

ÉCOLES NORMALES SUPÉRIEURES  
ÉCOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSÉES

CONCOURS D'ADMISSION SESSION 2014

FILIÈRE BCPST

COMPOSITION DE BIOLOGIE

Épreuve commune aux ENS de Cachan, Lyon, Paris et de l'ENPC

Durée : 6 heures

*L'utilisation des calculatrices n'est pas autorisée pour cette épreuve.*

★ ★ ★

L'épreuve a pour thème la circulation. La première partie (**partie A**, page 3) est un exercice de synthèse. La seconde partie (**partie B**, pages 4 à 22) est une analyse de documents sur le thème de l'hypertension artérielle.

L'analyse de documents comporte trois parties I, II et III. Les sous-parties I)1 et I)2 sont indépendantes entre elles ainsi que des autres parties. Pour les parties II et III, il est fortement conseillé aux candidats de suivre l'ordre proposé dans l'énoncé car il obéit à une progression logique.

**Il est conseillé de consacrer 2h à la partie de synthèse et 4 h à l'analyse de documents.**

Dans **chacune des parties** du devoir, il sera attaché une très grande importance à la rigueur ainsi qu'à la clarté des raisonnements et des illustrations.

## **PARTIE A : EXERCICE DE SYNTHÈSE**

### **La circulation chez les organismes pluricellulaires.**

On traitera de la circulation des sèves chez les Angiospermes et de la circulation sanguine chez les Mammifères, en soulignant les limites d'une telle approche comparative.

## **PARTIE B : L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE**

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.

**Dans la première partie de cette étude, on étudie la pharmacologie de deux médicaments anti-hypertenseurs (questions 1 à 7). Dans une seconde partie, on s'intéressera à l'une des causes de cette maladie (questions 8 à 10). Enfin, on abordera les conséquences de l'HTA sur le cœur (questions 11 à 22).**

*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'annexe p.22 récapitule l'ensemble des molécules et abréviations rencontrées dans l'énoncé.*

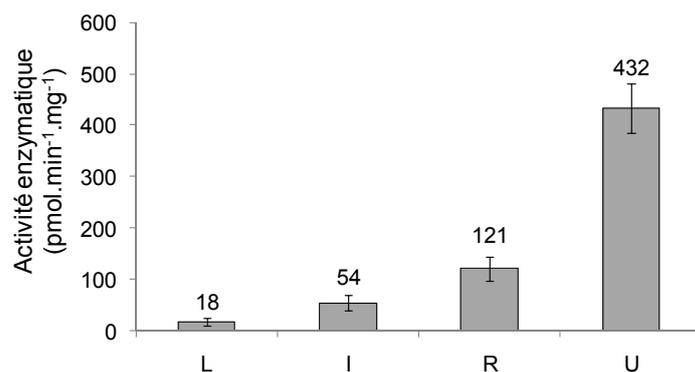
### **I) ETUDE PHARMACOLOGIQUE DE DEUX MEDICAMENTS ANTI-HYPERTENSEURS**

L'efficacité et les effets indésirables d'un médicament peuvent varier selon les individus en fonction de leur patrimoine génétique ou de la prise concomitante d'autres traitements. Ces deux aspects seront étudiés successivement dans cette partie.

#### **I)1. Pharmacogénétique**

La **débrisoquine** est un médicament anti-hypertenseur dont la posologie doit être adaptée à chaque patient. En effet, 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 ultra-rapides 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).

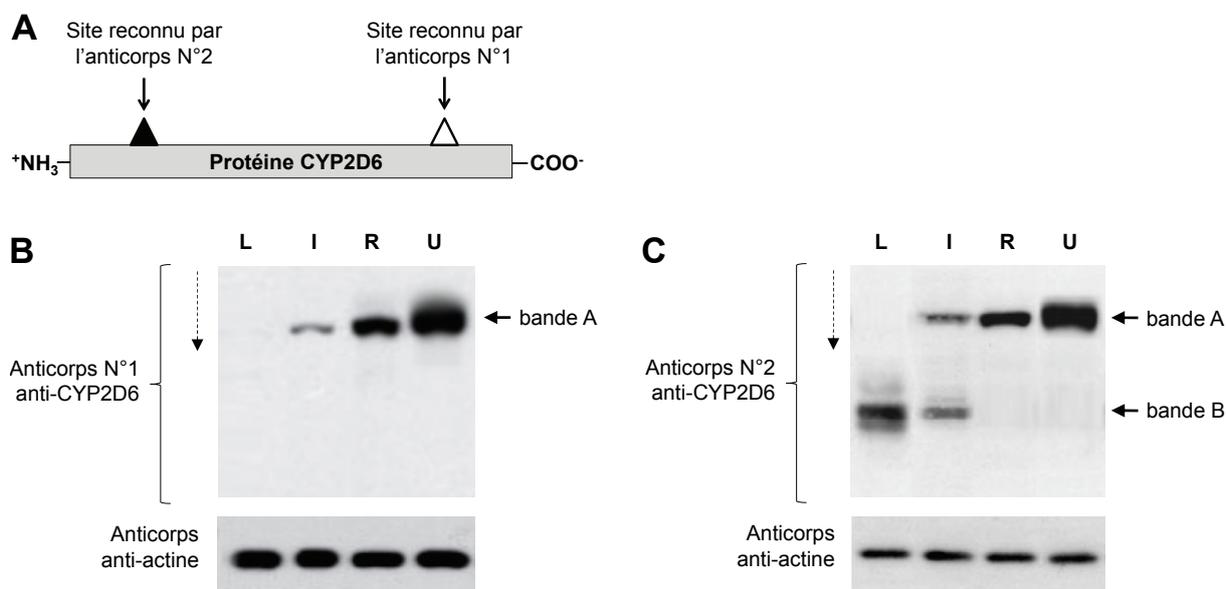


**Figure 1** : Activité *in vitro* de CYP2D6 issue de biopsies d'individus appartenant aux quatre groupes de métaboliseurs : lents (L), intermédiaires (I), rapides (R) ou ultra-rapides (U). L'activité enzymatique correspond à la quantité de substrat transformée par unité de temps (pmol.min<sup>-1</sup>)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

**Question 1 :**

- Analysez et interprétez la figure 1.
- 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.

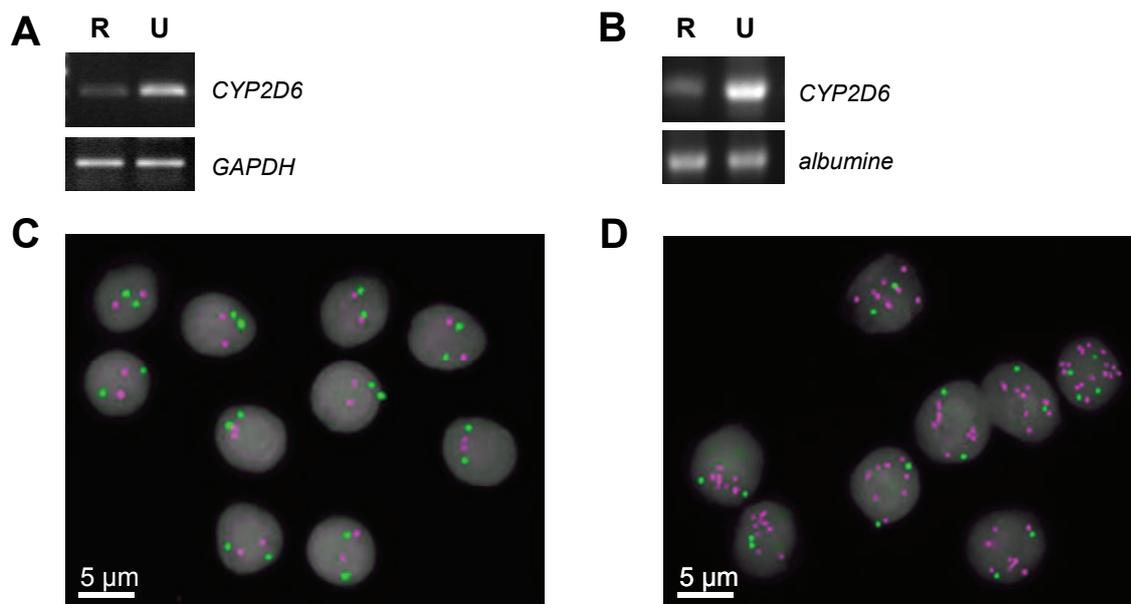
**Question 2** : Analysez et interprétez la figure 2. Confrontez ces résultats à ceux de la figure 1 et à l'effet du médicament sur les quatre types de patients étudiés.

