

**ECOLES NORMALES SUPERIEURES
ECOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSEES**

RAPPORT DE L'EPREUVE ECRITE DE BIOLOGIE - SESSION 2018

Coefficients (en% du total concours) : Lyon bio : 13,2% - Lyon ST : 6,6% - Paris Bio : 4,9% - Paris ST : 2,8% - Paris Saclay : 12,3% - ENPC : 5,0%

Membres du jury : Guillaume Barthole, Alain Bessis, Marc Coudel, Jean Baptiste Esmenjaud, Marie Gendrel, Marie Monniaux, Déborah Prévôt, Pascale Rialland, Clémence Richetta, Eloïse Thierry.

L'épreuve de biologie de la session 2018 proposait aux candidat-es de s'intéresser à l'optogénétique à travers un sujet de synthèse sur le potentiel de membrane et des documents qui étudiaient les opsines, depuis leurs propriétés moléculaires jusqu'à leur utilisation dans l'induction d'un comportement chez un animal. La majorité des candidat-es a abordé les deux parties proposées.

Le jury salue ici le niveau remarquable de quelques copies qui montraient une grande maîtrise des connaissances du programme alliée à une compréhension synthétique des processus biologiques et une grande rigueur dans l'exploitation des données.

SUJET DE SYNTHESE : Le potentiel de membrane

Ce sujet fait appel aux notions décrites quasiment explicitement aux paragraphes I-B-3 (Membranes et échanges) et I-B-4 (Membrane et différence de potentiel électrique) du programme et dans une moindre mesure II-C (automatisme cardiaque). Le texte accompagnant l'intitulé guidait les candidats et leur rappelait que le potentiel de membrane concerne toutes les cellules vivantes (donc animales et végétales) ; il leur était demandé d'expliquer les origines moléculaires, les variations et les rôles de ce potentiel de membrane. En cela, le sujet demandait un effort modéré de synthèse, mais surtout beaucoup de rigueur et de précision dans les connaissances et les explications.

LE CONTENU

Le texte accompagnant l'intitulé demandait aux candidats : 1-de traiter de toutes les cellules : potentiel de membrane des cellules animales et végétales et potentiel d'action des neurones et du muscle cardiaque ; 2-de décrire les origines moléculaires du potentiel de membrane, ses variations et ses rôles. Le plan du sujet était donc proposé.

La description des origines moléculaires du potentiel de membrane pouvait s'appuyer sur les expériences de Hodgkin et Huxley (prix Nobel en 1963) sur l'axone géant de Calmar (et non l'axone de Calmar géant !), ou sur n'importe quelles autres expériences pertinentes. Il était attendu que les candidats s'appuient sur ces expériences pour décrire :

-les acteurs moléculaires impliqués dans le potentiel de membrane (l'ATPase- Na^+/K^+ , les canaux ioniques sélectifs, l'ATPase- H^+ chez les plantes).

-La nature des gradients et des flux ioniques existant de part et d'autre des membranes des cellules, et la manière dont ils sont liés.

-Les potentiels chimiques et électriques et comment ils constituent ensemble une force « ion-motrice ».

Il est regrettable que chacun de ces aspects soit une grande source de confusion pour beaucoup de candidats qui ne font pas la distinction entre gradient, flux, potentiel chimique et potentiel électrique et qui donc ne comprennent pas l'origine moléculaire du potentiel de membrane. Les gradients ioniques ont rarement été présentés comme une forme d'énergie. Il n'a pas été rare de lire que « le potentiel de membrane est dû à la différence de concentration des ions » sans plus d'explication. Le jury rappelle que le potentiel de membrane est un potentiel électrique dû à l'existence d'un flux ionique (un courant) à travers des canaux (des résistances) rendu possible par le gradient généré par la ATPase- Na^+/K^+ . En plus de la description des acteurs moléculaires et des mouvements des ions, il était également attendu que les candidats connaissent et expriment la loi de Nernst sans se tromper de signe, en définissant chacun des termes avec leur unité. Il n'était pas exigé que les candidats déduisent la loi de Nernst de l'expression de l'enthalpie libre comme somme des potentiels chimique et électrique, mais le jury a apprécié cette démarche. Il était en revanche attendu que les candidats connaissent les **valeurs chiffrées** des concentrations intra- et extra-cellulaires des principaux ions (Na^+ et K^+) et donc des potentiels d'équilibre de ces ions et des potentiels de repos des cellules animales et végétales. Les copies dans lesquelles ces valeurs (même approximatives) étaient indiquées, et utilisées dans la loi de Nernst ont été valorisées. De rares copies ont également rappelé que les flux de protons dans les organites étaient à l'origine de potentiel de membrane. Quand ces notions ont été énoncées à bon escient et sans confondre les potentiels d'oxydo-réduction et de membrane, elles ont été valorisées.

Dans une deuxième partie, les candidats devaient décrire les variations du potentiel de membrane. Les candidats devaient discuter du potentiel d'action et de sa propagation, du potentiel post-synaptique et du potentiel pace-maker.

