

Composition de Biologie BCPST2
Octobre 2020, extrait ENS 2014
Analyse de documents

Durée : 2 heures

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par des moyens autres que ceux fournis par le sujet est interdit.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur la copie et poursuit la composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

**A partir de l'exploitation des documents et de vos connaissances
étudiez l'hypertension artérielle**

Vous ne rédigerez ni introduction, ni conclusion.

Les réponses sont à donner directement sur le sujet, dans les cadres prévus à cet effet.

Quand cela sera explicitement demandé par une question, ou à votre initiative, il sera possible de légender, **annoter ou compléter un document**, directement sur le **sujet**.

Les résultats présentés sont issus d'expériences répétées au moins 3 fois. Les images choisies sont représentatives de l'ensemble des expériences. Concernant les données chiffrées les moyennes obtenues sont représentées sous forme de graphiques (leur valeur est écrite au-dessus de chaque barre d'histogramme) ; les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des différentes valeurs obtenues.

L'hypertension artérielle (HTA) touche 31% de la population adulte française. Cette pathologie est un problème de santé publique majeur car elle augmente fortement l'incidence d'infarctus du myocarde, d'insuffisance cardiaque et d'accidents vasculaires cérébraux.

Thème 1 : Etude pharmacologique d'un anti-hypertenseur

La **débrisoquine** est un médicament anti-hypertenseur dont la posologie doit être adaptée à chaque patient. L'étude de son métabolisme dans l'organisme révèle de fortes disparités entre individus. On peut distinguer quatre groupes : **des métaboliseurs lents, intermédiaires, rapides ou ultra-rapides**. La dose standard du médicament régule la pression artérielle de manière attendue uniquement chez les patients de type métaboliseurs rapides, qui représentent la majorité de la population. Elle n'a pas d'effet sur les métaboliseurs ultrarapides mais provoque une hypotension chez les métaboliseurs lents et intermédiaires. Dans l'organisme, la débrisoquine est inactivée par CYP2D6, enzyme codée par un gène polymorphe. L'activité de l'enzyme chez les quatre types de métaboliseurs peut être mesurée *in vitro* à partir de biopsies d'intestin grêle. Pour chaque individu, on incube une même quantité de tissu (exprimée en mg de protéines) en présence d'un substrat de l'enzyme dont la vitesse de transformation est mesurable (**figure 1**).

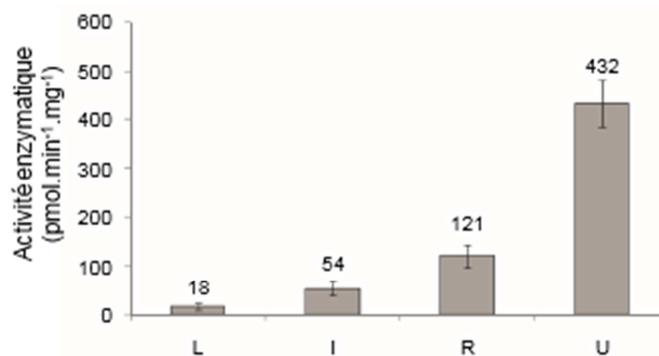


Figure 1 : Activité *in vitro* de CYP2D6 issue de biopsies d'individus appartenant aux quatre groupes de métaboliseurs : lents (L), intermédiaires (I), rapides (R) ou ultra-rapides (U). L'activité enzymatique correspond à la quantité de substrat transformée par unité de temps (pmol.min⁻¹) et est rapportée à la quantité de protéines tissulaires étudiée (en mg).

Question 1 :

a) Analysez et interprétez la figure 1.

b) Proposez des hypothèses permettant d'expliquer les différences d'activité de CYP2D6 observées chez les quatre types de métaboliseurs.

Les extraits protéiques réalisés à partir des biopsies sont soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et transférés sur une membrane. CYP2D6 est détectée grâce à deux anticorps spécifiques (**figure 2A**) couplés à une enzyme donnant un produit coloré en présence d'un substrat chromogène. L'actine est également immunodétectée (**figure 2B et C**).

