

SVT – Phase de résistance Stress : dosage colorimétrique du cortisol (produit de substitution) – Cédric Metge

Cycle et niveau de classe :

Lycée, Terminale EDS

Objectifs pédagogiques :

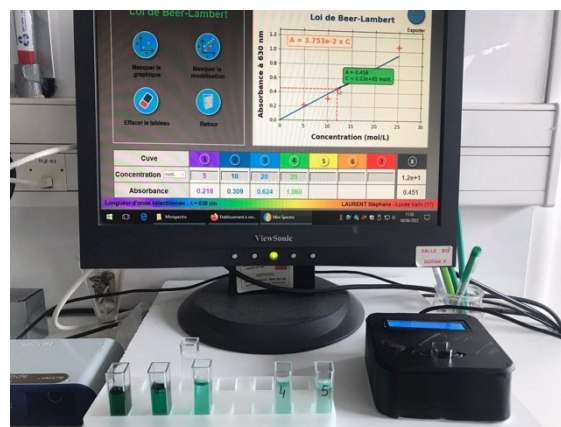
Réaliser un dosage colorimétrique du cortisol afin de mettre en évidence l'augmentation de sa concentration sérique lors de la phase de résistance

Compétences et capacités travaillées :

- Acquérir numériquement des données
- Utiliser des logiciels d'acquisition, de simulation et de traitement de données.

Outils numériques - intérêt et limites

Minispectro : est un spectrophotomètre fabriqué à partir d'un microcontrôleur **Arduino Nano**, d'un capteur de spectre **AS7341**, d'une DEL et d'un écran **LCD**. Le boîtier est imprimé à l'aide d'une **imprimante 3D**. Le minispectro est dirigé par une interface graphique très intuitive pour les élèves et les professeurs.



L'utilisation de ce mini spectro est proche des spectrophotomètres que l'on trouve habituellement dans les lycées. Il permet à nos élèves une première approche, **très pédagogique**, de la spectrophotométrie. Cependant, le capteur est sensible à seulement 8 longueurs d'ondes, il y a donc une **extrapolation des spectres d'absorption**.

Contextualisation :

Le cortisol est l'hormone qui intervient dans la phase de résistance du stress aigu. Vous êtes neuf binômes à collaborer sur une même étude pour doser le cortisol du sérum d'étudiants. Des étudiants ont subi des prélèvements lors de deux périodes :

la première période sans examen universitaire et la seconde avant des examens. (Le laboratoire voisin de recherche vous confie ses prélèvements pour analyse du cortisol).

Présentation (organisation, consignes et supports)

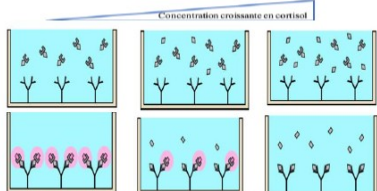
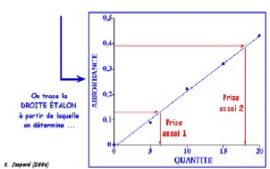
Organisation :

Séance de 2 heures en binôme






Consigne :

A l'aide d'un dosage colorimétrique, on cherche à montrer une augmentation du cortisol sanguin en cas de stress aigu lors de la phase de résistance.

Supports :

Ressources							
<p>Document 1 : Normes du cortisol sérique lors d'un examen</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <th style="padding: 2px 10px;">Heure de prélèvement</th> <th style="padding: 2px 10px;">Concentration (en nmol/l)</th> <th style="padding: 2px 10px;">Concentration (en micromol/l)</th> </tr> <tr> <td style="padding: 2px 10px;">8 h</td> <td style="padding: 2px 10px;">275 – 620</td> <td style="padding: 2px 10px;">100 - 250</td> </tr> </table> <p>Le syndrome de Cushing se caractérise par une sécrétion excessive de cortisol qui a pour origine des adénomes surrénalien ou hypophysaire. Sérum : liquide sanguin constitué de protéines, divers ions et des hormones (débarassé des cellules sanguines et des protéines de coagulation).</p> <p>Document 2 : Test Elisa par compétition</p> <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p>Concentration croissante en cortisol</p> <p>Légendes :</p> <ul style="list-style-type: none"> Anticorps anti-cortisol à doser Molécule à doser Enzyme Réactif Déclat coloré </div> </div> <p style="color: red; font-size: small;">La concentration de la molécule est donc inversement proportionnelle à l'intensité de la coloration du puits.</p>	Heure de prélèvement	Concentration (en nmol/l)	Concentration (en micromol/l)	8 h	275 – 620	100 - 250	<p>Document 3 : Détermination de concentration par dosages colorimétriques</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>Gamme étalon</p> <p>Quantités croissantes et CONNUES de la molécule choisie comme référence ou standard</p> <p>0µg 5µg 10µg 15µg 20µg</p> <p>Coloration dont l'absorbance est PROPORTIONNELLE à la quantité</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Echantillon à doser</p> <p>Volume de prise d'essai</p> <p>10µL 50µL 100µL</p> <p>Quantité INCONNUE mais absorbance proportionnelle à cette quantité</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>On trace la DROITE ÉTALON à partir de laquelle on détermine ...</p> <p>... la quantité inconnue dans le volume de prise d'essai</p> </div>
Heure de prélèvement	Concentration (en nmol/l)	Concentration (en micromol/l)					
8 h	275 – 620	100 - 250					

