Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV©

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :
www.formav.co/explorer

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIES

U42 - Biologie cellulaire

SESSION 2019

DUREE DE L'EPREUVE : 2h
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

Dictionnaire anglais/français.
Tout autre matériel est interdit.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 9 pages numérotées de 1/9 à 9/9.

Base nationale des Sujets d'EXamens de l'enseignement professionnel

Extraits végétaux et multirésistance à la chimiothérapie des cancers

La résistance à la chimiothérapie est un obstacle majeur pour le traitement de nombreuses pathologies malignes, dont les leucémies, les sarcomes (tumeurs malignes des tissus conjonctifs) et la plupart des carcinomes (tumeurs malignes des tissus épithéliaux).
Par conséquent, la recherche de nouveaux médicaments anticancéreux est essentielle pour améliorer le pronostic vital des patients. À ce titre, les produits naturels extraits des plantes médicinales traditionnelles sont de bons candidats.

Connue pour sa production de fruits comestibles, la plante *Annona glabra* a attiré l'attention des chercheurs du fait de son utilisation en médecine chinoise, pour le traitement de certains cancers.
Des extraits de cette plante ont été testés sur des lymphocytes circulants et sur différentes lignées leucémiques, afin d'évaluer leur potentielle cytotoxicité et d'en comprendre le mécanisme.

1. Micropropagation d'*Annona glabra* (6,5 points)

La culture naturelle d'*Annona glabra* à partir des graines est difficile à cause d'une germination lente et non uniforme aboutissant à l'obtention de plants très hétérogènes pouvant présenter des caractéristiques agronomiques indésirables. La micropropagation permet de remédier à ces difficultés de multiplication. L'initiation de la culture *in vitro* d'*A. glabra* est réalisée à partir de bourgeons axillaires.

1.1 Rappeler le nom du tissu indifférencié présent dans ce type d'explant.

Le **document 1** présente les recherches menées pour établir un système complet de micropropagation d'*A. glabra* en utilisant des explants de jeunes plantules.

1.2 Identifier les phytohormones utilisées dans le protocole et préciser celle qui induit la rhizogénèse.

1.3 Dégager le nom de chaque étape chronologique de la micropropagation d'*A. glabra* et indiquer sa durée respective.

1.4 En déduire une définition de la technique de micropropagation des végétaux.

1.5 Rappeler la nature biochimique du saccharose et de la glycine. Repérer un exemple de molécule appartenant à chacune des catégories suivantes : macroéléments, microéléments et vitamines.

1.6 Analyser l'impact de BAP et GA3 sur la croissance. Conclure quant aux concentrations optimales de BAP et de GA3.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

2. Évaluation de la cytotoxicité des extraits (6 points)

Des extraits des plantes obtenues sont ensuite testés sur différents types de cellules.
Les tests sont menés sur :

- une lignée cellulaire leucémique lymphoblastique humaine sensible appelée CEM ;
- une lignée dérivée de CEM exprimant le phénotype MDR (pour « *multidrug resistance* ») appelée CEM/VLB en raison de sa résistance à la vinblastine ;
- des lymphocytes normaux issus de prélèvements sanguins humains.

Le **document 2** présente la purification des lymphocytes à partir de sang.

2.1 Expliquer le principe de la séparation des cellules sanguines sur milieu Histopaque 1077®.

La culture *in vitro* des lymphocytes normaux est délicate contrairement aux lignées cellulaires continues.

2.2 Exposer les avantages que présente l'utilisation des lignées cellulaires continues en culture *in vitro*.

2.3 Expliquer l'utilité du contrôle des paramètres de température, pression partielle en CO_2 et hygrométrie, lors de la culture des lignées cellulaires.

L'estimation de la cytotoxicité repose sur la détermination de la viabilité cellulaire par un test colorimétrique utilisant le MTT (bromure de diméthylthiazol-diphényltétrazolium). Les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes réduisent le MTT en formazan. L'intensité de la coloration violette mesurée par spectrophotométrie est fonction du nombre de cellules vivantes.
La méthode et les résultats des tests de cytotoxicité utilisant des extraits de diverses parties de la plante d'*Annona glabra* (feuille, pulpe du fruit et graine) sont présentés dans le **document 3**.

2.4 Proposer une définition de l'IC50 et déterminer l'IC50 de l'extrait de feuille d'*Annona glabra* sur la lignée CEM/VLB à partir du graphe.

