



Concernant la forme, nous tenons à saluer les efforts de présentation générale des copies. Toutefois, certains candidats semblent considérer qu'un schéma global sans aucune explication est suffisant pour illustrer la problématique. Nous avons également noté une certaine faiblesse aussi bien dans les introductions que dans les conclusions des exposés. Les problèmes ne sont pas clairement posés et les conclusions se limitent trop souvent à un résumé du développement qui précède.

### **Remarques spécifiques**

Dans un premier temps, il était nécessaire d'illustrer les structures moléculaires qui assurent la réception et la reconnaissance du signal extracellulaire. Le type de récepteur mis en jeu (récepteur à sept hélices transmembranaires couplé aux protéines G, récepteur canal, récepteur cytoplasmique ou nucléaire...) ainsi que le domaine protéique qui assure la reconnaissance du signal devaient être clairement précisés. La nature des interactions entre récepteur et ligand devait être traitée. Trop peu de candidats ont en effet caractérisé les liaisons faibles (hydrogène, électrostatique, hydrophobe, van der Waals) qui interviennent dans l'interaction ligand / récepteur. Cette approche structurale aurait d'ailleurs permis à davantage de candidats de dégager les concepts d'affinité et de spécificité. Il est également important de noter que très peu de candidats se sont attachés à décrire les changements de conformation et les réarrangements structuraux du récepteur induits par le ligand, nécessaires à l'enclenchement d'une cascade de signalisation. Enfin, force est de constater, à de rares exceptions près, l'ignorance des candidats quant aux mécanismes qui permettent un effet biologique transitoire : réversibilité de l'association ligand / récepteur, désensibilisation de la cellule par internalisation du récepteur...

Dans un second temps, les candidats ont, pour la plupart, bien développé l'ensemble des mécanismes intracellulaires activés en aval du récepteur. Le cycle des protéines G est un exemple très bien traité dans de nombreuses copies. La notion de second messager (AMPc, GMPc, IP<sub>3</sub>, DAG...) est bien connue. Nous déplorons cependant l'absence de données plus précises (notamment quantitatives) quant à l'amplification du signal. Les modifications post-traductionnelles par phosphorylation de certains effecteurs intracellulaires sont globalement les seules modifications connues par les candidats. Nous avons noté dans certaines copies, lorsque la voie de signalisation liée au glucagon était utilisée comme exemple, de nombreuses imprécisions et incohérences dans l'enchaînement des événements intracellulaires et des cibles activées ou inhibées par phosphorylation. En particulier, des confusions importantes sont observées entre glycogène phosphorylase et glycogène synthétase. Enfin, là encore, aucun candidat n'a évoqué les mécanismes permettant le retour à l'état inactif des voies de signalisation : hydrolyse des nucléotides cycliques par les phosphodiesterases, déphosphorylation des protéines par des phosphatases, pompage du calcium cytosolique...

Dans un troisième temps, la réponse au signal devait être traitée à l'échelle moléculaire et à l'échelle cellulaire. L'exemple de la contraction musculaire se prêtait tout particulièrement à ce développement : interaction myosine/actine et hydrolyse de l'ATP, raccourcissement des sarcomères... L'exemple de la croissance de la cellule végétale sous l'effet de l'auxine était également très approprié, mettant en évidence des modifications de l'expression des gènes, la déstabilisation de la paroi et l'augmentation de la taille de la cellule.

En conclusion, certains candidats ont donc fourni un réel effort de réflexion et de synthèse, faisant appel à des connaissances touchant aussi bien la biochimie des protéines que la biologie cellulaire ou l'endocrinologie. L'étroitesse du temps imparti à cette question de cours faisait que tous les aspects ne pouvaient pas être développés, obligeant les candidats à faire des choix dans la conception de leur devoir. Cependant, dans de nombreuses copies, le sujet n'était traité que très partiellement, donnant clairement au jury l'impression d'un manque de réflexion plus que d'un choix justifiable.