Matériel et protocole d'utilisation du matériel	
<p>Matériel :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Barrette de 8 puits avec l'anticorps anti-cortisol - Micropipette, des embouts et sa fiche technique - 5 tubes avec le cortisol lié à l'enzyme (concentration fixe) et le cortisol à des concentrations connues (5, 350, 550, 685, 700 nmol/l) - tube d'un étudiant avant un examen X - tube du même étudiant hors période d'examen Y - tube d'un individu du lot confié par le laboratoire voisin Z - tube contenant le réactif de l'enzyme - Mesurim 2 et sa fiche technique - Fichier Calc : « Dosage colorimétrique cortisol.ods » et sa fiche technique 	<p>Afin de montrer une augmentation du cortisol sanguin en cas de stress aigu lors de la phase de résistance :</p> <p style="text-align: center;">Doser le cortisol sérique des trois échantillons.</p> <p><u>Protocole :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Annoter vos puits et déposer 20 µl des solutions fournies à la micropipette - Laisser incuber 2 minutes - Vider la barrette en les retournant délicatement sur le papier fourni - Laver tous les puits avec 20 µl de solution de lavage et vider comme précédemment - Mettre dans tous les puits 30 µl du réactif de l'enzyme

<p>Sécurité</p> 	<p>Équipements de protection individuelle</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">    </div>	<p>Dispositif d'acquisition et de traitement d'images</p> 
--	---	--

Lecture des absorbances

Après avoir réalisé les différentes cupules pour le dosage Elisa, utilisez le minispectro pour mesurer les absorbances de votre gamme étalon et des individus X, Y, et Z des cuves mises à disposition.

1. **Réaliser** le blanc avec de l'eau distillée,
2. **Choisir** la longueur d'onde 515 nm,
3. **Utiliser** l'onglet Colorimétrie pour lire les différentes absorbances,
4. A l'aide d'un tableur, **construire** la représentation graphique de votre gamme étalon (absorbance en fonction de la concentration) et en déduire les concentrations des échantillons X, Y et Z,
5. **Interpréter** les résultats obtenus pour l'individu étudié (échantillon X et Y) et de l'échantillon Z,
6. **Confronter** vos résultats expérimentaux de votre individu pour les échantillons X et Y à une étude statistique pour déterminer si vos résultats semblent fiables.

[Fichier Calc "Etude statistique des résultats obtenus pour différents individus](#)

En supplément :

[Aide à l'utilisation de l'interface graphique](#) du Minispectro (intuitive)

[Tutoriel pour la fabrication](#) du Minispectro

Bilan et retour des élèves :

Une activité pratique dense comportant un test Elisa, un dosage colorimétrique et une analyse d'étude statistique. L'exemple utilisé est fictif et ne repose sur aucune recherche ou publication. La gamme étalon et les échantillons pour le minispectro sont réalisées par le technicien en utilisant une gamme de rose à partir du chou rouge.

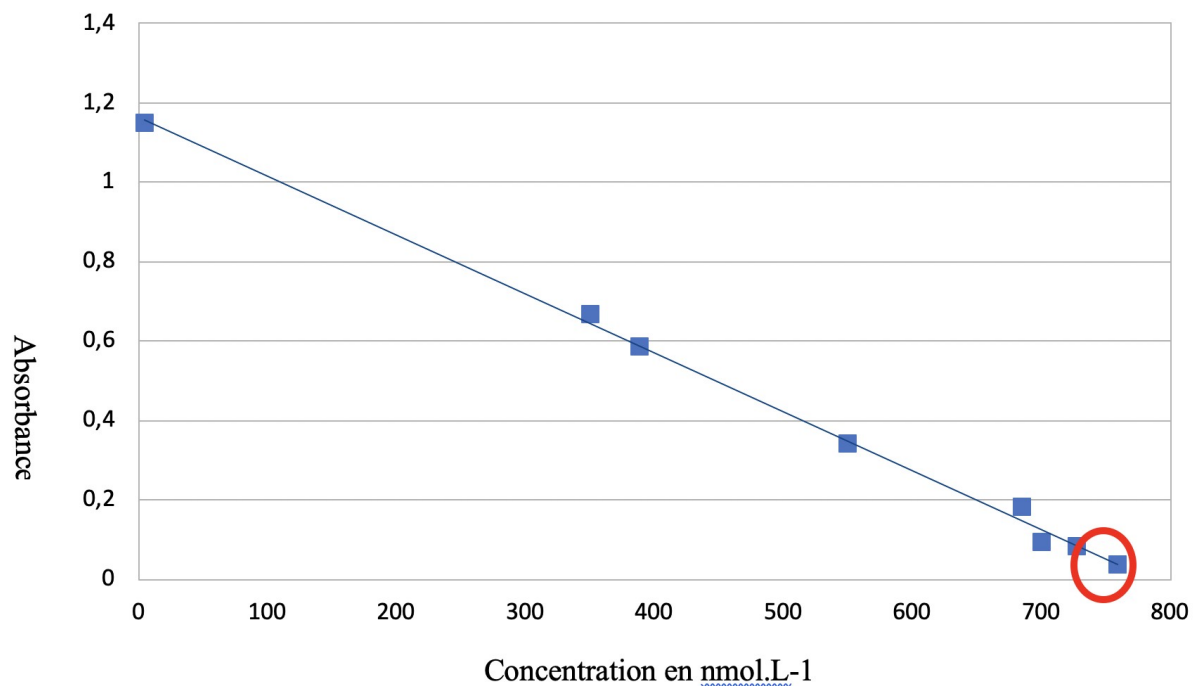
« Pour ma part, j'ai trouvé le TP sur le cortisol très formatif, j'ai pu utiliser le mini spectrophotomètre ce qui est intéressant pour faire un pont entre la Chimie et la SVT. De plus j'ai eu l'occasion d'apprendre les fonctionnalités calculatoires du logiciel tableur que je ne connaissais pas, comme les barres d'incertitude ou les calculs d'écart type et moyenne. Enfin l'utilisation des micropipettes c'est toujours sympa donc cela m'a vraiment plu. »

