

UNIVERSITE DE LA MANOUBA

CNSTN



ISBST



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue d'obtention du

DIPLOME UNIVERSITAIRE EN TECHNOLOGIE

Section : Microbiologie Industrielle

Détection du Virus de l'hépatite A dans les Coquillages en Tunisie

ZITOUNI MONCEF

Mémoire de fin d'étude soutenu publiquement à Sidi Thabet le 13 Juin 2008

Devant le jury composé de :

Mr : GARNA Heikel	Président
Mr : Ben AMOR Mohamed	Examineur
Mme : HMAEID Fatma	Encadreur Entreprise
Mlle : DHIFI Wissal	Encadreur ISBST

Année universitaire : 2007-2008

Dédicaces

En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce travail avec une grande fierté

A mes chers parents **ZITOUNI Mabrouk** et **Hlima** pour leurs encouragements et leur compréhension.

A mes frères, mes sœurs et toutes ma famille en reconnaissance de leurs encouragements.

A tous mes amis pour leurs sympathie et leur solidarités envers moi.

A Haifa qui m'a beaucoup soutenu

A tous ceux qui m'ont aidé à faire mieux dans la réalisation de ce travail.

Veillez, tous, accepter mes hautes salutations et considérations.

Merci

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur **TRABELSSI ADEL**, le Directeur Général du Centre National des Sciences et Technologie Nucléaire pour l'opportunité qu'il m'a donnée afin de réaliser mon projet de fin d'études au sein de son honorable institution.

Je voudrais également remercier mes encadreur ;

Dr. **HMAIED FATMA**, pour avoir accepté de diriger ce travail. Je suis très touché par ses qualités humaines et scientifiques qui ont joué un rôle déterminant dans l'accomplissement de ce travail.

Dr. **DHIFFI Wissal**, pour ses remarques et ses suggestions qui ont été déterminantes pour l'aboutissement de ce projet.

Je tiens aussi à remercier Mlle **AMRI ISLEM**, pour sa coopération.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les enseignants de l'**SBST** et à tout le personnel de l'unité de Microbiologie et Biologie Moléculaire du **CNSTN** pour leurs disponibilités et leurs précieux conseils.

Enfin, je remercie les membres de Jury qui ont bien voulu me honorer par leur présence afin de juger mon travail.

Liste des abréviations

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide ribonucléique
BET : Bromure d'éthidium
Cm : Centimètre
dnTP : désoxyribonucléosides triphosphate
EDTA : Acide éthylène diamine-tétracétique
G : Unité de mesure pour RCF
Kb : Kilobase
M : Molaire
mg : milligramme
MB : Moule Bizerte
ml : millilitre
mM : milli molaire
pb : paire de base
pH : potentiel d'hydrogène
PG : Palourde Gabès
PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne
PEG : Poly éthylène Glycol
PBS : Tampon Phosphate
Qsp : Quantité suffisant pour
HB : Moule Bizerte
RT : Reverse Transcription
rpm : rotation par minute
TBE : Tris Borate EDTA
Tp : Tampon
U : Unité
V : Volt.
VHA : Virus de l'Hépatite A
 μg : Microgramme
 μl : Microlitre
 μM : Micromolaire
 $^{\circ}\text{C}$: Degré Celsius

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les échantillons analysés

Tableau 2 : Séquences des amorces de la région VP1 utilisée dans la 1^{er} et 2^{ème} PCR

Tableau 3: Résultats de détection de VHA par différentes techniques d'extraction

Tableau 4 : Résultats de détection des virus de l'hépatite A par RT-PCR de mollusques bivalves tunisiens

Liste des Figures

Figure 1 : Observation en microscopie électronique des particules du VHA

Figure 2 : Génome du virus de l'hépatite A.

Figure 3 : Profil d'évolution de l'hépatite A

Figure 4 : Révélation du produit amplifié par RT - PCR en utilisant les amorces S3/AS4.

