

SESSION 2003

Filière BCPST

BIOLOGIE

Epreuve commune aux ENS de Paris, Lyon et Cachan

Durée : 6 heures

L'usage de calculatrices électroniques de poche à alimentation autonome, non imprimantes et sans document d'accompagnement, est autorisé. Cependant, une seule calculatrice à la fois est admise sur la table ou le poste de travail, et aucun échange n'est autorisé entre les candidats.

Tournez la page S.V.P.

Thème de l'épreuve : les **PHOSPHORYLATIONS**

Le sujet qui vous est proposé est divisé en deux parties totalement indépendantes identifiées par les lettres A et B. Vous pouvez les aborder dans l'ordre de votre choix. Les documents se rapportant à chacune des questions sont repérés par la même lettre que la partie du sujet à laquelle ils correspondent.

Il sera particulièrement tenu compte de la clarté et de la concision des réponses, de la qualité et de la précision des schémas.

Il est fortement recommandé aux candidats de bien gérer leur temps de composition afin de pouvoir aborder les deux parties du sujet. A titre tout à fait indicatif, des temps sont proposés pour chacun des chapitres à traiter.

Partie A : 1er sujet avec documents (Durée conseillée 3 h)

Ce sujet comporte une partie A.1 de type « Sujet de Synthèse » faisant appel aux connaissances et aux qualités rédactionnelles du candidat.

Au cours du développement du système nerveux, le réseau de neurones est mis en place et modelé sous l'action de facteurs de l'environnement : facteurs diffusibles comme les hormones, les cytokines et les facteurs de croissance.

Les cellules précurseurs des neurones prolifèrent au niveau de zones germinatives. Sous l'action de signaux extracellulaires, certains précurseurs cessent de se multiplier, et s'engagent vers un processus de *différenciation*. Ce phénomène consiste en l'acquisition des propriétés biochimiques (comme l'expression de certains enzymes et récepteurs spécifiques), morphologiques (comme l'extension d'axones et de dendrites, ou neurites) et électrophysiologiques (comme la capacité à générer un potentiel d'action) qui permettront à la cellule de remplir sa fonction neuronale. Progressivement, les cellules précurseurs qui commencent à se différencier, étendent en direction de leur cible de fins prolongements qui sont guidés sous l'effet attracteur ou répulsif de divers facteurs extracellulaires. Une fois leur cible atteinte, les neurones soit se différencient au niveau biochimique, s'intègrent dans le réseau neuronal en stabilisant leurs connexions avec les autres cellules, soit sont éliminés, le cas échéant, par mort cellulaire.

Le *nombre* de cellules qui composent le réseau neuronal est contrôlé par des facteurs solubles qui modulent la prolifération des cellules précurseurs des neurones et la survie des neurones plus matures. Le *devenir* des cellules, c'est-à-dire l'engagement vers la différenciation ou vers la mort cellulaire, est aussi contrôlé par des facteurs solubles, provenant de leur cible ou de leur environnement.

A-1. Signalisation inter- et intracellulaire (Durée conseillée 45 min)

De la reconnaissance d'un signal extracellulaire à la réponse biologique de la cellule.

A partir d'un exemple de votre choix, vous vous attacherez notamment à caractériser les mécanismes moléculaires et événements intracellulaires qui mènent de la reconnaissance du signal à la réponse de la cellule.

A-2. Caractérisation d'un facteur de croissance *in vivo*.

A-2.1. Des ganglions nerveux de poulet ont été isolés et incubés en présence d'extraits de glande salivaire de souris adultes. La formation d'un halo dense autour du ganglion correspond à la stimulation de la croissance des neurites des cellules nerveuses formant le ganglion (Document A.1)

Afin d'identifier les facteurs, contenus dans l'extrait de glande salivaire de souris adulte, responsables de la stimulation de l'extension neuritique (effet neurotrophique), on effectue trois étapes successives de purification de cet extrait et on obtient trois fractions : CM-1, CM-2 et CM-3.

Comment procéderiez-vous pour tester l'activité neurotrophique de ces fractions ?

A-2.2. On injecte quotidiennement pendant 12 jours la fraction purifiée CM-3 à des souriceaux nouveau-nés et à des souris adultes. Des animaux contrôles sont injectés avec du liquide physiologique dans les mêmes conditions (Tableau A1).