La majorité des candidats ont bien décrit les différentes phases du potentiel d'action, même s'il n'est pas certain que l'action concertée des canaux ioniques dépendants du voltage ait été comprise par tous et toutes. Le jury a ainsi été stupéfait de retrouver plusieurs fois que le passage d'un potentiel d'action change les concentrations ioniques dans la cellule. La charge d'ion K^+ transférée pour générer une différence de potentiel de -60 mV correspond au passage d'une quantité négligeable d'ions (environ 40 000) et ne concerne que quelques nanomètres de chaque côté de la membrane. Très peu de candidats ont indiqué la durée du potentiel d'action et de manière très surprenante, beaucoup ont oublié de parler de la notion de seuil (ce qui explique sans doute les nombreuses réponses erronées à la question 8 de l'étude de documents où il fallait atteindre un seuil pour déclencher un potentiel d'action sur des neurones).

Le jury déplore avec la plus grande force que les fondements ioniques de la propagation des potentiels d'action dans les neurones ne soient quasiment jamais correctement expliqués. Il est même navrant de lire dans de très nombreuses copies que la propagation du potentiel d'action dans l'axone est due à la diffusion des ions sodium à l'intérieur de l'axone, voire même par le fait qu'en entrant dans la cellule, les Na^+ provoqueraient un excédent de charge qui repousse les cations intracellulaires qui ainsi diffusent de proche en proche. Le jury rappelle que des stimulations électriques exogènes ou l'arrivée d'un potentiel d'action provoque une dépolarisation locale de la membrane. Si cette dépolarisation est suffisante (au-dessus d'environ -50mV), les canaux Na^+ dépendants du voltage

s'ouvrent et laissent passer des ions Na^+ puis passent temporairement dans un état non-conductif dit inactivé. Cette entrée de Na^+ dépolarise à son tour les régions adjacentes de la membrane plasmique du fait de courants axiaux. Cette dépolarisation entraîne l'ouverture de nouveaux canaux sodium dépendants du voltage dans ces régions. C'est donc la dépolarisation de proche en proche de la membrane plasmique qui est à l'origine de la propagation du potentiel d'action. Cette propagation est directionnelle car dans les zones où le potentiel d'action vient de passer, les canaux Na^+ sont inactivés et l'ouverture des canaux K^+ y a entraîné une hyperpolarisation. La vitesse de propagation dépendra donc de la capacité de la membrane à se charger rapidement (capacitance) et de la présence de canaux de fuite (résistance membranaire). Elle dépendra également de la résistance électrique du milieu intracellulaire de l'axone (où se propagent les courants axiaux) et donc de son diamètre. Il est probable que la mauvaise compréhension des mécanismes de propagation explique que le rôle de la myéline, s'il a souvent été évoqué, n'a pas été expliqué et que l'importance du diamètre des fibres n'a presque jamais été traitée.

La genèse du potentiel post-synaptique devait être décrite, mais uniquement en lien avec les changements de potentiel de membrane et sans entrer dans les détails du fonctionnement synaptique. Ainsi, l'arrivée du potentiel d'action au niveau du bouton présynaptique induit l'ouverture de canaux Ca^{2+} sensibles au voltage et l'entrée de Ca^{2+} qui provoque la libération du neuromédiateur. Ce neuromédiateur induit l'ouverture des récepteurs-canaux post-synaptiques et donc une dépolarisation par entrée de Na^+ qui, si elle est suffisante, provoque un potentiel d'action au niveau post synaptique.

Le potentiel pacemaker généré dans les cellules nodales du cœur correspond à un changement du potentiel de membrane et devait donc être traité. Il était acceptable de le décrire avec moins de précision que le potentiel d'action des neurones dans la mesure où les principes en jeu sont similaires (action combinée ou séquentielle de canaux de fuite et de canaux sensibles au voltage). Il était cependant attendu que les candidats fassent le lien entre la vitesse de dépolarisation spontanée du potentiel de pacemaker (canaux HCN) et la fréquence cardiaque, et décrivent les mécanismes moléculaires qui agissent sur cette vitesse. Là encore, si la rythmicité des potentiels d'action cardiaques a souvent été évoquée, ses mécanismes sont souvent mal compris.

Cette deuxième partie devait être **illustrée par des courbes de potentiel en fonction du temps**, pour le cas du potentiel d'action et pour le potentiel pacemaker. Un même schéma pouvait bien sûr être utilisé pour la mise en évidence expérimentale du potentiel d'action et pour décrire les changements de conductance.

Dans une dernière partie, les candidats devaient traiter des **rôles du potentiel de membrane**. Il n'est bien entendu pas possible d'être exhaustif et ce n'était pas attendu. Quelques éléments de réponse sont présentés ci-dessous :

-Le potentiel de membrane est l'expression d'une **énergie stockée dans les gradients ioniques** et il était attendu que les candidats décrivent la manière dont cette énergie peut être utilisée par les cellules, principalement dans le cas des transports actifs secondaires. Les candidats ont souvent décrit à bon escient les nombreux exemples chez les plantes et les animaux présents dans le programme, mais là encore peu ont compris les mécanismes en jeu dans ce type de transport. Il était possible de décrire l'utilisation des gradients dans les organites, mais cette description n'a été valorisée que si le lien avec le potentiel de membrane avait été établi.

