

# TP : Le niveau de stress

## Mise en situation et recherche à mener

Certaines conditions excessives de travail sont source de fatigue et de stress. Une équipe de recherche en endocrinologie s'interroge sur le niveau de stress généré par un travail important et cherche à le mesurer sur un échantillon représentatif de personnes travaillant dans un contexte de surmenage. Pour cela, des tests salivaires de cortisol, rapides et pratiques à effectuer, sont réalisés sur ces personnes à 13 h, moment de la journée où l'on observe en général un « pic » de sécrétion, après celui du matin.

**On cherche à déterminer le niveau de stress d'une personne volontaire.**

## Ressources

### Doc. 1 : test salivaire de cortisol

Lors d'un stress aigu, le cerveau déclenche une réponse très rapide de l'organisme, puis une réponse plus lente se met en place, au cours de laquelle une hormone, le cortisol, est sécrétée par les glandes surrénales.

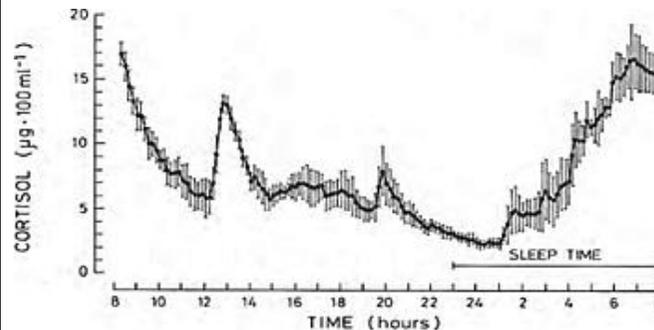
Le cortisol circulant dans le sang passe aussi dans la salive, ce qui fait qu'une augmentation de la cortisolémie (concentration sanguine de cortisol) se traduit par une augmentation proportionnelle de la concentration de cortisol dans la salive.

### Doc. 2 : concentration du cortisol salivaire

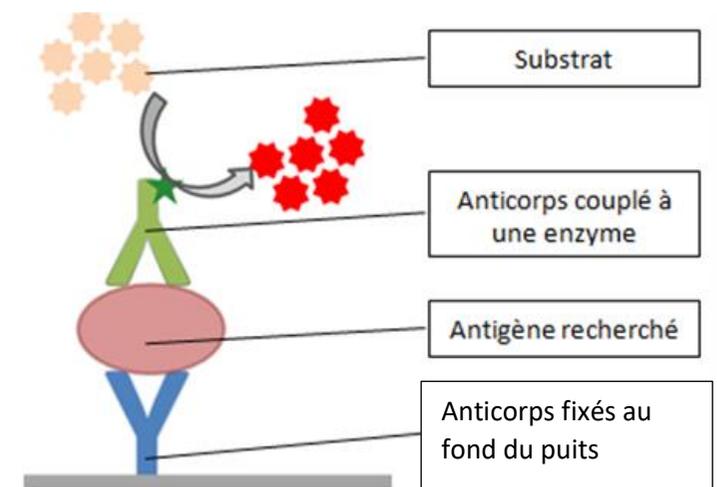
Le cortisol contenu dans la salive varie au cours de la journée. Il existe des différences individuelles, selon l'âge, le sexe et l'état de santé.

Le graphique ci-contre représente l'évolution de la concentration en cortisol salivaire au cours de la journée chez des étudiants d'une même cohorte, sains et non exposés à des situations stressantes (profil moyen de 12 individus).

*Source : INRS Colloque stress et cortisol salivaire*



### Doc. 3 : principe du test Elisa



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

### Matériel :

- Salive du patient à tester (X)
- 7 solutions à concentrations croissantes en cortisol C1 à C7 (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

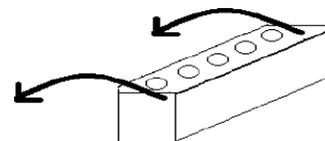
- Barrette de puits au fond desquels sont fixées des molécules d'anticorps spécifiques du cortisol
- Anticorps anti-cortisol lié à l'enzyme
- Réactif ONPG de l'enzyme très sensible à la lumière et donc dans un tube protégé par du papier aluminium
- Cônes de prélèvement à placer après usage dans un récipient contenant de l'eau de javel
- Papier filtre
- Récipient de récupération des contenus des puits
- Feutre permanent
- 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 40  $\mu\text{L}$  de chaque solution dans un puits :
    - De C1 dans le puits n°1, de C2 dans le puits n°2, etc... jusqu'à C7 (utiliser le même cône)
    - De la salive X de l'individu à tester, dans le dernier puits (changer de cône)
  3. Déposer 40  $\mu\text{L}$  d'anticorps anti-cortisol lié à l'enzyme, dans chacun des puits. (changer de cône : 1 seul pour les prélèvements => même molécule) => les dépôts doivent se faire rapidement.
  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 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 papier absorbant, conformément au schéma, de manière à éviter le mélange des produits.



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

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

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.