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 ultra-rapides 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 bicaténares 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** : Analysez et interprétez la figure 3. Expliquez l'origine de l'absence de réponse des métaboliseurs ultra-rapides à la débrisoquine.

## I)2. Interactions médicamenteuses

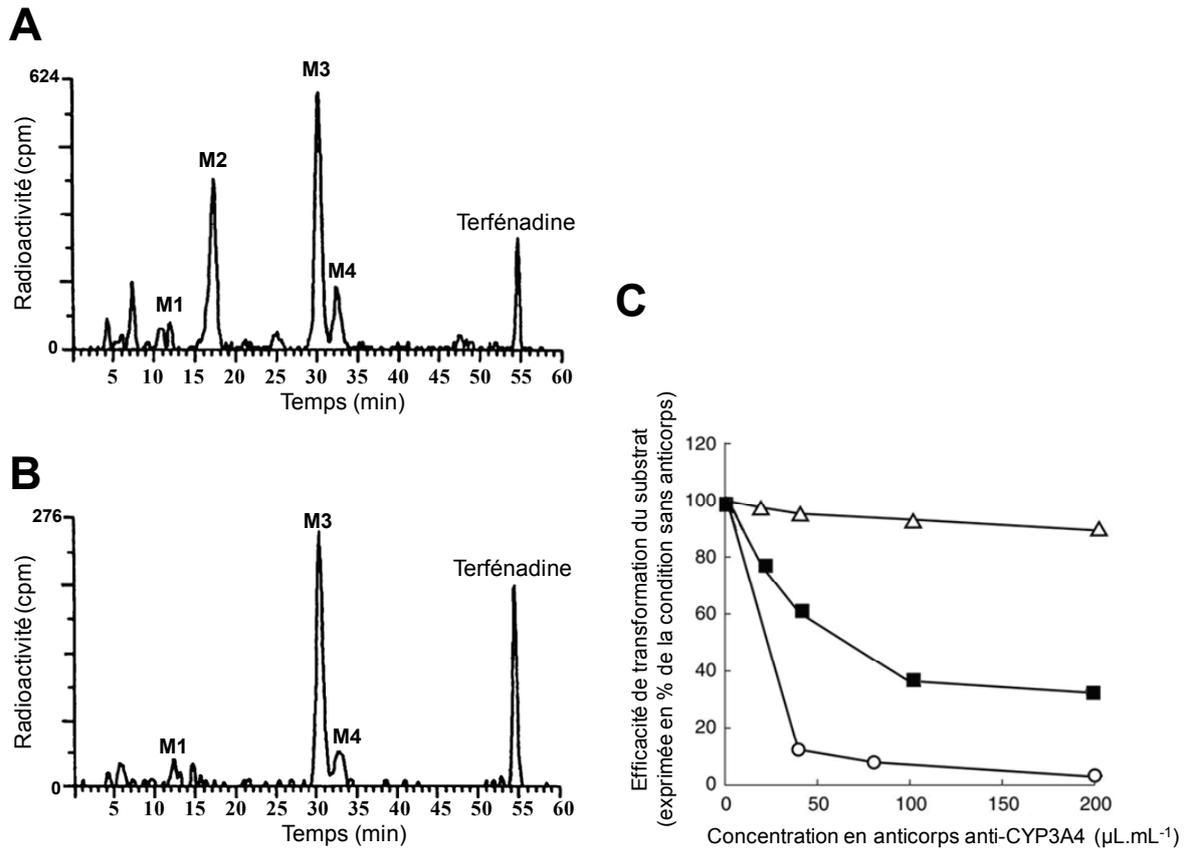
On parle d'interaction médicamenteuse lorsqu'on observe *in vivo* une modification significative des effets d'un médicament lors de la co-administration d'un autre médicament.

Le **mibefradil** est un médicament anti-hypertenseur qui ne cause pas d'effets secondaires graves lorsqu'il est administré seul. En revanche il est responsable d'une interaction médicamenteuse grave avec la **terfénadine**, médicament utilisé pour traiter les rhinites allergiques.

De nombreux médicaments sont transformés dans l'organisme. Chez l'Homme, la terfénadine est convertie en quatre métabolites notés M1 à M4. **M3** est le principal métabolite et est responsable de l'effet pharmacologique du médicament. On soupçonne que l'enzyme **CYP3A4**, exprimée notamment dans le foie, est impliquée dans le métabolisme de la terfénadine. On réalise deux expériences pour vérifier cette hypothèse.

On compare tout d'abord le métabolisme *ex vivo* de la terfénadine par un explant de foie humain et *in vitro* par l'enzyme CYP3A4 recombinante purifiée. La terfénadine est radiomarquée (**terfénadine\***) et incubée dans le milieu baignant les explants de foie, ou avec l'enzyme CYP3A4 purifiée. Après 30 minutes, un aliquot de milieu est prélevé et analysé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), technique permettant de séparer différentes molécules selon leur polarité. On récupère à la sortie de l'appareil des fractions successives pendant 60 minutes. La quantité de terfénadine ou de ses dérivés est mesurée dans chaque fraction par comptage de la radioactivité (figures 4A et 4B).

On étudie par ailleurs la transformation de la terfénadine en M3 par un explant de foie viable *ex vivo* en présence ou non d'un anticorps anti-CYP3A4 inhibant l'enzyme. On mesure en parallèle le métabolisme d'un substrat connu de l'enzyme, la **testostérone**, et d'une molécule non transformée par l'enzyme, l'**astemizole**. On incube ensemble le substrat, l'explant de foie et une quantité variable d'anticorps inhibiteur pendant 30 minutes puis on dose les quantités de métabolites produits (figure 4C).