-Les variations du potentiel de membrane ont une **composante informative** et il était attendu qu'elle soit discutée. Beaucoup de candidats ont pensé à dire que le message porté par le potentiel d'action est codé en fréquence, très peu ont pensé à rappeler que l'arrivée d'un potentiel d'action est une information précise dans le temps et dans l'espace. Quelques candidats ont évoqué les changements de potentiels de membrane lors de la mécano-réception ou la fécondation ou d'autres exemples encore plus originaux. Quand cette description était faite de manière pertinente et les liens entre le potentiel de membrane et les rôles biologiques explicités, ces exemples ont pu être valorisés.

LA METHODE

Le jury tient à rappeler des points d'ordre méthodologiques qui ont pu poser problème. Les candidats doivent comprendre que ce ne sont ni des formules à plaquer aveuglement, ni des caprices d'examineurs pointilleux, mais des conseils pour les aider à clarifier leur démonstration et montrer qu'ils ont compris les phénomènes ou concepts qu'ils décrivent.

Rigueur, vocabulaire et rédaction

La biologie est une science qui utilise un vocabulaire spécifique et précis pour désigner les acteurs, les mécanismes ou les concepts. Il est donc primordial que les candidats veillent à la **justesse de leur vocabulaire**. Des phrases comme « la propagation du potentiel d'action est due aux canaux ioniques dépendants du voltage » est peut-être juste, mais imprécise et ne permet pas de savoir si le candidat a compris la manière dont les canaux ioniques participent à la propagation du potentiel d'action. Écrire que l'équation de Nernst est $E = R.T/(z.F) .\ln(C1/C2)$ sans décrire les termes ne permet pas de savoir si les candidats ont compris ce qu'est un potentiel de repos et le sens des flux ioniques. De manière plus générale, lorsqu'une formule doit être présentée, elle doit également être explicitée. Écrire que « l'ATPase- Na^+/K^+ est un canal » est faux. C'est un transporteur qui transporte les ions de manière lente par rapport aux canaux et son rôle électrogène est négligeable.

Si la syntaxe et l'orthographe ont été plus satisfaisantes que l'an dernier, de nombreuses copies manquaient encore de **concision**, ce qui rend leur lecture malaisée et donne une impression de confusion.

Introduction et plan

L'introduction pose d'abord un **cadre général**, plus large que celui du sujet et qui doit attiser la curiosité du jury. Cette première partie est inexistante dans la majorité des copies. Un exemple -parmi d'autres- aurait été de rappeler que la possibilité de faire un électrocardiogramme ou un électroencéphalogramme témoigne d'une activité électrique et qu'à l'échelle cellulaire, celle-ci trouve son origine dans le potentiel de membrane.

La deuxième partie de l'introduction consiste à **définir les termes du sujet**. Le potentiel de membrane est la différence de potentiel électrique de part et d'autre des membranes biologiques due aux flux d'ions à travers ces membranes. Cette définition est explicitement écrite dans le programme. Définir les termes du sujet dans l'introduction permet de délimiter et évite de traiter des notions hors sujet (comme le potentiel hydrique traité dans certaines copies).

Il est ensuite conseillé d'expliquer le raisonnement qui a conduit le candidat à proposer le plan qui sera développé. Le jury déplore avec la plus grande force que beaucoup des candidats ne semble pas comprendre qu'un plan est une structuration des idées et pas une division artificielle de la

démonstration. Il est donc indispensable de le justifier c'est à dire d'explicitier les raisons qui ont conduit à structurer la démonstration de cette manière.

Les candidats doivent comprendre qu'écrire « Nous allons nous demander quelle est l'origine moléculaire du potentiel d'action, quelles sont ses variations et ses rôles ? », que l'on retrouve dans beaucoup de copies ne permet pas aux examinateurs de savoir si les candidats ont compris l'intérêt de discuter de ces trois points dans cet ordre et n'empêche pas de traiter des points hors sujet.

Fil conducteur et progression logique du raisonnement

Au-delà de la justesse indispensable des connaissances, le devoir de synthèse permet d'évaluer la capacité des candidats à **produire un raisonnement suivi**. Ainsi, tout élément exposé doit être explicitement relié au sujet, ainsi qu'aux éléments le précédant et le suivant. Ainsi, écrire que l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau présynaptique permet la libération du neuromédiateur est certes vrai, mais n'est pas relié au sujet et ne sera pas valorisé. Le lien sera effectué et valorisé si on attribue la libération du neuromédiateur au calcium qui entre par des canaux calcium dépendants du voltage ouverts au moment de la dépolarisation du potentiel d'action.

L'ordre des différents concepts, leur lien ainsi que les transitions entre chacun d'entre eux sont donc à travailler avec soin, et lors de la rédaction, les candidats doivent veiller à chaque instant à ne pas dévier de leur ligne directrice, et à **ne pas s'égarer dans des digressions** sans lien avec le sujet ou anticipant une étape ultérieure du raisonnement.

Démarche scientifique et expérimentale

La démarche scientifique (**hypothético-déductive**) n'est que peu utilisée dans les devoirs. Or les mises en évidence expérimentales possibles étaient relativement évidentes car historiques. Les raisonnements qui s'appuyaient sur des expériences bien décrites, des hypothèses et des conclusions ont été fortement valorisés.

