

Mise en situation et recherche à mener

Depuis plusieurs années, M. X présente une fatigue nerveuse, des troubles du sommeil mais aussi un visage gonflé et des accumulations de graisse au niveau du cou et du haut du dos. Son médecin suppose alors qu'il est atteint du syndrome de Cushing.

On cherche à argumenter, par un test ELISA, que M. X est atteint du syndrome de Cushing.

Ressources

Quelques informations sur le syndrome de Cushing :

Le syndrome de Cushing est une maladie liée à un déséquilibre hormonal. Il correspond à un excès de sécrétion de cortisol, hormone produite par les glandes corticosurrénales. Cet excès de sécrétion de cortisol entraîne des perturbations de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien à l'origine de différents symptômes comme l'apparition de graisses au niveau du visage, du tronc, une hypertension artérielle, des troubles psychiques ou une immunodépression.

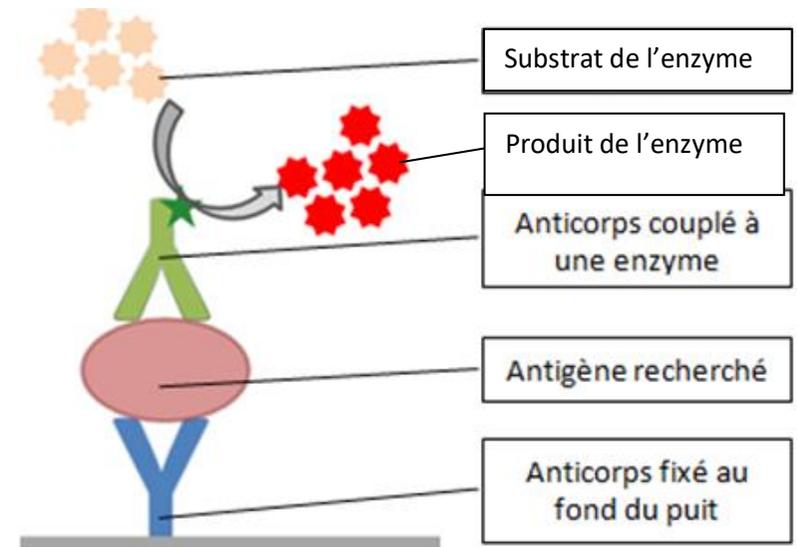
Valeurs normales de concentration en cortisol dans le sérum ou la salive :

	Dans le sérum	Dans la salive
Concentration en cortisol, le matin (en $\mu\text{g.dL}^{-1}$)	5,00 - 25,00	0,20 - 1,41

Principe du test ELISA lors de la recherche d'un antigène :

On utilise des puits tapissés avec des anticorps dirigés contre un antigène recherché. La solution à tester est ensuite déposée dans un puits et si l'antigène recherché est présent, il va se fixer aux anticorps présents au fond du puits. On rajoute alors dans le puits une solution d'anticorps spécifiques de l'antigène recherché couplés à une enzyme. Les puits sont alors rincés. Ainsi, les anticorps non fixés sont éliminés. Lorsqu'on rajoute dans le puits le substrat de l'enzyme, il se forme un produit coloré.

Par conséquent, plus la quantité d'antigène recherché est importante, plus la quantité de produit coloré obtenue après ajout du substrat est importante, plus la couleur du puits est intense.



Protocole (avec produits de substitution)

Afin d'argumenter que M.X est atteint du syndrome de Cushing :

- Réalisez un test ELISA.

Matériel :

- Salive du patient à tester (X)
- 7 solutions à concentrations croissantes en cortisol C1 à C6 (gamme étalon)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Concentration en cortisol $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$	0	4	8	16	32	64	128

- Barrette de puits au fond desquels sont fixées des molécules d'anticorps spécifiques du cortisol
 - Anticorps anti-cortisol lié à l'enzyme
 - Réactif ONPG de l'enzyme très sensible à la lumière et donc dans un tube protégé par du papier aluminium
 - Pipettes de prélèvement (une par manipulation) à placer après usage dans un récipient contenant de l'eau de javel
 - Papier filtre
 - Récipient de récupération des contenus des puits
 - Feutre permanent
 - Récipient avec eau de javel pour déposer le matériel souillé
- Chronomètre (montre)

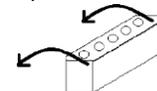
1. Repérer l'angle coupé de la barrette, le plus proche sera le puits n°1, le 8ème et dernier puits le X.
2. Déposer 2 gouttes ($40 \mu\text{L}$) *¹ :
 - De C1 dans le puits n°1, de C2 dans le puits n°2, etc... jusqu'à C7
 - De la salive X de l'individu à tester, dans le dernier puits
3. Déposer 2 gouttes d'anticorps anti-cortisol lié à l'enzyme, dans chacun des puits*².

4. Attendre 1 minute à température ambiante.

Le vrai test comporterait une étape de rinçage, mais comme nous utilisons des produits de substitution, cette étape ne doit pas être faite.

5. Vider le contenu des puits, par retournement de la barrette selon la méthode décrite ci-dessous, ce qui permet d'éliminer les molécules non fixées.

Vider le contenu de la barrette en la retournant d'un seul mouvement au-dessus du récipient de récupération, conformément au schéma, de manière à éviter le mélange des produits*³.



Avant de la redresser, la tamponner rapidement et délicatement sur du papier filtre propre pour éliminer le liquide restant

6. Ajouter 2 gouttes de réactif de l'enzyme (ONPG) dans chacun des puits*².

Attendre 3 à 4 minutes à température ambiante. Les changements de coloration apparaissent rapidement, puis se modifient au cours du temps
Prendre une photographie des résultats obtenus.

Sécurité



Précautions de la manipulation

*¹ Attention, une seule solution par puits. Changer de pipette de prélèvement à chaque nouvelle substance.

*² Ce dépôt doit être assez rapide ; Les niveaux des liquides doivent être, au final, équivalents.

*³ Lors du vidage des puits, attention à ne pas renverser le contenu d'un puits dans un autre puits.