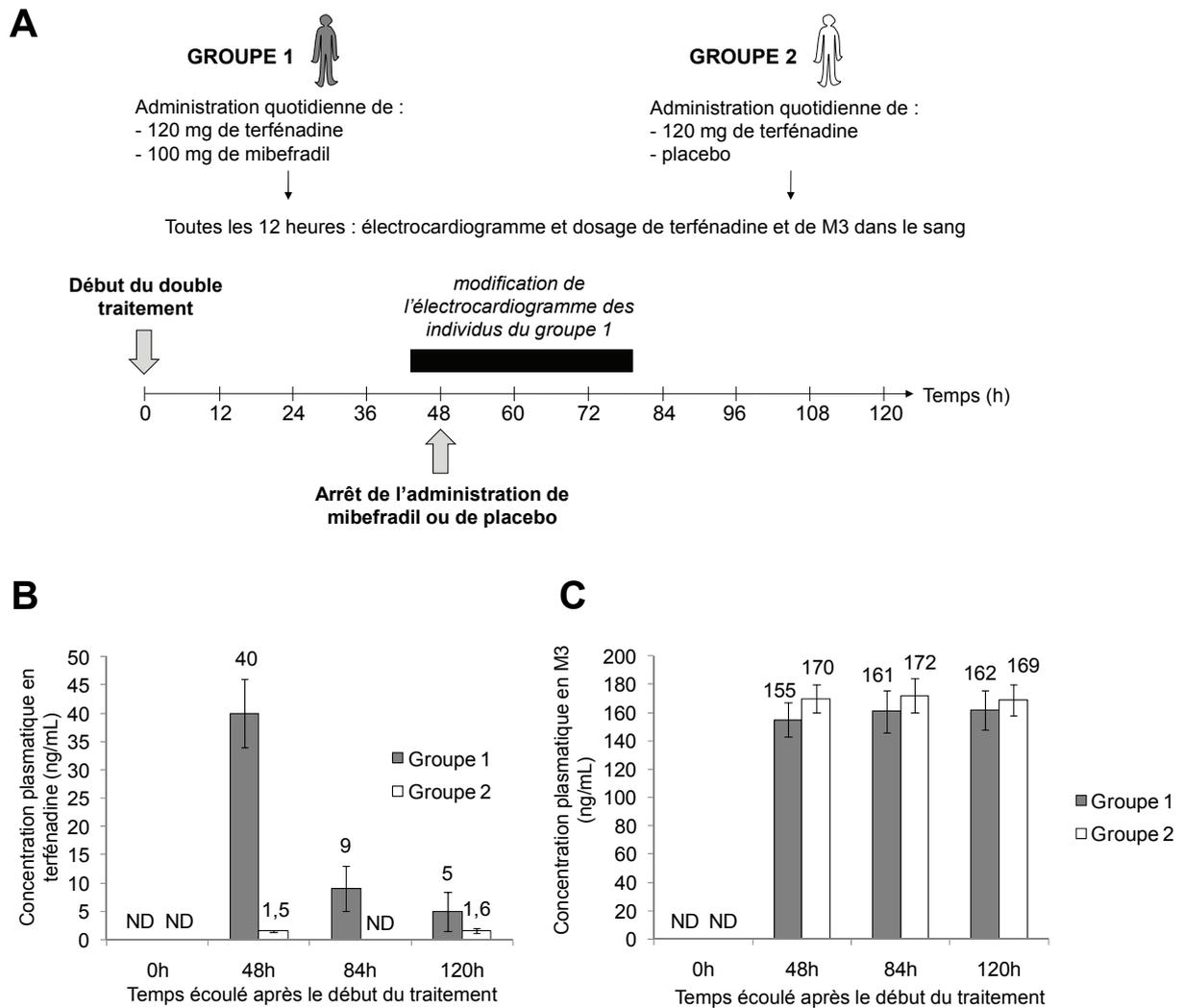


**Figure 4 :** Séparation par HPLC et dosage par comptage de la radioactivité des métabolites de la terfénadine\* transformée par un explant viable de foie (A) ou par l'enzyme CYP3A4 purifiée (B) ; aucune transformation de la terfénadine n'est observée en absence de tissu ou d'enzyme purifiée. C) Efficacité du métabolisme de la testostérone (O), de la terfénadine (■) ou d'astemizole ( $\Delta$ ) par un explant viable de foie en présence d'un anticorps inhibiteur de CYP3A4, exprimée en pourcentage de l'efficacité de transformation en absence d'anticorps. Le métabolisme de la terfénadine est mesuré par dosage de M3.

**Question 4 :** Analysez et interprétez les résultats de la figure 4.

La terfénadine, en vente libre, a été utilisée par des patients traités par le mibefradil. Des arythmies cardiaques potentiellement mortelles ont été observées chez ces sujets. Afin d'étudier le mécanisme de cette interaction médicamenteuse, on réalise des études *in vivo* (figure 5) et *in vitro* (figure 6).

On administre à des individus volontaires un traitement composé de terfénadine et de mibefradil (groupe 1) ou de terfénadine et d'un placebo (groupe 2). Toutes les 12 h pendant 120 h, on réalise un électrocardiogramme et une mesure des concentrations sanguines en terfénadine et en M3. La prise de mibefradil ou de placebo est arrêtée au bout de 48 h en raison d'une modification de l'activité cardiaque des individus du groupe 1 ; le reste du protocole est maintenu jusqu'à la fin de l'expérience. Le protocole ainsi que les résultats des analyses sanguines sont présentés dans la figure 5.

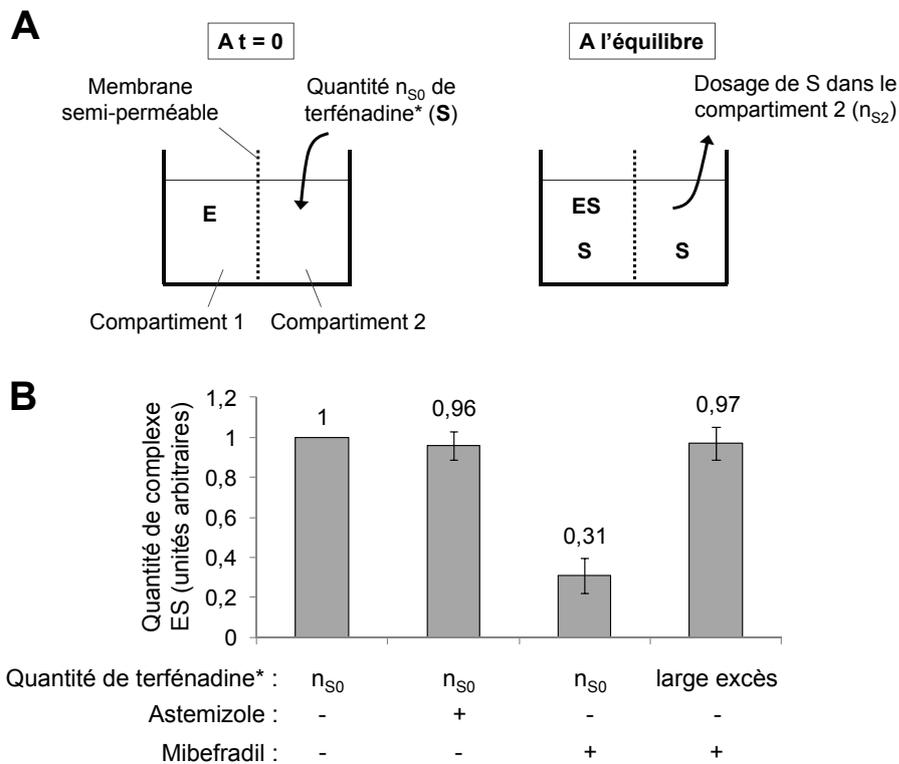


**Figure 5 :** A) Déroulement temporel de l'étude. Concentration plasmatique en terfénadine (B) et en M3 (C) à différents temps. ND : composé non détectable (le seuil de détection est de 1,4 ng/mL).

**Question 5 :** Analysez et interprétez les résultats de la figure 5. Quelle est la molécule responsable de l'effet cardiotoxique ? Justifiez votre réponse.

Afin de préciser l'origine de l'interaction médicamenteuse avec le mibefradil, on quantifie l'interaction de la terfénadine avec CYP3A4 en absence et en présence de mibefradil grâce à une expérience de dialyse à l'équilibre. L'expérience est réalisée à 4°C de façon à inhiber la transformation de ses substrats par l'enzyme. On utilise deux compartiments de volume identique, séparés par une membrane semi-perméable, c'est-à-dire perméable aux petites molécules comme le mibefradil et la terfénadine mais imperméable à l'enzyme, de taille trop élevée (figure 6A). L'enzyme (notée E) en quantité limitante est placée dans le compartiment 1. Dans une première expérience, elle est incubée avec une quantité connue (notée  $n_{S0}$ ) de terfénadine\* seule ou additionnée de mibefradil ou d'astemizole non marqués. Dans une seconde expérience, elle est incubée en présence de mibefradil non marqué et de terfénadine\* en large excès. A l'équilibre, on mesure la quantité de terfénadine\* dans le compartiment 2 (notée  $n_{S2}$ ). La quantité de terfénadine\* libre dans le compartiment 1 est notée  $n_{S1}$ . La quantité

de terfénadine\* en complexe avec l'enzyme est notée  $n_{ES}$ . Les résultats obtenus sont représentés figure 6B.



**Figure 6:** A) Schématisation de l'expérience de dialyse à l'équilibre. B) Quantité de complexes terfénadine\*-CYP3A4 (ES) dans les différentes conditions décrites. Les résultats sont normalisés par rapport à ceux obtenus lorsque la terfénadine\* est incubée seule avec l'enzyme.

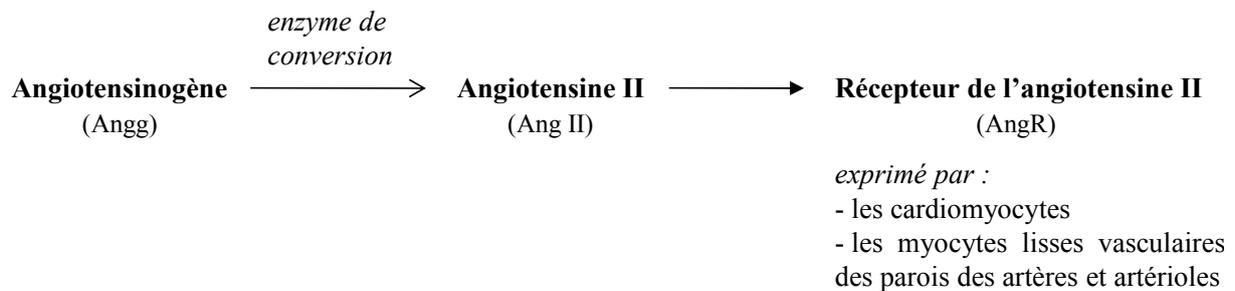
**Question 6 :**

- Démontrez qu'on peut quantifier la quantité de complexe terfénadine-CYP3A4 formé grâce à la mesure de  $n_{S2}$ .
- Analysez et interprétez la figure 6B (on considérera que CYP3A4 est une enzyme michaelienne). Concluez quant au mode d'action du mibefradil.

