

# **COURS DE COLLEGE DE MALADIES INFECTIEUSES**

## **MICROBIOLOGIE – PARASITOLOGIE**



### **Diagnostic biologique de la toxoplasmose**

**26 Janvier 2012 Faculté de Médecine de Sousse**

# Principes des techniques utilisées dans le diagnostic biologique de la toxoplasmose

*Pr.Ag Fathallah Akila*

*Faculté de Médecine de Sousse*

*CHU F. Hached de Sousse*

26 Janvier 2012 Faculté de Médecine de Sousse

## **Le diagnostic de la toxoplasmose**

**La recherche des anticorps sériques apporte une certitude diagnostique (immunocompétent)**

**L'étude de différents isotypes et de leur cinétique, préciser le stade évolutif de l'infection.**

**Elle est complétée par la recherche des Ac dans d'autres liquides biologiques (LCR, humeur aqueuse ,.....)**

# I La recherche des anticorps circulants :

**Les techniques sérologiques font appel**

- **A des antigènes entiers, vivants ou fixés = Antigènes figurés**
- **A des extraits antigéniques = Antigènes solubles**

# 1- Techniques utilisant des antigènes figurés

## 1.1- Dye test

## 1.2- Immunofluorescence indirecte (IFI)

## 1.3- Agglutinations

## 1.4- Réaction Immuno Sorbent Agglutination Assay (ISAGA) :

# 1.1- Dye test

## Principe

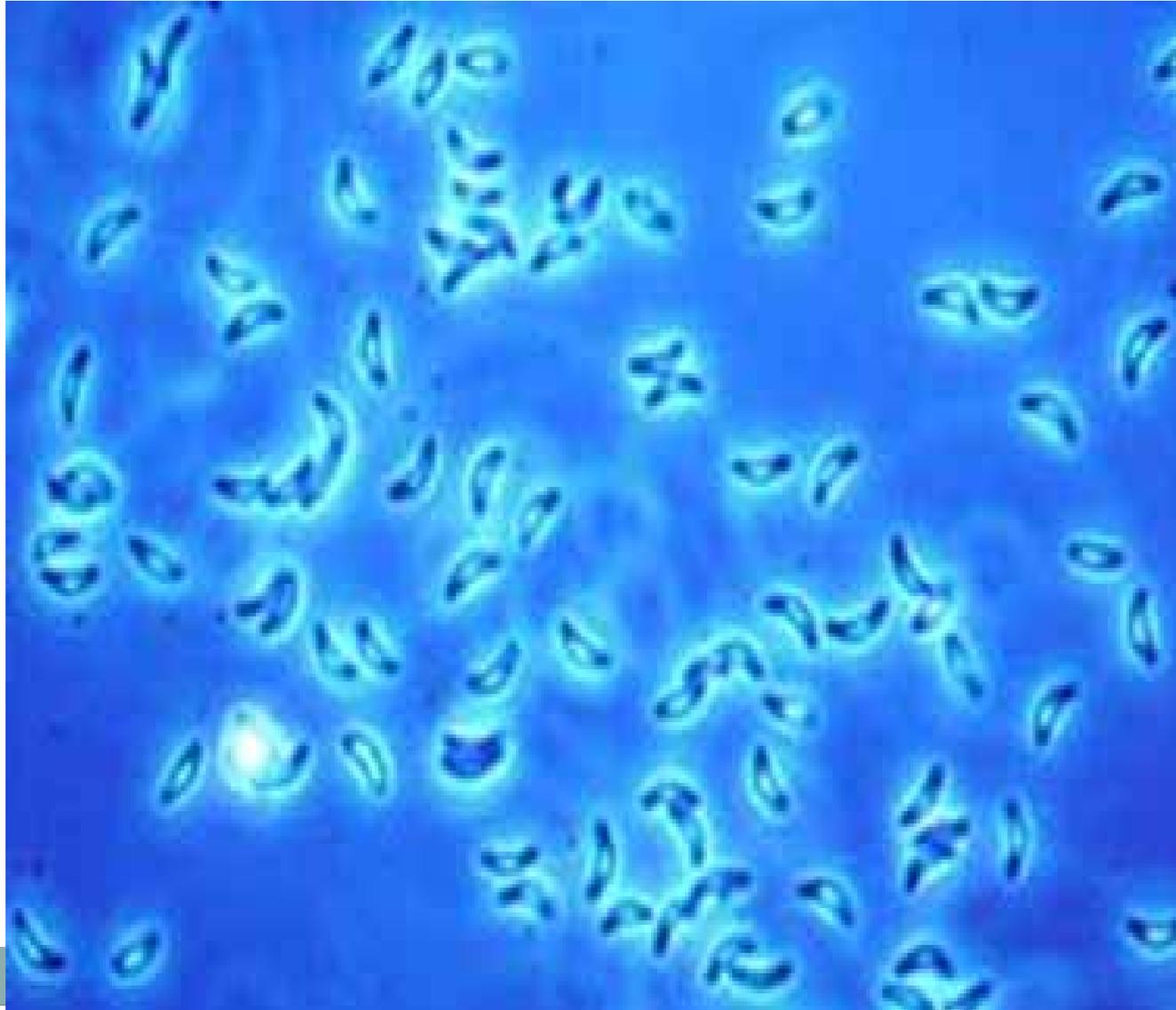
Des dilutions de sérum à tester, sont incubés avec des **toxoplasmes vivants** .

Après incubation la lecture se fait directement au microscope à contraste de phase.

**R°(+)** 50% des parasites sont lysés par les Ac.

les toxoplasmes morts apparaissent grisâtres alors que les parasites vivants apparaissent bien brillants

## 1.1- Dye test



## **1.1- Dye test**

**Technique de référence ++++**

**Seuil de positivité = 2 UI**

**Détecter les IgM et les IgG de surface.**

**Inconvénients :**

**Entretien d'une souche de toxoplasme vivants**

## 1.2- Immunofluorescence indirecte (IFI) (Toxo-Spot IF Biomérieux)

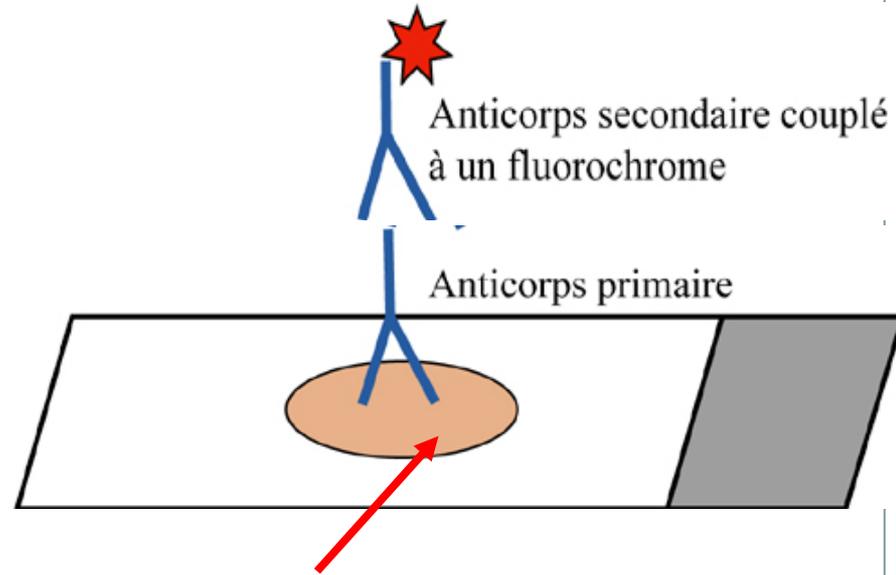
### Principe

L'Ag = **trophozoïtes de toxoplasme formolés** .

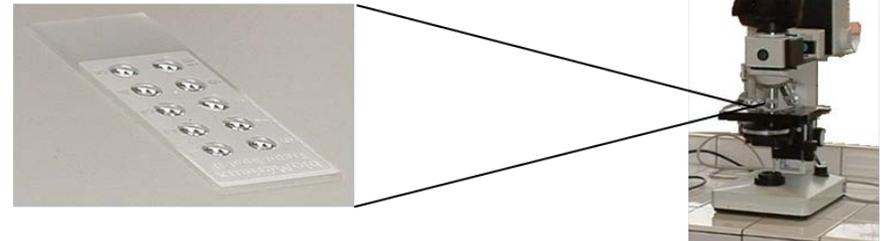
Sur ces Ag fixés, on fait agir différentes dilutions du sérum à tester (1/40, 1/80, 1/160, 1/320 ,etc.....).

La fixation des Ac spécifiques est révélé par des anti-Ig humaines marquées à la fluorescéine

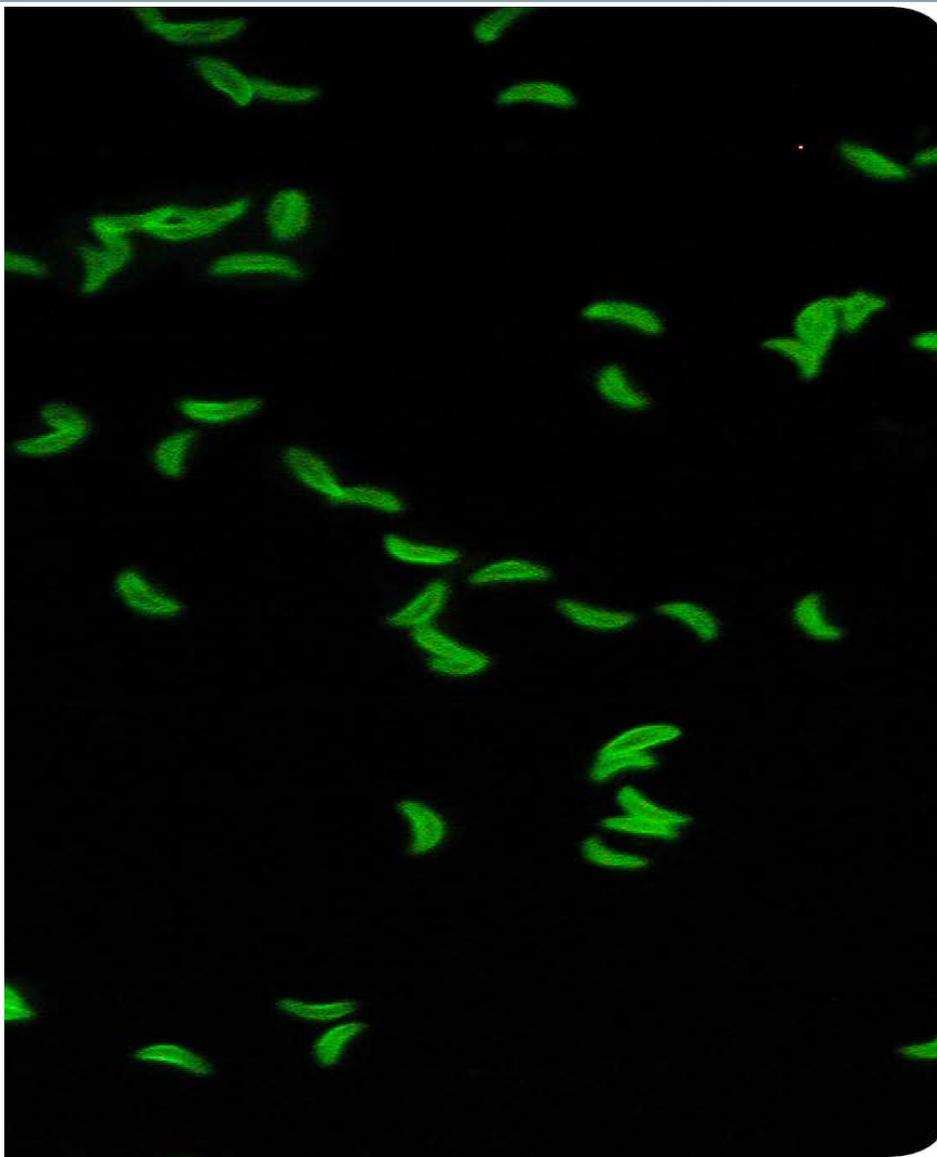
Microscope à fluorescence



Antigène fixé



Microscope à fluorescence



**Le titre = dernière dilution positive pour laquelle l'intégralité de la membrane des parasites apparait bien fluorescente.**