## Partie A – Sujet avec documents

### Généralités

Ce sujet, très largement accessible, a été abordé par tous les candidats, bien que laissé inachevé par une grande majorité. Le commentaire des documents a souvent manqué de concision et de clarté, notamment en ce qui concerne les expériences d'immunoprécipitation, très souvent mal comprises malgré les explications fournies dans le document A.5. Nous regrettons fortement le peu de sens pratique des candidats révélé par l'absence de réponse aux questions expérimentales A.2.4 et A.3.2e. Enfin, les schémas de synthèse demandés à la fin de cette partie, destinés à récapituler les voies de transduction étudiées, sont presque toujours demeurés incomplets et relativement décevants dans la mesure où ils n'intégraient pas l'ensemble des conclusions déduites des questions précédentes. Notons également que de nombreux candidats ont représenté la MBP (substrat servant à la mise en évidence d'une réaction enzymatique de phosphorylation) comme le substrat physiologique impliqué dans la voie de transduction étudiée, ce qui n'était absolument pas le cas.

### Remarques spécifiques

Ce premier sujet avec documents présentait, sur différentes lignées cellulaires, les événements cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la différenciation neuronale induite par un facteur diffusible, le facteur de croissance des neurones (Nerve Growth Factor, NGF). Les effets spécifiques de ce facteur étaient abordés à l'échelle de l'animal (observation de la chaîne ganglionnaire de souris), cellulaire (transfection par le gène codant le récepteur du NGF, cascade de signalisation) et moléculaire (fonctionnement du récepteur du NGF).

### Questions A.2.1 à A.2.4

De nombreux candidats ont très bien commenté les expériences *in vivo* démontrant qu'un facteur soluble (NGF) contenu dans un extrait de glande salivaire de souris adulte stimule la prolifération des cellules précurseurs des neurones et favorise la différenciation neuronale chez l'embryon de souris (développement d'extensions neuritiques, acquisition de marqueurs biochimiques). Les candidats ont globalement bien exploité les documents en comparant contrôles et essais et l'existence d'une « fenêtre de temps » durant laquelle l'action du NGF est possible, a été bien analysée. En revanche, la notion de blocage d'une activité biologique par le biais d'anticorps est souvent mal comprise. Nous regrettons également le manque de rigueur scientifique dans la démonstration de la spécificité des anticorps dirigés contre le NGF. A notre grande surprise, peu de candidats se sont appuyés sur les cribles phénotypiques présentés dans le sujet pour étayer leur démonstration, préférant proposer des tests biochimiques (diffusion à l'équilibre, colonnes d'affinité...) très compliqués et souvent irréalisables.

### Questions A.3.1 à A.3.3

L'ensemble des questions de la partie A3 conduisait à caractériser le récepteur spécifique du NGF (Trk). L'étude de la liaison du ligand sur le récepteur Trk est réalisée dans les cellules L transfectées par l'ADNc codant le récepteur du NGF (cellules L-Trk). L'expérience de Northern blot avait pour objectif de caractériser le système cellulaire : absence de Trk dans les cellules L témoins, efficacité de la transfection, expression constitutive de Trk dans les cellules L-Trk, absence d'effet du NGF sur la synthèse de Trk. De nombreux candidats n'ont pas compris l'importance de l'expérience de Northern blot effectuée sur les cellules L, qui justifiait la démarche expérimentale proposée pour l'étude de l'interaction NGF / Trk. Nous reprochons également à bon nombre de candidats de ne pas connaître la notion de spécificité de liaison associée aux interactions protéine/ligand. L'expérience de liaison du NGF radiomarqué sur la protéine Trk en présence de NGF froid illustre à ce propos le principe de fixation compétitive sur un même site et l'existence d'une fraction du ligand s'associant de manière non spécifique aux cellules. La détermination de la concentration de facteur de croissance qui déplace 50% de la liaison du NGF radiomarqué n'a que très rarement été justifiée et quelques rares candidats se sont aperçus d'un déplacement incomplet de la liaison du

NGF radiomarqué en présence de NT-3. Enfin, nous avons fort apprécié le parallèle effectué entre cinétique enzymatique et liaison ligand/récepteur afin de démontrer la fixation compétitive de deux ligands sur le même site. Toutefois, il aurait été judicieux de parler de « pourcentage de fixation spécifique » plutôt que de « vitesse initiale de catalyse » et de « constante de dissociation apparente » au lieu de « constante de Michaelis ».