**Question 7 :** A partir des réponses aux questions 4, 5 et 6, représentez par un schéma le plus complet possible le devenir et les effets pharmacologiques de la terfénadine administrée en absence ou en présence de mibefradil.

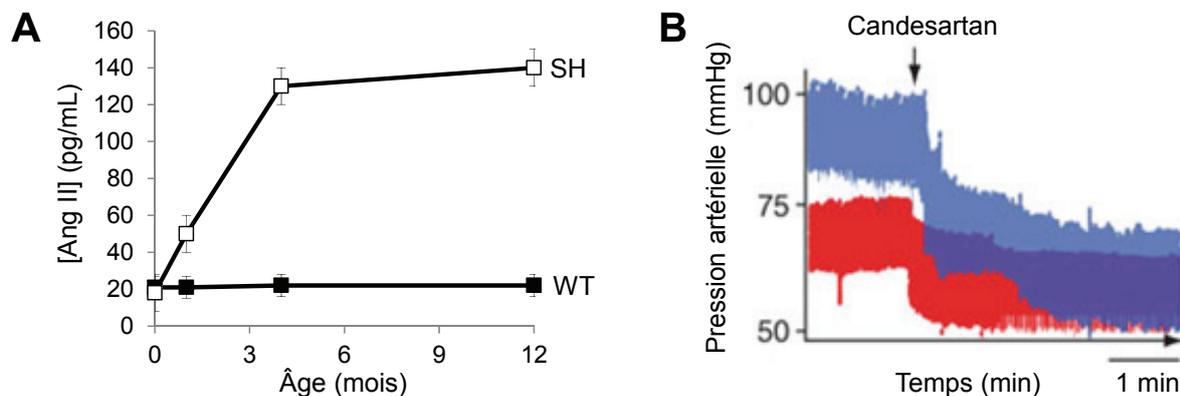
## II) RÔLE DE L' ANGIOTENSINE II DANS LA PATHOGENESE DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse 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 7A). On mesure également la pression artérielle de ces souris après injection par voie intraveineuse d'un inhibiteur pharmacologique spécifique d'AngR, le **candesartan** (figure 7B).

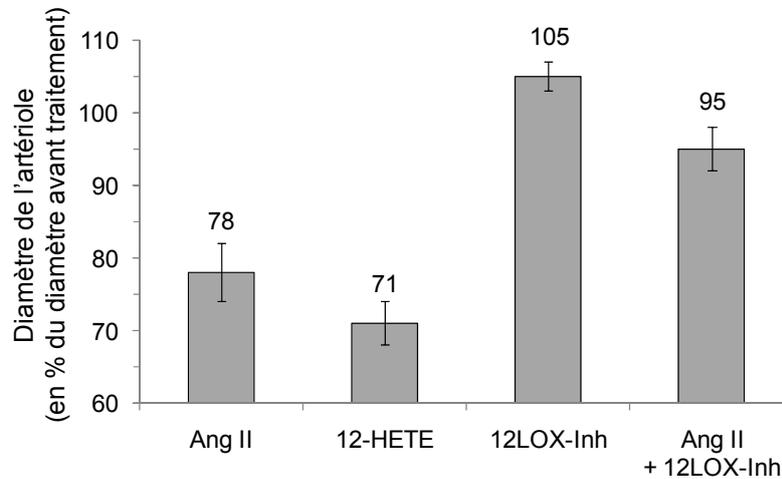


**Figure 7 :** **A)** Concentration plasmatique en Ang II chez des souris WT (■) et SH (□) en fonction de leur âge. **B)** Evolution de la pression artérielle au repos de souris WT (en rouge) et SH (en bleu), âgées de 4 mois, avant et après injection de candesartan (au niveau de la flèche).

### Question 8 : Analysez et interprétez la figure 7.

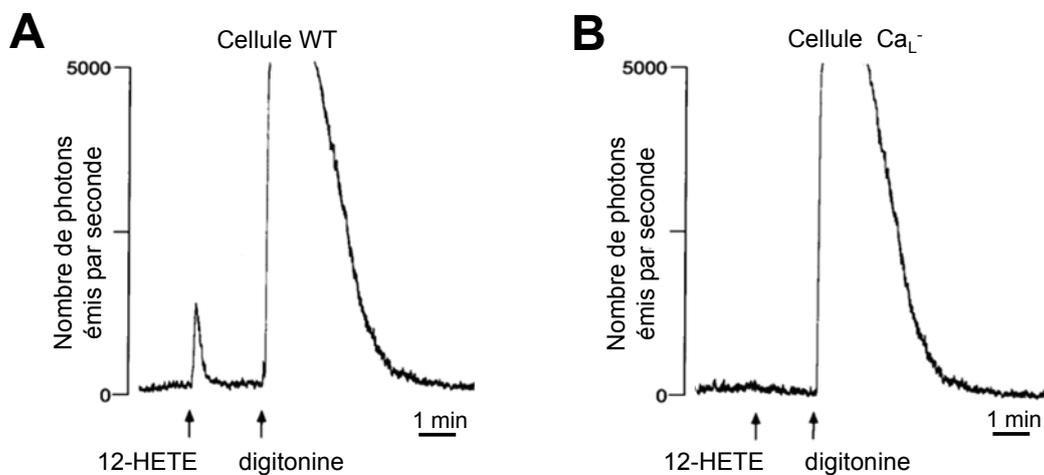
La fixation d'Ang II sur AngR en surface des cellules musculaires lisses vasculaires active la production d'un messager hydrophobe à action locale appelé **12-HETE**, grâce à une réaction catalysée par la 12-lipoxygénase (**12-LOX**).

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 (**12LOX-Inh**), ou de l'Ang II supplémentée de cet inhibiteur. On mesure ensuite le diamètre final de l'artériole (figure 8).



**Figure 8 :** Effet de l'Ang II, du 12-HETE, de 12LOX-Inh, ou de l'association de l'Ang II et de 12LOX-Inh (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.

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 : la lignée sauvage (**WT**) et une lignée dépourvue de canaux calciques de la membrane plasmique de type L (lignée **Ca<sub>L</sub><sup>-</sup>**). 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, la digitonine. On mesure en temps réel l'émission de photons par l'aequorine (figure 9).



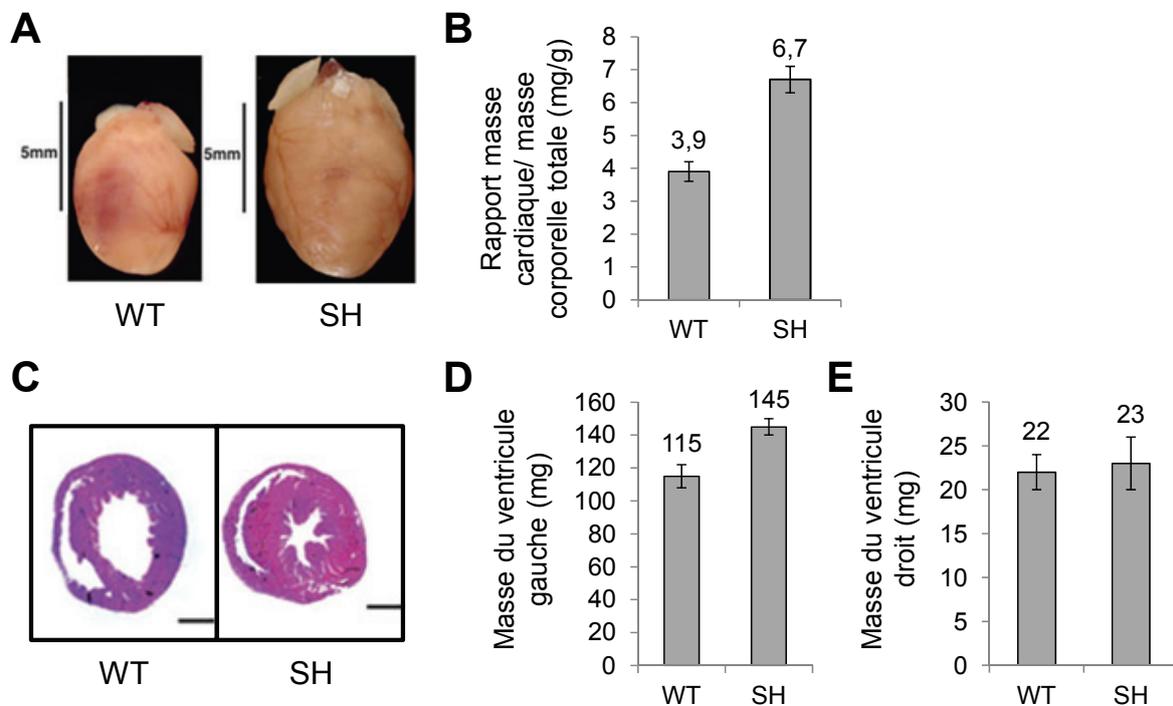
**Figure 9 :** Comptage au cours du temps des photons émis par une cellule WT (**A**) ou Ca<sub>L</sub><sup>-</sup> (**B**) exprimant l'aequorine, incubée en présence de 12-HETE puis de digitonine.