La biologie est une science expérimentale qui s'appuie sur le réel et ne peut se limiter à un exposé théorique ou une accumulation de notions et de modèles. Il est donc important d'appuyer ses raisonnements sur des **données chiffrées** (ordre de grandeur, tailles, concentrations, etc) et que les illustrations soient accompagnées d'échelles et de valeurs (abscisses, ordonnées, tailles des pics etc).

Exemples et illustrations

Le jury félicite les candidats qui utilisent des exemples et illustrations pour appuyer leur discours et leurs idées. Le jury constate une amélioration dans la présentation des figures, mais elles manquent encore souvent de **rigueur** et de **précision**. Nous rappelons qu'elles doivent comporter un titre et des légendes explicites ainsi qu'une échelle. Elles doivent être soignées et illustrer précisément la notion présentée.

Il est souvent judicieux d'utiliser une même illustration pour illustrer plusieurs notions : ainsi, le montage de Hodgkin et Huxley permet d'illustrer l'existence des potentiels de membrane et des potentiels d'action mais aussi, par l'utilisation de drogues appropriées montre l'implication des différents types de canaux ioniques.

Conclusion

Toute conclusion doit comporter un **résumé des idées essentielles** développées pendant l'exposé ainsi qu'un **élargissement du sujet**. Les candidats doivent comprendre là encore que présenter des idées au-delà de l'énoncé strict du sujet permet de montrer qu'ils ont compris comment les processus biologiques mêmes les plus fondamentaux ont une place plus importante, dans la compréhension du vivant, dans son approche technologique ou même dans la société. Des idées simples et concrètes sont souvent les plus efficaces et les possibilités ne manquaient pas pour ce sujet qui traitait du fonctionnement intime des neurones et du cœur et de ses enjeux depuis le décodage des signaux neuronaux à la révolution des pacemakers cardiaques.

ANALYSE DE DOCUMENTS

1) REMARQUES GENERALES:

L'analyse de documents permet d'évaluer diverses compétences scientifiques des candidats :

- (1) **analyser des résultats expérimentaux**, y compris de **manière critique**,
- (2) **comprendre des protocoles** et **concevoir des expériences**,
- (3) **synthétiser les résultats d'une série d'expériences** se rapportant à un même sujet, et prendre du recul vis-à-vis d'elle et formuler des conclusions,
- (4) **réfléchir sur les phénomènes biologiques** mis en évidence et **proposer des hypothèses pertinentes** permettant de les expliquer.

Beaucoup de candidats ont traité l'ensemble des questions. Mais la simple description des figures ne suffit pas pour réussir ces exercices : de trop nombreux candidats sont passés d'une figure à l'autre sans jamais dépasser le stade de la description, ne donnant ainsi aucune chance aux correcteurs d'évaluer les compétences mentionnées ci-dessus.

De plus, on ne peut espérer comprendre les phénomènes biologiques étudiés dans ces documents en *analysant partiellement les figures* et en concluant trop rapidement sans prendre en compte l'ensemble des informations présentées.

Par ailleurs, le jury attire l'attention des candidats sur la nécessité de *comprendre les protocoles* décrits pour pouvoir exploiter les résultats obtenus. Lorsque cette étape préliminaire est négligée, l'analyse et l'interprétation des figures sont souvent erronées. Certaines techniques de base en biologie ne sont pas reconnues ou pas comprises alors qu'elles font partie du programme et que leur maîtrise est un pré-requis à la réussite de l'exercice.

Il est donc indispensable pour les étudiants préparant le concours, et se destinant à une carrière scientifique, de maîtriser la méthode d'étude de documents, et de l'appliquer avec rigueur.

Le jury déplore qu'un certain nombre de candidats semble avoir choisi de parcourir l'ensemble des questions à la recherche de points « faciles » et ait abandonné les questions demandant de la réflexion. Il faut donc sans doute préciser que cette stratégie ne permet pas de réussir une telle épreuve car le barème valorise fortement les compétences (2), (3) et (4) sus-mentionnées.

Enfin, nous rappelons ici que, comme dans toutes les épreuves du concours, les compétences de **communication scientifique** sont évaluées : il est attendu des candidats qu'ils construisent une argumentation rigoureuse, suivant une progression logique et en distinguant précisément les liens de causalité, les simples corrélations et les hypothèses.

Dans le but d'aider les candidats se préparant à cette épreuve, le jury souhaite donc rappeler ici quelques conseils méthodologiques :

- **Lire attentivement l'énoncé.** Il renferme les informations essentielles à la compréhension des documents et pose l'objectif de chaque expérience.

- **Analyser** les documents **de manière détaillée** : décrire les variations temporelles, analyser les valeurs quantitatives, s'interroger sur la significativité des différences observées, s'intéresser à l'ensemble des données présentées dans la figure.

- **Utiliser un vocabulaire précis et adapté**. Dire qu'un facteur est « impliqué dans », « intervient dans » ou « a un rôle dans » n'a pas la même signification que « est nécessaire à », « est suffisant à » ou « est nécessaire et suffisant à » ou encore « sa présence est corrélée à ... ». Le jury accorde une grande importance à la rigueur scientifique et au choix des termes utilisés. Lorsque l'énoncé introduit une terminologie précise, les candidats sont invités à l'utiliser à la place de termes plus génériques.