**Ce titre est par la suite converti en **UI** en utilisant dans chaque réaction un témoin positif à titrage connu.**

**IFI (-) les toxoplasmes sont rouges**

Selon l'anti-Ig utilisé :

► **une IFI –IgG** les résultats exprimés en UI

le seuil de positivité : **12 UI/ml** .

rare faux (+) (AC antinucléaires)

► **IFI –IgM** « = **Test de Remington** » (conjugué anti-IgM)

s'exprime par l'inverse de la dernière dilution positive

( seuil = 1/40, 1/50)

des faux (+) sont plus fréquents

de faux (-)

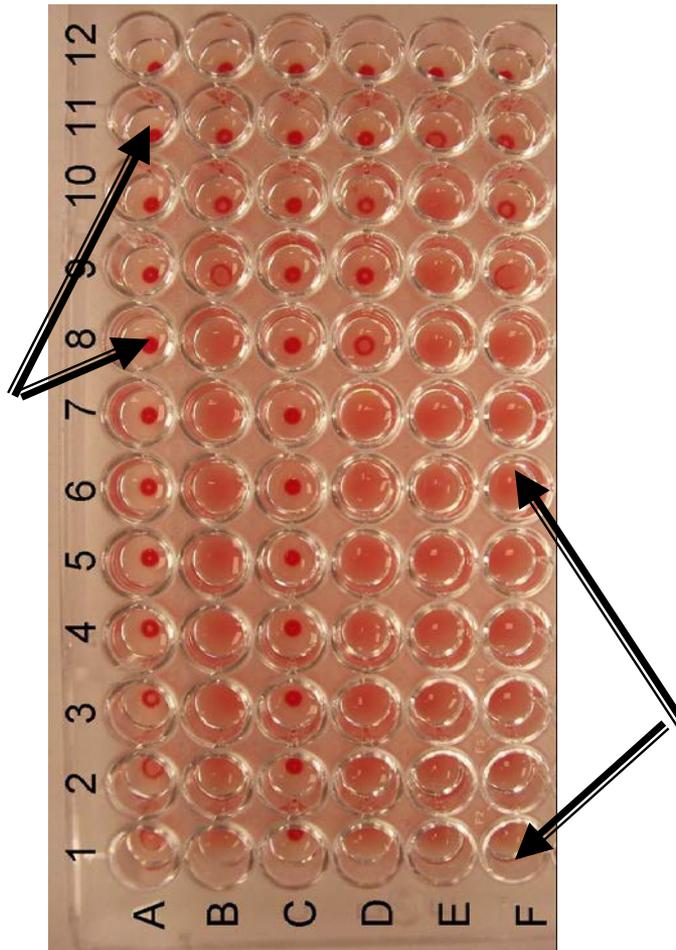
## **1.3- Agglutination directe d'une suspension de toxoplasmes**

**Bonne technique de dépistage.**

**Plaques de microtitration à 96 cupules à fond en U**

**Mettre en présence des suspensions très riches de trophozoïtes de toxoplasmes de diverses dilutions de sérums à étudier (1/40 , 1/80).**

Bouton de sédimentation = **R°(-)**



Après 24 heures d'incubation,  
l'agglutination est lu à l'œil  
nu

Une **R°(+)** = un voile formé au  
fond de la cupule  
(agglutination)

Une **R°(-)** se traduit par un  
point formé au fond de la  
cupule (sédimentation des  
toxoplasmes.)

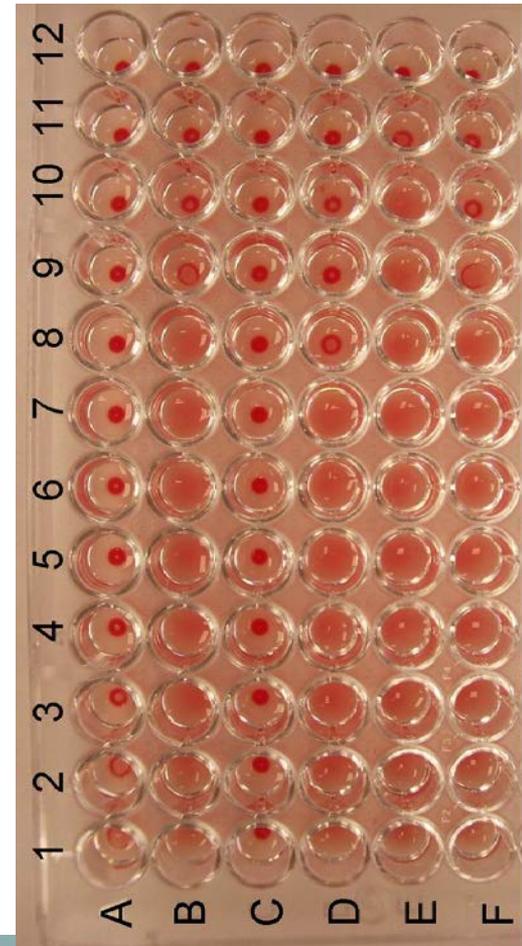
Le titre = dernière dilution  
donnant un voile couvrant  
**50%** de la cupule.

Voile = **R°(+)**

## Agglutination directe sensibilisée (ADS) :

Test réalisée sur une série de dilutions de sérum traitée au **2-mercapto-éthanol (2ME)** qui détruit les IgM.  
donc **ne détecte que les IgG**

Très sensible (seuil = **4 UI**)  
Peut être employée en dépistage et en titrage.



## 1.4- Réaction ISAGA Immuno Sorbent Agglutination Assay :

Utilisé pour la recherche des **IgM , IgA et IgE**

Ag = toxoplasmes formolés

Principe d'immunocapture.

la 1<sup>ère</sup> étape est une immunocapture :

le fond des puits de plaques de microtitration (fond en U) est sensibilisé par des Ac monoclonaux humain anti-IgM ,A ou E.

L'incubation du sérum humain dans ces cupules permet une capture des IgM, A ou E spécifiques ou non de *Toxoplasma gondii*.

Après lavage une suspension de toxoplasmes est ajoutée dans les cupules.

Une **R° (+)** un **voile formé au fond de la cupule**

Une **R° (-)** un **bouton de sédimentation**

## 1.4- Réaction ISAGA Immuno Sorbent Agglutination Assay :

Dans le but de quantifier les IgM, ou A anti-toxoplasme. La même R° est appliquée sur 3 cupules dans lesquelles on ajoute 3 quantités croissantes d'Ag.

A la lecture un score allant de **0 à 4+ est** affecté a chacune des cupules permettant d'attribuer au sérum testé un indice de:

**0 (sérum négatif)**

à **12 (sérum fortement positif** où dans ce cas les 3 cupules ont un voile complet témoin d'une grande quantité IgM, ou A anti-toxoplasme).

**Le seuil de positivité = 9**

## **2-Techniques utilisant des antigènes solubles**

### **Antigène**

**Toute ces R° utilisent un Ag extrait de tachyzoïtes,**

**La qualité des R° sera entièrement dépendante de la qualité de l'Ag préparé.**

**L'Ag soluble est fabriqué à partir de tachyzoïtes ,constitué d'un mélange d'Ag cytoplasmique et d'Ag membranaire.**

**2.1- Agglutination passive de particules de latex**

**2.2- ELISA**

**2. 3- ELIFA**

**2.4- WB**

## 2.1- Agglutination passive de particules de latex

L'Ag fixé sur particules de latex .

1 goutte de latex sensibilisée (+)

