des contrôles. A maintes reprises, le jury a constaté que les candidats ne savent pas ou savent mal interpréter les expériences témoins (par exemple questions 2 et 34).
- Lors de l'analyse, faites abstraction de vos connaissances acquises sur un autre modèle d'étude, de façon à ne pas faire dire aux résultats expérimentaux ce qu'ils ne permettent pas de dire (cf. partie B1).

Pour le reste, nous souhaitons saluer l'effort de concision, la précision des réponses ainsi que la rigueur d'analyse du sujet A (interprétations des expériences avec données chiffrées, références quasi-systématiques aux contrôles) constatées dans un assez grand nombre de copies.

Sujet de synthèse – Les microorganismes : place dans le vivant et diversité des métabolismes trophiques (on ne traitera pas des virus)

Ce sujet demandait aux candidats de mobiliser des connaissances dispersées dans le programme de BCPST (points 2.1 –diversité du vivant– et 2.5 –diversité des types trophiques du programme de cours ; étude de micro-organismes : bactéries, levures, protistes du programme de travaux pratiques), de les rassembler et de les organiser en un ensemble cohérent. La formulation du sujet suggérait une démarche pour répondre. L'exclusion des virus visait à éviter la discussion de leur place par rapport au vivant. Cette restriction ne justifiait cependant pas que les candidats se passent d'une délimitation du sujet et d'une définition des microorganismes. Dans l'introduction, il fallait en effet cerner le sujet en rappelant que les microorganismes sont les organismes dont la structure ne peut être appréhendée qu'à l'aide d'un microscope. Ce qui n'exclut pas qu'ils puissent être visibles à l'œil nu comme certaines colonies bactériennes.

Cette définition amenait tout d'abord le candidat à s'interroger sur leur place des microorganismes dans l'arbre phylogénétique du vivant, illustrant ainsi un premier aspect de leur diversité. Pour cela, Les candidats pouvaient s'appuyer sur divers exemples vus en cours ou en travaux pratiques. On peut regretter que nombre de candidats se limitent aux seuls procaryotes, voire qualifient de procaryotes des microorganismes eucaryotes. On attendait que soit présenté un arbre général du vivant, séparant clairement les Archées, les Eubactéries et les Eucaryotes. Il était également attendu que la classification des Eucaryotes soit suffisamment détaillée pour (1) montrer l'existence de microorganisme dans de nombreuses lignées eucaryotiques, et (2) situer sur l'arbre quelques événements endosymbiotiques à l'origine de certaines lignées (endosymbiose plastidiale primaire à l'origine de la Lignée verte notamment). A l'appui de l'arbre, quelques arguments étayant la théorie endosymbiotique étaient attendus (taille, organisation du génome, machinerie génétique...). Ainsi, les microorganismes présentent une grande diversité et n'ont pas d'unité autre que leur taille.

Cette diversité de structure correspond aussi à une diversité fonctionnelle, illustrée par les métabolismes trophiques. Le jury attendait que cette partie importante et difficile du programme soit fortement développée, sans toutefois qu'elle puisse à elle seule constituer une réponse au sujet. Les candidats devaient structurer leur rédaction pour bien définir les concepts clés qui sous-tendent les types trophiques. L'anabolisme et catabolisme, qui consistent en des réactions d'assimilation et de décomposition, devaient être illustrés dans leur diversité. Les métabolismes trophiques peuvent aussi être classés par la diversité des sources de carbone et d'azote aboutissant à la définition de l'hétérotrophie ou de l'autotrophie pour chacun de ces éléments. Le cas du carbone a d'ailleurs été généralement bien discuté, contrairement au cas de l'azote où peu de copies citent l'hétérotrophie à l'azote (e. g. levures). Enfin, la classification des types trophiques en fonction de la source de pouvoir réducteur et d'énergie (photolithotrophie, chimiolithotrophie, chimioorganotrophie et photoorganotrophie) devait illustrer encore la diversité métabolique des microorganismes. De nombreuses copies ont présenté cette classification mais sans l'illustrer d'exemples précis.