- **Réaliser des schémas complets**. Schématiser permet souvent de synthétiser efficacement des données. Cependant, tout schéma doit être légendé et explicité : un schéma non compréhensible par le jury ne pourra pas être valorisé.

- **Interpréter et conclure à l'issue de chaque figure**. En restant au niveau de la simple description ou de l'analyse superficielle, il est difficile de progresser dans la compréhension du phénomène biologique étudié. Il est nécessaire d'**exploiter l'ensemble des données** contenues dans le document, puisque toutes sont utiles pour bien appréhender le phénomène proposé. Le jury recommande de suivre le schéma classique suivant : **(1) analyse des résultats, (2) interprétation des résultats, (3) conclusions** (notamment s'il y a plusieurs figures) et éventuellement **(4) énoncé d'hypothèses explicatives**.

Il est également essentiel d'analyser au préalable les témoins pour pouvoir conclure rigoureusement. Enfin, il **ne faut pas sur-interpréter les résultats expérimentaux**, et déduire des relations de cause à effet à partir de simples corrélations. Ainsi sur le Western blot de la figure 3, le fait de trouver CHR2 et l'ATPase dans la même fraction ne donne aucune indication sur leur interaction fonctionnelle.

- **Indiquer clairement si les conclusions que vous donnez sont directement issues de l'analyse des documents et donc démontrées par les données expérimentales, ou s'il s'agit d'hypothèses spéculatives**. Si le jury encourage vivement les candidats à proposer des hypothèses après l'interprétation des résultats, celles-ci ne doivent pas être reprises dans les questions suivantes comme des éléments démontrés, au risque d'aiguiller l'analyse dans une mauvaise direction. Elles doivent au contraire être testées à nouveau et remises en question par les nouvelles données. Il est par ailleurs essentiel pour des étudiants engagés dans des études scientifiques de pouvoir réfléchir et envisager, pour chaque résultat, les différentes interprétations/hypothèses explicatives possibles.

- **Intégrer l'ensemble des données apportées par les différentes figures dans un modèle général que vous devez construire de vous-même tout au long de l'exercice**. Les sujets sont construits pour permettre aux candidats, en faisant la synthèse de leurs interprétations successives, de proposer une vision d'ensemble du mécanisme étudié. Sauf cas particulier, les figures ne sont pas indépendantes les unes des autres. Certaines questions, en général à la fin de chaque partie, incitent les candidats à faire cet effort de synthèse (qui ne doit pas se limiter à résumer la question précédente), on attend que les réponses aux différentes questions soient cohérentes entre elles et

s'appuient sur (ou soient discutées en fonction) des réponses précédentes. Les expériences en Biologie n'apportent pas toujours des réponses non-ambiguës. Si des incohérences sont notées par le candidat, le jury apprécie que celles-ci soient commentées.

- **Maîtriser les techniques de base de biologie**, tant dans leur protocole que dans leur principe. Le principe du Western blot et sa finalité sont mal maîtrisés par les candidats, tout comme le rôle du témoin de charge qui doit par ailleurs être analysé, et non pas simplement évoqué. Enfin, il est regrettable que malgré leurs cours de physique, beaucoup de candidats confondent les mesures de potentiel et de courant. Le **vocabulaire spécifique** des techniques est souvent aussi approximatif : *par exemple, dans les électrophorèses, on parle de bandes (et non de taches ou de traits).*

- **Concision, clarté et rédaction.** Il est inutile d'introduire chaque expérience par une description du protocole qui paraphrase le texte. Il est préférable d'approfondir l'analyse. L'écriture et la syntaxe doivent être soignées donc déchiffrables et compréhensibles par les correcteurs. Il est fortement recommandé de préférer des phrases courtes, à de longues phrases rendues incompréhensibles par trop de propositions subordonnées.

Une manière de progresser consiste bien évidemment à s'exercer sur des sujets d'Annales en s'appuyant sur la lecture des rapports de jury correspondants. Quelques éléments de compréhension et de correction sont proposés ci-dessous à cette fin.

2) ELEMENTS DE CORRECTION DE LA PARTIE B

Question 1 – Cette question introductive a été plutôt bien traitée, même si le flagelle et l'amyloplaste n'étaient pas légendés dans la grande majorité des copies.

a chloroplaste (ou thylakoïde) ; b parois (ou matrice extracellulaire) ; c appareil de Golgi ; d Amyloplaste (ou amidon ou pyrénoloïde) ; e noyau ; f vacuole ; g membrane ; h flagelle ; i mitochondrie

Question 2 – Le voltage imposé permet de mesurer les courants de part et d'autre de la membrane. Cette question a souvent été bien traitée, mais de trop nombreux candidats pensent que c'est le potentiel qui est mesuré. La figure 2 montrait que l'opsine absorbe la lumière avec un pic autour de 450 nm et que son illumination induit un courant négatif (entrant) donc un flux d'ions. Il n'était pas possible à ce stade de savoir si CHR2 capte la lumière puis permet l'ouverture d'un canal ionique porté par une autre protéine ou si c'est CHR2 qui est en même temps le capteur et le canal. Il n'était pas possible non plus à ce stade de savoir si le courant est porté par des anions ou des cations ni si les ions entrent ou sortent puisque la composition du milieu n'était pas indiquée. Beaucoup d'étudiants ont écrit que CHR2 est voltage-dépendant car le courant n'est pas le même quand le voltage imposé change. La dépendance au voltage signifie que l'ouverture dépend du voltage. Pour un canal, le courant transmembranaire dépend toujours du voltage puisqu'il est passif. Ainsi, même pour un canal de fuite, toujours ouvert (donc non « voltage dépendant ») le courant dépendra du voltage.