2.5 Montrer que l'extrait n'est pas cytotoxique pour les lymphocytes normaux.
Identifier l'extrait d'*Annona glabra* le plus cytotoxique sur la lignée CEM/VLB. Argumenter la réponse.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

3. Étude de l'induction de l'apoptose (5,5 points)

L'induction de l'apoptose pourrait être à l'origine de l'effet cytotoxique des extraits. Une étude est menée pour explorer cette hypothèse.
L'analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux après marquage fluorescent de l'ADN montre que la répartition des cellules de la lignée CEM/VLB dans les différentes phases du cycle cellulaire est affectée en présence d'extrait de graine d'*A. glabra* (**document 4**).

3.1 Représenter sur un graphe, l'évolution de la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire. En déduire la (ou les) phase(s) du cycle cellulaire dans lesquelles se trouvent les populations cellulaires 1, 2 et 3.

3.2 Comparer les processus cellulaires d'apoptose et de nécrose.

3.3 Comparer les deux cytogrammes et conclure sur l'effet de l'extrait de graines.

L'induction de l'apoptose dans les cellules de la lignée CEM/VLB traitées ou non par un extrait de graines d'*A. glabra* est étudiée en cytométrie de flux après marquage préalable des cellules avec deux réactifs fluorescents : l'iodure de propidium et l'annexine-V-EGFP, souvent nommée « Annexine V » (**documents 5 et 6**).

3.4 Montrer l'intérêt de l'utilisation de l'iodure de propidium et de l'annexine V pour identifier l'apoptose précoce et l'apoptose tardive. En déduire l'état physiologique des populations cellulaires des quadrants A, C et D.

3.5 Conclure sur l'intérêt potentiel de la plante *Annona glabra* dans la lutte contre les cancers multirésistants.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)
Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

<u>Document 1</u> : Effet de l'addition de BAP et de GA3 sur les plantules d'*Annona glabra*

Protocol of micropropagation of *Annona glabra*

For the phase of axillary bud proliferation (duration 30 days), cuttings of nodal segments removed from juvenile plants were cultured in a basic medium MS supplemented with various concentrations of Benzylaminopurin (BAP), used isolated or in combination with various concentrations of Indol acetic acid (IAA), and with or without 1.0 $mg.L^{-1}$ of Gibberellic acid (GA3). At the end of this phase, the average number of shoots obtained by explants and their average size were measured for each treatment. For the rooting of shoots obtained at the end of this proliferation phase, various concentrations of IAA and different pH were tested in the medium (duration 15 days). At the end of this phase, the average number of roots obtained by shoots and their average size were evaluated. The acclimatization of the microplants was then followed in controlled conditions for 21 days.

MS : Murashige and Skoog

Milieu de Murashige et Skoog (MS)

Acide borique (H_3Bo_3) …… 6,2 $mg.L^{-1}$	Nitrate de potassium (KNO_3)…… 1900 $mg.L^{-1}$
Acide nicotinique …….. 0,5 $mg.L^{-1}$	Phosphate de potassium (KH_2PO_4) …... 170 $mg.L^{-1}$
Agar ……... 10 $g.L^{-1}$	Pyridoxine / HCl ……..…… 0,5 $mg.L^{-1}$
Chlorure de calcium ($CaCl_2,2H_2O$)……. 440 $mg.L^{-1}$	Saccharose ……..…. 20 $g.L^{-1}$
Chlorure de cobalt ($CoCl_2,6H_2O$) ……... 0,025 $mg.L^{-1}$	Sulfate de cuivre ($CuSO_4,5H_2O$) ……..... 0,025 $mg.L^{-1}$
Glycine (recristallisée) …… 2,0 $mg.L^{-1}$	Sulfate de fer ($FeSO_4,7H_2O$) ……..…..… 27,8 $mg.L^{-1}$
Inositol ……... 100 $mg.L^{-1}$	Sulfate de magnésium ($MgSO_4,7H_2O$) .... 370 $mg.L^{-1}$
Iodure de potassium (KI)……..… 0,83 $mg.L^{-1}$	Sulfate de manganèse ($MnSO_4,4H_2O$) .... 22,3 $mg.L^{-1}$
Molybdate de sodium ($Na_2MoO_4,2H_2O$). 0,25 $mg.L^{-1}$	Sulfate de zinc ($ZnSO_4,7H_2O$) ……..… 8,6 $mg.L^{-1}$
Na_2EDTA ($Na_2EDTA,2H_2O$) ……..... 37,2 $mg.L^{-1}$	Thiamine / HCl …….. 0,1 $mg.L^{-1}$
Nitrate d'ammonium (NH_4NO_3)…… 1650 $mg.L^{-1}$	