		Ganglions nerveux		Fibres nerveuses	
		Volume cellulaire (% du contrôle)	Nombre de neurones (% du contrôle)	Epaisseur des neurites	Densité de neurites
Souriceaux	Contrôles	100	100	n.d.	n.d.
	+ CM-3	410	250	n.d.	n.d.
Souris adultes	Contrôles	100	100	-	-
	+ CM-3	200	100	+++	+++

Tableau A1 : Effets de l'injection quotidienne de la fraction CM-3 sur le développement des ganglions nerveux et des fibres nerveuses chez le souriceau et chez la souris adulte. n.d. : non déterminé.

Quels effets induit la fraction CM-3 sur le développement des cellules nerveuses chez le souriceau ? Chez l'adulte ? Selon vous, quels événements cellulaires pourraient rendre compte de l'effet observé sur le nombre de cellules nerveuses ganglionnaires chez le souriceau ?

A-2.3. L'activité mitotique des cellules ganglionnaires de souriceaux nouveau-nés injectés quotidiennement avec du CM-3 pendant 9 jours est mesurée en comptant le nombre de cellules mitotiques sur des coupes de ganglion nerveux (Tableau A2).

Age	1 jour	3 jours	5 jours	7 jours	9 jours
Contrôles	140	170	180	180	50
Injection CM-3	140	250	400	250	50

Tableau A2 : Nombre de cellules présentant des figures mitotiques dans les ganglions nerveux de souriceaux nouveau-nés injectés ou non par du CM-3.

Commentez l'effet de l'injection de la fraction CM-3 sur l'activité mitotique des cellules des ganglions nerveux de souriceaux.

A-2.4. Le principe actif contenu dans la fraction CM-3 responsable de l'effet neurotrophique est appelé Nerve Growth Factor ou NGF. Les auteurs ont injecté la fraction CM-3 à des lapins et ont obtenu un sérum contenant des anticorps dirigés contre le NGF.

- a.** *Par quelle expérience démontreriez-vous que ces anticorps sont dirigés contre le NGF ?*

Ce sérum anti-NGF est injecté quotidiennement pendant 20 jours à des souriceaux nouveau-nés. Des souriceaux contrôles sont injectés dans les mêmes conditions avec du sérum de lapin normal. Les ganglions nerveux d'animaux traités et contrôles sont disséqués et étudiés. Le document A.2 présente les résultats obtenus lorsque la dissection est réalisée plusieurs semaines après le traitement. Des résultats similaires sont obtenus lorsque la dissection est réalisée juste après le traitement.

- b.** *Caractérisez l'effet des sera utilisés.*

- c. *Que signifie l'observation, chez les animaux traités, d'une morphologie ganglionnaire similaire juste après le traitement ou plusieurs semaines après la fin du traitement ?*

A-3. Caractérisation du récepteur du Nerve Growth Factor.

A-3.1. Des études préliminaires visant à caractériser la signalisation intracellulaire initiée par le NGF ont conduit au clonage d'un ADN complémentaire (ADNc) codant une protéine tyrosine kinase de 140 kDa, appelée Trk. Cette protéine appartient à la même famille que le récepteur de l'insuline. Afin de préciser le rôle de cette protéine, l'ADNc codant Trk a été introduit par transfection dans une lignée cellulaire appelée L. On obtient alors la lignée cellulaire L-Trk. Les cellules L et L-Trk, cultivées en présence ou en l'absence de NGF, sont lysées et les ARN totaux sont extraits. Les ARN sont séparés selon leur taille par électrophorèse et transférés sur une membrane, où ils sont hybridés avec l'ADNc radiomarqué de Trk (Document A.3).

Interprétez ces résultats. Pourquoi a-t-on choisi les cellules L pour la transfection ?

A-3.2. Les cellules L et L-Trk sont incubées pendant 2 heures à 4°C avec du NGF radiomarqué à l'iode 125 ($[^{125}\text{I}]\text{-NGF}$), en présence ou en l'absence d'un excès de NGF non radiomarqué. Le NGF radioactif non lié est ensuite éliminé par plusieurs lavages. Les cellules sont lysées et la radioactivité associée aux cellules est mesurée (Tableau A3).