Listes des abréviations

<i>INTRODUCTION</i>	- 8 -
<i>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	- 10 -
I- Contamination des aliments par les virus :	- 11 -
1- Aliment à risque élevé :	- 12 -
2- Contamination des coquillages :	- 12 -
3- Persistance des virus dans les coquillages:	- 13 -
II- VIRUS DE L'HEPATITE A :	- 14 -
1- Classification - Morphologie - Structure :	- 14 -
2- Propriétés physico-chimiques :	- 15 -
4- Épidémiologie et modes de transmission :	- 16 -
5- Pouvoir pathogène :	- 17 -
5-1- L'hépatite virale A	- 17 -
5-2- Physiopathologie :	- 18 -
6- Diagnostic virologique :	- 18 -
6-1- Diagnostic direct :	- 18 -
6-2- Diagnostic indirect :	- 19 -
7- Prévention et traitement :	- 19 -
7-1- Mesures non spécifiques :	- 19 -
7-2- Immunisation passive :	- 20 -
7-3- Vaccination :	- 20 -
7-4- Traitement	- 20 -
III- LES MOLLUSQUES :	- 21 -
1- La classification des mollusques bivalves :	- 21 -
2- Production de mollusques bivalves en Tunisie :	- 21 -
2-1 Les huîtres :	- 22 -
2-2- les moules :	- 22 -
2-3- les palourdes :	- 22 -
<i>MATHERIELS & METHODES</i>	- 23 -
I- MATERIELS :	- 24 -
1- Mollusques bivalves :	- 24 -
2- Témoin positif :	- 24 -
II- METHODES :	- 26 -
1- Préparation des échantillons de mollusques bivalves	- 26 -
2- Préparation du témoin positif	- 26 -
2-1- Préparation des selles	- 26 -
2-2- Contamination artificielle :	- 26 -
3- Extraction et concentration des virus de l'hépatite A :	- 26 -
3-1- Principe :	- 26 -
3-2- Protocole expérimental :	- 27 -
3-2-1- Première technique d'extraction (T1) :	- 27 -
3-2-2- Deuxième technique d'extraction (T2) :	- 27 -
4- Extraction et purification de l'ARN viral à partir des échantillons de mollusques :	- 28 -
4-1- Principe :	- 28 -

4-2- Protocole expérimental :	- 28 -
5- Détection du génome viral par RT- PCR :	- 29 -
5-1- Principe de la transcription inverse	- 29 -
5-2- Synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN viral	- 29 -
5-3- Principe de la Nested PCR	- 29 -
5-4- Protocole du Nested PCR	- 29 -
5-5- Visualisation des produits amplifiés	- 30 -
5-5-1- Principe	- 30 -
5-5-2- Protocole	- 31 -
<i>RESULTATS & DISCUSSION</i>	- 32 -
I- Résultats:	- 33 -
II- Discussions :	- 37 -
2-1- Rendement des deux techniques d'extraction et de concentration (T1 et T2) : ...-	
37 -	
2-2- Evaluation de la contamination virale des mollusques bivalves :	- 38 -
<i>CONCLUSION</i>	- 40 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 42 -
Annexes	- 48 -

INTRODUCTION

Les mollusques bivalves faisant l'objet d'une exploitation de pêche ou d'aquaculture représentent en Tunisie une richesse dont les enjeux économiques sont importants. Ces mollusques sont constitués essentiellement de palourdes, de moule, d'huîtres et de pectinidés. Leur exploitation contribue à l'objectif national d'autosuffisance alimentaire en plus de constituer un apport substantiel de devises annuellement. La majeure partie de la production de mollusques tunisiens est exportée vers l'Union Européenne. Cependant, le marché local en particulier le secteur touristique et hôtelier est également fort demandeur. De plus cette activité génère un nombre important d'emplois. Pour ces raisons, la conchyliculture est considérée par les autorités publiques comme une activité florissante à soutenir. Par ailleurs, l'activité conchylicole, développée à proximité des côtes, est directement conditionnée par les facteurs environnementaux et la qualité du milieu marin.

En effet, les eaux littorales constituent le réceptacle des apports terrestres urbains et agricoles qui peuvent contenir des substances potentiellement pathogènes pour l'homme. Ainsi, les microorganismes qui se trouvent dans l'eau sont concentrés par les coquillages et peuvent pour certains constituer un risque sanitaire pour le consommateur en provoquant des infections bactériennes, des maladies virales et une menace pour le secteur conchylicole. Plusieurs virus sont à l'origine des maladies virale comme les Norovirus, Entérovirus, hépatite A...

Nous sommes intéressé à la recherche de virus de l'hépatite A dans les coquillages en Tunisie.

Notre travail a eu pour objectif premier de trouver une méthode d'extraction et de concentration des virus entériques pouvant contaminer les mollusques bivalves qui soit rapide, efficace et compatible avec une détection moléculaire par la technique de RT-PCR.

Dans cette étude, nous avons procédé à la comparaison de deux méthodes d'extraction et de concentration des virus quand à leurs capacités de détection par RT-PCR. Ensuite, nous avons adopté la technique d'extraction la plus efficace à la recherche du virus de l'hépatite A

dans des échantillons de mollusques bivalves d'origine Tunisienne prélevés en milieu naturel et dans des sites de productions avant l'étape de purification.