Résultats

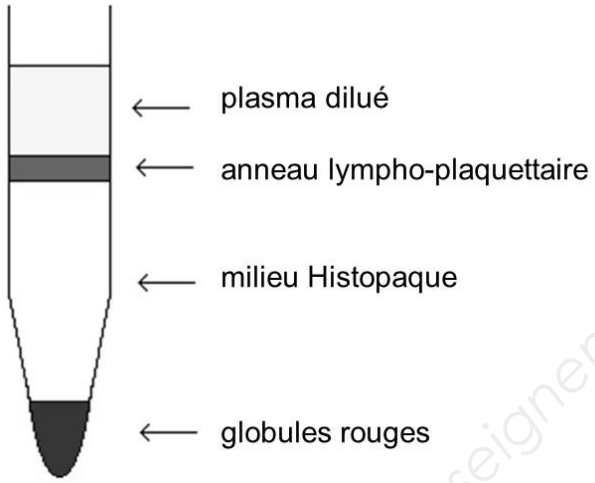
Les plantules sont issues de la micropropagation de bourgeons axillaires. La taille des tigelles est mesurée après 45 jours de culture *in vitro* (moyenne calculée à partir de 10 répétitions par traitement).

Régulateur de croissance ($mg{\cdot}L^{-1}$)		Longueur moyenne des tigelles (cm)
BAP	GA3	
0,00	0,0	1,12 ± 0,3
0,05	0,0	1,45 ± 0,3
0,05	1,0	0,79 ± 0,2
0,50	0,0	2,12 ± 0,8
0,50	1,0	0,68 ± 0,1
1,00	0,0	0,80 ± 0,2
1,00	1,0	0,68 ± 0,2
1,50	0,0	1,19 ± 0,6
1,50	1,0	0,44 ± 0,4

Base Nationale des Sujets d'Examen de l'enseignement professionnel

Document 2 : **Purification de lymphocytes à partir d'un prélèvement sanguin**

Le sang dilué au demi en tampon phosphate salin est déposé sur milieu Histopaque 1077® (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Le milieu Histopaque 1077® présente une densité de 1,077 $g.L^{-1}$ et contient un agent agrégeant des globules rouges. Après centrifugation, le tube présente l'aspect suivant.



Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document 3 : **Analysis of cytotoxicity**

Cytotoxicity assays of *A. glabra* extracts against different leukocyte cell lines

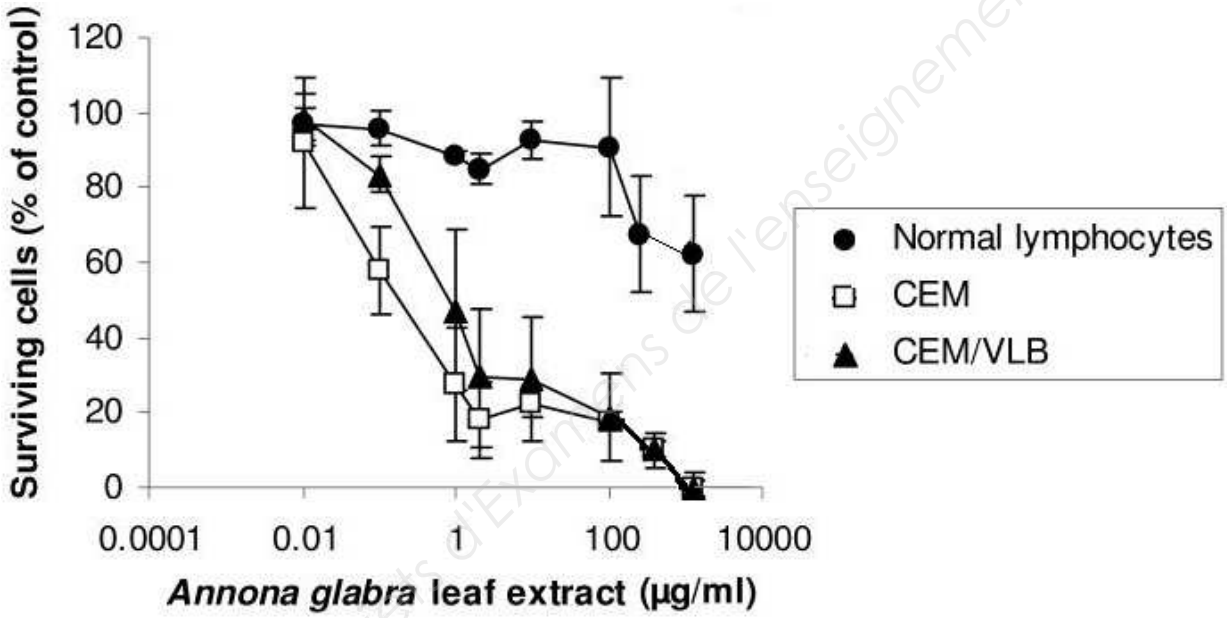
Cytotoxicity assays of *A. glabra* extracts against drug-sensitive leukemia cell line (CEM), multidrug-resistant leukemia cell line (CEM/VLB) and normal human lymphocytes were performed using the cell proliferation kit I (MTT) from Roche Biochemicals (Indianapolis, IN, USA).