#### **Questions A.4.1 à A.4.4.**

Dans cette partie, il était proposé aux candidats de s'intéresser aux événements intracellulaires engendrés par la liaison du NGF à son récepteur dans un autre système cellulaire, les cellules PC12. L'approche expérimentale repose sur la technique de Western blot après immunoprécipitation éventuelle de protéines spécifiques. L'immunoprécipitation, illustrée en détail dans le document A.5, a globalement été très mal exploitée. L'ensemble de ces expériences démontre que la liaison du NGF entraîne l'activation du récepteur Trk par autophosphorylation sur une tyrosine, qui a pour conséquence l'activation, par phosphorylation sur une tyrosine, d'une MAP kinase de masse moléculaire 45 kDa environ (masse déterminée à partir de l'expérience d'immunodéplétion). Pour la plupart des candidats, l'immunodéplétion n'a présenté aucune difficulté d'interprétation et les candidats ont très bien justifié les pistes électrophorétiques à utiliser pour déterminer la masse moléculaire de la MAPK considérée. En revanche, nous avons été fort surpris par le fait que certains candidats n'ont aucune notion de la masse relative de certains atomes : l'iode 125 est pour certains à l'origine de la différence de masse de 18 kDa entre Trk et Trk lié au NGF radiomarqué. De même, nous n'avons pas compris pourquoi certains candidats ont considéré la « tyrosine phosphorylée » comme une protéine kinase co-immunoprécipitant avec le récepteur du NGF et/ou responsable de la phosphorylation de Trk.

#### **Questions A.5.1 à A.5.2 et A.6.**

Dans cette dernière partie étaient illustrés les effets sélectifs du NGF et de l'EGF sur la différenciation neuronale des cellules PC12. L'information essentielle résidait dans la cinétique d'activation de la MAPK de 45 kDa étudiée précédemment : en présence de NGF, la MAPK est maintenue sous son état phosphorylé pendant plus de 3 heures, alors qu'en présence d'EGF, l'activation n'est que transitoire. L'interprétation de ces données ne présentait aucune difficulté et un bon nombre de candidats a remarqué que la phosphorylation de la MAPK sur une tyrosine était en étroite corrélation avec son activité enzymatique de type sérine/thréonine kinase. En revanche, les hypothèses pouvant expliquer les effets de l'EGF après surexpression de son récepteur dans les cellules PC12 sont souvent mal formulées ou incomplètes. L'analyse du document de microscopie par fluorescence permettant de déterminer la localisation de la MAPK dans les différentes lignées cellulaires est souvent dépourvue de commentaires sur les cellules contrôles qui ne sont soumises à aucune stimulation. Enfin, les bilans demandés sous forme de schémas sont le plus souvent incomplets : acides aminés phosphorylés, effet temps, effet quantitatif... ou faux : rien n'indiquait une liaison de l'EGF sur le récepteur spécifique du NGF – qui entrerait en contradiction avec les résultats des expériences de compétition décrites dans la question A3 – ou encore une activation par phosphorylation du récepteur de l'EGF.

### **Partie B - Question de cours**

#### **Généralités**

Cette question de cours, très largement d'actualité, a été abordée par une grande majorité des candidats mais s'est révélée être traitée de manière très peu satisfaisante. Très peu de candidats ont pensé à établir des comparaisons entre virus en termes d'organisation structurale, de cycles de multiplication et de régulation ainsi que nous l'attendions. Les monographies virales ne présentaient que très peu d'intérêt et ont été sanctionnées dans la notation de la forme de l'exposé. Les exemples classiquement traités ont été ceux des bactériophages T4 et lambda, ainsi que celui du VIH (virus

très largement décrit en classe de terminale). Les candidats ont souvent des connaissances très confuses en virologie et beaucoup d'entre eux méconnaissent la diversité des virus. De nombreux candidats écrivent « le » bactériophage comme s'il n'en existait qu'une seule espèce, confondent le phage lambda et le phage T4 qu'ils croient également tempéré, assimilent lysogénie et intégration des rétrovirus, ignorent que la réplication de la très grande majorité des virus à ARN ne passe pas par une étape de transcription inverse, ont l'idée fausse que le VIH infecte les bactéries... Ce sujet de virologie a également donné aux candidats l'occasion de montrer que leurs connaissances en biologie moléculaire demeurent encore insuffisantes. Enfin, les schémas sont dans l'ensemble extrêmement peu soignés.