**Question 9 :** Analysez et interprétez les résultats des figures 8 et 9.

**Question 10 :** En vous appuyant sur les figures 7, 8 et 9, proposez un modèle expliquant les causes de l'HTA chez les souris SH de l'échelle moléculaire à l'échelle physiologique.

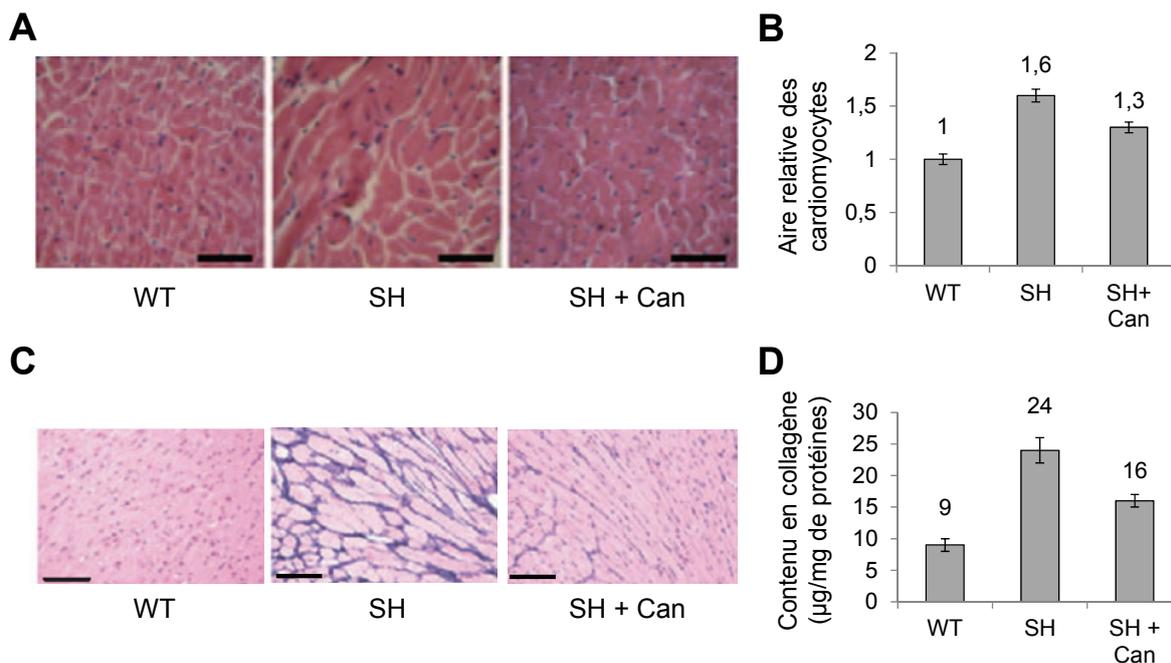
### **III) CONSÉQUENCES DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE SUR LE CŒUR**

Les cœurs de souris WT ou de souris SH âgées de 4 mois sont prélevés et analysés à l'échelle macroscopique (figure 10) ou microscopique (figure 11).



**Figure 10 :** 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 11:** Analysez et interprétez la figure 10.

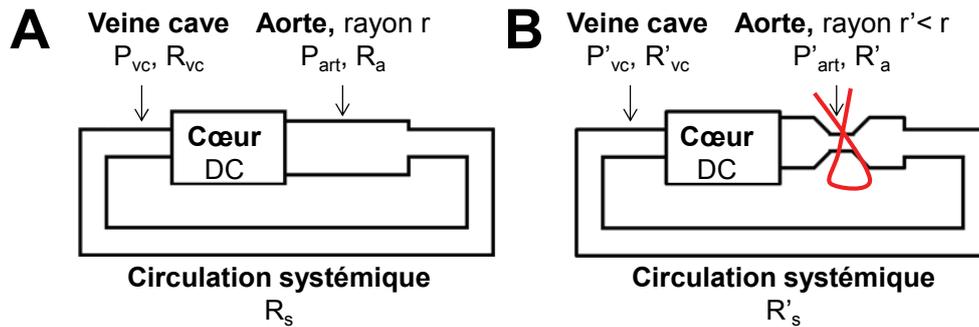


**Figure 11** : **A et C**) Coupes histologiques de ventricules gauches de souris âgées de 4 mois WT, SH ou de souris SH traitées pendant 5 semaines par du candesartan (SH+Can). Des coupes non représentées sur cette figure ont également été réalisées sur des souris WT traitées au candesartan pendant 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 12 :**

- Analysez et interprétez la figure 11.
- Proposez des hypothèses permettant d'expliquer l'effet du candesartan sur le cœur des souris SH.
- 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 12).

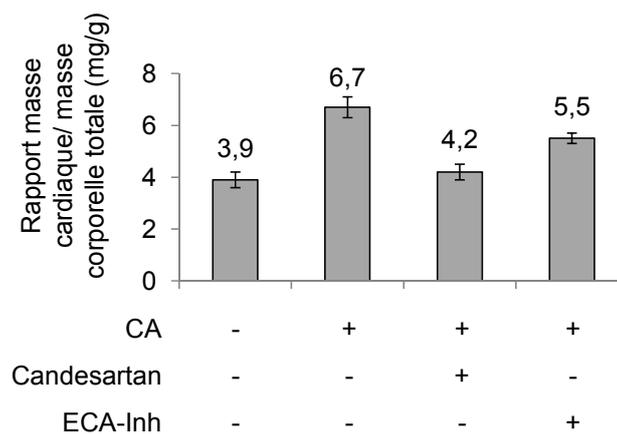


**Figure 12** : Modélisation de la circulation sanguine systémique sans (A) ou avec (B) constriction aortique. L'exposant «' » se réfère aux valeurs des grandeurs considérées après constriction aortique :  $P_{art}$  et  $P'_{art}$  = pression artérielle moyenne (respectivement avant et après constriction 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 13** : 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 14** : 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 13).

