

## S1. Le diagnostic d'une hypersécrétion hormonale (stratégie partielle orale)

Monsieur X présente depuis quelques mois une glycémie chroniquement trop élevée. Des dosages d'adrénaline et de glucagon ne montrent aucune anomalie. Les médecins penchent alors pour une anomalie de sécrétion du cortisol qui est une hormone hyperglycémiant.

**On veut vérifier que ses symptômes proviennent d'un excès de sécrétion de cortisol et en chercher l'origine.**

**Pour répondre à la problématique, on vous demande :**

- d'**effectuer** le protocole ELISA 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 anomalie de la sécrétion en cortisol et en **chercher** l'origine si c'est le cas (là aussi, rendre compte de vos résultats).

### Ressources complémentaires

#### Document 1. Aide à la stratégie.

Les hormones ayant un effet hyperglycémiant : glucagon, hormone de croissance (GH), catécholamines (exemple : adrénaline), cortisol.

#### Document 2 : principe du test ELISA

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

Dans la technique utilisée, 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, 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 » et 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 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ )	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  $5 \mu\text{g.dL}^{-1}$ ),
  - \* 1 avec une concentration « normale » en cortisol (intervalle haut de  $25 \mu\text{g.dL}^{-1}$ ),
  - \* 1 sérum à tester (sérum de M. X),
- 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 :  $\text{H}_2\text{O}_2$ . **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.



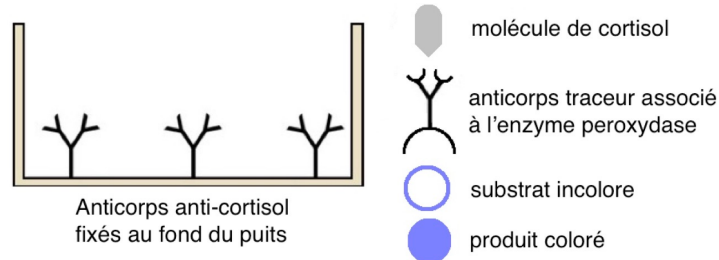
Solution de lavage toxique  
Substrat de l'enzyme corrosif



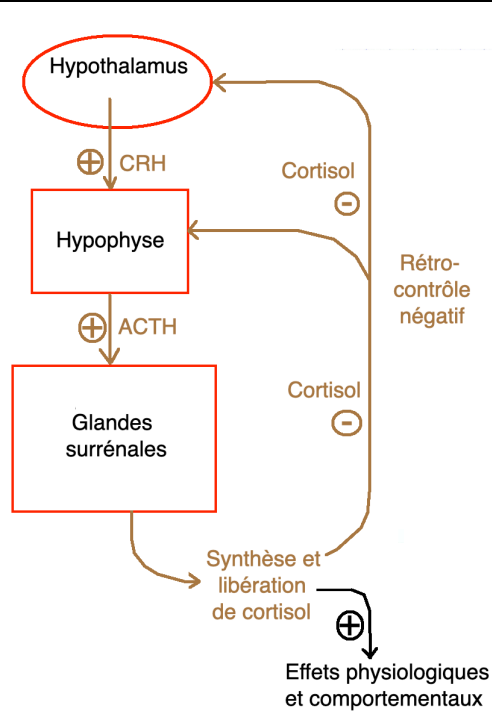
Blouse, lunettes et gants obligatoires

- A. **Déposer** dans quatre puits 100  $\mu\text{L}$  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  $\frac{3}{4}$  (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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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).

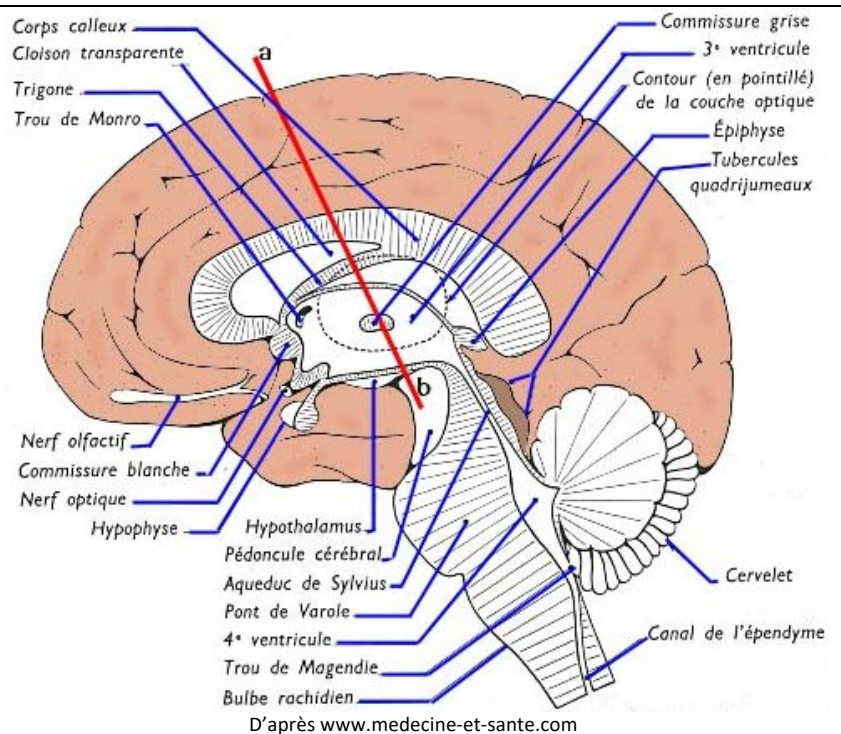
**Document 5 : les conventions pour le schéma**



**Document 6 : le système de régulation du cortisol**



**Document 7 : coupe sagittale de l'encéphale (hémisphère droit)**



**Document 8 : dosages de l'ACTH du patient**

Hormone	Concentration mesurée chez le patient	Valeurs de référence
ACTH	Elevée	Indétectable

**Matériel à votre disposition :**

- logiciel « Eduanat2 » et différents fichiers à ouvrir (fiche technique et fichiers dans votre répertoire TG).

**Travail à faire :**

- **Exploiter** le matériel mis à votre disposition pour **visualiser** si l'origine du problème vient du système de commande de la libération de cortisol. Pour cela **exploiter** les coupes d'encéphales à partir des images obtenues par IRM (sous Eduanat2).
- **Ouvrir** Eduanat2 → **charger** l'image IRMsain.anat.nii.gz puis dans « comparer les images » IRMpatient.anat.nii.gz.
- **Rendre** compte de vos résultats puis **conclure** à partir de l'ensemble des données. On indique que les surrénales du patient sont normales.