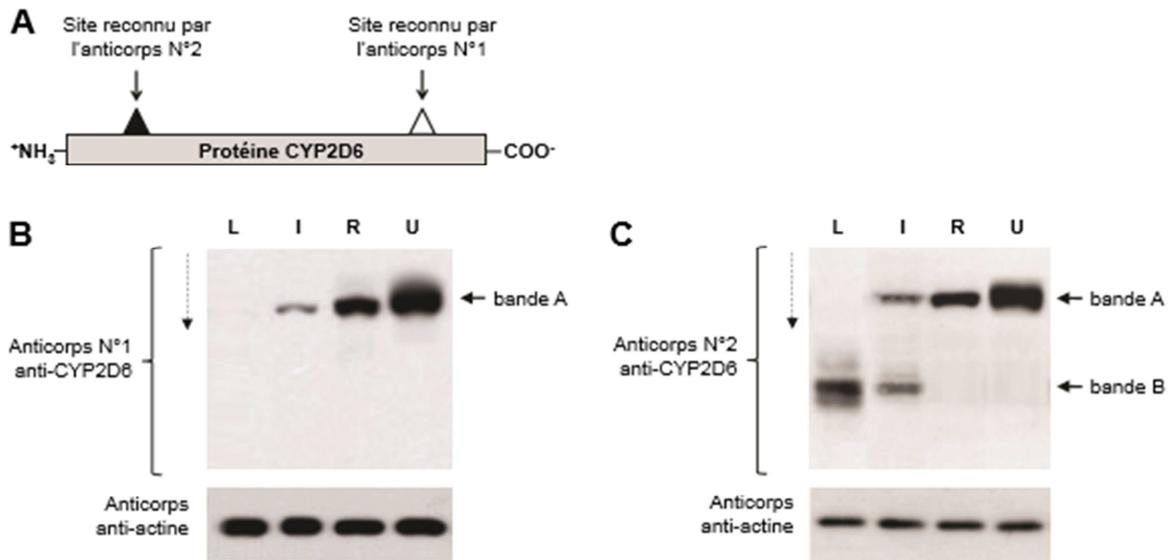


Figure 2 : A) Sites reconnus par les deux anticorps anti-CYP2D6. B) et C) Immunodétection sur membrane d'extraits protéiques réalisés à partir de biopsies provenant de métaboliseurs lents (L), intermédiaires (I), rapides (R) ou ultra-rapides (U). La nature des anticorps utilisés pour l'immunodétection est précisée à gauche de chaque membrane. La bande A correspond à la masse moléculaire attendue pour la protéine CYP2D6 codée par l'allèle le plus répandu. La flèche en pointillés indique le sens de migration des protéines lors de l'électrophorèse.

Question 2 :

- a) **Rappeler le nom de la technique utilisée dans cette expérience. Pourquoi détecte-t-on l'actine ? Analyser cette détection.**
- b) **Analysez et interprétez la figure 2.**
- c) **Confrontez ces résultats à ceux de la figure 1 et à l'effet du médicament sur les quatre types de patients étudiés.**

Trois expériences supplémentaires sont menées pour comprendre la particularité des métaboliseurs ultra-rapides.

Dans un premier temps, les ARNm sont extraits de biopsies de métaboliseurs rapides ou ultrarapides et soumis à une transcription inverse. Une amplification par PCR (polymerase chain reaction) est alors réalisée grâce à un couple d'oligonucléotides spécifique du gène CYP2D6 ou du gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), dont l'expression est invariable d'un individu à l'autre. Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose et les fragments d'ADN bicaténaire sont révélés grâce à la fluorescence d'un agent intercalant de l'ADN (**figure 3A**).

Dans un deuxième temps, l'ADN génomique est extrait des biopsies. Un fragment du gène de CYP2D6 est amplifié spécifiquement par PCR et révélé après migration dans un gel d'agarose (**figure 3B**). Le gène de l'albumine sert de contrôle.

Enfin, les cellules issues des biopsies sont déposées sur une lame de verre puis perméabilisées par l'ajout d'un détergent. Elles sont alors incubées avec une sonde d'ADN émettant une fluorescence verte complémentaire d'une séquence invariante du chromosome 22 (sur lequel se trouve le gène CYP2D6) et une sonde d'ADN émettant une fluorescence rouge complémentaire d'une séquence spécifique de CYP2D6. Les résultats de cette hybridation *in situ* sont visualisés par microscopie à fluorescence et présentés dans les **figures 3C et 3D**.