Question 3 – La figure 3 permettait de montrer que CHR2 est une protéine membranaire car elle est présente dans la même fraction que l'ATPase qui est membranaire. CHR2 est composée de 5 à 7

régions transmembranaires (hydrophobes d'une vingtaine d'acides aminés), mais à cette étape, il n'était pas possible de savoir si le domaine N-terminal est à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule. Si la localisation membranaire de CHR2 a été souvent correcte, il est en revanche regrettable que l'analyse du profil d'hydrophobicité n'ait été que très partielle. Quasiment aucun candidat n'a corrélé la taille des régions hydrophobes à la taille attendue des régions membranaires (environ 20 acides aminés) et très peu ont pensé aux deux orientations possibles du domaine N-terminal (et donc de l'ensemble des régions transmembranaires).

Question 4 – La figure 4 permettait de montrer que CHR2 est un canal sélectif pour les cations. Peu de candidats ont construit un raisonnement solide montrant que le courant est différent quand les cations changent (NaCl vs CsCl par exemple) alors qu'il est identique lorsque les anions sont modifiés (NaCl vs. AsNa par exemple). D'autre part le passage à travers CHR2 est d'autant plus efficace que les ions sont petits, montrant que c'est un canal sélectif. CHR2 étant un canal cationique, il est attendu que le courant dépende de la concentration de cations et notamment de protons, donc du pH. Beaucoup de candidats n'ont pas tenu compte des réponses précédentes et ont pensé à une protonation de NMG qui changerait son aptitude à passer par le canal malgré la taille énorme de la molécule comparée aux ions.

Question 5 – La figure 5 étudiait le rôle de certains acides aminés polaires au sein de régions hydrophobes potentiellement membranaires identifiées précédemment. Très peu de candidats ont fait le lien avec la question précédente. Il était possible de supposer que ces acides aminés polaires pointent leur résidu vers l'intérieur du canal et ont donc des propriétés fonctionnelles particulières. La figure 5B permettait d'identifier des acides aminés dont la mutation altère le temps que met le courant à atteindre son pic et qui sont donc impliqués dans l'ouverture du canal. La figure 5C identifie les acides aminés qui modifient le rapport des courants portés par les ions Na⁺ et K⁺ c'est à dire impliqués dans la sélectivité du canal. Là encore, très peu de candidats ont compris en quoi ces expériences permettaient de caractériser le rôle de ces acides aminés.

Question 6 – Les expériences précédentes montraient que CHR2 permet de modifier le potentiel de membrane de *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de lumière. Le jury a valorisé toutes les réponses argumentées et pertinentes (changement de métabolisme jour/nuit, polarisation de la cellule vers des sources de lumières pour optimiser la photosynthèse, détection de la profondeur etc). Il est important de redire ici qu'un changement de potentiel de membrane ne s'accompagne pas d'un changement de concentration ionique à l'intérieur de la cellule et la détection de la lumière par CHR2 n'est donc pas directement associée à un changement du pH intracellulaire ou à une signalisation calcique.

Question 7 – L'étude de l'halorhodopsine proposée sur la figure 6 montre que cette protéine est elle aussi sensible à la lumière et responsable d'un courant membranaire en présence de lumière. A - 60mV, le courant induit par NpHR est sortant. Si cette protéine est un canal alors le courant est soit porté par le K⁺ qui sort soit par un anion qui rentre. Puisque la cellule est maintenue au potentiel d'équilibre de l'ion potassium, celui-ci est à l'équilibre et ne peut pas être responsable du courant qui est alors probablement dû à une entrée d'ions chlorure. Cependant, la figure 7C montraient que le

courant induit par NpHR ne dépend pas du potentiel de membrane. Cette protéine n'est donc pas un canal mais un transporteur. Ce raisonnement difficile n'a quasiment jamais été abouti.

Question 8 – Les expériences présentées à la figure 7, permettent de montrer que si des neurones expriment CHR2 et NpHR, alors il est possible de déclencher, ou d'inhiber le déclenchement d'un potentiel d'action par de la lumière. Les temps différents d'illumination à 450 nm correspondent à des intensités de stimulation différentes. Seule une stimulation de 10 msec induit une dépolarisation suffisante pour déclencher un potentiel d'action. De manière étonnante voire inquiétante, moins de 10% des candidats ont identifié ici un potentiel d'action. De nombreux candidats qui avaient bien décrit les potentiels d'action dans leur sujet de synthèse n'ont pas su ici les reconnaître. L'action inhibitrice de la stimulation à 595 nm, qui met en jeu NpHR a très peu été décrite.