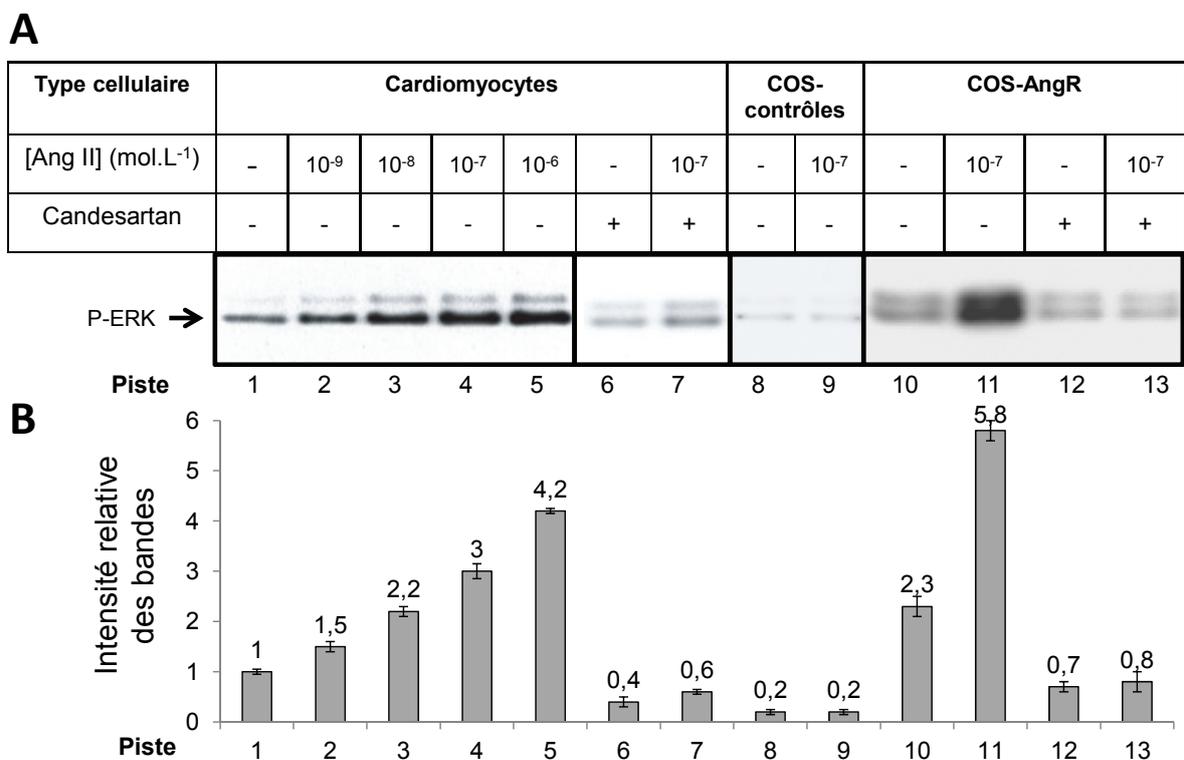


**Figure 13** : Des souris WT subissent ou non une constriction aortique puis sont traitées ou non 5 semaines par du candesartan ou par ECA-Inh (conditions décrites sous l'histogramme). Les souris témoin (1<sup>ère</sup> colonne) subissent également une opération chirurgicale mais pas de constriction aortique. A l'issue des 5 semaines, le rapport de la masse cardiaque sur la masse corporelle est calculé.

**Question 15** : Analysez et interprétez la figure 13. 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 14).



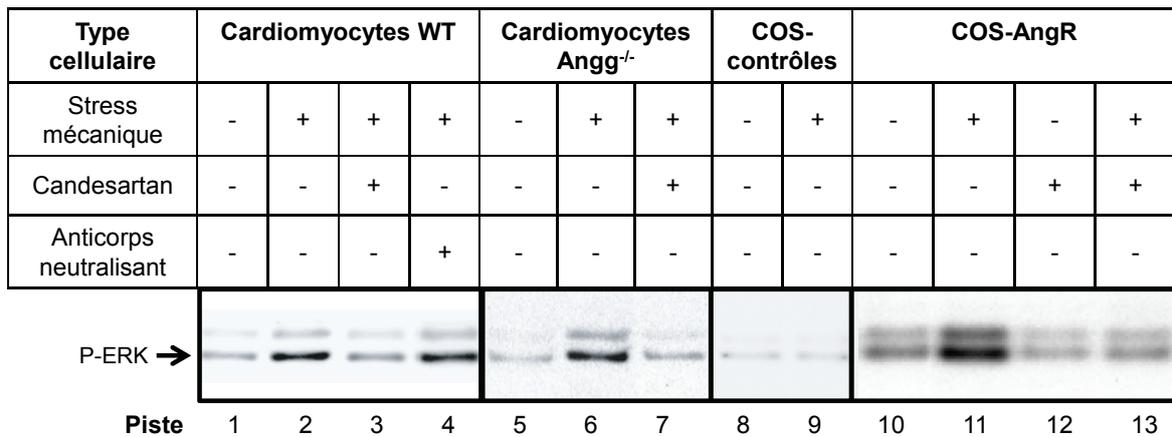
**Figure 14** : **A**) Immunodétection de P-ERK (bande indiquée par la flèche) dans des extraits protéiques de cellules incubées dans les conditions indiquées dans le tableau. La quantité totale de protéine ERK déposée dans chaque puits est identique. **B**) Quantification de l'intensité relative des bandes.

**Question 16 :**

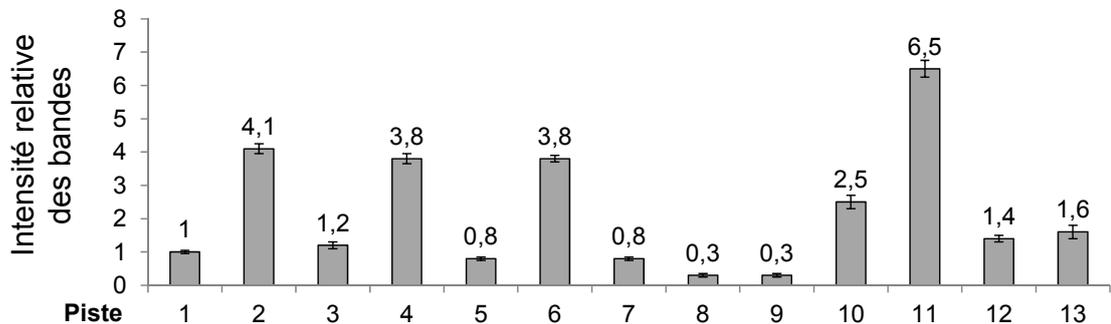
- Quel est l'intérêt de transfecter les cellules COS par un plasmide ne permettant pas l'expression d'AngR ?
- Analysez et interprétez les résultats de la figure 14. Que suggère l'effet du candesartan sur les cardiomyocytes et les cellules COS-AngR en absence d'Ang II ?

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<sup>-/-</sup>**), des cellules COS-contrôles et des cellules COS-AngR (figure 15). L'analyse de la phosphorylation de la protéine ERK est conduite selon le même protocole que celui utilisé dans la figure 14.

**A**



**B**

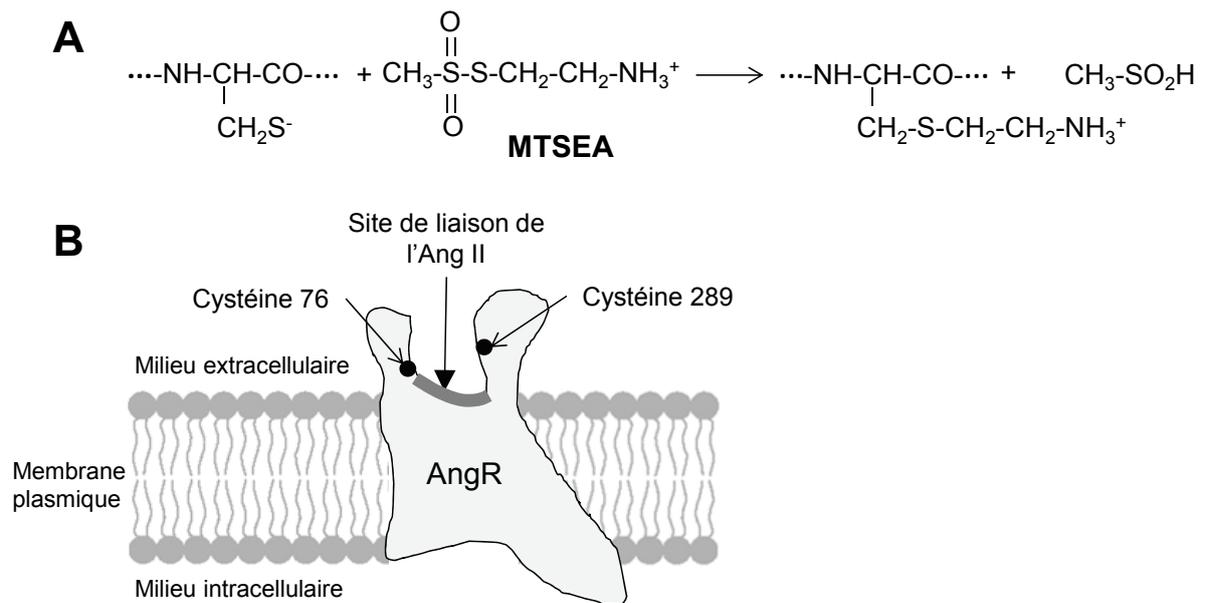


**Figure 15** : **A**) Immunodétection de P-ERK (bande indiquée par la flèche) dans des extraits protéiques de cellules incubées dans les conditions indiquées dans le tableau. La quantité totale de protéine ERK déposée dans chaque puits est identique. **B**) Quantification de l'intensité relative des bandes.

**Question 17:** Analysez et interprétez la figure 15. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous faire pour expliquer ces résultats ?