Comme de nombreux candidats le font remarquer, les microorganismes présentent donc la totalité des types de métabolismes existant dans le vivant. Quelques rares copies ont judicieusement souligné les capacités d'adaptation métabolique aux conditions du milieu, s'appuyant sur l'exemple de l'opéron lactose. Cette double capacité permet aux microorganismes de coloniser tous les milieux et de s'installer à tous les niveaux des réseaux trophiques. L'importance écologique des microorganismes est ainsi posée. Cette importance pouvait être illustrée dans les cycles biogéochimiques de l'azote et du carbone. Dans le cas du cycle du carbone, le jury attendait des aspects quantitatifs qui n'ont été que bien rarement développés. On pouvait à cette occasion discuter la notion de verrou écologique. Enfin, on attendait que les candidats évoquent les relations interspécifiques et citent quelques relations symbiotiques (mycorhizes, nodosités...) ou parasitaires (cas des microorganismes pathogènes).

D'une manière générale, très peu de candidats ont discuté la diversité des microorganismes, certains ne les définissant tout simplement pas. Le second reproche important porte sur l'importance des microorganismes, qui a souvent été limitée aux cycles de la matière. De façon étonnante, le rôle des procaryotes dans l'évolution de la lignée eucaryote a été très largement omis. On aboutit ainsi à des plans mal justifiés et présentant très peu de recul (I- Phototrophie ; II- Chimiotrophie ; III- Cycles ou encore : I- Autotrophie ; II- Hétérotrophie ; III- Cycles).

Plus précisément, il faut mettre en garde les candidats sur l'emploi des termes scientifiques. En premier lieu, le terme « archéobactéries » est à proscrire et le terme « archées » vieilli (introduit par Carl Woese, ce terme présuppose que les Archées sont apparues avant les Eubactéries, ce qui n'est pas du tout établi à l'heure actuelle). Concernant la description des métabolismes, les erreurs sont particulièrement nombreuses et révèlent une maîtrise insuffisante de cette partie de programme. On note ainsi de fréquentes confusions entre source de matière et source d'électrons. La distinction entre les termes « autotrophie » et « lithotrophie », ou « hétérotrophie » et « organotrophie » est inexistante dans la plupart des copies. De même, il y a confusion fréquente entre les termes « chimiosynthèse » et « chimiolithotrophie » (même si effectivement les microorganismes chimiosynthétiques sont dans la grande majorité des cas chimiolithotrophes). La distinction entre les termes a pour but surtout de distinguer la façon dont les métabolismes seront décrits (à savoir, par exemple, l'existence d'un cycle de Calvin, ou l'oxydation d'une source minérale d'électrons dans le cadre d'une respiration). Ces confusions conduisent certains candidats à distinguer quatre types de métabolismes : fermentation, respiration, photosynthèse, chimiosynthèse ! Or les chimiosynthèses chez *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, par exemple, se font dans le cadre de métabolismes respiratoires lithotrophes. De la même manière, les candidats ont des difficultés à définir le terme fermentation, aussi appelée « phosphorylation au niveau du substrat ». Il s'agit d'un processus biologique, ne nécessitant pas de lumière, n'impliquant pas de chaînes de transport d'électrons membranaire couplée à la conversion d'énergie, conduisant à une oxydation incomplète d'un substrat organique, et générant de l'ATP par phosphorylation au niveau du substrat (transfert de groupes phosphate en phase soluble). De nombreux candidats opposent la fermentation où l'accepteur final d'électron est organique et la respiration = accepteur final d'électrons est inorganique. Ainsi, la réduction du fumarate en succinate associée à la genèse d'un gradient de protons puis la synthèse d'ATP est décrite dans certaines copies comme une fermentation et non pour ce qu'elle est : une respiration anaérobie au cours de laquelle le fumarate sert d'accepteur terminal d'électrons (chaîne membranaire de transporteurs d'électrons, gradient de protons, synthèse d'ATP...). La réduction du fumarate par la fumarate réductase membranaire dans le cadre par exemple de la fermentation acide mixte d'*E. coli* est un exemple au cours duquel respiration anaérobie et fermentation ont lieu simultanément.

Par ailleurs, certains candidats confondent les phototrophes et photosynthétiques : tous les photosynthétiques (= photoautotrophes) sont des phototrophes, mais les phototrophes ne sont pas tous des photosynthétiques. On peut citer des phototrophes non photosynthétiques i.e. photohétérotrophes : les bactéries photoorganohétérotrophes du genre *Heliobacterium* ; les Archées du genre *Halobacterium* sont des chimioorganohétérotrophes capables d'être transitoirement phototrophes grâce à des pompes à protons photosensibles).