1 goutte de D° sérum

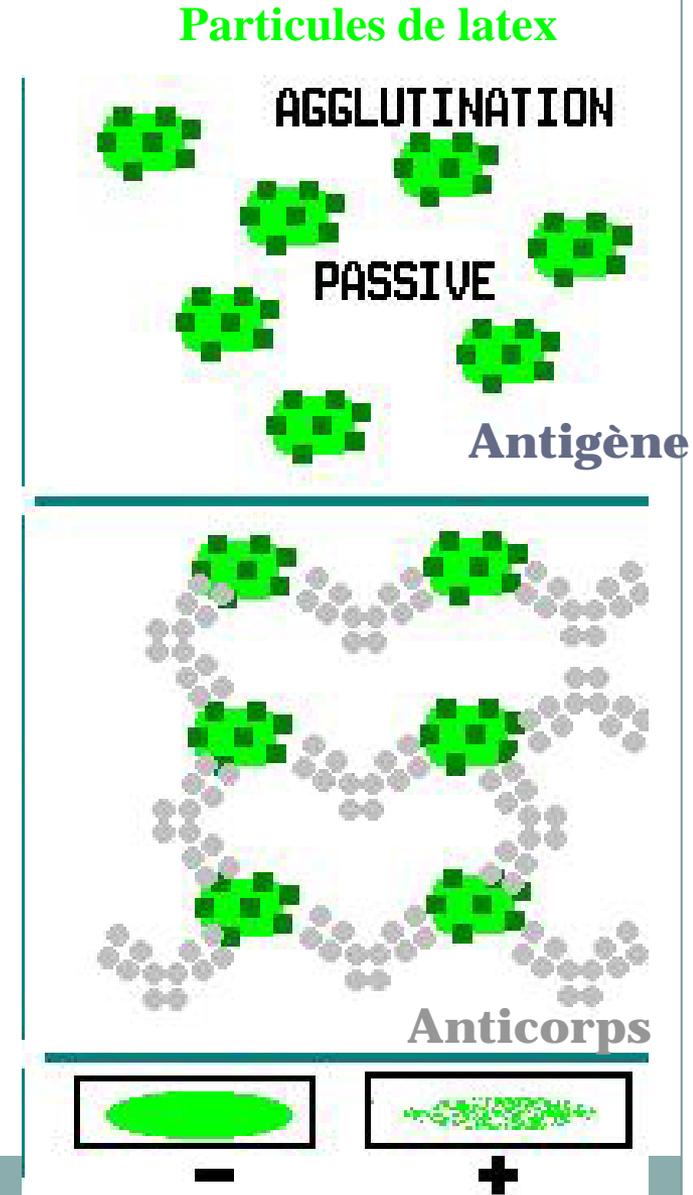
lecture à l'œil nu qq mn

R° (+) = agglutinat

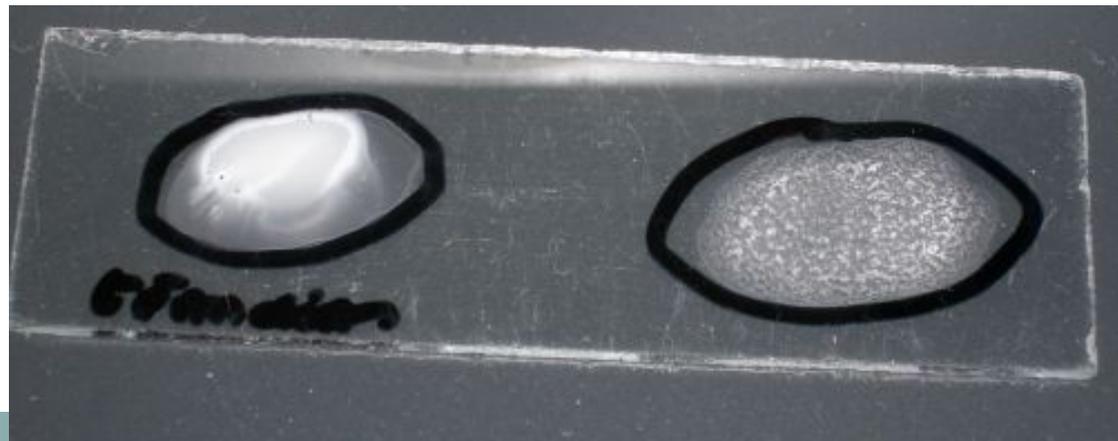
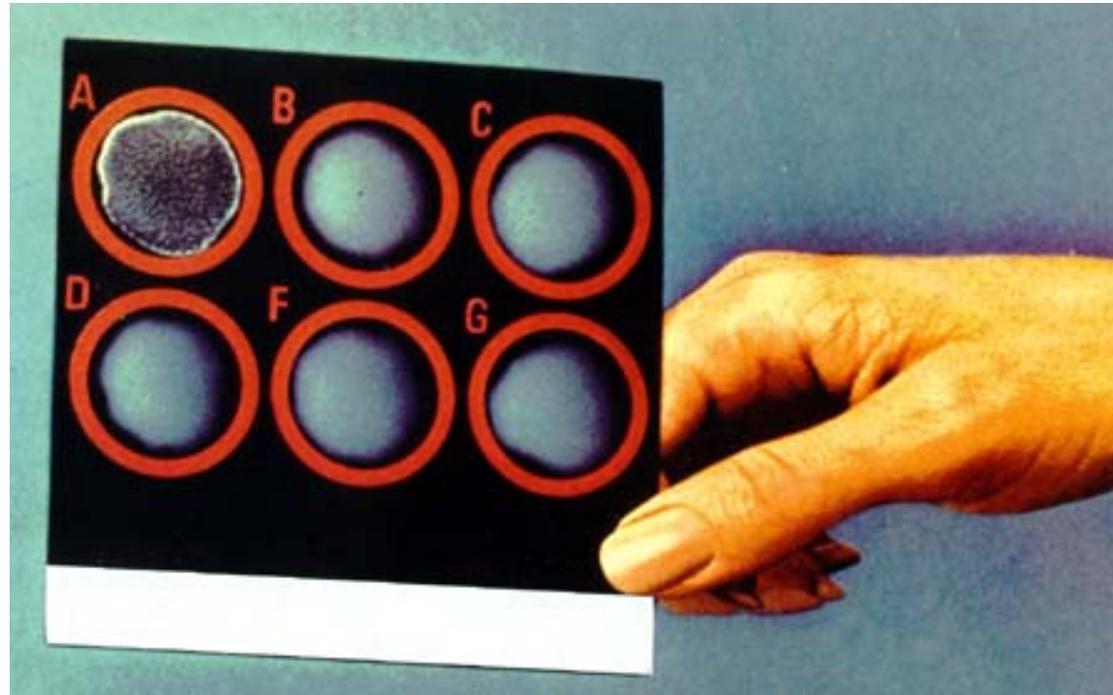
R° (-) il n'ya pas d'agglutination.

La suspension reste homogène et uniforme.

Uniquement en **screening** et détecte les Ig totales



## 2.1- Agglutination passive de particules de latex



## **2.2 ELISA Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay :**

### **Deux techniques ELISA**

- ♣ Technique ELISA indirecte « classique » dans laquelle le sérum à étudier est incubé directement avec un Ag immobilisé**
  
- ♣ ELISA inverse « immunocapture » dans laquelle une immunocapture de l'isotype que l'on souhaite étudier est d'abord réalisée avant l'incubation avec l'Ag**

### 2.3.1- ELISA indirecte « classique » : recherche et titrage des IgG Trousse Platelia® Toxo IgG TMB (Bio-Rad) :

#### Principe :

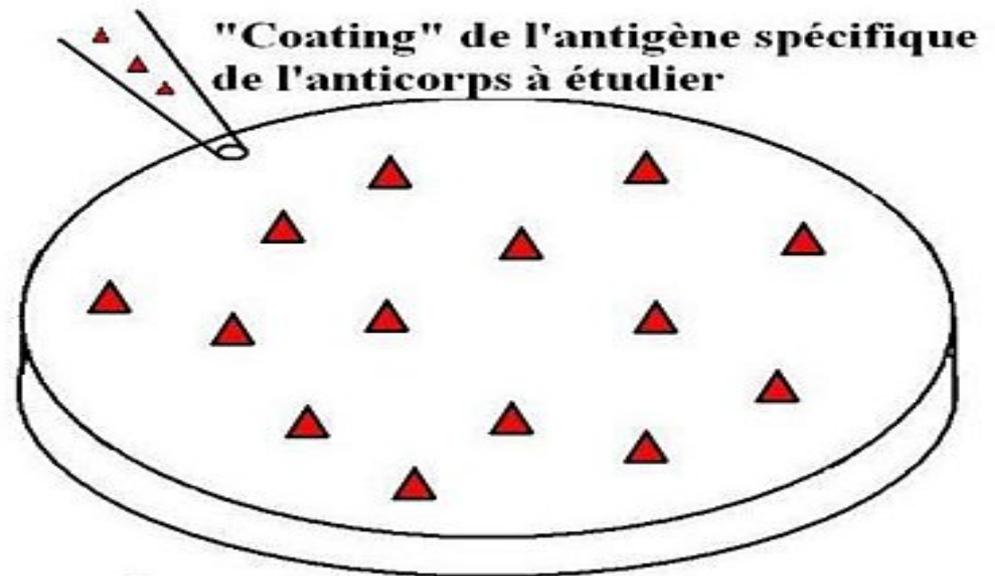
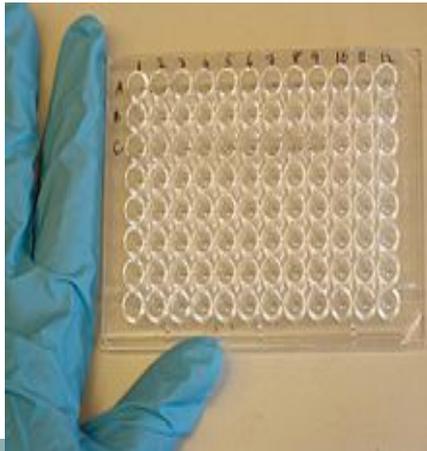
Plaques en polystyrène de 96 puits à **fond plat**

1ère étape appelée « **Coating de l'antigène** ».

Incuber l'Ag dans les puits de la plaque

Etape du « **Surcoating** » ou étape de saturation complémentaire :

une autre solution protéique évitant les faux (+) (lait, gélatine, albumine)

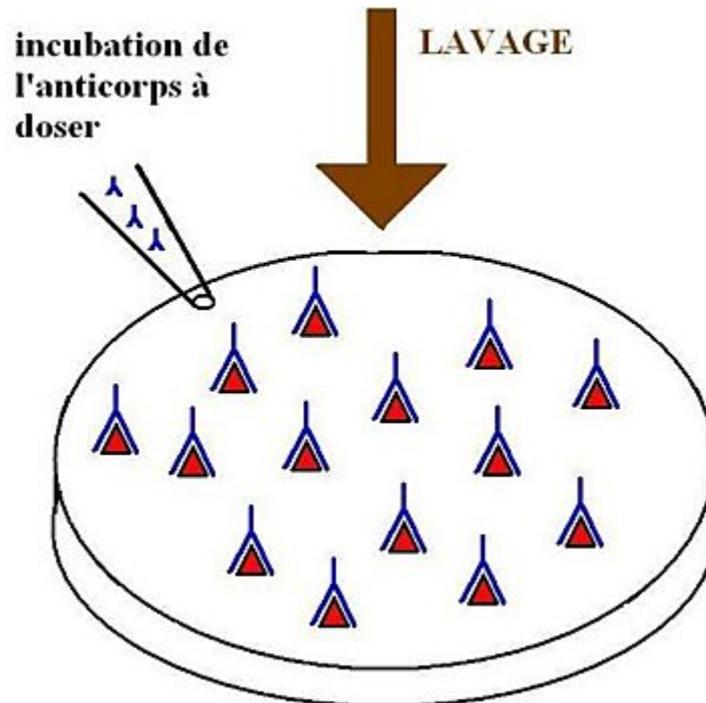


### 2.3.1- ELISA indirecte « classique » : recherche et titrage des IgG Trousse Platelia® Toxo IgG TMB (Bio-Rad) :

La 2<sup>ème</sup> étape : fixation de l'Ac à doser:

le sérum est testé à une seule dilution I° à 37°C (30 mn à 2 H).

Les Ac se fixent spécifiquement sur l'Ag immobilisé.

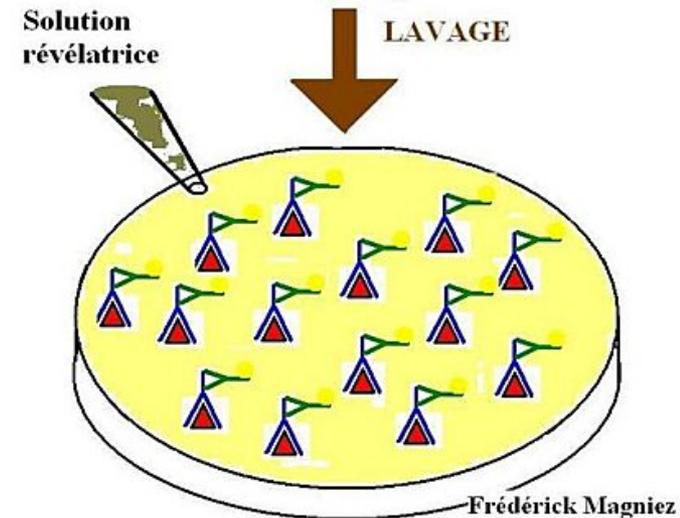


### 2.3.1- ELISA indirecte « classique » : recherche et titrage des IgG Trousse Platelia® Toxo IgG TMB (Bio-Rad) :

La 3<sup>ème</sup> étape : fixation du conjugué:  
I° à 37°C du conjugué anti-IgG couplé  
à la peroxydase ( 30 mn à 2 H )  
Le conjugué est fixé spécifiquement  
sur les Ac à doser.

La 4<sup>ème</sup> étape : révélat° des Ac fixés  
La solution révélatrice contenant le substrat  
spécifique de l'enzyme .

I° à T° ambiante et à l'obscurité pendant **10 mn.**  
L'apparition d'une coloration dans le substrat  
indique la présence de l'Ac à doser.

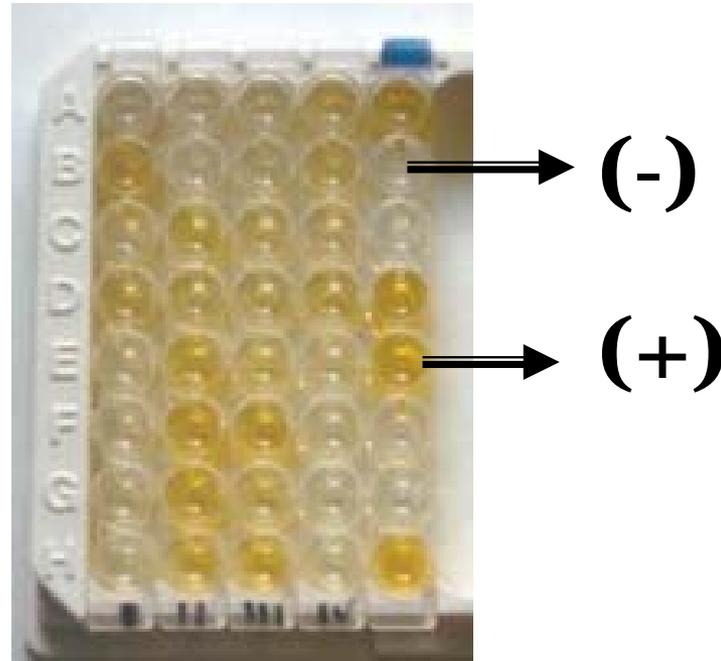


### 2.3.1- ELISA indirecte « classique » : recherche et titrage des IgG Trousse Platelia® Toxo IgG TMB (Bio-Rad) :

La R° enzymatique est arrêtée par l'ajout de **l'acide sulfurique**.