Les avantages d'utiliser de la lumière pour moduler l'activité des neurones sont nombreux et sont liés à la précision spatiale et temporelle du stimulus. Cette méthode nécessite de disposer de neurones qui expriment des opsines, ce qui peut être difficile. De plus, tous les compartiments du neurone vont exprimer la protéine (bouton présynaptique, soma, compartiment post-synaptique) et la lumière peut donc entraîner un changement de potentiel de membrane dans tous ces compartiments, ce qui peut rendre l'interprétation délicate (cf. question suivante). Beaucoup de candidats ont identifié la nécessité de travailler dans une pièce noire ou avec une longueur d'onde précise comme inconvenients. S'il est vrai que ce sont des contraintes importantes pour mettre en œuvre cette méthode, elles sont cependant très simples à surpasser dans les laboratoires de recherche et ne font pas vraiment partie des inconvenients.

Question 9 – La figure 8 montrait que l'activation de CHR2 dans les neurones présynaptiques déclenche des courants ioniques au niveau post synaptique avec la même fréquence que la fréquence d'illumination. Cependant, on ne pouvait pas exclure que l'activation de CHR2 induise la dépolarisation au niveau du bouton présynaptique et donc la libération du neuromédiateur sans déclenchement d'un potentiel d'action. La TTX, qui bloque les canaux sodium dépendants du voltage et donc les potentiels d'action bloque la transmission synaptique. Cela montre que la dépolarisation par CHR2 entraîne un potentiel d'action au niveau présynaptique qui, lui, provoque la libération du neuromédiateur. L'utilisation de NBQX prouve que les courants sont liés à l'activation des récepteurs-canaux ligands-dépendants post-synaptiques.

Les expériences décrites dans les figures 9 à 11 utilisaient de l'optogénétique pour décrypter le cycle des vésicules présynaptiques pendant une transmission synaptique. Ce cycle étant extrêmement rapide (de l'ordre de la milliseconde), il nécessite pour l'étudier des techniques capables d'agir dans ces mêmes ordres de grandeur temporels.

Question 10 et 11 – Beaucoup de candidats qui ont traité la question 10 ont proposé à juste titre que les vésicules fixées sont prêtes à décharger les neuromédiateurs alors que les vésicules liées sont en réserve. En revanche, quasiment aucun candidat n'a pensé que l'expérience décrite en 9B permettait de montrer qu'une stimulation induit un courant ionique (et donc un potentiel d'action associé) et un seul, ce qui est nécessaire pour l'étude qui suit.

Les histogrammes des figures 10E et F permettaient de montrer que la quantité de vésicules liées fluctue lors d'une transmission synaptique alors que le nombre de vésicules fixées diminue dès les premiers temps après le déclenchement de la transmission synaptique et revient à la quantité initiale après 3-4 sec (ce qui correspond au temps de récupération décrit dans l'énoncé). Si ces données favorisent un modèle où les vésicules fixées fusionnent à la membrane, on ne peut pas exclure qu'elles passent dans un autre compartiment qui ne serait pas pris en compte dans ces expériences. La figure 11 montre que les puits qui apparaissent au niveau de la zone active, c'est à dire où le médiateur est libéré, ont une taille et une cinétique d'apparition compatible avec l'hypothèse qu'elles sont dues à la fusion des vésicules fixées. Là encore, on ne pouvait pas exclure que les effets analysés ici étaient dus à l'action de la lumière elle-même ou à l'activation de CHR2 au niveau du bouton présynaptique et donc à une dépolarisation locale indépendante des potentiels d'action. La même expérience répétée sans CHR2 ou avec CHR2 mais en présence de TTX aurait pu être utile.

Question 12 – Les puits observés à la figure 11 ne sont pas localisés dans la zone active et sont plus gros que les vésicules synaptiques. Ils ne sont donc probablement pas impliqués dans l'exocytose. Le fait que la ferritine, qui stocke le fer et qui est donc visible en microscopie électronique soit observée à l'intérieur de ces puits alors qu'elle a été ajoutée au milieu extérieur, montre qu'il est ici question d'endocytose. L'analyse cinétique montre de plus que ces puits apparaissent après l'exocytose des vésicules de la zone active. L'hypothèse la plus vraisemblable est que cette endocytose de grosses vésicules est un moyen de régénérer des vésicules synaptiques et de restaurer la surface de membrane du bouton présynaptique.

En assimilant les puits à des sphères, il est possible de calculer les surfaces théoriques de membrane internalisées par les gros puits ou externalisées par les petits puits de la zone active. En tenant ensuite compte de la proportion de synapses contenant ces puits (0,2 petits puits par zone active ; 0,15 gros puits par synapse), il était possible de proposer que 960 nm² de membrane fusionnent à chaque potentiel d'action alors que 2880 nm² de membrane sont internalisés. Il est regrettable que beaucoup de candidats ne maîtrisent pas les formules mathématiques de base et tentent de calculer la surface d'une sphère grâce à la formule de la surface d'un disque. Beaucoup d'explications pouvaient être proposées pour expliquer cette différence, comme par exemple l'existence d'autres sources d'exocytose non identifiées ici ou des problèmes d'échantillonnages liés à l'épaisseur des coupes de microscopie électronique par rapport aux tailles des vésicules. Le lien entre la localisation des vésicules dans la zone active ou à côté de celle-ci et leur fonction potentielle n'a quasiment jamais été proposé.