Encore plus dans le détail, les réactions d'oxydoréduction ont été bien maltraitées, notamment les réactions de nitrosation et de nitratisation qui ne sont équilibrées dans quasiment aucune copie, alors que le cursus BCPST comprend une part importante de cours de chimie qui auraient pu être judicieusement mobilisés...

Au total, le sujet nécessitait donc de mobiliser des connaissances des deux années de classes préparatoires, et non une tranche de cours correspondant uniquement à la diversité des types trophiques. Il fallait également faire preuve de rigueur pour définir les notions clés. Le manque de rigueur a été doublement sanctionné car, en plus de l'erreur commise, cela empêchait de classer correctement les métabolismes.

Sur la forme, les copies sont globalement satisfaisantes : l'orthographe et la syntaxe sont généralement bonnes, les schémas colorés mais malheureusement souvent en nombre insuffisant ou entachés d'erreurs.

Les introductions restent fréquemment incomplètes avec une discussion insuffisante du sujet, ou artificielles avec des juxtapositions de définitions. Rappelons que l'introduction doit expliquer le sujet pour dégager une problématique qui justifie (et annonce) le plan.

Dans le développement, les titres doivent être soignés et homogènes, traduire une progression dans la réponse au sujet. Les paragraphes doivent partir d'un problème et le résoudre pour en poser un autre : la rédaction de conclusions partielles et de transitions doit donc être fortement encouragée.

Enfin, la conclusion doit répondre de manière argumentée à la problématique et mettre le sujet en perspective avec une « ouverture » du sujet. Cette partie trop souvent sous-estimée par les candidats ne doit pas être négligée : elle manifeste la capacité de synthèse et de prise de recul du candidat, elle est aussi l'occasion de manifester sa curiosité, sa culture personnelle et d'emporter l'adhésion du lecteur... ou de laisser une bien piètre image au correcteur au moment d'attribuer la note !

Sujet A – 'Interactions cellules eucaryotes – *Plasmodium*'

Ce sujet avait pour objectif de mettre en évidence quelques aspects des interactions moléculaires entre les principaux stades invasifs (sporozoïtes, mérozoïtes) d'un eucaryote unicellulaire, le *Plasmodium*, et les cellules eucaryotes cibles (cellules acinaires des glandes salivaires de moustique, hépatocytes et hématies de mammifère). Le cycle de développement complet de *Plasmodium* était donné en introduction.

Le sujet comprenait deux parties indépendantes :

- la partie A-1 permettait de comprendre l'origine de quelques effets pathogéniques de *Plasmodium falciparum* chez l'Homme (augmentation de la rigidité des hématies infectées, adhérence des hématies infectées à l'endothélium vasculaire et aux plaquettes). De manière générale, c'est la partie qui a été la plus abordée et la mieux comprise.
- la partie A-2 traitait d'un mécanisme locomoteur original de *Plasmodium*, appelé *mobilité en glissant*, par lequel le parasite adhère aux cellules cibles et les envahit rapidement. En fin d'étude (Question 26), les candidats étaient amenés à proposer un mécanisme d'invasion des cellules cibles par le *Plasmodium*. Cette question difficile exigeait d'intégrer l'ensemble des conclusions précédentes dans un modèle cohérent. Rares sont ceux qui l'ont abordée correctement.

A-1. Adhérence des hématies infectées par *Plasmodium* à l'endothélium vasculaire

La question 1 était une simple application du cours et n'a globalement pas posé de difficultés. Parmi les conséquences hémodynamiques liées à l'infection des hématies par le *Plasmodium*, la majeure partie des candidats a fait mention de la capacité de déformation des globules rouges amoindrie au moment de la traversée des capillaires. D'autres ont évoqué la possible obstruction des capillaires par les hématies infectées ou l'augmentation de la résistance périphérique totale à l'écoulement. Toutes ces réponses ont été acceptées.

La question 2, bien que très facile, a été très mal traitée parce que la notion de témoin expérimental n'est pas bien acquise. Peu d'élèves ont su expliquer que la protéine Hsp70 est utilisée comme un témoin de charge : elle permet de s'assurer que la même quantité de protéines a été déposée dans chaque puits de l'électrophorèse. A la place, beaucoup ont conclu que la protéine Hsp70 est un contrôle de masse moléculaire ou qu'elle permettait de vérifier que KHARP ne modifie par son niveau d'expression ou encore qu'elle permet de vérifier que l'on n'a pas altéré le génome de l'hématie. D'autres enfin n'ont pas compris qu'il s'agissait d'un témoin... Les résultats de la figure 2 montraient que l'invalidation du gène codant la protéine KHARP aboutit bien à l'absence de la protéine dans les hématies infectées.