Et la R° colorimétrique est mesurée au spectrophotomètre

Le résultat obtenu est une densité optique (**DO**) qui peut être convertie en **UI** par comparaison avec une courbe étalon établi avec une série de sérums titrés



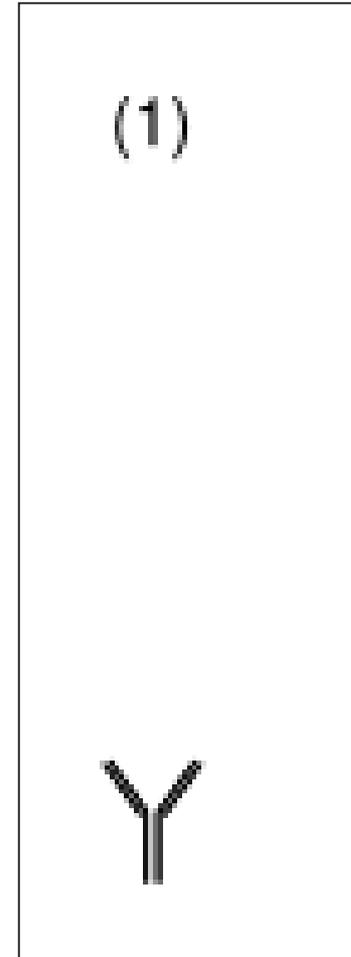
**2.4.2- ELISA inverse ou sandwich « dite immunocapture »  
recherche des anticorps IgM et IgA (Platelia Toxo IgM) (Platelia  
Toxo IgA)**

**Etape 1 : Immunocapture**

**Le fond des plaques est sensibilisé**

**Ac anti-IgM (pour les ELISA IgM)**

**ou anti-IgA (pour les ELISA IgA)**



**AC anti ou IgM  
anti-IgA**

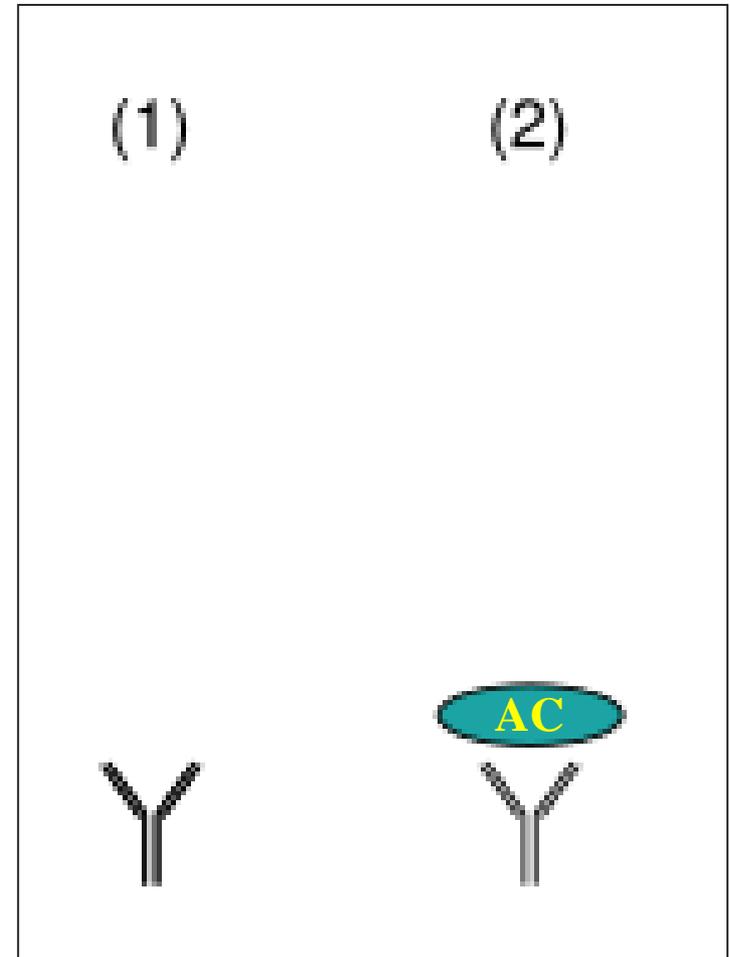
**2.4.2- ELISA inverse ou sandwich « dite immunocapture »  
recherche des anticorps IgM et IgA (Platelia Toxo IgM) (Platelia  
Toxo IgA)**

**Etape 2**

**Le sérum du patient est ajouté**

**Les Ac des isotypes correspondant sont  
captés sur le support.**

**Toutes les IgA ou IgM du sérum du  
patient s'accrochent sur les anti-IgA ou  
anti-IgM respectivement.**



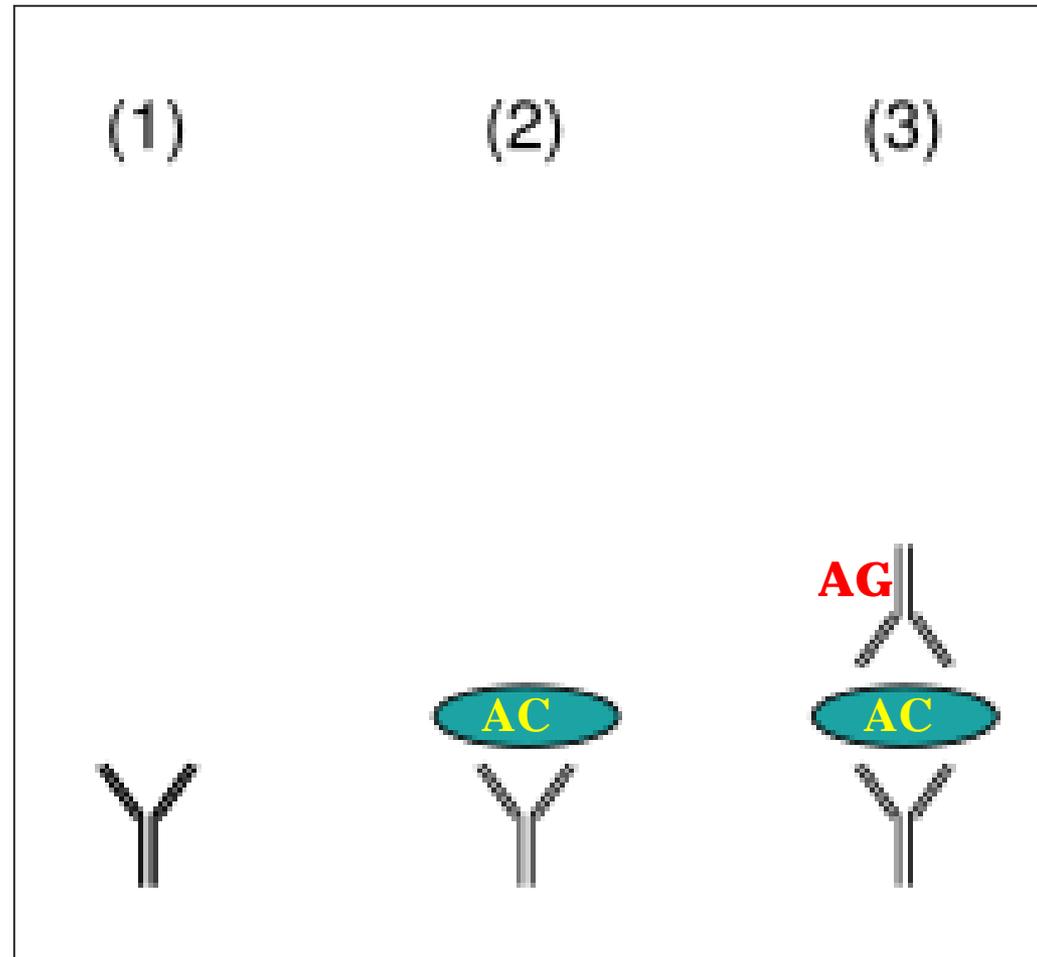
**AC anti ou IgM  
anti-IgA**

## 2.4.2- ELISA inverse ou sandwich « dite immunocapture » recherche des anticorps IgM et IgA (Platelia Toxo IgM) (Platelia Toxo IgA)

### Étape 3 :

Après lavage

l'Ag toxo est ajouté, celui-ci peut  
être soit directement marqué  
à une enzyme

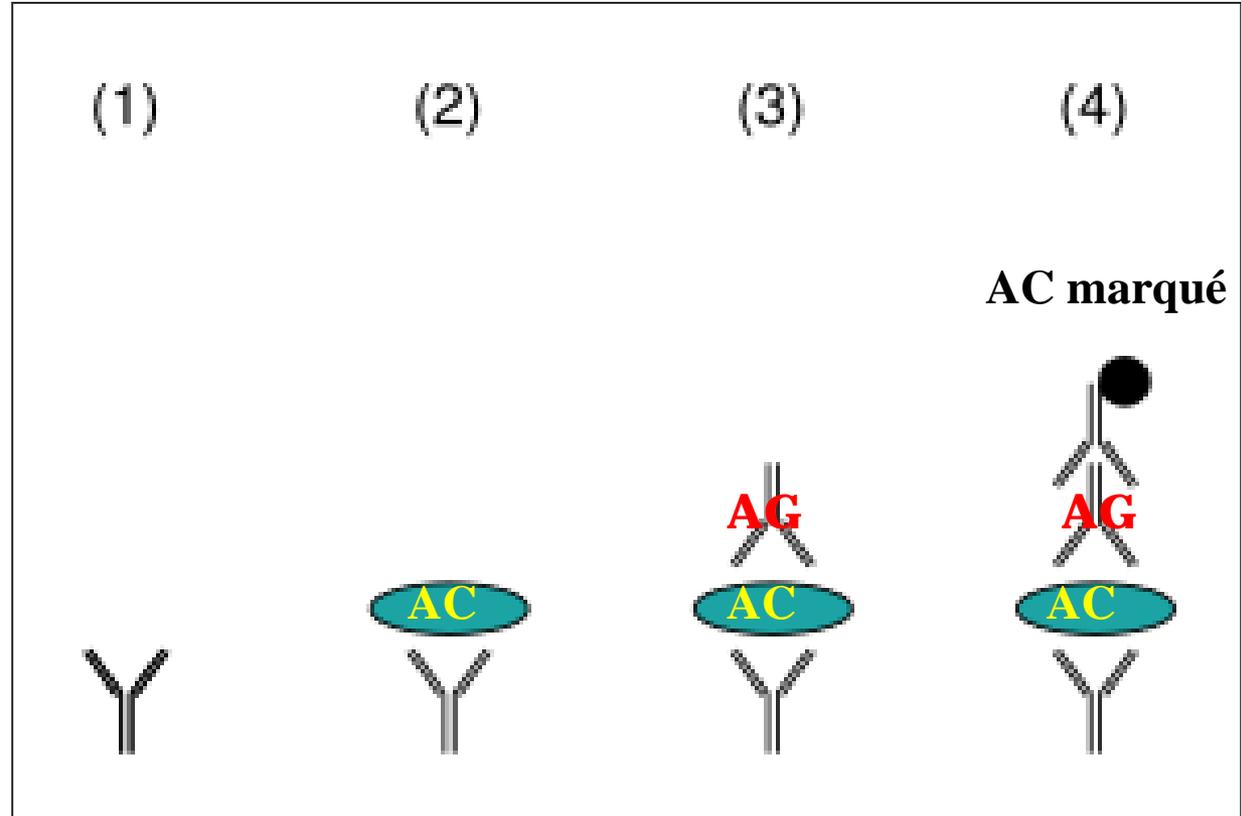


## 2.4.2- ELISA inverse ou sandwich « dite immunocapture » recherche des anticorps IgM et IgA (Platelia Toxo IgM) (Platelia Toxo IgA)