L'intérêt de cette étude est d'évaluer la contamination virale des mollusques bivalves d'origine tunisienne. Ce contrôle permettra de prévenir les risques sanitaires liés à leur consommation et de suivre l'évolution de ces virus entériques dans l'environnement. La mise en place en Tunisie d'outils de contrôle virologique des mollusques bivalves permettra de mieux contribuer à l'amélioration de leur qualité microbiologique en vue de répondre par anticipation aux exigences futures des normes internationales dans ce domaine.

Après une revue bibliographique portant sur l'intérêt de recherche du VHA (contamination alimentaire) et des méthodes d'analyse virologique des coquillages proposé dans la littérature, nous développerons les résultats et commentaires concernant le choix de la méthode d'analyse virologique des coquillages la plus appropriée. Ainsi, nous présenterons et nous commenterons les résultats de détection de VHA. Enfin, une conclusion de ce travail est proposée.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Contamination des aliments par les virus :

Les infections virales d'origine alimentaire et hydrique sont des causes de maladies chez l'être humain qui sont de plus en plus observées. Les raisons de cette augmentation relèvent davantage des tests diagnostiques améliorés qui contribuent à renforcer la détection de certains groupes de virus et des changements dans les méthodes de fabrication et les modes de consommation facilitant la distribution d'aliments à haut risque dans le monde entier [1].

De nombreux virus peuvent être présents dans le système intestinal. Les virus véhiculés par les aliments et l'eau peuvent être divisés en trois catégories :

- i) Virus à l'origine des gastro-entérites (*astrovirus*, *rotavirus*, *adénovirus* de type 40 et 41, et les deux types de *calcivirus* entériques, virus de type *Norwalk* (NLV), et les *calcivirus* typiques ou virus de type *Sapporo* (SLV).
- ii) Virus hépatique d'origine fécale transmis par voie orale : virus de l'hépatite A (HAV), virus de l'hépatite E (HEV).
- iii) Virus à l'origine d'autres maladies, ex. *Entérovirus*.

De plus, plusieurs virus se reproduisent dans le système intestinal mais qui ne sont pourtant pas impliqués dans la transmission de maladies d'origine alimentaire ou dont le rôle est inconnu.

Contrairement aux bactéries, les virus, sont strictement des parasites intracellulaire qui ne peuvent se reproduire dans les aliments ou dans l'eau. En conséquence, la contamination virale des aliments n'augmente pas pendant leur transformation et peut même diminuer. Ceci implique que l'infection virale par voie de nourriture contaminée dépend de la stabilité du virus quantités de virus présents/degré de contamination virale, transformation des aliments ou de l'eau et prédisposition de l'hôte.

La plupart des virus véhiculés par les aliments ou l'eau sont relativement résistants à la chaleur, à la désinfection et aux changements de pH. Les problèmes de la détection de la contamination virale des aliments ou de l'eau sont que généralement- les produits contaminés ont une apparence, une odeur et un goût normaux et que les méthodes de diagnostique (moléculaires) pour la plupart de ces virus ne sont pas disponibles ordinairement dans les laboratoires de microbiologies alimentaire.

Nous avons mis l'accent sur les virus qui sont le plus couramment transmis par les aliments, notamment les virus de l'hépatite A.

1- Aliment à risque élevé :

Les coquillages sont connus comme étant une source d'infections virales alimentaires en raison de la présence concentrée de virus dans les eaux contaminées [2]. L'épuration, pratique qui peut réduire la contamination virale, n'est pas efficace pour réduire la contamination virale. D'autres aliments, ont cependant aussi été impliqués comme véhicules de transmission (desserts, fruits, légumes, salades, sandwiches). En effet, toute nourriture traitée manuellement et non (suffisamment) chauffée est une source possible de contamination [3]. Il est important de noter que la contamination peut survenir, non seulement à la fin de la chaîne de distribution, mais aussi à presque chaque étape de la distribution, de la ferme à la table du consommateur.

2- Contamination des coquillages :

Les virus, comme toute particule ingérable par des bivalves, sont d'abord fixés au niveau du mucus bronchial, les liaisons virus mucus s'établissent très rapidement et que l'adsorption du virus est inversement proportionnelle à la salinité de l'eau [4].

La fixation des virus, par un coquillage physiologiquement actif, est un phénomène très rapide [5]. L'existence d'un cycle de bioaccumulation-relargage, conduisant à un équilibre dans la quantité de virus présente dans les coquillages a été démontré [6, 7].