La question 3 comparait au microscope électronique le phénotype des hématies infectées par un clone sauvage de *Plasmodium* par rapport au clone mutant 3D7-mut. La plupart des candidats concluent à juste titre que la flèche pointe un knobs, alors que quelques uns voient dans les protubérances la protéine KHARP ! Pour ces candidats, une meilleure connaissance des tailles des cellules, molécules et structures sub-cellulaires aurait permis d'éviter ce genre d'interprétation grossière. La conclusion est que la protéine KHARP est à l'origine de l'apparition des knobs (puisque'ils n'apparaissent que chez les hématies infectées par le clone mutant).

Aux questions 4 à 6, on testait l'adhérence des hématies infectées par un clone sauvage ou mutant de *Plasmodium* à différentes molécules purifiées en *conditions statiques*, ainsi que l'adhérence de ces mêmes hématies à des plaquettes en *conditions d'écoulement*. Plus de 90 % des candidats ont analysé les résultats de la table 1 sans tenir compte des barres d'erreur et ont conclu, à tort, qu'il existe une différence significative d'adhérence à ICAM-1 entre les clones sauvage et mutant. De manière très surprenante, quelques uns ont vu le recoupement des barres d'erreurs, mais ont tout de même conclu à une différence significative ! Concernant CD36, la plupart se contentent de noter une absence de différence significative d'adhérence entre les clones sauvage et mutant sans voir la forte augmentation de la valeur absolue obtenue pour ces deux clones par rapport au contrôle BSA. Les résultats de la figure 4A, quant à eux, ont été globalement bien analysés, mais nous avons relevé de nombreuses mauvaises interprétations de la figure 4B, en particulier celle qui consiste à dire que « quelle que soit la pression, 100% des hématies infectées par la souche sauvage du *Plasmodium* adhèrent » sans se soucier de la pertinence de cette réponse par rapport à leur analyse précédente (figure 4A). La question 6, plus ouverte, devait amener le candidat à confronter les résultats apparemment paradoxaux de la table 1 et la figure 4 et à proposer une explication cohérente des différences observées en *conditions statiques* et en *conditions d'écoulement*.

L'étude de l'évolution de la localisation de la protéine PfEMP1 chez les clones sauvages et mutants (questions 7 et 8) ne posait pas de problèmes, à condition de bien lire l'énoncé (celui-ci précisait ce que traduit un marquage ponctuel et un marquage diffus). La conclusion est que l'expression de la protéine KHARP est nécessaire à l'expression correcte de PfEMP1 à la membrane au cours de la maturation des mérozoïtes.

A la question 9, il était demandé de récapituler les fonctions de KHARP, de PfEMP1 et des knobs. KHARP est nécessaire à la formation des knobs (Question 3) et l'expression correcte de PfEMP1 à la membrane (Question 8). D'après les données de l'énoncé, PfEMP1 assurerait l'adhérence des hématies infectées à l'endothélium vasculaire via son interaction avec la molécule CD36. D'après les conclusions des questions 4, 5 et 6, on pouvait proposer que les hématies infectées adhèrent *in vivo* à l'endothélium vasculaire et aux plaquettes par l'intermédiaire des knobs.

A-2. Invasion des cellules cibles par *Plasmodium*

Cette partie a été largement abordée mais rares sont ceux qui l'ont terminée. Elle commençait par une question facile qui n'a posé de problèmes pour personne (Question 10). Néanmoins, si tous les candidats citent le sporozoïte et le mérozoïte comme stades invasifs, environ la moitié des copies oublient le stade ookinète qui traverse l'épithélium mésentérique du moustique.

A la question 11, la plupart des candidats caractérisent bien le mouvement d'un sporozoïte sur une lame de verre (mouvement circulaire, sans déformation et rapide : environ 1,5 $\mu\text{m/s}$), mais ne réussissent pas toujours à le comparer au mouvement d'une cellule embryonnaire animale (mobilité plus lente, avec déformation cellulaire).