### Etape 3 et 4

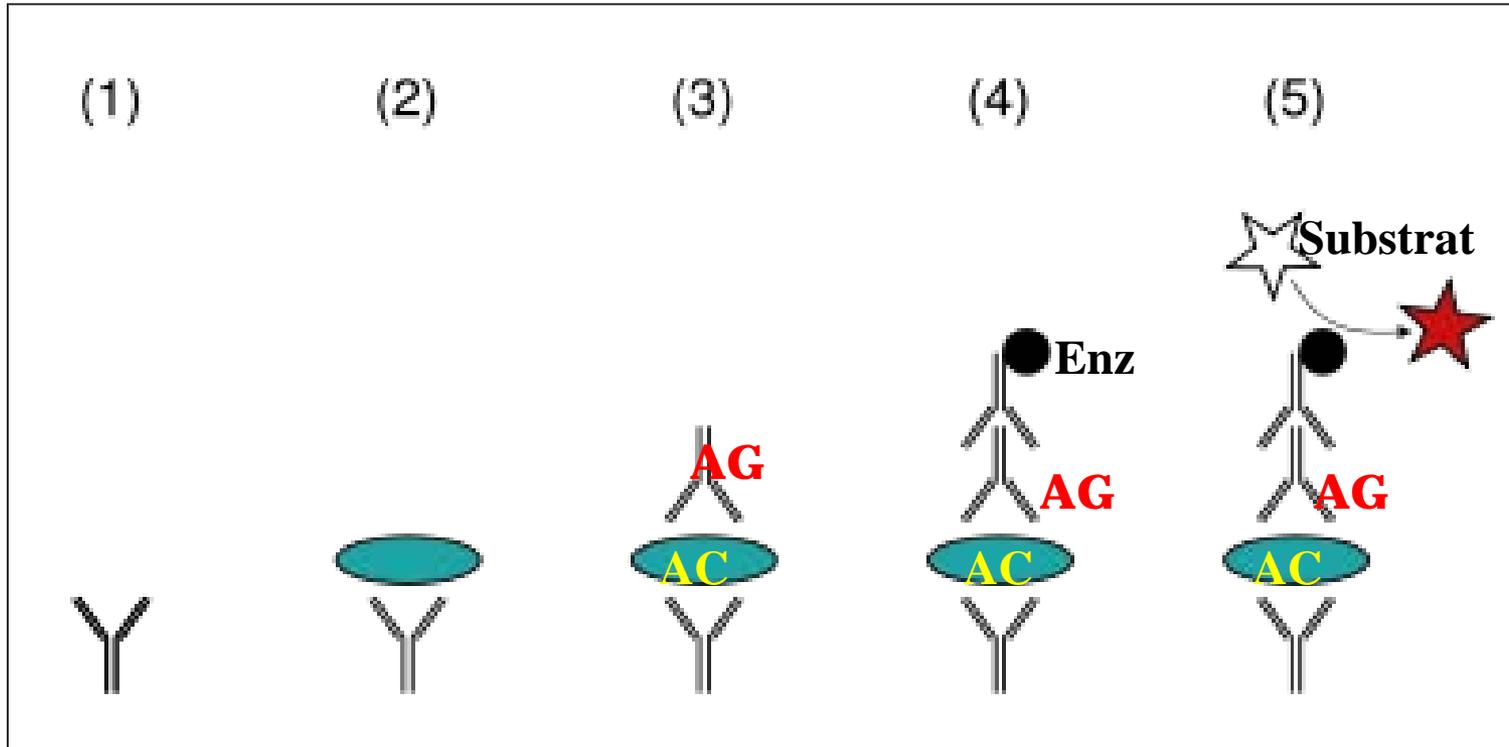
soit couplé avec un Ac  
marqué avec une  
enzyme.

Si le patient possède  
des Ac IgM ou IgA  
anti toxo,  
ils vont reconnaître  
l'Ag et le fixer



AC anti ou IgM anti-IgA

## 2.4.2- ELISA inverse ou sandwich « dite immunocapture » recherche des anticorps IgM et IgA (Platelia Toxo IgM) (Platelia Toxo IgA)



**Etape 5 :** Le substrat de l'enzyme est ajouté donnant une R° colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'Ac spécifiques retenue dans les cupules

le Test (+) si le sérum testé contient des IgA ou des IgM spécifiques de l'Ag conjugué.

Expression des résultats ELISA IgA , IgM, . **Test (+) ou (-) ou limite**

## **2.4.3-Etude de l'avidité des IGG par ELISA (Platelia® Toxo IgG avidity Complementary Reagents )**

**Mesure de l'avidité des Ac IgG pour l'Ag toxo  
la datation de l'infection toxoplasmique**

**Trousse « Platelia® Toxo IgG Avidity Complementary Reagents »  
(+)**

**Trousse Platelia® Toxo IgG TMB (Bio-Rad) :**

**Principe: L'utilisation d'un agent dissociant la liaison Ag/Ac  
(urée) en parallèle avec la technique habituelle de mesure des Ac  
IgG permet de comparer la DO obtenue avec agent dissociant à la  
DO obtenue sans agent dissociant.**

**Les sérums sont déposés en double**

**Sur le 1<sup>er</sup> sérum on réalise une ELISA indirecte classique sans  
agent dissociant**

**Sur le 2<sup>ème</sup> sérum on fait agir l'agent dissociant**

**Avidité basse : la liaison Ag/Ac est dissociée facilement.**

**Avidité haute : la liaison Ag/Ac est faiblement dissociée**

**On calcule l'indice d'avidité (IA)**

**IA = DO sérum avec urée / DO sérum sans urée**

**Si IA < 0,40 : Avidité faible toxoplasmose récente de (-) 5 mois**

**IA ≥ 0,50 Avidité forte toxoplasmose de (+) 5 mois**

**0,40 ≤ IA < 0,50 Avidité intermédiaire**

## 2.4- ELIFA **E**nzyme **L**inked **I**mmunofiltration **A**ssay : Profil immunologiques comparés :

Cette technique consiste à réaliser dans un 1<sup>er</sup> temps une électrosynérèse avec un Ag soluble de *Toxoplasma gondii* = R<sup>o</sup> de précipitation sur membrane d'acétate de cellulose obtenue par migration conjointe d'un Ag déposé linéairement et d'un sérum déposé de façon circulaire.

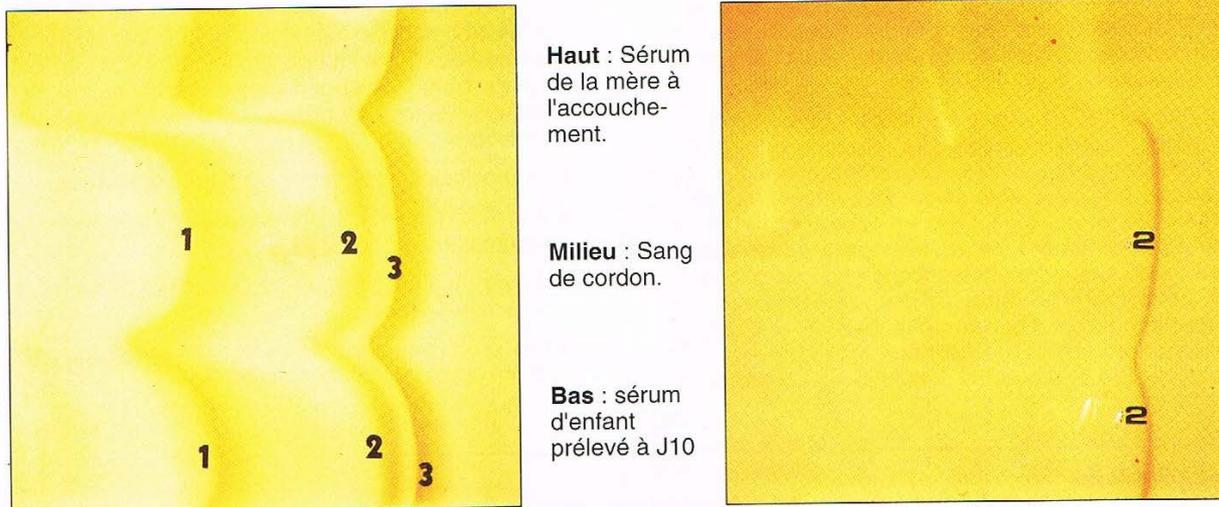
La migration est accélérée grâce à un courant électrique.



## 2.4- ELIFA Enzyme Linked Immunofiltration Assay : Profil immunologiques comparés :

Les arcs de précipitation obtenus sont ensuite révélés par une méthode immuno-enzymatique.

*Diagnostic de toxoplasmose congénitale par PIC-ELIFA IgG et IgM*



**Photos 1 et 2 :** Méthode des Profils Immunologiques Comparés ELIFA : diagramme de toxoplasmose congénitale après immunofiltration avec des anticorps anti- $\gamma$  (photo de gauche) et anti- $\mu$  (photo de droite) marqués à la peroxydase. (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Pr. J.M. PINON, Hôpital Maison Blanche, 45 rue Cognac Jay, 51092 REIMS Cédex)

Photo de gauche : PIC-ELIFA; noter :

- (a) la mise en évidence d'anticorps IgG dans le sérum maternel à l'accouchement;
- (b) la présence d'un anticorps IgG maternel transmis révélé à la même concentration chez la mère et l'enfant (3);
- (c) la présence d'un anticorps IgG maternel transmis associé à un néoanticorps de même spécificité synthétisé par le fœtus (2);
- (d) la présence d'un néoanticorps IgG synthétisé par le fœtus (absent dans le sérum maternel) (1).

Photo de droite : PIC-ELIFA IgM; noter la présence d'un néoanticorps IgM (2) synthétisé par le fœtus

## 2.5- Western Blot = WB

1<sup>ère</sup> étape Les protéines (Ag) sont séparées sur un gel de polyacrylamide **SDS-PAGE** (**S**odium **D**odécyl**s**ulfate-**P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis) par électrophorèse.

SDS protéines chargées (-)

Séparation en fonction de leur PM.

Plus le PM est faible plus la protéine migre plus loin.

On peut connaître la taille des molécules migrées en migrant en parallèle un témoin contenant des protéines de PM connue



## 2.5- Western Blot = WB

2<sup>ème</sup> étape c'est le **Blot ou " buvardage "** : Transfert par capillarité des protéines antigéniques séparées du SDS-PAGE vers une membrane de nitrocellulose ou de nylon . Surcoating puis lavage de la membrane

3<sup>ème</sup> étape fixation des Ac spécifiques

Des Ac marqués par des enzymes sont mis en contact avec la membrane de nitrocellulose par arrosage ou immersion.

Ils se fixent sur les protéines dont ils sont spécifiques.

4<sup>ème</sup> étape mise évidence des Ac spécifiques

Détection des par coloration enzymatique

Résultat : on obtient des bandes, ce qui permet de connaître la taille et la nature des Ag.