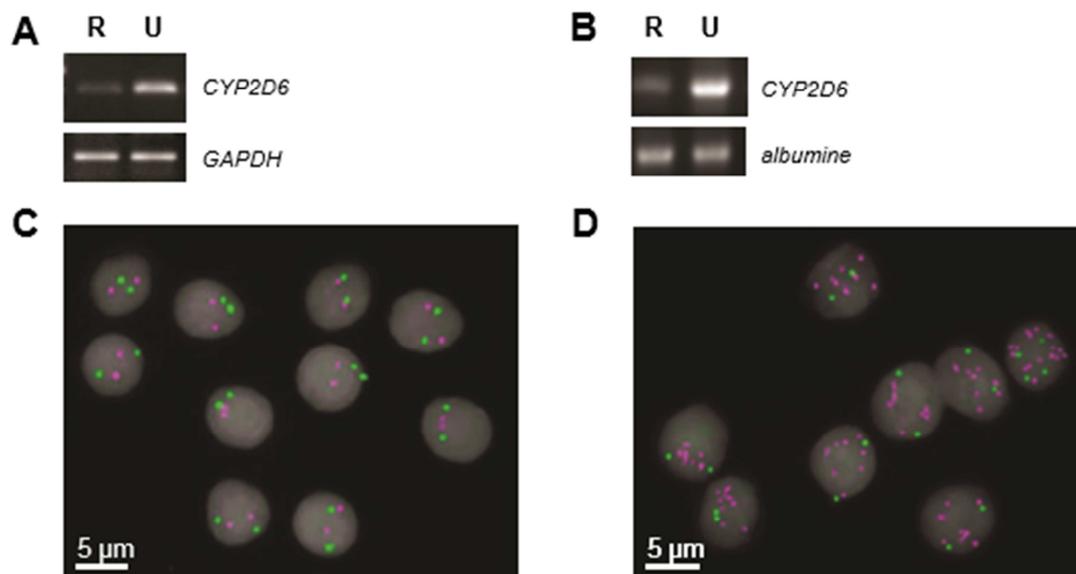


Figure 3 : A et B) Produits d'amplification obtenus à partir d'ARNm (A) et d'ADN génomique (B) de biopsies de métaboliseurs rapides (R) et ultra-rapides (U). La cible de la PCR est indiquée sur la droite. C et D) Hybridation *in situ* de sondes fluorescentes complémentaires d'une séquence invariante du chromosome 22 (verte) ou du gène CYP2D6 (rose) sur des cellules issues de biopsies d'un métaboliseur rapide (C) ou ultra-rapide (D). L'ADN est marqué par un agent intercalant fluorescent apparaissant en gris.

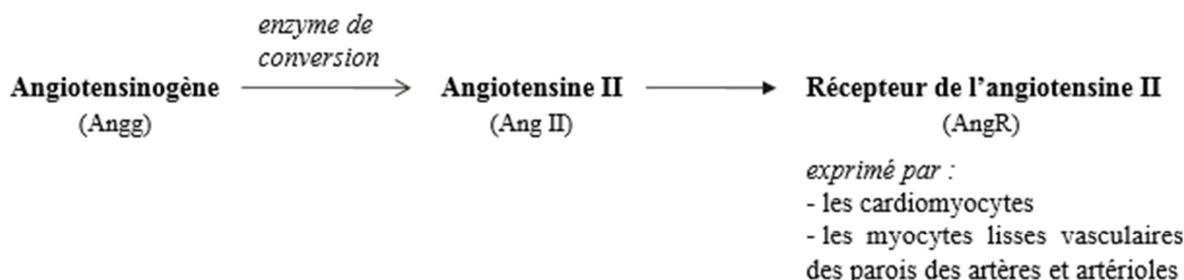
Question 3 :

a) Analysez et interprétez la figure 3.

b) Expliquez l'origine de l'absence de réponse des métaboliseurs ultra-rapides à la débrisoquine.

Thème 2 : Rôle de l'angiotensine ii dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse de l'HTA sont multiples et mal connus. Plusieurs études montrent que l'angiotensine II (Ang II) et/ou son récepteur (AngR) jouent un rôle clé dans cette pathologie. L'Ang II est une hormone peptidique dérivée de la transformation enzymatique d'un précurseur, l'angiotensinogène (Angg) :



On dispose d'une lignée de souris développant spontanément à deux mois une HTA dont on ne connaît pas la cause (souris SH). On se propose d'étudier l'implication de l'Ang II dans le phénotype de ces souris. Dans une première série d'expériences, on dose l'Ang II dans le plasma de souris sauvages (Wild Type, WT) et de souris SH (**figure 4 A**). On mesure également la pression artérielle de ces souris après injection par voie intraveineuse d'un inhibiteur pharmacologique spécifique d'AngR, le candesartan (**figure 4 B**).

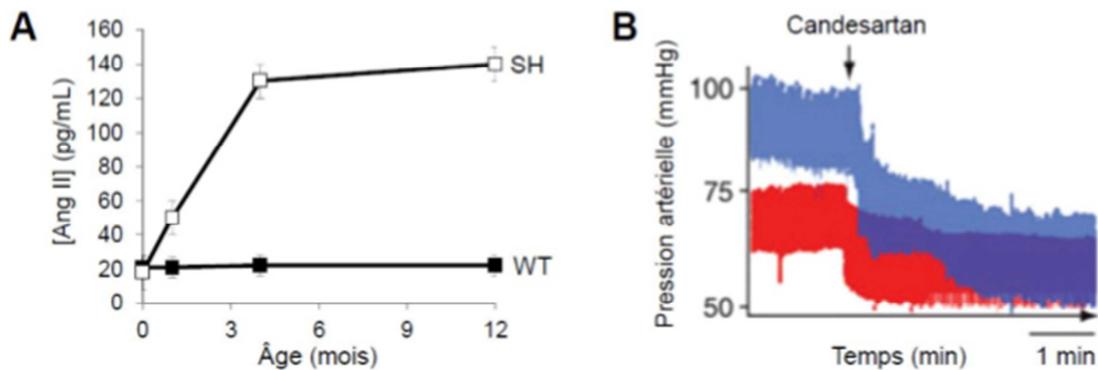


Figure 4 : A) concentration plasmatique en Ang II des souris WT (carré noir) et SH (Carré blanc) en fonction de leur âge. B) Evolution de la pression artérielle de souris WT (en rouge) et SH (en bleu), âgées de 4 mois, avant et après injection de candesartan (au niveau de la flèche).