The cells were plated in 96-well plates at 10^4 cells/100 µl/well for CEM and CEM/VLB, and $8x10^4$ cells/100 µl/well for the normal lymphocytes.

The leaf, pulp and seed extracts (0.01 to 5.00 10^3 µg/ml) were added in triplicates.

The plates were incubated at 37°C for 48 hours and the MTT assay was performed according to the manufacturer's protocol.

The percentage of surviving cells based on control treatment (untreated) was calculated and plotted against extract concentrations. The values from three separate experiments were averaged and the mean IC50 as well as standard deviation values were calculated for each extract.

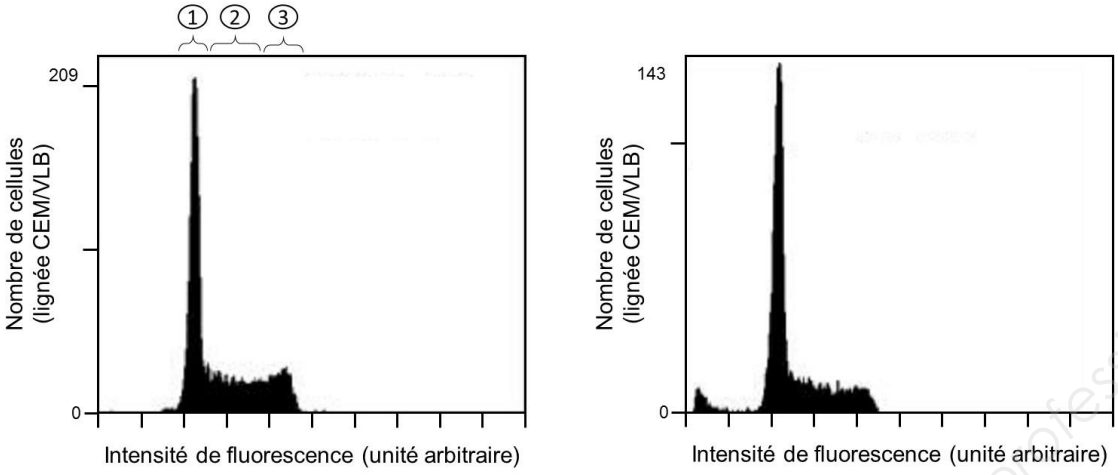


Cytotoxicity of normal lymphocytes and human leukemia cell lines using alcoholic extracts of leaf, pulp and seed from *Annona glabra*

	IC50 values of *A. glabra* extract (µg/ml)		
Cells	Leaf	Pulp	Seed
Human lymphocytes	>5.00 10^3 ±0.09 10^3	>5.00 10^3 ±0.06 10^3	>5.00 10^3 ±0.09 10^3
CEM	0.30±0.02	0.35±0.02	0.07±0.00
CEM/VLB	1.00±0.07	0.65±0.06	0.10±0.01