IgG



IgM

**2.5- En pratique 2 types de WB sont utilisés:**

**2.5.1-WB (Toxoplasma WB IgG IgM LDIBIO )**

**pour comparer plusieurs Profil immunologiques :**

**Sérum mère- Sérum enfant**

**Sérum - Humeur aqueuse**

**Sérum- LCR**

## **2.5.1- WB Test LDBIO Toxo II IgG:**

**Ce test est réalisé sur les échantillons où la sérologie était considérée comme douteuse et ou discordante ou à la limite de la détectabilité par l'ELISA et l'IFI.**

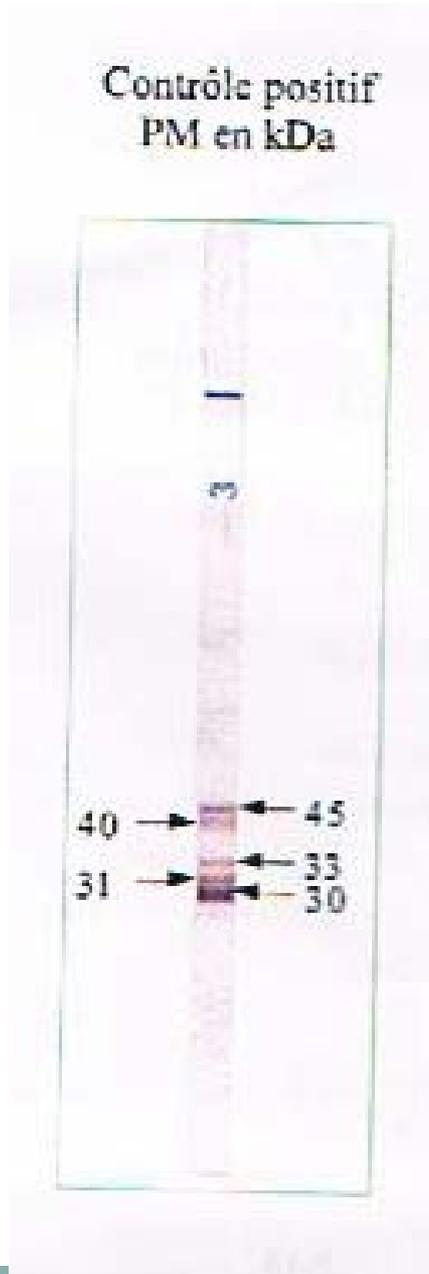
**♣ Soit le titre est situé dans la zone grise pour les 2 techniques ELISA et IFI**

**6 UI/ml ≤ Titre ≤ 9 UI/ml pour l' ELISA**

**et 6 à 12 UI en IFI**

**♣ Soit les résultats obtenus en ELISA et l'IFI sont discordants : une technique faiblement positive et l'autre négative .**

## 2.5.1- WB Test LDBIO Toxo II IgG:



Ce test permet de révéler **5 bandes** hautement spécifiques de l'infestation toxoplasmique **30, 31, 33, 40 et 45 kDa.**

Une **R° (+)** est définie par la présence au moins de **3 bandes** parmi les **5** spécifiques du test y compris la bande à 30 kDa

## II La recherche des antigènes circulants :

La détection d'Ag peut être d'un intérêt certain, notamment lorsque la réponse humorale est faible ou anormale (**fœtus, sujets immunodéprimés**).

Un test rapide d'**immunochromatographie** est en cours de réalisation pour la détection d'Ag toxo circulant (**Yan-Hua Wang et al (2011)** )

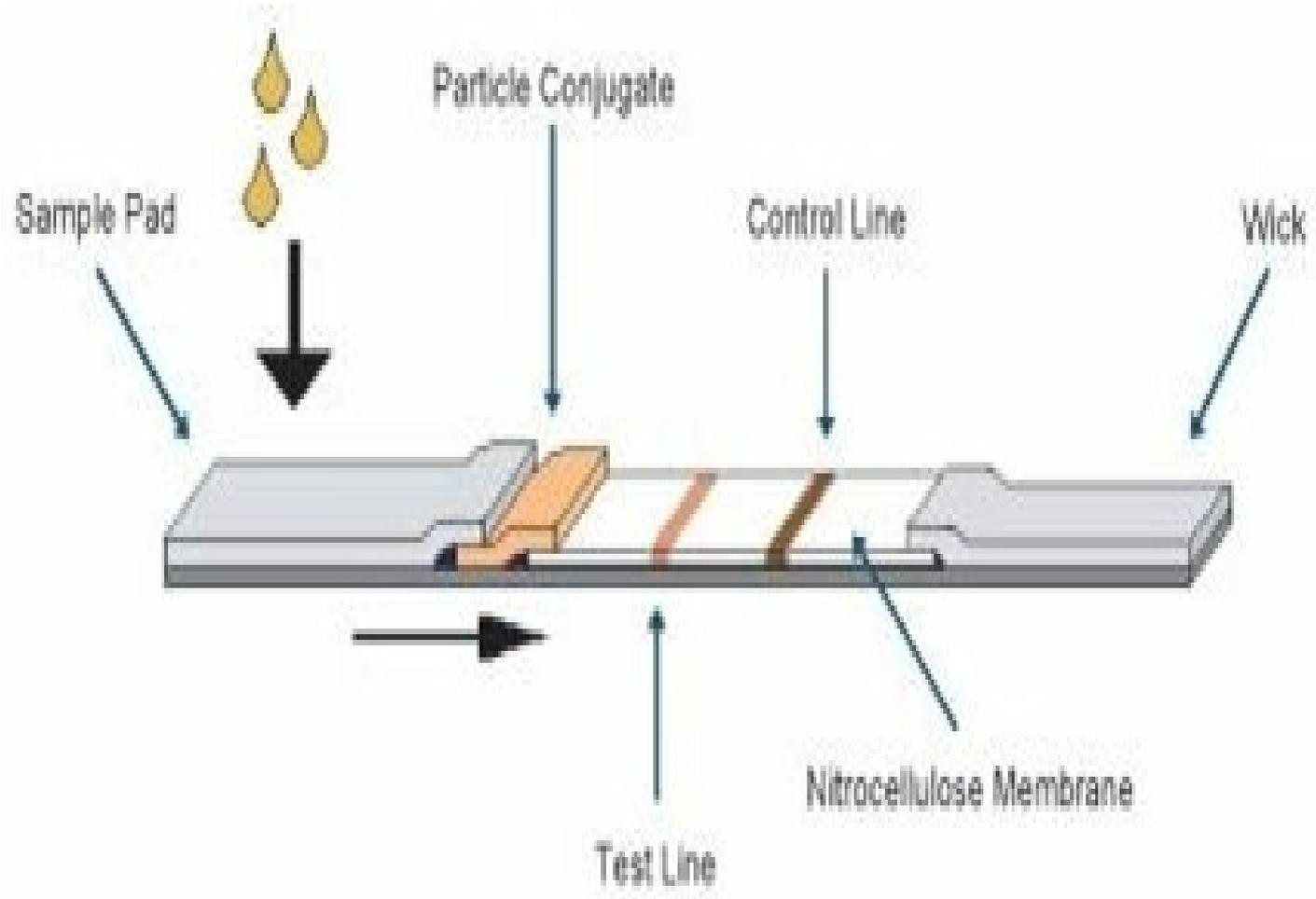
Au niveau de la zone du dépôt de l'échantillon « **sample pad** », le papier buvard de la membrane est imprégné d'un conjugué marqué à l'or colloïdal (**AC anti toxo\***)

Un **AC anti toxo** de capture et un **Ag toxo** sont immobilisés en 2 lignes transversales sur la membrane

1<sup>ère</sup> ligne « **Test line** » un Ac anti-toxo est immobilisé permettant de fixer les éventuels Ag toxo contenus dans le prélèvement à tester

2<sup>ème</sup> ligne « **control line** » est fixé l'Ag toxo servant de contrôle positif.

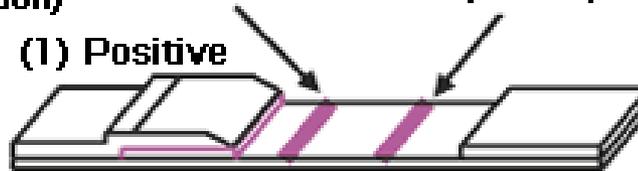
Le prélèvement est déposé sur le buvard, les Ag toxo présents vont se fixer aux Ac marqués à l'or colloïdal, l'échantillon va ensuite migrer vers le haut de la carte-test, traversant les 2 lignes où se trouve l'Ac de capture et l'Ag ESA



Test line appearance position (30 mm from the test sample drop section)

Control line appearance position (38 mm from the test sample drop section)

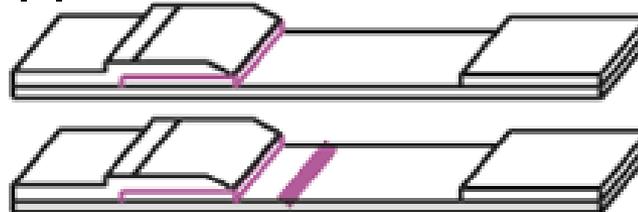
(1) Positive



(2) Negative



(3) Re test



## EN PRATIQUE

### ELISA Trousse Platelia® Toxo IgG TMB (Bio-Rad) :

1<sup>ère</sup> intention.

Son seuil de positivité est de **6 UI/ml**.

- **Titre < 6 UI/ml** : titre non significatif, = sérologie (-).
- **6 UI/ml ≤ Titre ≤ 9 UI/ml** : résultat douteux (zone grise) à contrôler sur un nouveau sérum et à confronter avec une 2<sup>ème</sup> technique différente.
- **Titre > 9 UI/ml** : sérologie (+).
- Expression des résultats ELISA IgG UI / mL  
Titre
  - (-) quand **< 8-10 UI / mL**
  - Faible : **10 à 30UI / mL**
  - Modéré : **30 à 100 UI / mL**
  - Moyen : **100 à 300 UI / mL**
  - Elevé ou fort : **≥ 300 UI / mL**

## **IFI Trousse Toxo Spot IF, (Bio-Mérieux):**

**C'est la technique utilisée en 2<sup>ème</sup> intention,**

**L'IFI indiquée quand la sérologie en ELISA**

**était élevée > 240 UI /ml ou**

**douteuse (zone grise ) et à la limite de la  
déteçtabilité**

### **III Mise en évidence des parasites**

#### **1-Recherche directe**

#### **2-Techniques indirectes**

##### **2.1- Inoculation à l'animal**

##### **2.2- Culture cellulaire**

#### **3- Biologie moléculaire**

### **III Mise en évidence des parasites**

#### **1-Recherche directe du parasite**

♣ **Sur frottis ou apposition, après coloration (au May Grunwald Giemsa ou MGG)**