Question 4 : Analysez et interprétez la figure 4.

La fixation d'Ang II sur AngR en surface des cellules musculaires lisses vasculaires active la production d'un messager hydrophobe à action locale appelé 12-HETE, grâce à une réaction catalysée par la 12lipoxygénase (12-LOX).

On étudie l'effet de l'Ang II sur des artérioles rénales de rat. Elles sont perfusées pendant 10 minutes avec du sang contenant de l'Ang II, du 12-HETE, un inhibiteur spécifique de la 12-lipoxygénase (12LOXInh), ou de l'Ang II supplémentée de cet inhibiteur. On mesure ensuite le diamètre final de l'artériole (**figure 5**).

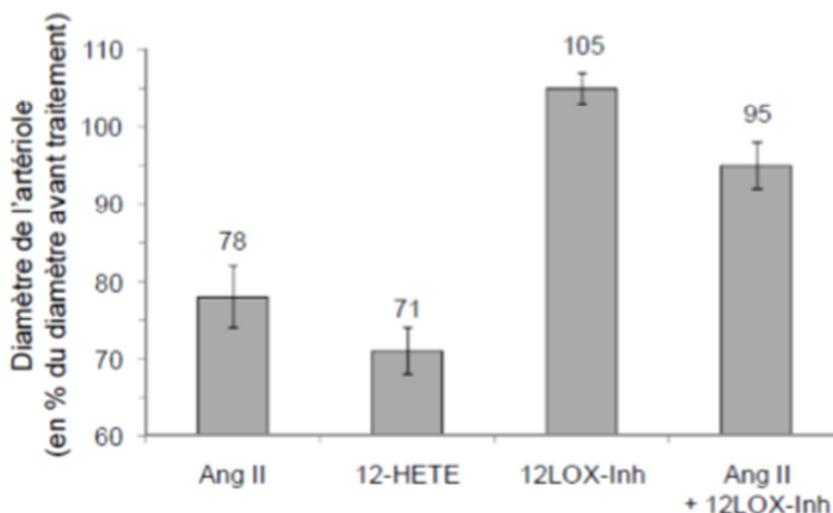


Figure 5 : Effet de l'Ang II, du 12-HETE, de 12LOX-Inh, ou de l'association de l'Ang II et de 12LOX-I (Ang II + 12LOX-Inh) sur le diamètre d'artérioles rénales de rat. Les résultats sont représentés en pourcentage du diamètre de l'artériole avant traitement.

Question 5 :

- a) Analyser l'effet de AngII et 12-HETE sur le diamètre des artères.
- b) Pourquoi teste-t-on l'effet du 12 LOX-Inh, que pouvez-vous conclure de son effet sur le diamètre des artérioles.
- c) Analyser et interpréter l'effet de l'ANgII + 12 LOX-Inh.

Par ailleurs, les effets cellulaires et moléculaires du 12-HETE sont étudiés sur une lignée de cellules musculaires lisses vasculaires humaines dont on possède deux variants :

- 1) une lignée sauvage (WT),
- 2) une lignée dépourvue de canaux calciques de la membrane plasmique (lignée CaL⁻).

L'entrée de calcium dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines entraîne leur contraction. On transfecte ces deux lignées avec un plasmide permettant l'expression de l'aequorine, une protéine qui émet un photon lorsqu'elle lie des ions calcium. Les cellules sont cultivées dans un milieu de composition proche de celle du liquide extracellulaire *in vivo* et traitées avec du 12-HETE puis avec un détergent doux perméabilisant la membrane, la digitonine. On mesure en temps réel l'émission de photons par l'aequorine (figure 6).

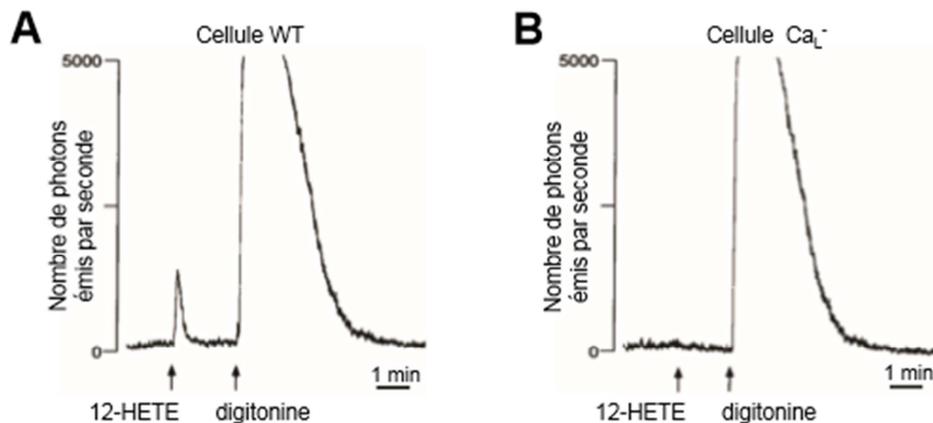


Figure 6 : Comptage au cours du temps des photons émis par une cellule WT (A) ou CaL⁻ (B) exprimant l'aequorine, incubée en présence de 12-HETE puis de digitonine.