Le sujet continuait par une question méthodologique (Question 12). Il s'est avéré que peu d'élèves ont des connaissances solides sur le clonage et notamment sur les principes d'inactivation d'un gène par recombinaison homologue (*knock-out*) et de sélection de clones recombinants à l'aide d'un marqueur ou d'un gène de résistance à un antibiotique. La méthode proposée par les candidats a

souvent reposé sur l'utilisation d'enzymes de restriction avec pour limite la nécessité de trouver une enzyme qui coupe là où on le souhaite...

Les questions 13 à 16 étudiaient le phénotype de l'inactivation de deux gènes codant pour les protéines CS et TRAP connues pour être indispensables à l'adhérence des sporozoïtes aux cellules acinaires des glandes salivaires de moustique. A la question 13, le fait de déterminer le nombre de parasites intracellulaires dans les glandes salivaires de moustique permet de tester le rôle éventuel de ces protéines dans la pénétration du parasite à l'intérieur des cellules par le mécanisme de mobilité en glissant. Peu de candidats ont bien répondu à cette question car ils n'ont pas su faire la différence entre les deux étapes clés de l'invasion pourtant citées en début d'énoncé : (1) adhérence à la membrane de la cellule cible et (2) pénétration dans la cellule cible par mobilité en glissant. Grâce à cette méthode, on montrait ici que la protéine TRAP est impliquée dans la pénétration des sporozoïtes dans les cellules de glandes salivaires (Question 14) et, contre toute attente, que la protéine CS est nécessaire à la formation des sporozoïtes (Question 15), probablement en déterminant les points de bourgeonnement du parasite à partir d'une structure syncytiale au sein de l'oocyste (Question 16). Globalement, les candidats ont su analyser ces résultats. Toutefois, certains n'ont pas su déterminer si une fluctuation est significative à la table 2 et parmi ceux-ci beaucoup contournent la difficulté en citant les chiffres de la table sans préciser si les valeurs sont équivalentes ou non à celles observées chez les contrôles.

Les questions 17 à 19 apportaient des précisions sur les fonctions de TRAP *in vivo* et ne présentaient pas de difficulté majeure, si ce n'est de bien savoir transposer les conclusions obtenues *in vitro* aux fonctions possibles *in vivo*. Les résultats montraient que TRAP joue un rôle critique dans la capacité des sporozoïtes à infecter le foie des mammifères (Question 17) et qu'elle est indispensable à la mobilité en glissant *in vitro* (Question 18). Il était ensuite demandé de récapituler les fonctions de TRAP *in vivo* (Question 19) : adhérence des sporozoïtes aux cellules des glandes salivaires et aux hépatocytes (une donnée de l'énoncé) mais aussi pénétration dans ces cellules par mobilité en glissant.

Les questions 20 à 25 avaient pour objectif de comprendre les rôles des différents domaines de la protéine TRAP et d'étudier l'évolution de sa localisation lors du déplacement du sporozoïte. La question 20 était une question facile souvent réussie. Les résultats d'immunomarquage à l'aide d'un anticorps reconnaissant la région cytoplasmique de TRAP permettent de vérifier que la protéine est indétectable à la surface des sporozoïtes TRAP associés au mésentéron. La protéine TRAP étant transmembranaire, la perméabilisation préalable des cellules est une étape indispensable pour que l'anticorps puisse pénétrer dans les cellules et se fixer au domaine cytoplasmique de TRAP. A la question 21, l'examen du phénotype de mutants Δ de TRAP montrait que la région cytoplasmique de TRAP est essentielle à la bonne mobilité des sporozoïtes *in vitro* ainsi qu'à leur capacité d'envahir des cellules cibles *in vivo*, probablement parce que ce domaine établit un lien avec le cytosquelette du sporozoïte. A la question 22, les mutations TRYP et ACID rendent les sporozoïtes tout aussi incapables d'infecter des cellules cibles *in vivo*, mais elles n'abolissent pas la mobilité en glissant *in vitro* : de manière surprenante, ces mutations transforment le mouvement *circulaire* observé chez le sauvage en un mouvement *pendulaire* (le sporozoïte fait des va-et-vient sur un arc de cercle de longueur à peu près égale à la taille du sporozoïte). Les résultats d'immunomarquage obtenus à l'aide de l'anticorps reconnaissant la partie extracellulaire de la protéine TRAP (Question 23) montraient que le marquage ne concerne pas seulement le sporozoïte mais également une « trainée » laissée en arrière du sporozoïte lors de son déplacement. La comparaison de ce résultat avec celui obtenu avec la région cytoplasmique de TRAP suggérait alors que la partie extracellulaire de TRAP est clivée et libérée sur le support au moment du déplacement (Question 24). Ainsi, une explication du mouvement pendulaire observé précédemment chez les clones TRYP et ACID est que, le clivage de TRAP ne pouvant avoir lieu, le sporozoïte n'est pas libéré de son point d'attache, si bien que celui-ci est obligé de faire demi-tour après avoir parcouru sa longueur (Question 24). Les bonnes réponses à ces questions plus difficiles ont été rares mais quelques

