S1. Le diagnostic d'une hypersécrétion hormonale (stratégie partielle orale)
Monsieur Jean Stresstro présente depuis quelques mois une glycémie chroniquement trop élevée. Des dosages d'adrénaline et de glucagon ne montrent aucune anormalité. Les médecins penchent alors pour une anomalie de sécrétion du cortisol qui est une hormone hyperglycémiante.
On veut vérifier que l'hyperglycémie chronique de M. Jean Stresstro provient d'un excès de sécrétion de cortisol.

Pour répondre à la problématique, on vous demande :

- *d'**effectuer** le protocole demandé et de rendre compte de vos résultats (à l'aide d'un schéma légendé et d'une photographie légendée et titrée) ;*
- *d'**analyser** les résultats obtenus pour déterminer si l'hyperglycémie est due à une anormalité de la sécrétion en cortisol.*

Ressources complémentaires

Document 1. Aide à la stratégie.

Les hormones ayant un effet hyperglycémiant :

- le glucagon,
- l'hormone de croissance (GH),
- les catécholamines (exemple : adrénaline),
- le cortisol.

Document 2 : principe du test ELISA

Le test ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser les anticorps* ou des antigènes* dans un liquide biologique.

Dans cette technique de dosage employée ici, les puits d'une microplaque sont tapissés avec des anticorps anti-cortisol fixés au fond du puits. Les solutions à tester sont ensuite déposées dans les puits de la microplaque et si les antigènes recherchés sont présents ils vont se lier aux anticorps spécifiques. Un premier lavage est réalisé pour éliminer les antigènes non liés aux anticorps spécifiques. Un deuxième anticorps, l'anticorps traceur, capable de se lier à l'antigène recherché, est alors ajouté dans le puits. Un deuxième lavage permet d'éliminer les anticorps traceurs non fixés. L'anticorps traceur est couplé à une enzyme**. On ajoute enfin une molécule incolore (qui est le substrat** de l'enzyme) qui conduit à la formation d'un produit** coloré si l'enzyme est présente. L'intensité de la coloration dépend alors de la concentration en antigène recherché.

* Voir première spécialité, thème « immunologie ».
** Voir première spécialité, chapitre « enzymes ».

Document 3 : valeurs normales de concentration en cortisol dans le sérum et dans la salive. Les valeurs sont prises le matin (moment où la sécrétion de cortisol est la plus forte).

	Dans le sérum	Dans la salive
Concentration en cortisol le matin (en $\mu g.dL^{-1}$)	5 à 25	0,20 à 1,41

La sécrétion du cortisol suit un rythme circadien fixe : elle est maximale entre 6h et 8h du matin, puis décroît jusqu'au soir où elle est minimale.

Le prélèvement salivaire est simple : le cortisol libre plasmatique diffuse librement dans la salive où sa concentration est indépendante du flux salivaire. Le test sérologique nécessite une prise de sang.

Document 4 : le protocole à suivre

Dans le protocole, la totalité des molécules est remplacée par des produits de substitution.
Attention à bien organiser votre poste de travail pour éviter les erreurs qui peuvent arriver très vite.

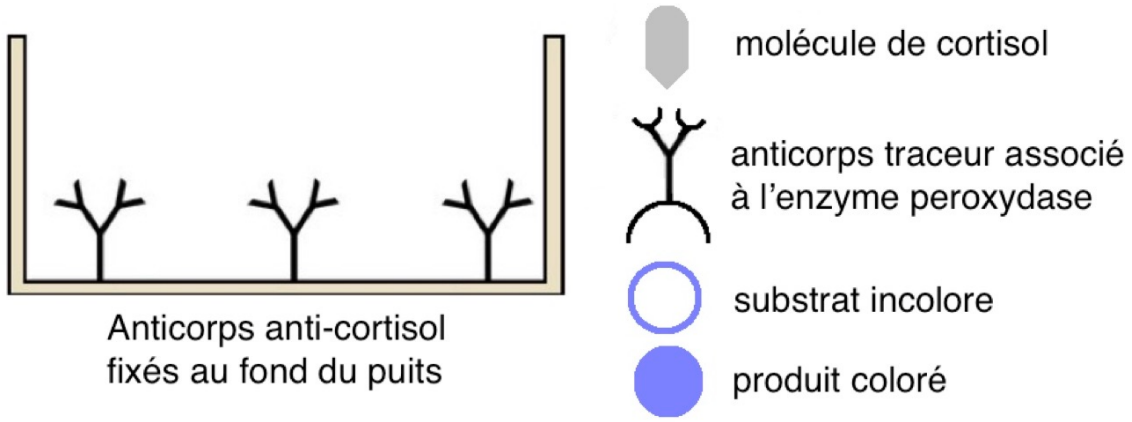
Matériel :

- une barrette de 8 puits au fond desquels sont fixés des anticorps anti-cortisol,
- quatre solutions à tester :
  - * 1 sans cortisol,
  - * 1 avec une concentration « normale » en cortisol (intervalle bas de 5 $\mu g.dL^{-1}$),
  - * 1 avec une concentration « normale » en cortisol (intervalle haut de 25 $\mu g.dL^{-1}$),
  - * 1 sérum à tester (sérum de M. Jean Stresstro),
- de l'eau distillée,
- une solution d'AC traceurs = complexe entre un anticorps anti-cortisol associé à l'enzyme peroxydase,
- une solution de lavage,
- une solution de substrat de l'enzyme peroxydase : H_2O_2. **L'action de l'enzyme sur ce substrat se traduit par une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en cortisol,**
- une micropipette (avec cônes), des gants, des lunettes de protection, un feutre effaçable.

Le mode d'emploi de la micropipette sera donné oralement.

Attention :

	Solution de lavage toxique Substrat de l'enzyme corrosif
	Blouse, lunettes et gants obligatoires.

A. **Déposer** dans quatre puits 100 µL de sérum à tester (puits numérotés 1, 2, 3 et 4), en repérant les puits (marquage au stylo). **Privilégier** le remplissage d'un puits sur deux pour éviter le risque de mélange.
B. **Laisser** incuber 10 min à température ambiante.
C. **Vider** la barrette en la renversant d'un geste énergique au-dessus de l'évier. Avant de la remettre à l'endroit, **tamponner** les puits sur du papier filtre pour **éliminer** les restes de produits et **éviter** la contamination.
D. **Laver** les quatre puits délicatement : pour cela, **remplir** tous les puits au ¾ (ne pas déborder) avec la solution de lavage et **vider** immédiatement puis **tamponner** comme précédemment. **Répéter** ensuite 2 fois le processus (= 3 lavages au total).
E. **Mettre** dans les quatre puits 100 µL de la solution d'anticorps traceur anti-anticorps sur lesquels sont fixés l'enzyme.
F. **Laisser** incuber 10 min à température ambiante.
G. **Vider** les puits et les **laver** / **tamponner** 3 fois comme à l'étape D.
H. **Mettre** dans les quatre puits 100 µL de substrat de l'enzyme peroxydase. **Attendre** qu'une coloration se développe (ne pas **attendre** trop longtemps pour **comparer** les colorations car au bout de quelques min les différences s'estompent).

Document 5 : les conventions pour le schéma