Question 6 :

- a) Expliquer le principe expérimental de l'expérience. Que teste-t-on en incubant les cellules avec de la digitonine.
- b) Analyser les résultats obtenus à la figure 6.

Question 7 :

En vous appuyant sur les figures 4, 5 et 6, proposez un modèle expliquant les causes de l'HTA chez les souris SH de l'échelle moléculaire à l'échelle physiologique. Réalisez un schéma bilan du modèle.

Thème 3 : conséquences de l'hypertension artérielle sur le cœur

Les cœurs de souris WT ou de souris SH âgées de 4 mois sont prélevés et analysés à l'échelle macroscopique (**figure 7**) ou microscopique (**figure 8**).

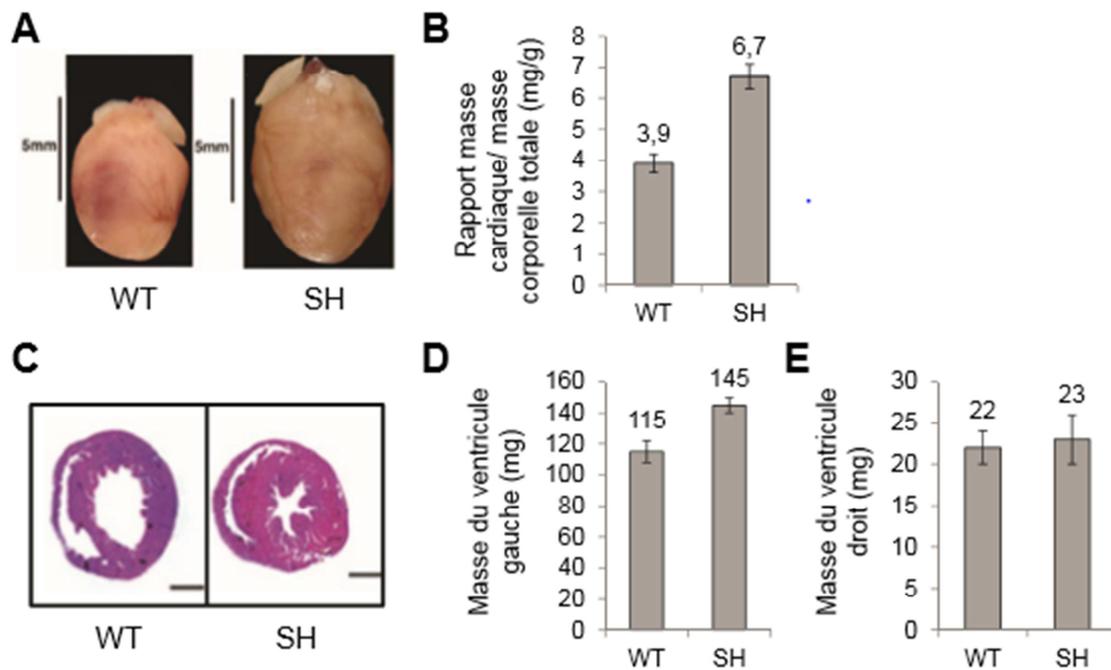


Figure 7 : A) Photographies de cœurs isolés de souris WT ou SH. L'échelle est indiquée à gauche de chaque photographie. B) Les souris WT et SH ainsi que leurs cœurs sont pesés et le rapport masse cardiaque sur masse corporelle (en mg/g) est calculé. C) Des coupes histologiques transversales réalisées au niveau des ventricules des cœurs de souris WT ou SH sont marquées par un colorant rose/mauve. Barre d'échelle : 1,2 mm. D et E) Masse des ventricules gauches (D) et droits (E) (en mg) de cœurs de souris WT et SH.

Question 8 : Expliquer pourquoi en B, les résultats sont ramenés en masse corporelle. Analysez et interprétez la figure 7