candidats ont compris ces mécanismes. Enfin, à la question 25, on pouvait déduire que la protéine TRAP se localise au niveau de la membrane plasmique du sporozoïte sauvage mais aussi dans des vésicules de sécrétion à l'avant du sporozoïte. Cela suggère que, lors du déplacement du sporozoïte, la protéine TRAP est exocytée et intégrée à la membrane plasmique à l'avant du sporozoïte, qu'elle transloque vers l'arrière du sporozoïte lors d'un déplacement, et que sa partie extracellulaire est enfin clivée, libérant ainsi le sporozoïte de son point d'attache. Le cycle peut ensuite recommencer par la sécrétion de nouvelles protéines TRAP.

Pour finir, il était demandé de proposer un modèle d'invasion des cellules cibles par les sporozoïtes qui soit compatible avec les résultats expérimentaux (Question 26). Rares sont les candidats qui ont traité cette question, et encore plus rares sont ceux qui construisent un modèle cohérent. Le plus souvent, le jury a vu un sporozoïte qui « glisse » le long d'une membrane plasmique de sporozoïte, mais pratiquement jamais un sporozoïte qui pénètre à l'intérieur de sa cible. Très peu de candidats font intervenir le cytosquelette du sporozoïte (complexe actine/myosine) ou essaient de comprendre comment la contraction du cytosquelette propulse le sporozoïte dans la cellule cible, sur le même principe qu'une cellule embryonnaire se déplace sur une matrice extracellulaire (pour de plus amples informations sur ce modèle, voyez l'article de médecine/sciences 2001 : 17 :720-9).

Sujet B – Le génome de l'hépatite D et sa réplication

Ce sujet abordait les principaux aspects de la structure et de la réplication du génome d'un nouveau virus : le virus de l'hépatite D (HDV). Il se subdivisait en trois parties qui n'étaient pas totalement indépendantes dans la mesure où les questions bilans des parties B-2 (Question 43) et B-3 (Questions 50 à 53) demandaient d'intégrer les conclusions des parties précédentes.

B-1. Analyse du génome viral dans les virions et les cellules infectées

La principale difficulté de cette partie a été pour les candidats de savoir utiliser leurs connaissances à bon escient. D'un côté, beaucoup de candidats se sont appuyés sur leurs connaissances des virus (VIH notamment) et ne sont pas arrivés à s'affranchir de certaines idées reçues (par exemple que le génome viral s'intègre nécessairement sous forme d'ADN dans le génome cellulaire) alors que les résultats expérimentaux démontraient précisément le contraire. D'un autre côté, il fallait savoir transposer les concepts de réplication et d'expression de l'information génétique au cas de HDV. Ainsi le génome de HDV peut être répliqué ou transcrit, mais en aucun cas traduit directement même s'il se présente sous la forme d'un ARN simple brin ! En effet, seuls les ARN polyadénylés viraux sont destinés à être traduits. Et de manière surprenante, très peu de candidats ont su faire le lien entre un ARN polyadénylé (avec queue polyA) et ARNm (cf. Question 30).

La seconde difficulté pour les candidats a été l'analyse des résultats d'électrophorèses d'ADN présentées aux figures 13 à 15, ce qui a donné lieu à plusieurs confusions ou contresens. C'est pourquoi, nous invitons les candidats à bien comprendre le protocole expérimental et à bien lire les figures avant de s'engager dans l'analyse.

A la question 27, les expériences d'hybridation montraient que le génome viral contenu dans les virions est un ARN simple brin d'environ 1,7kb, complémentaire de la *Sonde1*.