### **Remarques spécifiques**

Dans une première partie, il était nécessaire de décrire, de façon comparative, les caractéristiques structurales des virus et leur constitution biochimique. En particulier, nous attendions des commentaires sur la capsidie des virus et sur les éléments qui constituent l'enveloppe lorsque celle-ci est présente (virus enveloppés). Le rôle de ces différentes structures devait être évoqué : protection du génome viral, interaction spécifique avec la cellule hôte, tropisme... Très peu de candidats ont en effet mentionné l'interaction VIH / lymphocytes T / macrophages par le biais de la glycoprotéine de surface du VIH (gp120) et de la molécule CD4. La taille des virus, bien qu'abordée pour le bactériophage T4 ou lambda, est totalement méconnue des candidats dans le cas du VIH. La description des éléments internes des virus s'est souvent limitée à la caractérisation de l'acide nucléique constitutif des bactériophages T4 et lambda ainsi que du VIH. De très rares candidats ont évoqué la diversité importante des génomes viraux : ADN, ARN de polarité positive ou négative, segmenté ou non... Souvent, les expériences de Hershey et Chase ont été citées afin de montrer que l'ADN est le support de l'information génétique, ce qui n'était pas du tout l'optique attendue pour ce type de sujet. Nous déplorons également la méconnaissance des candidats quant aux protéines codées par le génome viral. Enfin, l'équipement enzymatique des virus semble se limiter pour la plupart des candidats à la transcriptase inverse dans le VIH alors que le lysozyme (bactériophages), la neuraminidase (virus de la grippe) sont d'autres enzymes contenues dans les virus et indispensables au cycle de multiplication viral. A la fin de cette partie, une définition claire des virus devait être proposée.

Dans une seconde partie, en relation avec la structure des virus, nous attendions une description des cycles de multiplication virale que le candidat pouvait exposer selon un plan chronologique : interaction virus / cellule cible, pénétration dans la cellule, synthèses protéiques et réplication de l'information génétique, assemblage et libération de nouvelles particules virales. Certains candidats, en s'appuyant sur l'exemple du bactériophage T4, ont considéré que l'abandon de la capsidie à l'extérieur de la cellule cible est un phénomène universel. Rares sont les candidats qui savaient que l'enveloppe externe du VIH fusionne avec la membrane plasmique des lymphocytes T et des macrophages conduisant à la libération du corps viral dans le cytoplasme de la cellule, dans lequel a lieu la transcription inverse de l'ARN viral. Le cycle lytique du bactériophage utilisé comme exemple est généralement correctement développé et bien illustré. Nous aurions toutefois aimé voir apparaître dans les copies la notion de synthèse protéique séquentielle : des protéines « précoces » sont synthétisées très rapidement après le début de l'infection, elles sont nécessaires à la réplication de l'information génétique, des protéines « tardives » incluant les protéines structurales constitutives de la capsidie du virus, sont synthétisées plus tardivement au cours du cycle de multiplication. Le cycle de multiplication du VIH a été décrit de manière très fantaisiste dans de nombreuses copies : on a pu lire que l'ARN libéré assure directement la synthèse des protéines constitutives du virus, que l'ARN viral est copié en ADNc puis répliqué et transcrit, qu'une fois l'ARN viral entré dans le lymphocyte T, l'ADN cellulaire est dégradé... Là encore, nous notons la méconnaissance des candidats quant à la biologie de ce virus dont trois étapes-clés devaient être évoquées : la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN par la transcriptase inverse, l'intégration de l'ADNc double brin dans l'ADN de l'hôte par l'intégrase, la transcription de l'ADNc intégré permettant la synthèse des protéines virales.

Enfin, dans un troisième temps, devait être abordée la régulation des cycles de multiplication comme une stratégie originale de réplication virale. La possibilité pour le bactériophage lambda d'entraîner un cycle lytique ou de lysogéniser la bactérie hôte a été particulièrement développée même si les aspects moléculaires contrôlant ces deux phénomènes n'ont jamais été décrits par les candidats. Toutefois, il est à noter que le bactériophage lambda ne lysogénise pas obligatoirement la bactérie avant de démarrer son cycle lytique. Nous tenons également à rappeler que le stade proviral du VIH ne correspond en aucun cas à un état « dormant » dans lequel le virus demeurerait pendant de nombreuses années avant de pouvoir s'exprimer et induire une pathologie.