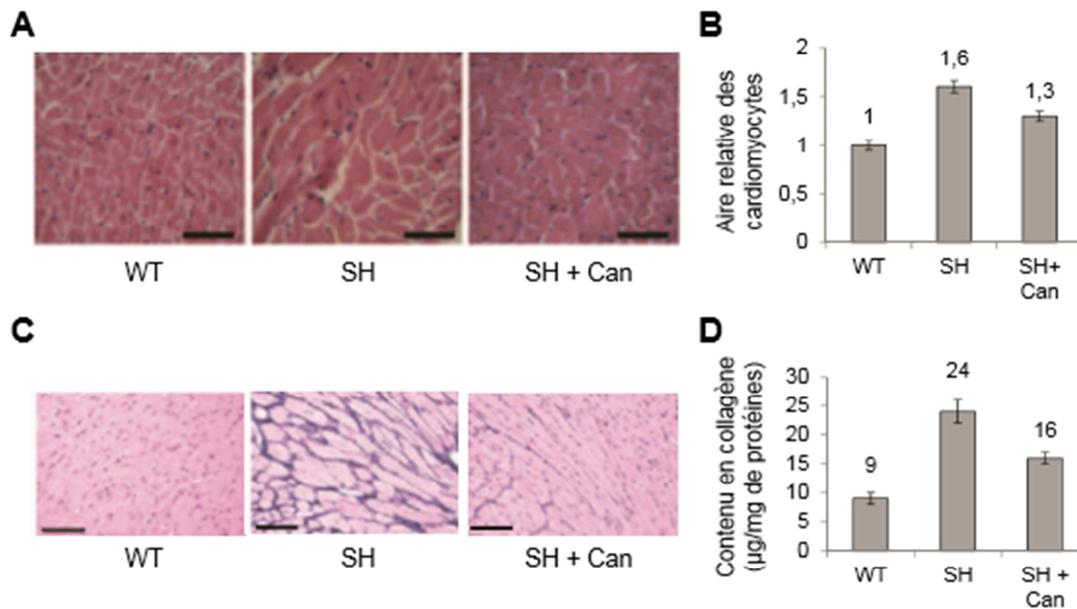


Figure 8 : A et C) Coupes histologiques de ventricules gauches de souris âgées de 4 mois WT, SH ou de souris SH traitées pendant 5 semaines par du candesartan (SH+Can). Des coupes non représentées sur cette figure ont également été réalisées sur des souris WT traitées au candesartan pendant 5 semaines. Les images obtenues sont identiques à celles des souris WT pour chaque type de marquage.

A) Les coupes sont incubées avec un colorant marquant en rouge le cytoplasme des cellules et en bleu les noyaux. Barre d'échelle : 30 µm.

B) L'aire relative des cardiomyocytes est quantifiée dans les 3 types de souris.

C) Les coupes sont colorées à l'aide d'un colorant marquant en violet les fibres de collagène. Barre d'échelle : 100 µm.

D) Contenu en collagène d'extraits de ventricule gauche de chaque type de souris (exprimé en µg de collagène/ mg de protéines tissulaires).

Question 9 :

a) Analysez et interprétez la figure 8.

b) Proposez des hypothèses permettant d'expliquer l'effet du candesartan sur le cœur des souris SH.

c) En considérant que le cœur de patients atteints d'HTA présente des altérations analogues à celles des souris SH, quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous faire pour expliquer la défaillance cardiaque progressive observée chez ces patients.

Pour expliquer les mécanismes responsables des altérations cardiaques observées lors d'une HTA, on utilise un modèle expérimental original. On réalise une constriction aortique chirurgicale (notée CA) chez des souris WT : un fil de suture est serré autour de l'aorte de manière à diminuer son rayon (**figure 9**).

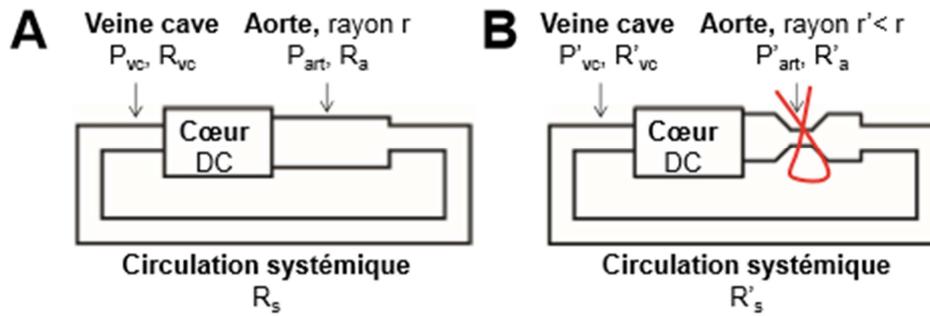


Figure 9 : Modélisation de la circulation sanguine systémique sans (A) ou avec (B) constriction aortique. L'exposant «'» se réfère aux valeurs des grandeurs considérées après constriction aortique :

P_{art} et P'_{art} = pression artérielle moyenne (respectivement avant et après constriction aortique),

P_{vc} et P'_{vc} = pression hydrostatique de la veine cave,

R_a et R'_a , R_s et R'_s , R_{vc} et R'_{vc} = résistances respectives de l'aorte, de la circulation sanguine systémique et de la veine cave.

DC = débit cardiaque.

Question 10 : Exprimez la pression artérielle moyenne P_{art} en fonction de DC, R_a , R_s , R_{vc} et P_{vc} . En utilisant la loi de Poiseuille, expliquez pourquoi la constriction aortique est un modèle permettant d'étudier les effets de l'HTA sur le cœur.