Les questions 28 à 30 permettaient de dégager les grandes étapes de réplication et d'expression de HDV dans les hépatocytes. Les résultats des pistes 4 et 5 de la figure 13 montraient qu'il n'existe aucun ADN viral dans les hépatocytes infectés, ce qui prouve que la réplication du virus ne passe pas par un intermédiaire ADN (contrairement au VIH). A l'inverse, la bande à 1,7 kb révélée par la *Sonde2* (aux pistes 7 et 9 de la figure 13, mais pas à la piste 11) correspond à un ARN non polyadénylé complémentaire du génome viral, l'antigénome, que l'on pouvait interpréter comme un intermédiaire de réplication du génome viral (selon le modèle : génome -> antigénome -> génome). A la question 29, beaucoup de candidats n'arrivent pas à donner les arguments qui montrent que les

ARN génomique et antigénomique viraux se présentent également sous forme multimérique (la taille des ces ARN correspondent en effet à 2 ou 3 fois la taille du génome viral) et, parmi les candidats ayant l'apparence de correctement répondre à la question 29, les questions ultérieures ont révélé qu'ils avaient en fait confondu la multimérisation de deux acides nucléiques avec la formation d'acides nucléiques double brin. De manière surprenante, la présence d'une queue polyA pour l'ARN de 0,8 kb a été rarement associée au caractère « messenger » de cet ARN (contrairement aux ARN génomique et antigénomique non polyadénylés), ce qui a conduit bien souvent à la confusion entre transcription et traduction (Question 30). Enfin, aucun candidat n'a montré par un calcul simple que cet ARNm possède une taille suffisante pour coder l'unique protéine virale : l'antigène δ .

Les questions 31 et 32 précisait que l'ARN des virions se présente exclusivement sous forme circulaire (pistes 1 à 4 de la figure 14) alors que, dans les hépatocytes infectées (pistes 6 et 7 de la figure 14), les ARN viraux non polyadénylés (ARN génomique, ARN antigénomique et les formes multimériques correspondantes) existent à la fois sous des formes linéaires (ces formes apparaissent en bas du gel, sous la bande à 6,6 kb) et circulaires (en haut du gel), dans des proportions variables selon le type d'ARN considéré (les formes monomériques sont majoritairement circulaires, les formes multimériques majoritairement linéaires). Plusieurs arguments pouvaient être avancés pour montrer que le génome de 1,7 kb du virion est circulaire : (1) il migre bien au-dessus que la bande à 6,6 kb du marqueur de taille ; (2) la digestion ménagée de cet ARN par la RNase T1 donne une bande à la taille attendue de 1,7 kb ; (3) puisqu'une simple digestion à la RNase T1 donne toujours une bande de même taille malgré le fait qu'elle n'ait aucune spécificité de clivage, cela traduit bien que l'ARN génomique est circulaire (dans le cas contraire, la coupure aléatoire d'un ARN linéaire donnerait plusieurs bandes de taille différente).

Sauf exception, les questions 33 et 34 n'ont pas été comprises. La plupart des candidats ne savent pas interpréter l'augmentation de l'intensité de la radioactivité de la bande 28S au cours du temps. Cette augmentation traduit l'accumulation des ARN suite au marquage métabolique (expérience témoin). Les résultats montraient que l'ARN antigénomique monomérique se réplique pour donner d'abord une forme génomique multimérique (bande à 3,4 kb apparaissant en premier) et que ces formes multimériques sont les précurseurs d'une forme monomérique (bande à 1,7 kb s'accumulant plus tardivement). A la question 34, quelques très bons candidats réussissent à donner un tableau récapitulatif complet et juste ! Le mécanisme d'expression et de répllication du génome viral est le suivant : (1) l'ARNm de 0,8 kb serait transcrit directement à partir du génome viral au moment de l'infection ; (2) le génome viral se répliquerait en deux étapes : il servirait d'abord de matrice pour produire un ARN antigénomique multimérique, lequel serait ensuite clivé en une forme monomérique linéaire puis circularisé pour donner l'ARN antigénomique. Sur le même principe, ce dernier ARN servirait enfin de matrice pour produire un ARN génomique multimérique puis monomérique.

Les questions 35 à 37 avaient pour objectif de montrer que l'ARN génomique (circulaire et simple brin) est constitué de deux séquences complémentaires inversées (Cf. résultats de l'analyse par Dot-plot) qui s'hybrident pour donner une structure double brin dans des conditions (naturelles) non dénaturantes (cf. résultats de la figure 17). Une partie non négligeable de candidats ont répondu correctement à ces questions.