♣ **Sensibilité**



**Ac monoclonaux dans des tests d'IF ou immuno-enzymatique.**

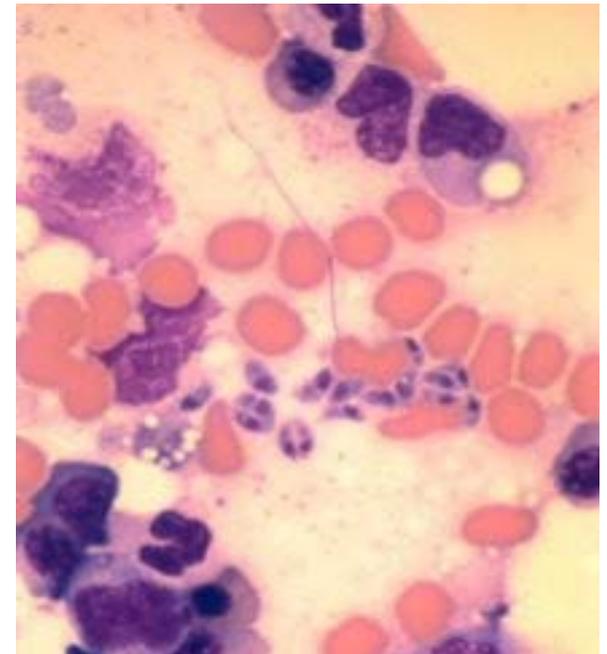
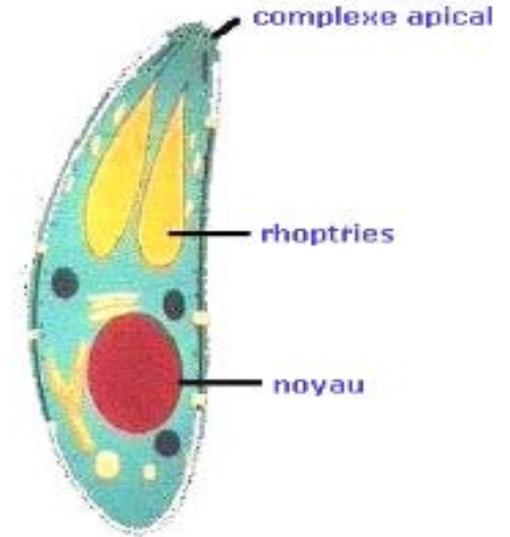
**Identification des parasites est souvent difficile : toxoplasmes rares, et il est difficile de les identifier parmi les débris cellulaires.**

♣ **Sur coupes histologiques: l'utilisation d'une méthode immuno-histochimique (immuno-peroxydase) en complément des méthodes de coloration habituelles Giemsa et Hémalin éosine est conseillée.**

### III Mise en évidence des parasites

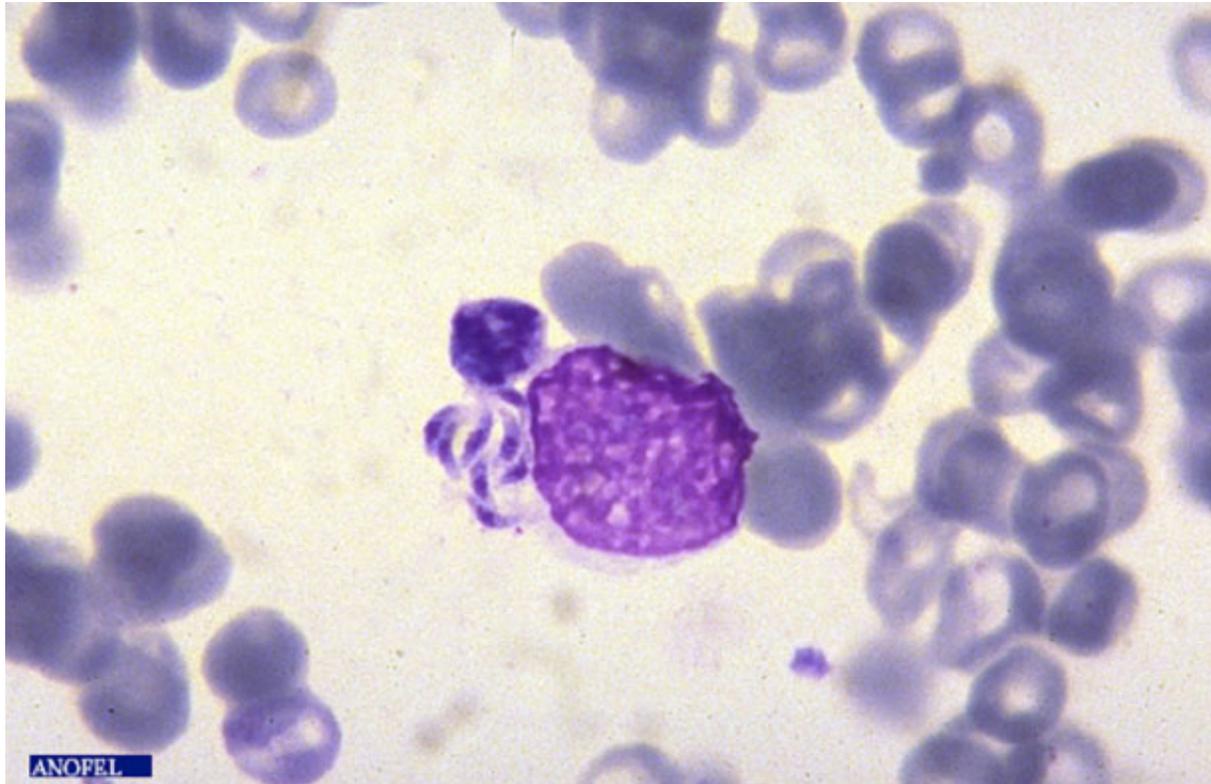
#### 1-Recherche directe

♣Le parasite se présente sous forme de trophozoïtes intra ou extra cellulaire (4 à 7 microns, forme en croissant)



### III Mise en évidence des parasites

#### 1-Recherche directe (trophozoïtes)



<http://umvf.omsk-osma.ru/campus-parasitologie-mycologie/cycle2/poly/0201ico.html>

### III Mise en évidence des parasites

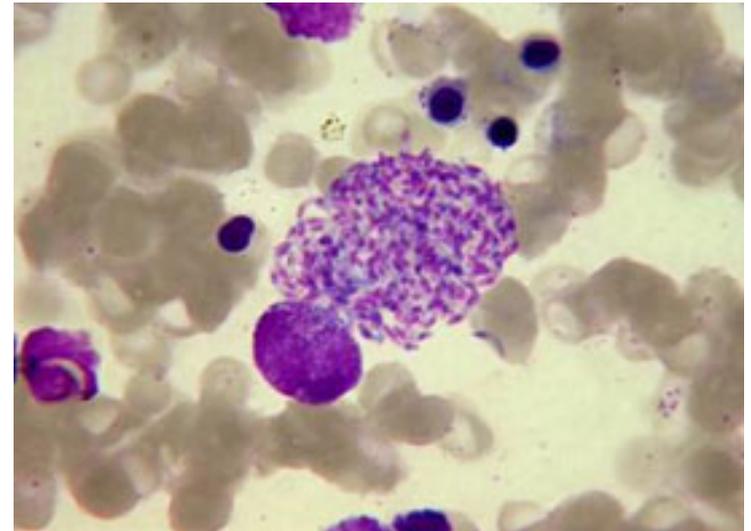
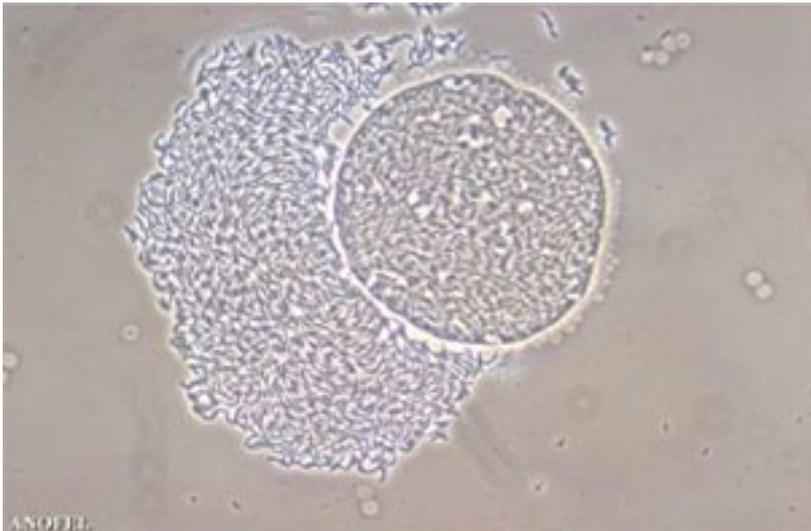
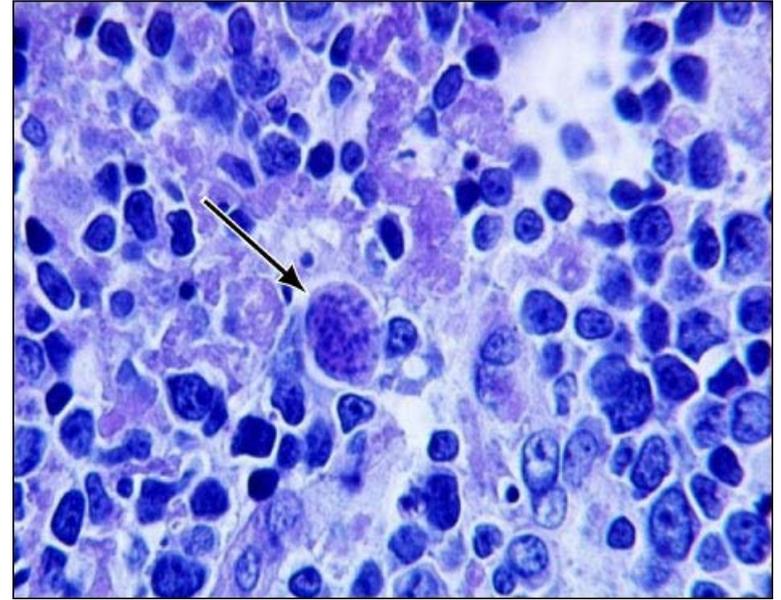
#### 1-Recherche directe

#### ♣ Sur coupe histologique

les kystes ont

**20 à 100 microns**

de diamètre.