Question 11 : Discutez les avantages et inconvénients de l'étude des effets de l'HTA sur le cœur dans le modèle des souris SH et dans le modèle de la constriction aortique.

Après cinq semaines, on étudie les effets de la constriction aortique sur le cœur de souris WT traitées ou non après opération par du candesartan (Can) ou par un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène en Ang II (ECA-Inh) (**figure 10**).

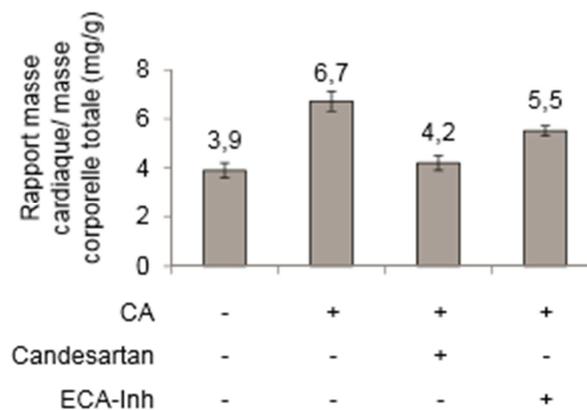


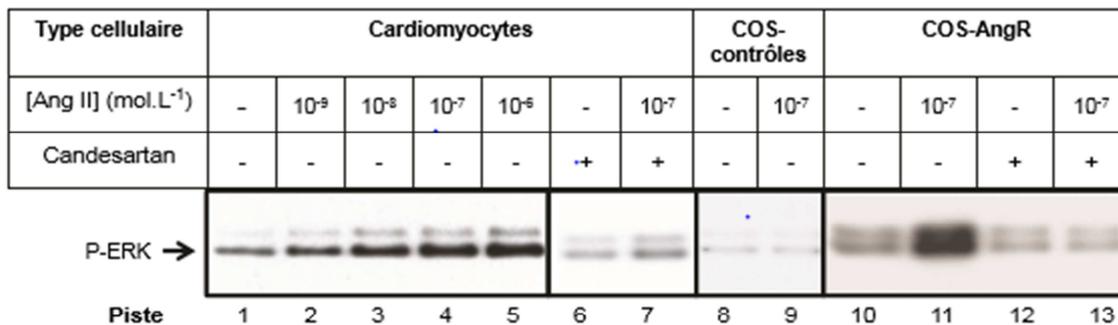
Figure 10 : Des souris WT subissent ou non une constriction aortique puis sont traitées ou non 5 semaines par du candesartan ou par ECA-Inh (conditions décrites sous l'histogramme). Les souris témoin (1ère colonne) subissent également une opération chirurgicale mais pas de constriction aortique. A l'issue des 5 semaines, le rapport de la masse cardiaque sur la masse corporelle est calculé.

Question 12 : Analysez et interprétez la figure 10. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous faire pour expliquer la différence d'effet entre le candesartan et ECA-inh ?

Pour comprendre l'effet du candesartan sur le cœur de souris WT après constriction aortique on s'intéresse plus précisément aux propriétés du récepteur à l'Ang II (AngR).

On étudie l'activation d'AngR en réponse à l'Ang II dans des cardiomyocytes de souris isolés et mis en culture, dans des cellules COS (lignée cellulaire n'exprimant pas AngR) transfectées par un plasmide ne comportant pas de séquence codante (cellules COS-contrôles) ou dans des cellules COS transfectées par un plasmide permettant l'expression d'AngR (cellules COS-AngR). Les cellules sont incubées 8 minutes dans différentes conditions puis sont lysées. Les protéines présentes dans les extraits cellulaires sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et transférées sur une membrane. L'activation d'AngR induit une cascade de transduction du signal conduisant à la phosphorylation de la protéine ERK dont on détecte la forme phosphorylée (P-ERK) à l'aide d'un anticorps spécifique couplé à une enzyme donnant des produits colorés en présence d'un substrat chromogène (**figure 11**).

A



B

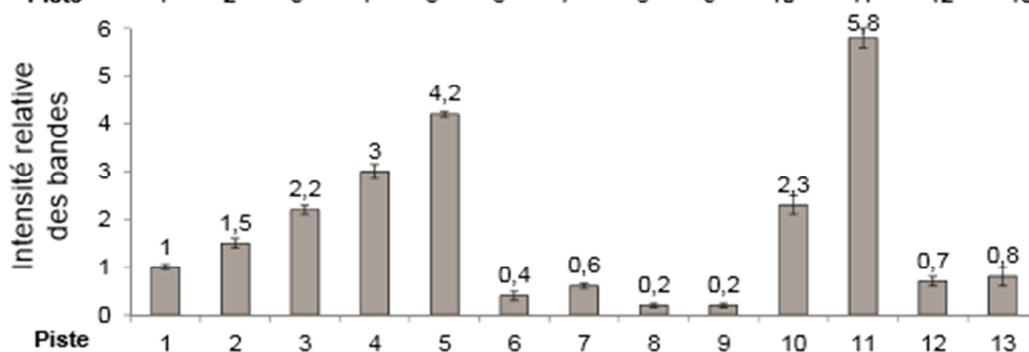


Figure 11 : A) Immunodétection de P-ERK (bande indiquée par la flèche) dans des extraits protéiques de cellules incubées dans les conditions indiquées dans le tableau. La quantité totale de protéine ERK déposée dans chaque puits est identique. B) Quantification de l'intensité relative des bandes.