L'importance de la bioaccumulation des virus dépend, de l'intensité de l'activité de filtration du coquillage (c'est-à-dire de son état physiologique et des paramètres physico-chimique de l'eau), mais aussi :

➤ **Du type de coquillage :** Le type de coquillage et ses particularités anatomiques influent grandement sur la quantité de virus retenus : les coquillages dits fouisseurs (coques, palourdes, clams, praires) vivent dans le sable, qui est un réservoir de micro-organismes et se contaminent plus facilement que les huîtres ou les moules qui sont en pleine eau. Il existe des différences entre les espèces pour la bioaccumulation des virus [8].

➤ **De l'état du virus** (libre ou adsorbé sur des particules) : L'état du virus joue un rôle important ; ainsi plusieurs études ont montré que les virus en suspension parmi des débris cellulaires (suspension brute) ou associés à un support particulaire étaient accumulés plus efficacement par les coquillages, que sous leur forme libre [9, 10].

➤ **De la quantité de virus dans l'eau :** De plus forts taux d'accumulation sont trouvés, lorsque la quantité de virus dans l'eau de mer est élevée. Toutefois, il y a probablement une quantité limitée de sites d'adsorption pour les virus sur le mucus branchial [4, 11].

➤ **De la température de l'eau.**

En fait la rétention virale par les fruits de mer et le facteur d'accumulation des virus varient dans de fortes proportions. En ce qui concerne, la localisation des virus au niveau des coquillages. Il apparaît qu'après 2 à 4 heures de séjour dans l'eau contaminée, les virus se répartissent, pour la quasi-totalité dans la glande digestive [12].

L'étude de la répartition des particules virales à l'intérieur du corps du mollusque est très utile pour expliquer les temps de rétention, car les contaminations présentes dans le tube digestif sont vrai semblablement plus rapidement éliminées par les fèces que ceux présents dans le reste du corps.

Par ailleurs, sur le plan technique la connaissance de cette répartition est importante. En effet, lors de l'analyse des coquillages, l'extraction des virus est réalisée classiquement à partir de la chair totale des coquillages. Cependant, compte- tenu du fait qu'il a été confirmé que la grande majorité des virus étaient concentrés dans le tube digestif [12, 13], plusieurs auteurs ont proposé d'extraire les virus seulement à partir des tissus digestifs, ce qui présente l'intérêt [14, 15] d'une part, d'éliminer des tissus contenant souvent des quantités importantes d'inhibiteurs, d'autre part de réaliser l'analyse sur un plan de grand nombre d'individus.

3- Persistance des virus dans les coquillages:

La persistance des virus pendant l'immersion des coquillages dépend de l'activité physiologique du coquillage et du milieu environnant, notamment du niveau de pollution virale de l'eau de mer. Cette persistance est très variable et peut être longue.

Lorsque les températures sont basses, les bivalves sont en activité ralentie et filtrent peu d'eau. Ces conditions favoriseraient donc la rétention des micro-organismes. Cela pourrait expliquer partiellement pourquoi les cas de gastro-entérites et d'hépatite A surviennent principalement en hiver et au début du printemps.

Si les virus sont susceptibles de persister longtemps pendant l'immersion des coquillages dans l'eau de mer il a été montré aussi qu'au cours du stockage soit à l'état frais, soit à l'état congelé les virus peuvent persister dans les coquillages.

Compte tenu de la persistance des virus dans les coquillages plusieurs étapes sont nécessaire afin d'extraire le virus.

L'extraction doit comporter les étapes suivantes : élution, concentration virale, extraction des ARN puis purification. L'étape de purification des ARN est nécessaire pour éliminer les inhibiteurs des enzymes de RT-PCR présents dans les coquillages (acide humique, polysaccharide, glycogène). Les principales méthodes utilisées sont décrites dans le tableau 1. Ces données font apparaître un consensus quant à l'efficacité de l'élution par le tampon glycine et de la concentration des virus par le PEG. Concernant l'extraction des acides nucléiques, l'utilisation de kits commerciaux semble de plus en plus fréquente.

II- VIRUS DE L'HEPATITE A :

1- Classification - Morphologie - Structure :

Le VHA appartient à la famille des *Picornaviridae* qui comprend cinq genre dont trois comportent des virus pathogènes pour l'homme : *Rhinovirus* (plus de 100 sérotypes), *Entérovirus* (au moins 67 sérotypes) et *Hépatovirus* dont il est actuellement le seul représentant.

En microscopie électronique, le VHA se présente sous forme de particule sphérique non enveloppée mesurant de 27 à 32 nm de diamètre, avec une capsid à symétrie cubique constituée de 32 sous unités ou capsomère (figure 1). Chaque capsomère est constitué de quatre protéines virales : VP1, VP2, VP3 et VP4. Les protéines VP1, VP2, VP3, ont un poids moléculaire variant de 25 à 35 KDa, elles sont situés à l'extérieur de la capsid et constituent la cible des anticorps neutralisants.