Pour conclure, ce virus ne ressemblait en rien au modèle du VIH vu en cours, tant sur la structure du génome (le génome de HDV est un ARN circulaire simple brin) que sur les mécanismes de répllication (la répllication de HDV passe par la synthèse d'une molécule d'ARN complémentaire au génome : l'antigénome) et d'expression (transcription directe de l'ARN génomique donnant un ARN messenger viral polyadénylé).

B-2. Mécanisme de circularisation de l'ARN viral

La partie B-2, plus difficile que la précédente, mettait en évidence les activités autocatalytiques antagonistes de l'ARN génomique : activité de clivage (de type endonucléasique) d'une part, et activité de ligation (de type ARN ligase) d'autre part. Rares sont les candidats qui ont déduit ces deux activités. A la question 38, quelques candidats donnent des explications périlleuses pour justifier la taille de 148 nucléotides attendue pour le fragment 1.

A la question 40, la plupart des candidats arrivent à identifier les différentes formes d'ARN de la figure 19 mais aucun n'a su expliquer « proprement » les résultats de cette figure (Question 41), à savoir que la ligation ne peut se faire qu'à partir de fragments dérivant du clivage préalable d'un même ARN. Cela suggère donc que, suite au clivage du fragment 1 ou du fragment 2, les produits de clivage restent associés (sans doute par des appariements d'ARN) et que l'activité ribozyme ne peut être qu'intramoléculaire.

Au total, si l'on suppose que ces activités autocatalytiques de clivage et de religation sont présentes dans les conditions physiologiques cellulaires, celles-ci pourraient permettre de cliver les multimères d'ARN viral puis d'induire la circularisation des monomères formés, aussi bien pour l'ARN antigénomique que pour l'ARN génomique donnant les ARN viraux matures, destinés à l'encapsulation.

B-3. Mécanisme de synthèse du génome viral

Cette dernière partie avait pour objectif d'identifier les ARN polymérases impliquées dans la réplication (et l'expression) du génome viral. Cette partie a été rarement traitée, sauf la question 44 où presque tout le monde a compris le problème théorique lié à la réplication de ce virus. En effet, puisque la réplication du virus nécessite une polymérase ARN-dépendante et que ni la cellule ni le virus lui-même l'apporte, on ne voit pas quelle enzyme pourrait permettre sa réplication.

Dans les expériences présentées aux questions 46 à 50, on testait la participation des ARN polymérases cellulaires dans la réplication du virus. Pour cela, des cellules animales sont transfectées par l'ARN génomique (ou antigénomique) du virus en association avec l'ARN codant l'antigène δ , puis les cellules sont cultivées en présence d'une concentration appropriée en α -amanitine, une substance capable d'inhiber l'activité des trois types de polymérases cellulaires selon la concentration utilisée. Les résultats de la figure 21 montraient que la synthèse de l'ARNm de 0,8 kb est dépendante de Pol II alors que la synthèse de l'ARN antigénomique à partir de l'ARN génomique est dépendante de Pol I. De même, les résultats de la figure 22A montraient que la synthèse de l'ARN génomique à partir de l'ARN antigénomique est dépendante cette fois-ci de Pol II. En première approximation, ces résultats sont très étonnants car ces deux polymérases n'utilisent habituellement que des matrices ADN pour fonctionner (leur activité est ADN-dépendante). Toutefois le fait que, dans ces expériences, l'expression de l'antigène δ est absolument nécessaire pour que la synthèse des ARN viraux puisse avoir lieu suggérait que l'antigène δ puisse s'associer aux polymérases cellulaires Pol I et Pol II et transformer leur activité d'ARN polymérase ADN-dépendante en activité ARN polymérase ARN-dépendante (Question 51).

A la question 52, on pouvait conclure, compte tenu des données de l'énoncé, qu'au moment de l'infection, l'ARN génomique libéré dans le cytoplasme est d'abord amené au noyau grâce à l'antigène δ et, qu'une fois dans le noyau, il peut avoir simultanément deux devenir distincts parce qu'il est pris en charge par deux compartiments nucléaires différents : soit le nucléoplasme contenant la Pol II produisant l'ARNm de 0,8 kb, soit le nucléole contenant la Pol I qui produit l'ARN antigénomique de 1,7 kb.