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

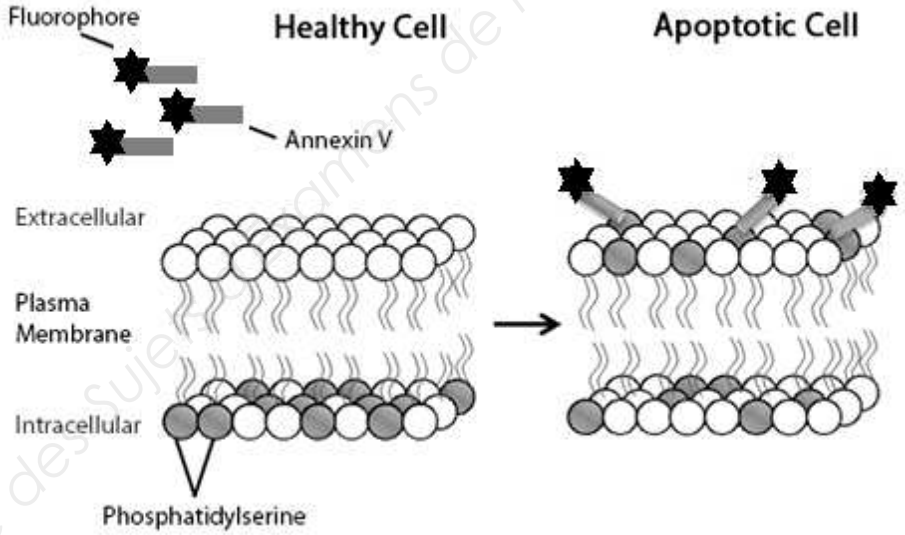
Document 4 : **Analyse du cycle cellulaire**



extrait de graine: 0 µg.mL^{-1} **extrait de graine: 10 µg.mL^{-1}**

Document 5 : Marquage différentiel à l'annexine-V et à l'iodure de propidium

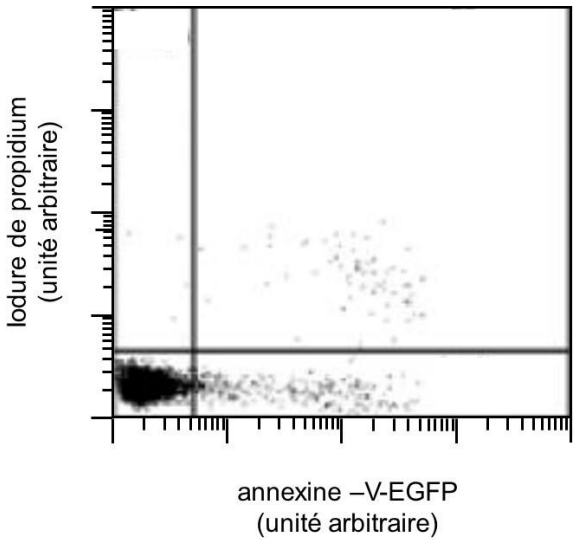
Annexine-V



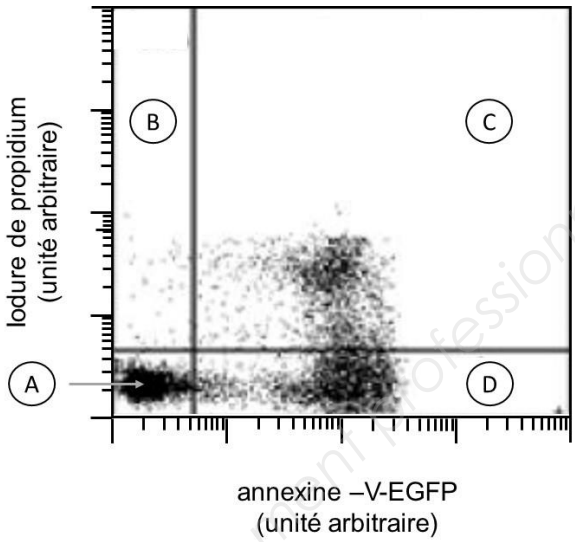
Iodure de propidium (IP) : c'est un colorant cationique et un agent intercalant des acides nucléiques sans spécificité de base (réagit avec l'ADN ou l'ARN). Excité par le laser bleu (488 nm), il émet une fluorescence rouge (617 nm) quand il est lié à l'ADN. Son utilisation en cytométrie en flux est liée à sa lipophobie (ou hydrophilie) relativement élevée, qui l'empêche de traverser facilement les membranes plasmiques, sauf celles endommagées. Ceci fait de lui un puissant marqueur de la viabilité cellulaire. Dans le cas d'une cellule viable, l'IP ne peut pénétrer et se lier à l'ADN de la cellule, contrairement à une cellule morte qui présente une membrane perméabilisée/fragilisée.

Reproduction des sujets interdite hors aménagements de l'enseignement professionnel

Document 6 : Analyse de l'induction de l'apoptose



extrait de graine: 0 µg.mL^{-1}



extrait de graine: 10 µg.mL^{-1}

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.