La protéine VP4 tapisse la face interne de la capsid virale. Le génome viral est une molécule d'ARN linéaire et monocaténaire de polarité positive d'environ 7.5Kb [16, 17, 18, 19].

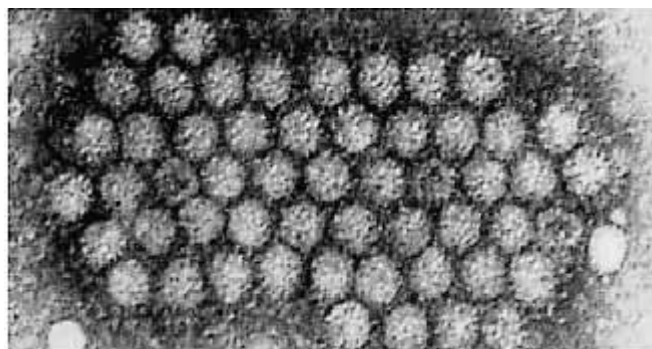


Figure 1 : Observation en microscopie électronique des particules du VHA

2- Propriétés physico-chimiques :

Les VHA se distinguent par une résistance relative plus élevée que celle des entérovirus, aux agents physique et chimiques : il peut résister pendant 1 heure à une température de 60°C. Il est inactivé à 100°C pendant 5 minutes. Il peut persister dans les fruits de mer pendant 19 minutes à 80°C et pendant 3 minutes à 90°C. Le VHA est stable à pH=1, il peut résister aux concentrations de chlore utilisé pour la chloration habituelle des eaux de boissons ou des eaux de piscine, les concentrations nécessaires pour l'inactiver étant 10 fois supérieures. Ces résistances confèrent au VHA une survie prolongée dans le milieu extérieur, dans l'eau, dans l'aliment, sur les surfaces sèches et sur les mains souillées.

Par contre, il est sensible à l'hypochlorite de sodium 1%, au glutaraldéhyde à 0.5%, au formaldéhyde, à l'hypochlorite de sodium à 4 mg/ml et à la solution de Dakin (5 mg/ml de chlore libre) [19].

3- Organisation génomique :

Le VHA comporte un brin d'ARN linéaire monocaténaire, de polarité positive, de taille approximative de 7.5Kb et présente une queue de 40 à 80 nucléotides [20]. Le génome du virus est divisé en 3 régions. Une région non codante du côté 5' terminal (5' NCR) de 734 à 740 nucléotides (figure 2). Elle constitue la portion la plus conservée du génome [20]. Cette région qui occupe 10% du génome viral présente une structure secondaire qui intervient dans l'initiation de la traduction proposée par **Lemond** et **Robertson** en 1993. Le côté 5' terminal du génome ne présente pas de Cap mais lié d'une façon covalente à une protéine virale « VPg ».

Le génome comporte une région codante avec un cadre de lecture ouvert. Cette région code pour un précurseur poly protéique composé de 3 régions désignées par P1, P2 et P3. La région P1 comporte les protéines structurales de la capsidie par contre les régions P2 et P3 présentent les protéines non structurales (figure 2). Une région non codante courte est repérée du côté 3' terminal située entre les nucléotides 7416 et 7478 et liée à une queue poly A. une étude récente a montrée la possibilité de fixation de protéine d'origine cellulaire sur cette région qui coïncide avec l'infection persistante du virus [21].

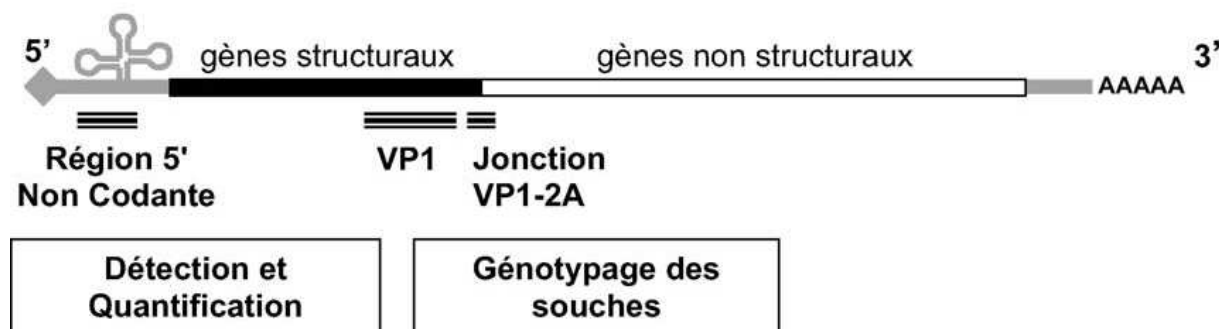


Figure 2 : Génome du virus de l'hépatite A

4- Épidémiologie et modes de transmission :

Le VHA est le plus résistant de *Picornavirus* et conserve son pouvoir infectieux après plusieurs semaines dans l'eau de mer, ou sur des objets [22]. Cette résistance, associée à une excrétion fécale prolongée, conditionne son mode de transmission essentiellement féco-oral qui peut être direct par contact avec des sujets infectés, ou indirect par l'intermédiaire d'eau ou d'aliment contaminés.