En conclusion, les meilleures copies sont celles dans lesquelles transparait un réel effort de réflexion et de présentation comparative des virus tant sur le plan structural que sur le plan fonctionnel.

## Partie B – Sujet avec documents

### Généralités

Ce deuxième sujet avec documents se voulait être discriminant compte tenu de sa relative difficulté. Cet exercice quelque peu original dans sa forme faisait appel à des connaissances de base en biologie moléculaire et en enzymologie. La réaction chimique élémentaire intervenant dans la polymérisation de l'ADN est une réaction d'estérification entre le groupement -OH libre à l'extrémité 3' de l'ADN et le groupement phosphate en 5' d'un désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP) :



Elle se devait d'être connue de l'ensemble des candidats et permettait de réaliser une grande partie du devoir. A notre grande surprise, nous avons constaté que cette réaction (normalement détaillée dans les chapitres concernant la réplication de l'information génétique ou, sous une forme un peu différente, la transcription) n'était maîtrisée que par de très rares candidats, rendant l'exercice d'autant plus difficile et par là même peu abordé.

### Remarques spécifiques

#### Questions B.2.1 à B.2.3.

L'ensemble de ces questions avait pour objectif de faire raisonner les candidats sur le thème des mutants de la transcriptase inverse du VIH résistants à un traitement par les analogues de désoxyribonucléosides (AZT, d4T, 3TC, ddN). Il était précisé aux candidats la structure de ces dérivés nucléosidiques ainsi que la voie métabolique probable de l'activation de ces composés.

La première question (B.2.1.a) a été particulièrement décevante dans la mesure où beaucoup de candidats ont considéré que la cible virale des analogues de désoxyribonucléotides était la matrice ARN ou la chaîne d'ADN en formation. Du fait de la méconnaissance de la réaction de polymérisation de l'ADN, et de l'absence d'analyse du document B.1, peu de candidats ont compris le mode d'action de ces analogues, à savoir qu'il s'agit de composés terminateurs de chaîne. Ce sont des analogues des substrats naturels reconnus par la polymérase virale et incorporés dans l'ADN en cours de formation ; mais l'absence de fonction OH en 3' du ribose de ces analogues ne permet plus l'élongation de l'ADN viral, bloquant ainsi la réplication du virus. A partir du document B.2, dont le commentaire est presque toujours resté très insuffisant, les candidats devaient voir qu'une infection virale par le VIH se décompose en trois phases : la phase initiale symptomatique, la phase asymptomatique et la phase de SIDA déclaré. Le traitement antiviral mis en œuvre est efficace dans les tous premiers temps de l'infection, permettant une lutte efficace contre le virus, mais l'émergence de variants résistants à l'analogue de nucléoside atténue ensuite considérablement l'efficacité du traitement, conduisant inéluctablement à une issue fatale, comme dans le cas d'un individu n'ayant subi aucun traitement.

Concernant la caractérisation enzymatique de mutants de la transcriptase inverse, certains candidats ne connaissent manifestement pas les méthodes d'obtention de la courbe de vitesse initiale ( $V_i$ ) en fonction de la concentration en substrat (S), ni la signification des constantes d'inhibition ( $K_i$ ), qui étaient essentielles à l'interprétation du tableau B2. Nous reprochons également à l'ensemble des candidats de manquer de sens critique quant à la significativité des différences observées dans la mesure des efficacités catalytiques d'incorporation des nucléotides naturels à l'extrémité d'un oligonucléotide par plusieurs mutants de la transcriptase inverse. L'interprétation de la structure cristallographique du complexe transcriptase inverse / nucléotide et les hypothèses formulées pour expliquer la moindre réactivité des analogues vis-à-vis des mutants de l'enzyme ont été très souvent incomplètes, vagues ou très générales, sans référence réelle à la structure présentée. Très peu de candidats ont pensé à commenter ou à discuter séparément l'impact de chacune des mutations sur l'incorporation des analogues nucléotidiques antiviraux.