### **III Mise en évidence des parasites**

#### **2-Techniques indirectes**

##### **2.1- Inoculation à l'animal :**

**Inoculation par voie intra-péritonéale à des souris toxo (-)**

**Tout liquide biologique , LBA++**

**Tissus (placenta ,biopsie cérébrale...)**

**Mais les R ne peuvent être connus qu'au bout de 30 à 45 jours**

**kystes dans le cerveau de l'animal sacrifié.**

**Réduire délai**

**-par l'Ex du liquide de lavage péritonéal 5 à 7 jours après**

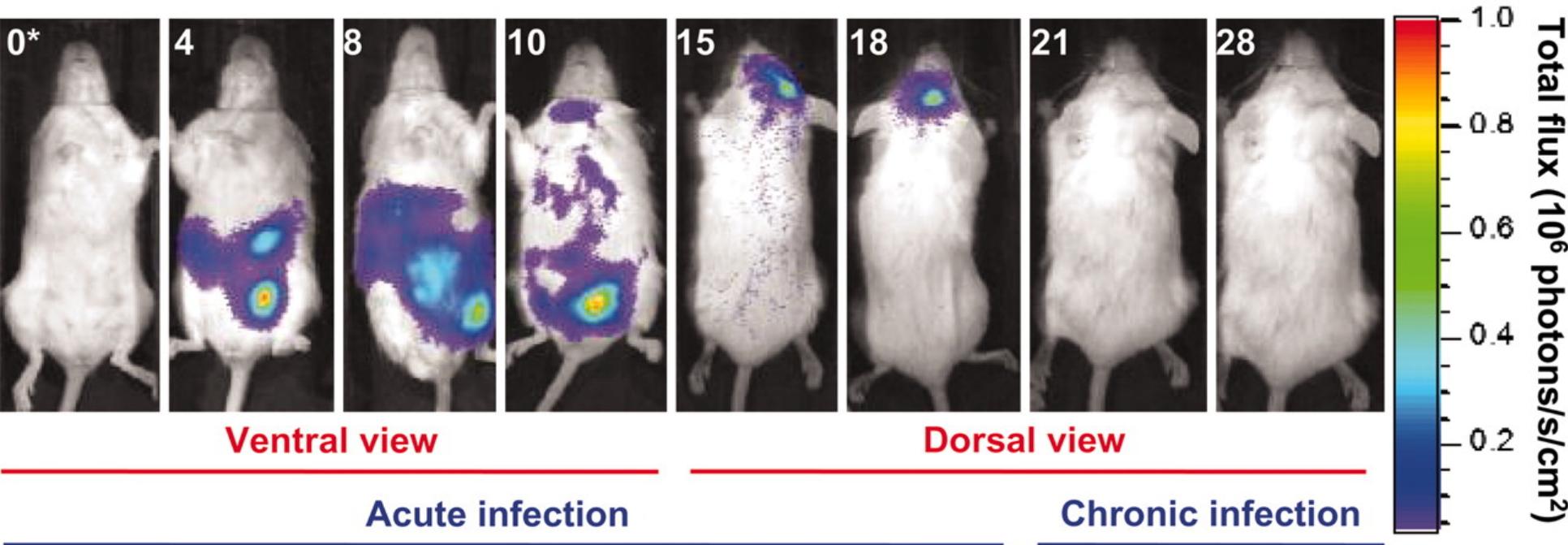
**l'inoculation**

**- ou par le sérodiagnostic dès la 2<sup>ème</sup> – 3<sup>ème</sup> semaine**

**Technique de référence +++++**

**Mais résultats tardifs et nécessite l'entretien d'une animalerie**

## 2.1- Inoculation à l'animal



\* Days post-infection

<http://ssaft.com/Blog/dotclear/index.php?tag/Toxoplasmose>

# **III Mise en évidence des parasites**

## **2-Techniques indirectes**

### **2.2- La culture cellulaire**

**♣ Technique délicate sensible aux contaminations (moins utilisée)**

**moins sensible que l'inoculation à la souris**

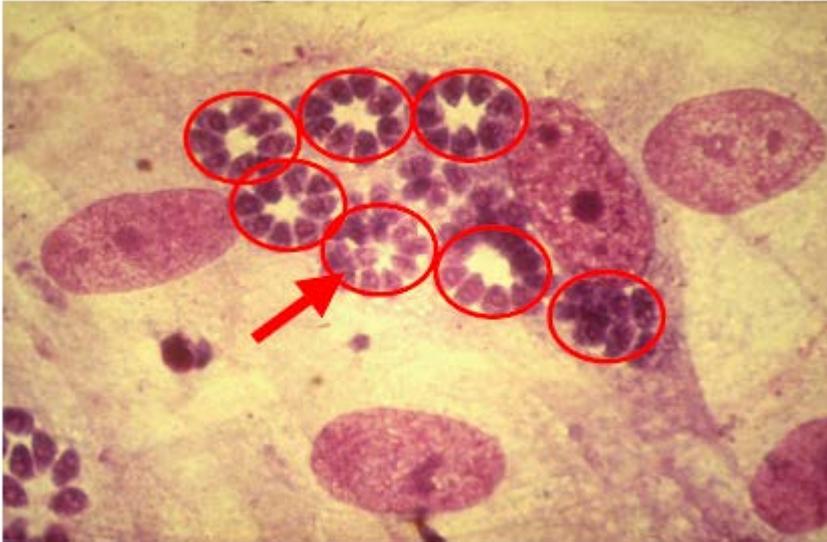
**Résultat plus rapide(dès 3<sup>ème</sup> – 4<sup>ème</sup> jour).**

**Culture positive :**

**kystes arrondies (50 à 200 microns, granuleux et réfringents**

**Trophozoïtes intra ou extracellulaires**

## 2.2- Culture cellulaire



**Tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* intracellulaires (dans de nombreuses vacuoles parasitophores).**

<http://servalor.unistra.fr/Plateforme-Parasitologie>

## 2.3- Biologie moléculaire : PCR +++++

C'est une technique d'amplification génique (ADN)

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun

3 étapes : Dénaturation

Hybridation

Elongation

Tous les éléments nécessaires à la R° sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux  $\neq$  cycles de T° réalisés dans un thermocycleur.

La séquence d'ADN à amplifier

La Taq Polymerase

Deux amorces, sens et anti-sens

4 nucléotides dGTP, dATP, dTTP, dCTP = (dNTPs )



Taq

amorce sens



amorce anti-sens



**Les séquences cibles les plus utilisées sont :**

**le gène B1 (Lin et al, 2000)**

**l'ARNr 18S (Kupferschmidt et al., 2001)**

**la séquence répétée AF146527 (Reischl et al., 2003) ;**

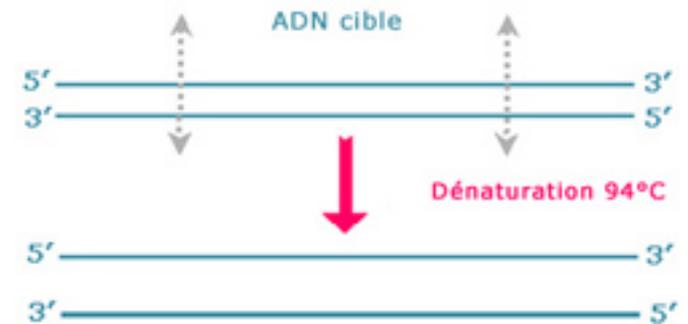
**(Cassaing et al., 2006)**

## Dénaturation:

Le tube est chauffé quelques secondes à **94°C**.

Les double-brins d'ADN se séparent.

L'ADN est **dénaturé**.



## Hybridation:

La T° est rapidement abaissée à

55°C. Les amorces

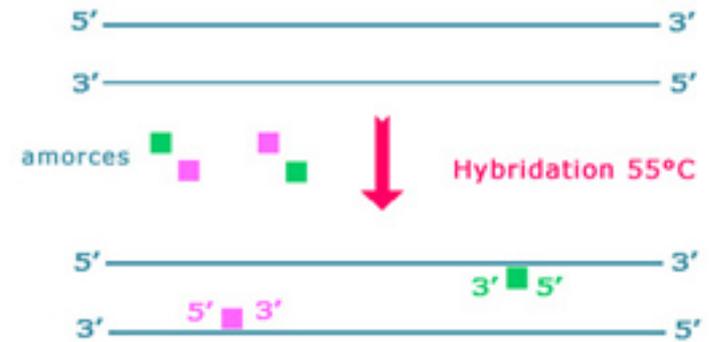
« **reconnaissent** » leur séquence

complémentaire sur les brins

d'ADN cibles.

Elles s'hybrident chacune sur

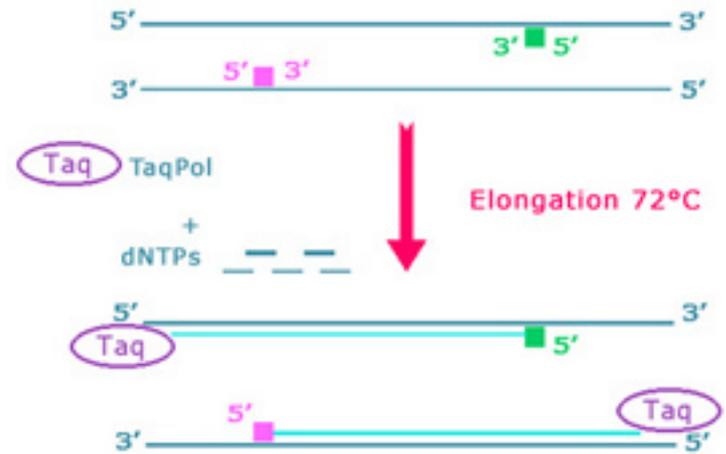
leur brin respectif.



## Élongation:

La T° du tube est ensuite augmentée à **72°C**, ce qui permet à la Taq Pol d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens **5' vers 3'**.

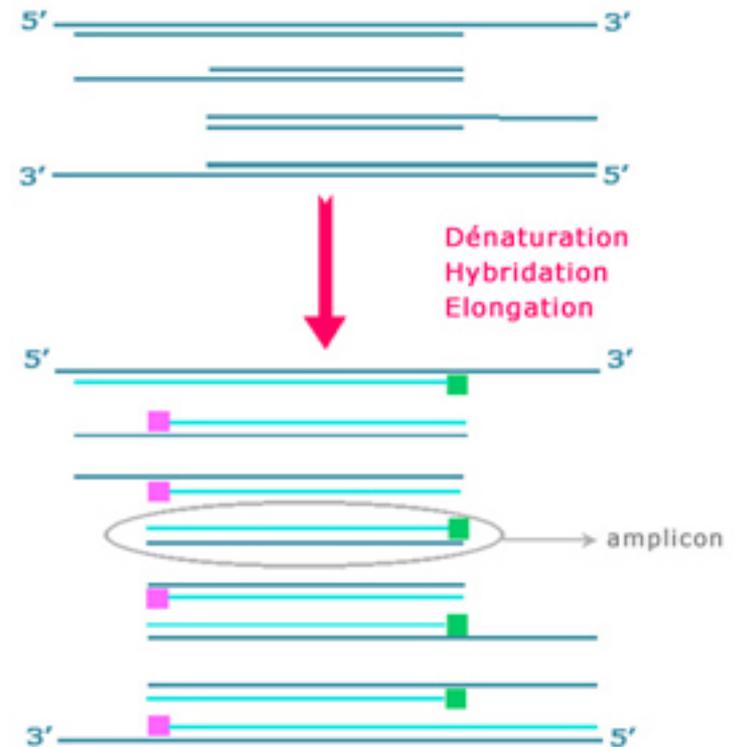
Un nouveau brin d'ADN, dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible, vient d'être synthétisé.



Au fil des cycles la quantité  
d'amplicons va augmenter de façon  
exponentielle.

On obtient, en théorie  $2^n$  copies pour  
 $n$  cycles.

En pratique une PCR de  $30$  cycles  
produit environ  $10^6$  copies



les produits d'amplification

visualisées avec le **Bromure**

**d'Ethidium (BET)** = produit

intercalant qui se glisse entre les

bases des acides nucléiques.

Cette molécule présente une

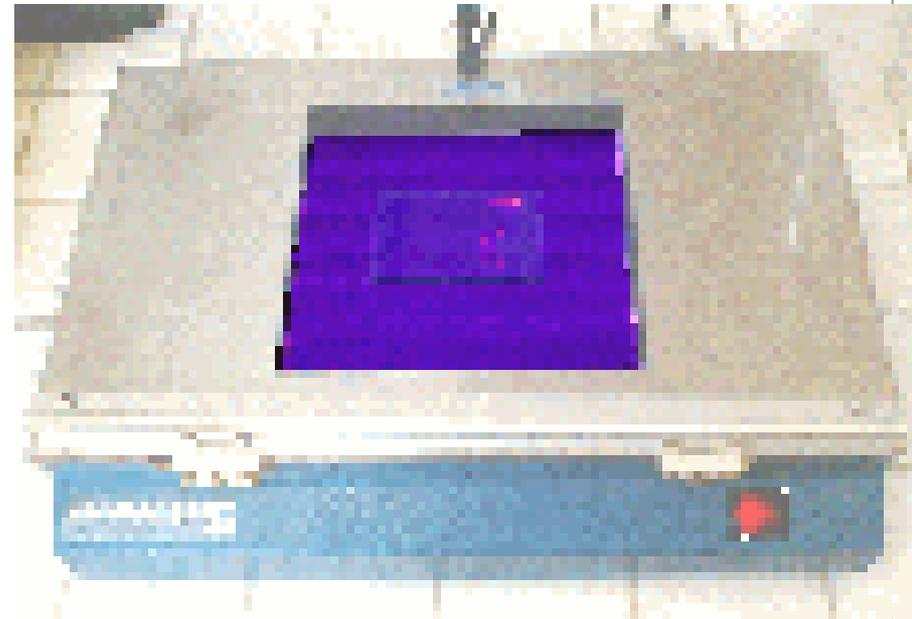
**fluorescence orange** sous UV

Les produits d'amplification

sont soumis à une électrophorèse

en gel d'agarose.

Electrophorèse  
en gel d'agarose



**JE VOUS  
REMERCIE**