L'épidémiologie du VHA diffère selon les zones géographiques par la prévalence des anticorps anti-VHA (séroprévalence) et l'incidence de l'infection aiguë. Dans les pays en voie de développement, le VHA est endémique. La plupart des sujets sont infectés dans l'enfance et pratiquement tous les adultes sont immunisés. Dans ces régions, la transmission directe est la plus fréquente. Les épidémies sont rares car la plupart des infections surviennent chez des jeunes enfants qui restent le plus souvent asymptomatiques. Dans les pays industrialisés, des conditions socio-économiques meilleures s'accompagnent d'une baisse de la séroprévalence [23] mais paradoxalement l'incidence de l'infection peut augmenter parce que des sujets plus âgés sont susceptibles au VHA et font le plus souvent des infections symptomatiques. Dans ces pays, l'hépatite A survient de manière sporadique ou dans un contexte épidémiques [24].

Par ailleurs, des cas groupés liés à une source de contamination commune peuvent survenir. Des épidémies ont été associées à la consommation de fruits de mer crus ou mal cuits, des fruits ou des légumes crus ou de manière plus générale, d'aliment qui ne peuvent pas subir une inactivation virale par la chaleur [25]. L'importation d'aliments contaminés à partir de pays à forte endémicité pourrait devenir une source importante d'épidémies dans les pays développés [26]. Il faut noter que ces épidémies s'accompagnent d'une transmission secondaire de virus, qui peut concerner jusqu'à 20% des cas groupés observés.

La transmission du VHA par l'eau contaminée est beaucoup plus rare que la transmission interpersonnelle. L'hépatite A est néanmoins considérée à juste titre comme

maladie professionnelle pour les personnels de santé. La transmission du VHA de patient à soignant est connue de longue date [27]. Le VHA peut ainsi occasionner des infections nosocomiales, la transmission s'effectuant le plus souvent au moment où le patient source est encore asymptomatique.

La transmission parentérale du VHA est plus rare, mais des cas sont régulièrement décrits. Il s'agit d'hépatite A posttransfusionnelles [28], ou liées à l'utilisation de médicaments dérivés du sang [29], ou encore transmises par toxicomanie intraveineuse [30]. Le sujet source est le plus souvent asymptomatique au moment de la contamination et surtout séronégatif, il n'y a pas d'anticorps neutralisants circulants. Plus récemment, des épidémies ont été décrites dans la population homosexuelle masculine, liée à des contacts oraux [31].

5- Pouvoir pathogène :

5-1- L'hépatite virale A

L'hépatite A est une infection humaine cosmopolite, très fréquente dans les zones géographiques les plus défavorisées où elle se présente souvent sans manifestation clinique apparentes et touchent essentiellement les enfants de bas âge. Par contre, dans les pays développés et quand l'infection touche des sujets à des âges plus avancés au-delà de l'enfance, les formes ictérique deviennent fréquentes et peuvent être plus ou moins sévères.

La période d'incubation dure en moyenne trente jours avant l'hépatite clinique avec des extrêmes allant de 15 à 50 jours selon la quantité du virus à laquelle la personne a été exposée. Au cours de cette phase peuvent se voir des troubles gastro-intestinaux discrets, un syndrome pseudo grippal, une asthénie, une anorexie, des nausées ou une urticaire. La période de contagion commence 15 jours après l'apparition de ses signes. L'hépatite aiguë est définie par l'apparition d'une insuffisance hépatocellulaire aiguë due à une destruction massive des hépatocytes. Elle se manifeste par un ictère cutanéomuqueux, une asthénie très marquée, une décoloration de selles, un brunissement des urines et signe biologique majeur : l'évasion des transaminases sériques témoin de la destruction du parenchyme hépatique.

L'hépatite A évolue toujours vers la guérison, sauf dans certains cas où elle peut être sévère avec sa forme fulminante qui est observée dans 1 cas sur 10.000 personnes avec une létalité qui peut dépasser 1% après 40 ans. Il existe toutefois des évolutions atypiques telles que les formes à rechute avec une deuxième ascension des transaminases sériques quelques semaines après la guérison, la plupart de ces rechutes symptomatiques ou non sont de bon pronostic [32, 33].