La partie B.2.3. a été très mal comprise. Rares sont les candidats à avoir identifié la « bande T » de l'électrophorèse comme correspondant à l'amorce ADN allongée de trois désoxyribonucléotides normaux et terminée par de l'AZT ou du d4T. La réaction mise en jeu après addition de pyrophosphate était la réaction inverse de la polymérisation de l'ADN, c'est-à-dire l'excision du terminateur de chaîne, permettant le déblocage de l'amorce terminée par l'analogue de nucléotide. S'ensuivait une reprise de l'élongation de l'amorce par les nucléotides naturels (apparition de produits de taille supérieure à 25 nucléotides). Cette réaction représente un mécanisme possible de résistance du virus à certains agents antirétroviraux et pourrait jouer un rôle important *in vivo* (concentration locale en pyrophosphate forte). Malgré cela, les candidats ont globalement tenté de décrire les figures afin de glaner quelques points mais les commentaires se sont révélés très peu satisfaisants.

### Questions B.3.1 à B.3.3

La partie B.3, peu abordée par les candidats, avait pour objectif d'expliquer que l'échec des thérapies antirétrovirales basées sur l'utilisation exclusive des analogues de nucléosides résulte également en partie d'une résistance cellulaire à l'activation des analogues nucléosidiques, activation par phosphorylation jusqu'au stade triphosphate mettant en jeu les kinases de la voie de récupération des nucléotides ou « salvage pathway ». Les résultats des expériences de chromatographie des nucléosides phosphorylés ont été très mal interprétés. Certains candidats ont confondu le temps de rétention de chacune des formes phosphorylées des analogues de nucléosides (intrinsèque à la technique de chromatographie) et le temps nécessaire pour assurer les phosphorylations séquentielles de ces analogues. Ainsi certains candidats n'ont absolument pas compris que certaines étapes de phosphorylation étaient difficiles à réaliser, limitant la biodisponibilité de l'analogue triphosphate dans la cellule.

Les questions de la partie B.3.2 avaient pour but de tester la capacité des candidats à élaborer leurs réponses à partir des informations les plus pertinentes et représentatives qu'ils pouvaient extraire d'un tableau de valeurs particulièrement complet. Il apparaît que cet ensemble de questions a toujours été traité très superficiellement, en commentant l'effet général de la modification des analogues en 3' du ribose, sans prendre la peine d'analyser les résultats obtenus pour les divers analogues et les différentes kinases des compartiments cytosolique et mitochondrial. Une telle analyse aurait facilité l'identification de l'étape qui apparaît cinétiquement limitante dans l'activation de chaque analogue.

Enfin, la question B.3.3, bien que ne présentant pas de difficulté, n'a été que très peu abordée. L'analyse de l'expression des gènes codant trois des kinases de la voie de récupération des nucléotides montrait une réduction de la quantité d'ARNm codant la thymidine kinase (enzyme responsable de la première étape de phosphorylation des nucléosides) en présence d'AZT. Des expériences de digestion de l'ADN correspondant par des enzymes de restriction mettaient en évidence une modification du gène par méthylation (certainement dans la zone promotrice), limitant son accessibilité aux facteurs de transcription et/ou à l'ARN polymérase.

### **Questions B.4.1 à B.4.3**

Dans cette partie, le principe de la fluorescence a été très rarement décrit de façon claire et exacte. De nombreux candidats connaissent les acides aminés qui émettent de la lumière par fluorescence, à l'exception de l'histidine qui n'en émet pas, erreur fréquemment retrouvée dans les copies. L'analyse cinétique demandée dans cette partie, bien que difficile en apparence, se ramenait à une interprétation simple de type cinétique de Michaelis. Certains candidats ont tracé la courbe demandée mais son interprétation est apparue très aléatoire. Nous avons noté et ne pouvons que déplorer la grande faiblesse des candidats en matière de cinétique enzymatique : signification d'une courbe de saturation hyperbolique, notions de constante cinétique maximum et de constante de dissociation. L'étude structure-fonction proposée s'est pour beaucoup limitée à la définition (incomplète) d'une liaison hydrogène.

En conclusion, les candidats montrent de réelles difficultés à extraire les informations essentielles et significatives au sein d'un ensemble de données, ce qui nuit fortement à l'interprétation des résultats. De nombreux candidats ont cherché à analyser des différences manifestement peu significatives. Enfin, une meilleure justification des réponses et des résultats de calculs présentés avec des unités correctes est absolument primordiale.