AngR existe sous une conformation inactive et sous une conformation active permettant l'activation de voies de transduction du signal. Afin d'étudier l'effet du stress mécanique sur la conformation d'AngR, on emploie la méthode dite « d'accessibilité des cystéines ». Cette méthode repose sur l'utilisation d'un réactif capable de former une liaison covalente avec les résidus cystéine, le **MTSEA** (méthylthiosulfonate-éthylammonium) (figure 16A). Le MTSEA

n'interagit qu'avec les chaînes latérales des résidus cystéines au contact du solvant, c'est-à-dire situées au niveau de la poche d'accès au site de liaison de l'Ang II sur AngR. Cette poche contient 2 cystéines potentiellement accessibles, les cystéines 76 et 289 (figure 16B). On dispose de 3 mutants : les mutants **C76A** et **C289A**, dans lesquels les cystéines 76 et 289 respectivement ont été remplacées par une alanine, et le mutant **C76A/C289A** dans lequel les cystéines 76 et 289 ont toutes deux été remplacées par des résidus alanine. Dans un premier temps, on étudie la conformation d'AngR grâce à cette méthode en absence de stress mécanique (figure 17). On s'intéresse ensuite à l'effet du stress mécanique sur la conformation du récepteur (figure 18).

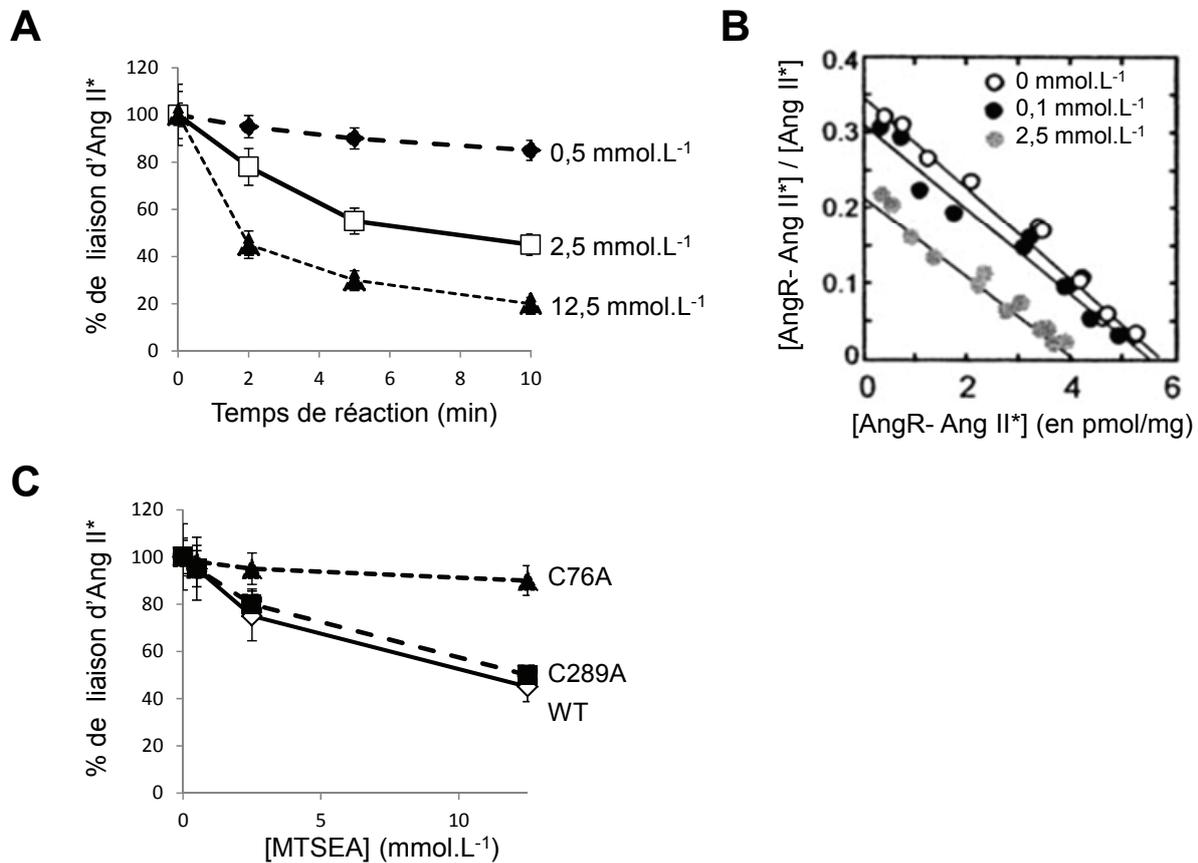


**Figure 16** : **A**) Structure du MTSEA et réaction d'addition sur la chaîne latérale d'une cystéine. **B**) Représentation schématique d'AngR et des cystéines 76 et 289.

Des cellules COS transfectées par un plasmide permettant l'expression de la forme sauvage d'AngR sont lysées ; leurs membranes sont incubées pendant 0 à 10 minutes en présence de différentes concentrations en MTSEA puis, après arrêt de la réaction, en présence d'Ang II radiomarquée (**Ang II\***) en excès pendant 1 heure ; la réaction d'association d'Ang II\* à AngR est alors à l'équilibre. Après lavage, la quantité d'Ang II\* libre et/ou liée aux membranes est déterminée par mesure de la radioactivité. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison d'Ang II\* sur la forme sauvage d'AngR en absence d'incubation avec du MTSEA (figure 17A).

On incube ensuite une même quantité de membranes de cellules COS exprimant la forme sauvage d'AngR en présence de 0 à 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de MTSEA pendant 10 minutes. Après arrêt de la réaction, les membranes sont incubées en présence de différentes concentrations en Ang II\* ; à l'équilibre, on mesure la concentration en Ang II\* libre ; la mesure de la radioactivité liée aux membranes permet de déterminer la concentration en complexes AngR-Ang II\*. On représente le rapport [AngR-Ang II\*]/ [Ang II\*] en fonction de [AngR-Ang II\*] (représentation de Scatchard) (Figure 17B).

On incube enfin les membranes de cellules COS exprimant la forme sauvage (WT) ou les formes mutantes C76A et C289A d'AngR pendant 2 minutes en présence de différentes concentrations en MTSEA puis, après arrêt de la réaction, en présence d'Ang II\* en excès. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison d'Ang II\* sur AngR (WT, C76A ou C289A) en absence d'incubation avec du MTSEA (figure 17C).



**Figure 17:** **A)** Pourcentage de liaison d'Ang II\* sur la forme sauvage d'AngR en fonction du temps de réaction en présence de 0,5 (◆), 2,5 (□) ou 12,5 mmol.L<sup>-1</sup> (▲) de MTSEA. **B)** Représentation des résultats selon la méthode de Scatchard pour différentes concentrations en MTSEA (0, 0,1 ou 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>). **C)** Pourcentage de liaison d'Ang II\* sur la forme sauvage d'AngR (WT, ◇) ou sur les mutant C76A (▲) et C289A (■) en fonction de la concentration en MTSEA.

**Question 18: Analysez et interprétez la figure 17A.**

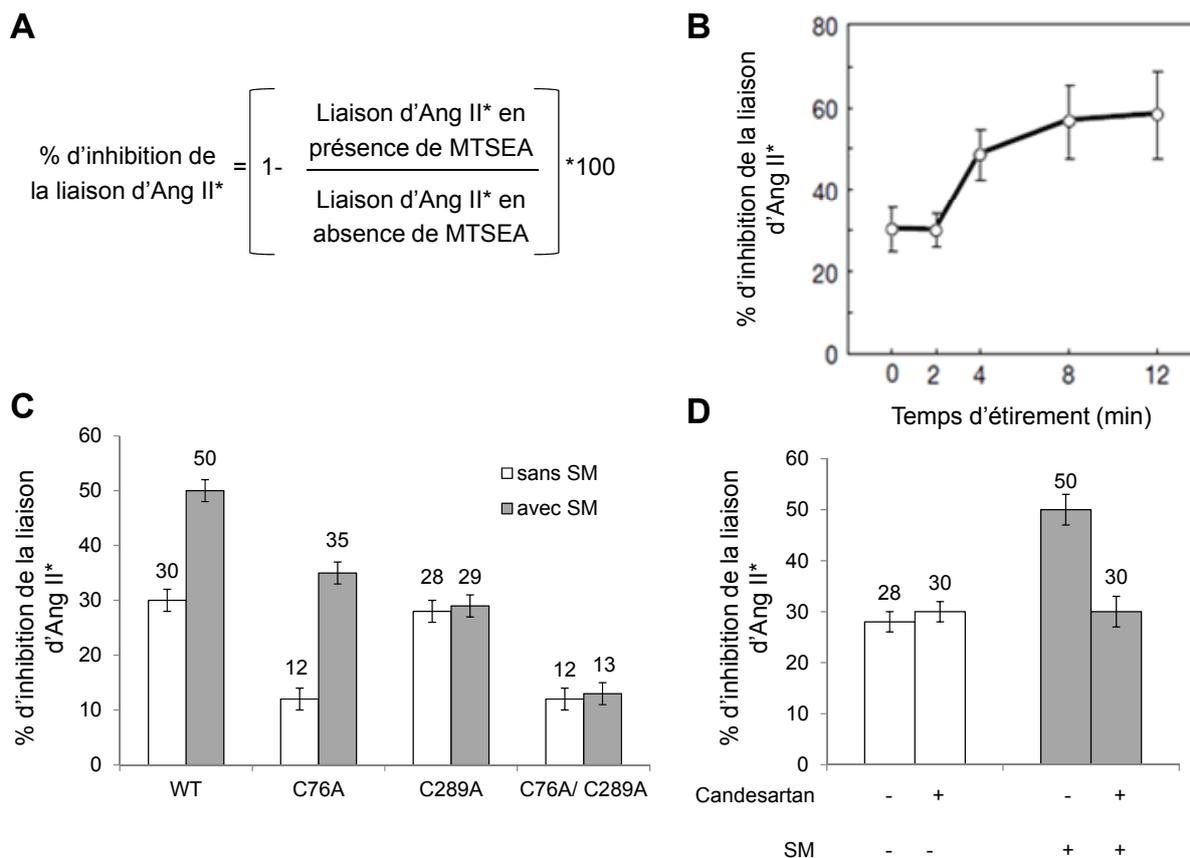
AngR possède un seul site de liaison de l'Ang II. On appelle  $[AngR]_{max}$  la concentration totale en sites de liaison de l'Ang II accessibles sur les cellules COS.