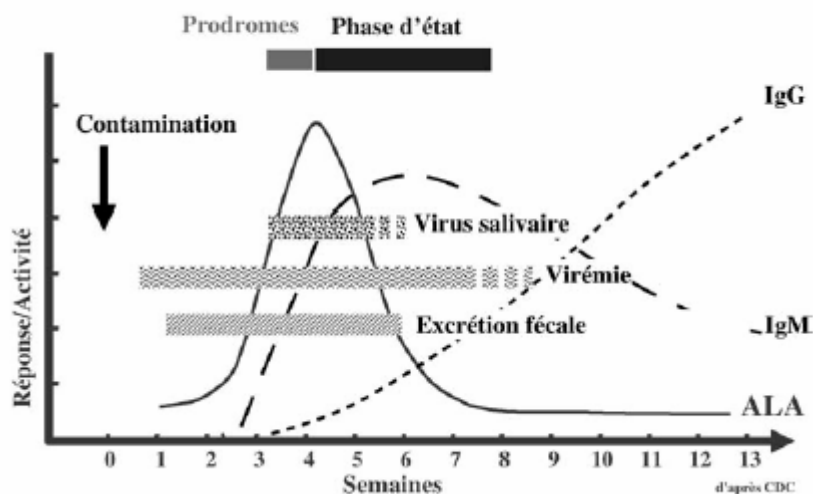


Figure 3 : Présentation clinique classique

5-2- Physiopathologie :

Après contamination par voie orale, le virus se multiplie d'abord dans la muqueuse oropharyngée et digestive puis, suite à une virémie, il va gagner le foie ou il va se multiplier dans les hépatocytes. Il est rejeté dans les canicules biliaires et éliminé avec les selles.

L'excrétion dans les selles débute 4 à 6 jours avant l'apparition de l'ictère, elle diminue ensuite rapidement et disparaît généralement en 2 à 3 semaines. La phase aiguë est caractérisée par une nécrose hépatocellulaire à l'origine de l'élévation des taux sériques des transaminases, enzymes libérées par le foie en cas de lésion des hépatocytes. L'hépatite A est très contagieuse, la contagiosité varie environ de deux semaines avant une semaines après l'apparition de l'ictère [32, 24].

6- Diagnostic virologique :

6-1- Diagnostic direct :

Le diagnostic direct des infections par le VHA repose sur la détection du virus ou de l'un de ses constituants dans les selles, pendant la phase pré ictérique. Cette détection se fait par visualisation du virus par immunomicroscopie électronique ou par recherche d'antigènes viraux par une technique immuno-enzymatique du type ELISA. Le génome viral peut être détecté, dans le sérum ou dans les selles de sujets infectés pendant la phase aiguë, et amplifié par une technique de biologie moléculaire : la transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR).

La réaction de polymérisation en chaîne est la méthode de choix pour une détection rapide, sensible et spécifique des pathogènes viraux dans l'environnement. Cette technique permet de fabriquer des copies d'ADN double brin grâce à une étape préliminaire de transcription inverse aboutissant à la synthèse d'un ADN complémentaire de l'ARN viral, servant de matrice pour l'amplification ultérieure.

La réaction de polymérisation en chaîne est en fait la répétition de trois étapes réalisées successivement :

- Une étape de dénaturation de l'ADN qui correspond à la rupture des liaisons hydrogènes sous l'effet de l'augmentation de la température.
- Une étape d'hybridation du couple d'amorce du côté 3' de chaque brin d'ADN par diminution progressive de la température jusqu'à la température d'hybridation.
- Une étape d'élongation des amorces par l'intermédiaire d'une enzyme de polymérisation ou ADN polymérase thermolabile.

La Nested PCR ou PCR nichée fait intervenir deux PCR successives, la première PCR est réalisée avec un couple d'amorces dites extérieures, le produit est ensuite re-amplifié en utilisant un autre couple d'amorce dites internes qui doivent être complémentaires d'une région située à l'intérieur du fragment amplifié lors de la première PCR. C'est donc une méthode encore plus sensible que la PCR.

6-2- Diagnostic indirect :

Le taux des anticorps de type IgM s'élève dès le début des signes cliniques et persiste entre 8 et 12 semaines après l'infection. Le dosage des IgM est le meilleur moyen de diagnostic de l'infection aiguë par le VHA. La recherche des IgG anti-VHA est utile pour déterminer le statut immunitaire d'un sujet à risque en vue d'une vaccination. Le dosage préalable à la vaccination est conditionné par l'âge et les données socio-économiques du candidat à la vaccination (profession, voyage...).