« Pour le tp sur le cortisol, nous avons utilisé un test elisa où nous avons observé les couleurs de chaque solution. Nous avons donc appris à utiliser un spectrophotomètre et préparer des

solutions, ce qui peut être amusant. Les tp sont simples, ludiques, passionnants et enrichissants. »

Exemples de production :

Graphique représentant l'absorbance en fonction de la concentration en cortisol



Titre : Graphique représentant l'absorbance du cortisol en fonction de sa concentration.

On a cherché à partir de ce graphique les concentrations en cortisol des individus x, y et z :

B	C	D
C(μmol/L)	A	
5	1,051	
350	0,539	
550	0,088	
685	0,023	
700	0,039	
-667,161851	0,029	
-380,620859	0,466	
-680,931556	0,008	

Individus

— x
— y
— z

Formule pour la concentration :

$$=(a- 1,04648993828817)/0,001525087201503$$

On observe que l'individu z a une forte concentration en cortisol (680.931555 μmol/L), proche de la concentration de l'individu x (667.161851 μmol/L). L'individu y a une faible concentration de 380,620859 μmol/L.

On observe que l'individu z a une forte concentration en cortisol ($680.931555 \mu\text{mol/L}$), proche de la concentration de l'individu x ($667.161851 \mu\text{mol/L}$). L'individu y a une concentration bien plus faible de $380,620859 \mu\text{mol/L}$.

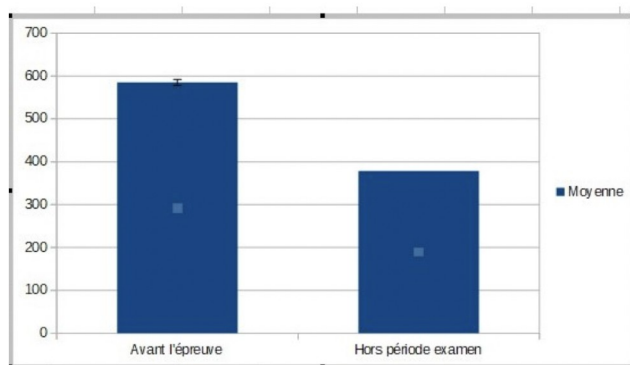
Or nous savons que l'individu x est en période d'examen ce qui est source de stress contrairement à l'individu y qui est éloigné de sa période d'examen, il n'y a pas de source de stress. De plus, nous savons que le cortisol est l'hormone qui intervient dans la phase de résistance du stress aigu, c'est-à-dire qu'il y a une forte sécrétion de cortisol dans une situation de stress c'est le syndrome de Cushing.

On peut donc en déduire que l'individu z est lui aussi en situation de stress, il présente en effet une forte concentration de cortisol.

Cependant ces résultats ne sont pas suffisants, il faudrait réitérer l'expérience avec plusieurs autres individus.

	Avant l'épreuve	Hors période examen
Moyenne	584,866666667	378,533333333
Ecart-type	17,8764598311	22,753148071
Nombre d'expériences	30	30
Intervalle de confiance à 95 %	6,67517980443	8,4961651202

Concentration en cortisol ($\mu\text{mol/L}$)



Graphique représentant la moyenne de concentration de cortisol de plusieurs individus avant épreuve et hors période examen

On observe que la concentration en cortisol de l'individu y ($380,620859 \mu\text{mol/L}$) hors période examen se trouve dans l'intervalle de confiance.

Mais on remarque que les concentrations en cortisol des individus x et z est très élevés ($667.161851 \mu\text{mol/L}$ et $680.931555 \mu\text{mol/L}$) avant l'examen et ne se trouve pas dans l'intervalle de confiance de la moyenne. **On peut donc en conclure que nos résultats des concentrations de x et z ne sont pas assez pertinents.**