**Question 19 :**

- Ecrire la constante de dissociation à l'équilibre  $K_D$  de la réaction d'interaction entre AngR et Ang II\*. En faisant intervenir  $[AngR]_{max}$ , en déduire l'équation de la droite  $[AngR-Ang II^*] / [Ang II^*] = f([AngR-Ang II^*])$  (figure 17B).
- En rassemblant les résultats des figures 17A et 17B, décrire l'effet de l'incubation des membranes en présence de MTSEA sur l'interaction entre AngR et l'Ang II.

**Question 20 : Analysez et interprétez la figure 17C.**

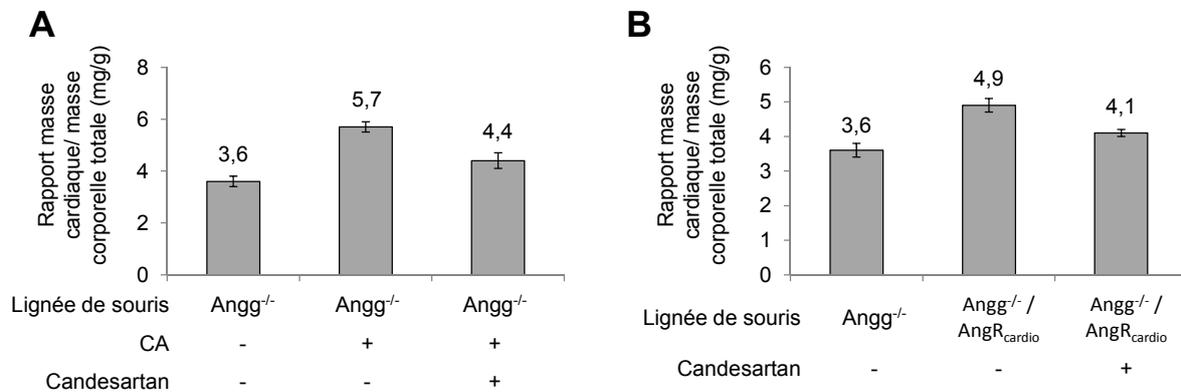
Des cellules COS exprimant la forme sauvage ou l'une des formes mutantes d'AngR sont soumises ou non à un stress mécanique (SM) en présence ou non de candesartan. Elles sont ensuite lysées et leurs membranes sont incubées avec 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de MTSEA pendant 2 minutes avant arrêt de la réaction (figure 18). Après incubation en présence d'Ang II\* en excès pendant 1 heure, le pourcentage d'inhibition de la liaison d'Ang II\* à AngR est calculé par la formule présentée en figure 18A.



**Figure 18 :** **A)** Formule de calcul du pourcentage d'inhibition de la liaison d'Ang II\* à AngR. **B à D)** Pourcentage d'inhibition par le MTSEA de la liaison d'Ang II\* à AngR dans différentes conditions. **B)** Soumission de cellules COS exprimant la forme sauvage d'AngR à un stress mécanique pendant 0 à 12 minutes. **C)** Soumission (en gris) ou non (en blanc) de la forme sauvage ou des mutants C76A, C289A et C76A/C289A d'AngR à un stress mécanique (SM) pendant 8 minutes. **D)** Soumission (en gris) ou non (en blanc) à un stress mécanique pendant 8 minutes de cellules COS exprimant la forme sauvage d'AngR ; les cellules ont été préalablement incubées ou non en présence de candesartan (conditions indiquées dans le tableau sous l'histogramme).

**Question 21 : Analysez et interprétez la figure 18.**

Afin de confirmer *in vivo* l'importance des résultats démontrés *in vitro* dans les figures 14, 15 et 18, on étudie dans différentes conditions expérimentales le cœur de souris n'exprimant pas le gène de l'angiotensinogène (souris  $Angg^{-/-}$ ) ou de souris  $Angg^{-/-}$  surexprimant  $AngR$  spécifiquement dans les cardiomyocytes (souris  $Angg^{-/-}/AngR_{cardio}$ ) (figure 19).



**Figure 19 :** **A)** Rapport masse cardiaque/ masse corporelle totale de souris  $Angg^{-/-}$  ayant ou non subi une constriction aortique (CA) et traitées ou non pendant 5 semaines par du candesartan. **B)** Rapport masse cardiaque/ masse corporelle totale de souris  $Angg^{-/-}$ , de souris  $Angg^{-/-}/AngR_{cardio}$  ou de souris  $Angg^{-/-}/AngR_{cardio}$  traitées par du candesartan pendant 5 semaines.

**Question 22 :** A la lumière des conclusions des figures précédentes :

- Expliquez les résultats des figures 19A et 19B.
- Proposez un modèle permettant d'expliquer les effets de l'HTA sur le cœur.

- Fin de l'épreuve -

## **Annexe : molécules et abréviations utilisées dans l'étude de documents**

<b>Nom</b>	<b>Description</b>
12-HETE	Messenger hydrophobe à action locale produit par 12-LOX en réponse à Ang II
12-LOX	12-lipoxygénase : enzyme catalysant la synthèse de 12-HETE
12LOX-Inh	Inhibiteur de 12-LOX
Ang II	Angiotensine II
Ang II*	Angiotensine II radiomarquée
Angg	Angiotensinogène : précurseur de l'angiotensine II
Angg <sup>-/-</sup>	Souris n'exprimant pas le gène de l'angiotensinogène
Angg <sup>-/-</sup> / AngR <sub>cardio</sub>	Souris n'exprimant pas le gène de l'angiotensinogène et surexprimant AngR dans les cardiomyocytes
AngR	Récepteur à l'Ang II
Astemizole	Médicament non transformé par CYP3A4
CA	Constriction aortique : procédure chirurgicale permettant de réduire le rayon de l'aorte chez la souris
Candesartan (Can)	Inhibiteur pharmacologique spécifique de AngR
Cellules Ca <sub>L</sub> <sup>-</sup>	Cellules dépourvues de canal calcique de type L
COS	Cellules de Mammifère n'exprimant pas AngR
CYP2D6	Enzyme dégradant la débrisoquine
CYP3A4	Enzyme soupçonnée de transformer la terfénadine
Débrisoquine	Médicament anti-hypertenseur
ECA-Inh	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène en angiotensine II
Enzyme de conversion	Enzyme impliquée dans la conversion d'angiotensinogène en angiotensine II
ERK	Molécule phosphorylée après activation d'AngR
HTA	Hypertension artérielle
M1, M2, M3, M4	Métabolites issus de la transformation de la terfénadine <i>in vivo</i>
Mibefradil	Médicament anti-hypertenseur
MTSEA	Méthylthiosulfonate-éthylammonium : réactif se liant covalamment aux cystéines accessibles au solvant
SM	Stress mécanique : étirement du support élastique sur lequel les cellules sont cultivées
Souris SH	Souris spontanément hypertensives
Terfénadine	Médicament anti-allergique présentant des interactions avec le mibefradil
Terfénadine*	Terfénadine radiomarquée
Testostérone	Substrat connu de CYP3A4
WT	Sauvage