Question 13 :

- a) Quel est l'intérêt de transférer les cellules COS par un plasmide ne permettant pas l'expression d'AngR ?
- b) Analysez et interprétez les résultats de la figure 8. Que suggère l'effet du candesartan sur les cardiomyocytes et les cellules COS-AngR en absence d'Ang II ?

L'HTA génère un stress mécanique sur les cardiomyocytes. Afin d'en étudier les effets in vitro, on cultive des cellules sur un support élastique étirable et on leur applique un stress mécanique par étirement du support de 20% pendant 8 minutes. Les cellules sont également incubées ou non en présence de candesartan ou d'un anticorps empêchant la liaison d'Ang II à AngR (anticorps neutralisant). Plusieurs types cellulaires sont étudiés : des cardiomyocytes isolés à partir de souris WT ou de souris dont les deux allèles du gène codant l'angiotensinogène ont été invalidés (souris Angg^{-/-}), des cellules COS-contrôles et des cellules COS-AngR (**figure 12**). L'analyse de la phosphorylation de la protéine ERK est conduite selon le même protocole que celui utilisé dans la **figure 11**.

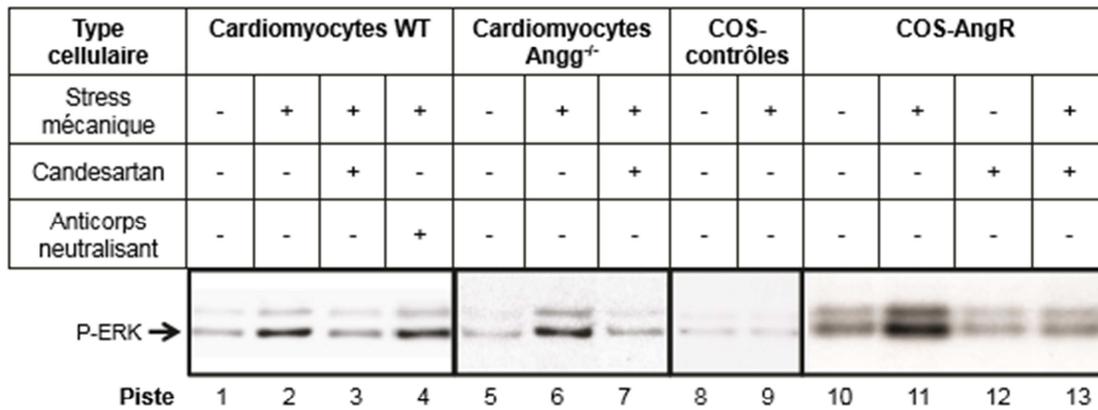
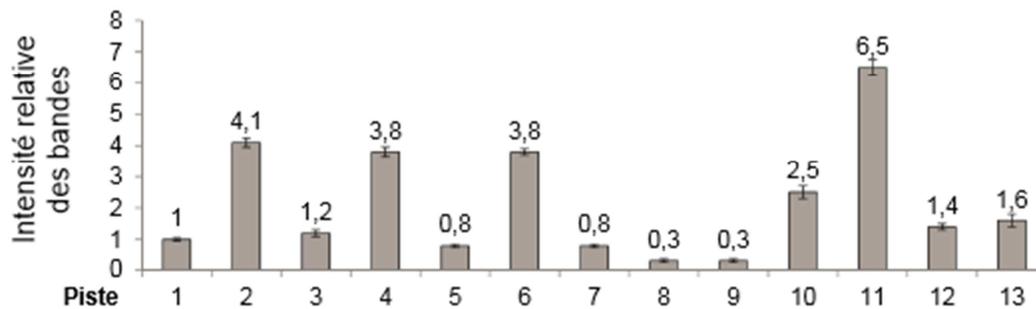
A**B**

Figure 12 : A) Immunodétection de P-ERK (bande indiquée par la flèche) dans des extraits protéiques de cellules incubées dans les conditions indiquées dans le tableau. La quantité totale de protéine ERK déposée dans chaque puits est identique. B) Quantification de l'intensité relative des bandes.

Question 14 : Analysez et interprétez la figure 8. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous faire pour expliquer ces résultats ?

Question 15 : Récapitulez l'ensemble des conséquences de l'HTA sur le cœur au niveau de l'organe, au niveau cellulaire et au niveau moléculaire.