	$[^{125}\text{I}]\text{-NGF}$	$[^{125}\text{I}]\text{-NGF} + \text{NGF}$
Cellules L	0,1	0,1
Cellules L-Trk	4,5	0,1

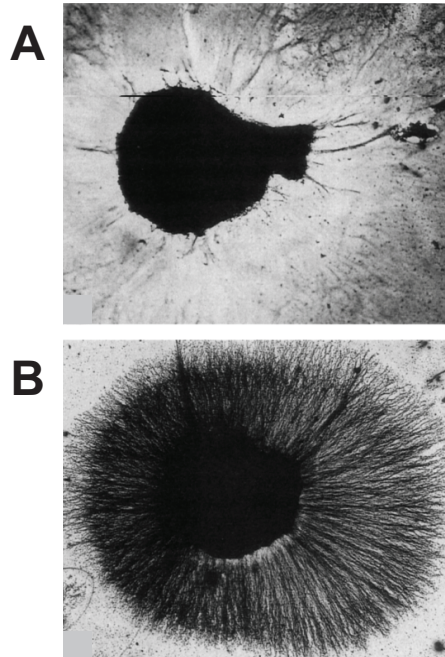
Tableau A3 : Liaison du NGF radiomarqué aux cellules L et L-Trk en culture, exprimée en coups.min⁻¹ ($\times 10^{-4}$) et pour 10^5 cellules.

- a. *A quoi correspond la radioactivité liée aux cellules L et L-Trk ?*
- b. *Comment expliquez-vous la diminution de radioactivité liée aux cellules L-Trk en présence d'un excès de NGF ?*
- c. *A partir des informations obtenues jusqu'ici, dégagez le rôle de la protéine Trk dans les cellules des ganglions nerveux.*

Dans une seconde expérience, on incube les cellules L-Trk avec du $[^{125}\text{I}]\text{-NGF}$ pendant 2 heures à 4°C en présence de concentrations croissantes en facteur de croissance NGF, EGF (Epidermal Growth Factor) ou NT3 (Neurotrophine-3). Après plusieurs lavages, la radioactivité associée aux cellules est mesurée. Pour chaque facteur de croissance, on obtient une courbe de déplacement de la liaison du NGF radiomarqué en fonction de la concentration du facteur de croissance (Document A.4).

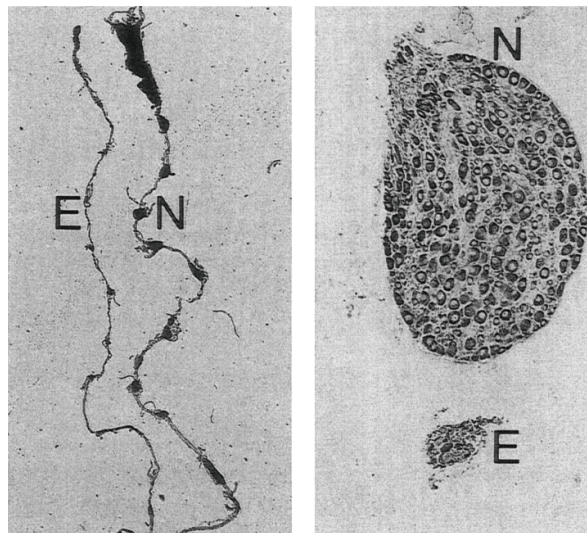
- d. *Déterminez pour chaque facteur de croissance, la concentration de ligand qui donne lieu à 50% de déplacement de la liaison du $[^{125}\text{I}]\text{-NGF}$ (IC_{50}). Que pouvez-*

Document A.1.



Réponse d'un ganglion nerveux embryonnaire de poulet aux extraits de glande salivaire de souris adulte. **A.** Ganglion nerveux cultivé 24 heures en l'absence d'extraits de glande salivaire. **B.** Ganglion nerveux cultivé pendant 24 heures en présence d'extraits de glande salivaire.

Document A.2.



Effet de l'injection d'anticorps anti-NGF sur la chaîne ganglionnaire nerveuse. **Gauche:** chaîne ganglionnaire nerveuse de souriceau nouveau-né injecté avec un sérum contenant des anticorps anti-NGF (E) ou avec un sérum de lapin contrôle (N). **Droite:** Coupe d'un ganglion nerveux de souriceau nouveau-né injecté avec un sérum anti-NGF (E) ou avec un sérum de lapin contrôle (N). Dans les deux cas, ces dissections sont réalisées plusieurs semaines après le traitement.