Question 13 – Cette partie permet de montrer le potentiel thérapeutique de l'utilisation d'opsine. La figure 12B, permet de conclure que la transfection de hRod-GFP conduit à l'expression de la GFP dans toute la cellule de la couche granulaire externe (CGE) et qu'elle permet de visualiser les corps cellulaires mais aussi les segments externes. La transfection de pCag-GFP permet l'expression de la GFP dans les cellules de la couche ganglionnaire (CGG).

En comparant à la situation contrôle décrite en 12B, il est possible de conclure que dans les trois modèles de rétinite décrits sur la figure 12C, les CGI et CGG sont présentes mais la CGE est réduite chez RI, encore plus fine chez Rr et absente chez les Rs. Les segments externes ne sont visibles dans aucun des trois modèles.

Puisque dans les modèles RI et Rr, les cellules de la CGE sont toujours présentes, alors c'est le promoteur hRod qui devra être utilisé. Le texte introductif rappelait que dans une rétine intacte, la lumière polarise les cellules de la CGE. Pour reproduire cette polarisation, on devra donc utiliser NpHR.

Pour interpréter les expériences décrites sur les figures 12D-G, il était indispensable de s'appuyer sur les contrôles (transfection de GFP) et de construire un raisonnement suivi depuis la CGE (12D) jusqu'aux données comportementales (12G).

La figure 12D montrait que dans la CGE, une illumination évoque un courant de 20 pA dans les cellules pigmentaires. Dans les deux modèles de rétinites, la lumière n'induit aucun courant. En revanche, l'expression de NpHR permet d'évoquer un courant beaucoup plus grand (environ 80 pA) dans les cellules pigmentaires.

Dans la CGG (fig. 12E), la lumière induit un courant identique d'environ 200 pA dans les cellules ganglionnaires de souris WT ou de RI et Rr qui expriment l'opsine. La transmission synaptique a donc filtré le signal trop grand des cellules pigmentaires exprimant l'opsine.

Dans le cortex (12F), les potentiels évoqués par la lumière sont d'environ 0,1 mV chez les souris contrôles mais sont inférieurs à 0,02 mV dans les modèles de rétinites donc probablement nuls. De manière étonnante (en tout cas inexplicable sur la base des données fournies ici), l'expression de l'opsine dans les modèles RI ne permet pas de restaurer les potentiels dans le cortex (mêmes valeurs de potentiels pour Op et GFP). En revanche, dans le modèle Rr, la réponse corticale évoquée après expression de l'opsine est au même niveau que chez la souris WT saine. Il y eu une « guérison ».

Les effets observés au niveau du cortex se retrouvent au niveau du comportement. Des souris saines restent moins de 25% de leur temps dans le compartiment lumineux (les souris sont nocturnes et fuient la lumière). Les souris RI et Rr restent environ 50% dans chaque compartiment. Elles sont probablement aveugles et ne font pas la différence entre les compartiments. L'expression de l'opsine ne change pas le comportement des RI mais restaure le comportement des Rr, ce qui est cohérent avec les résultats du cortex.

-Dans la rétine saine, la lumière inactive les cellules de la CGE mais induit une activation des cellules de la CGI et de la CGG. Dans la rétinite sévère il n'y a plus de CGE. Une stratégie de thérapie génique devra donc permettre d'activer les cellules de la CGG à la lumière. Une solution est d'exprimer CHR2 en utilisant le promoteur pCag.

Question 14 – Les données de la figure 14 permettent de montrer que la stimulation optogénétique est capable de recruter un petit nombre de neurones sur un animal entier et donc qu'il est possible de déclencher un comportement par de la lumière. En effet, dans les mouches témoins, ou dans des mouches qui expriment CHR2 dans des neurones sans lien avec le comportement de fuite (NN), alors la lumière n'a pas d'effet. Mais quand les fibres géantes expriment CHR2, alors une illumination est suffisante pour induire un comportement de vol dans 63% des cas. Cette expérience montre que l'illumination à travers la tête a permis d'enclencher une signalisation dans un neurone qui a conduit au recrutement du circuit dans lequel il est engagé.

Aucune donnée statistique n'était fournie dans cette expérience et les différences entre les lignées étaient donc difficiles à interpréter. Cependant, lorsque des neurones en contact direct avec les muscles expriment CHR2, le pourcentage de réaction est plus important (82% de réussite pour

IN+MS+MV). On pouvait noter que la stimulation de tous les neurones ne permet pas d'activer le comportement de fuite. En effet, le comportement de fuite nécessite une action coordonnée des muscles et donc des motoneurones, et lorsque tous les neurones sont stimulés en même temps, aucune coordination n'est possible

La décapitation des mouches IN+MS+MV n'empêche pas d'avoir une réponse comportementale. Cette expérience montrait que la lumière est captée directement par CHR2 exprimé par les neurones du thorax. Le circuit thoracique isolé est directement responsable du comportement.

Question 15 -

Aucune réponse spécifique n'était attendue. Les propositions vraisemblables, créatives, pertinentes et justifiées ont été très fortement valorisées