7- Prévention et traitement :

7-1- Mesures non spécifiques :

Certaines précautions peuvent diminuer le risque de contacter le VHA, il s'agit notamment du traitement adéquat de l'eau de boisson, d'éviter de consommer des fruits de

mer crus, de bien se laver les mains avant la préparation d'aliments et avant de manger ainsi qu'après avoir été aux toilettes.

7-2- Immunisation passive :

Les gammaglobulines polyvalentes confèrent une protection passive immédiatement mais présentent les inconvénients d'une efficacité limitée à quelques mois et d'un coût élevé.

7-3- Vaccination :

Le premier vaccin contre l'hépatite A est le vaccin HAVRIX[®] (Smith Kline Beecham Pharma) mis sur le marché en 1992. C'est un vaccin entier conventionnel, préparé à partir de la souche HM175 adaptée sur des cellules diploïdes humaines MRC5 inactivée par le formol et adsorbée à l'hydroxyde d'aluminium. Il est très immunogène, le taux de séroconversion étant de 98.9% un mois après une seule injection. Le vaccin développé par **Pasteur Mérieux** est préparé à partir de la souche GMB cultivée sur cellules MRC5, il est également inactivé par le formol et adsorbé sur hydroxyde d'aluminium. Un autre vaccin, le VAQTA (**Merck Frosst**), de même principe et préparé à partir de la souche CR326F conférerait une immunité protectrice de 100% dès le 21^{ème} jour suivant une injection unique. Depuis 1996, un nouveau vaccin combiné hépatite A et hépatite B est indispensable, le TWINRIX [33].

La vaccination contre l'hépatite A est recommandée pour les sujets originaires de pays qui présentent un risque d'exposition au virus de l'hépatite A soit à l'occasion d'un voyage en zone d'endémie ou dans un cadre professionnel particulier tels que le personnel impliqué dans la restauration collective. La vaccination contre VHA est également préconisée chez les hémophiles, les polytransfusés, les homosexuels, bisexuels et les utilisateurs de drogues intraveineuses.

7-4- Traitement

Il n'y a pas de traitement spécifique et curatif. L'arrêt de la consommation d'alcool permet une récupération plus ou moins rapide. Pour les formes fulminantes, une transplantation hépatique peut être envisagée.

III- LES MOLLUSQUES :

1- La classification des mollusques bivalves :

L'ensemble des mollusques constitue un embranchement du règne animal (ou phylum) réparties en sept classes. Les principales sont au nombre de trois : celle des bivalves, comprenant autres les palourdes (*clovisses*), les coques, les moules, les huîtres et les coquilles Saint-Jacques, celles des *gastropodes*, parmi lesquels on peut citer les *escargots* et les *ormeaux* et enfin celle des *céphalopodes*, comprenant notamment le calamar, la seiche et le poulpe. Il existe une très grande variété de mollusques que l'on peut trouver dans les mers, en eau douce ainsi qu'à l'intérieur des terres. Ils sont généralement des filtres microphagies qui se nourrissent de phytoplanctons. Certains d'entre eux filtrent jusqu'à 300 litres d'eau par jour [34].

Les mollusques bivalves ont une valeur nutritionnelle et diététique intéressante, souvent vantée car leur chair est particulièrement riche en protéine (10g de protéines par 100g de chair), en glucides tel que les polysaccharides (6g par 100g de chair), en minéraux principaux (Chlorure, Phosphore, Soufre et Potassium) et en vitamines principales (C et A). Les lipides ne représentent que 1% de la masse totale [35], cas unique parmi les denrées animales. Les mollusques bivalves sont pour la plupart mangés cru ou légèrement cuits, sans aucune préparation ou transformation intermédiaire et témoignent directement de la qualité du milieu.

2- Production de mollusques bivalves en Tunisie :

La Tunisie dispose de nombreuses espèces de mollusques, fixés ou non, dont l'exploitation, aussi bien par la pêche que par l'élevage est relativement récente. La production tunisienne de mollusques bivalves repose sur les activités d'exploitation de stocks naturels (95%) et d'élevage (5%). Les activités d'élevage concernent les filières de moules (*Mytilus galloprovincialis*), d'huître creuse (*Crassostrea giga*) et d'huître plate (*Ostrea edulis*). L'exploitation des stocks naturels concerne essentiellement la palourde (*Ruditapes decussatus*).

Les zones de production s'étalent sur l'ensemble du littoral tunisien méditerranéen (lac et canal de Tunis, Bizerte, Sfax nord, Gargour Guetifa, Metline Nord et Sud, Shkira, Gabès Nord et Sud, Mednine Nord, Lagune Boughrara et Djerba Nord. L'activité d'aquaculture n'est pratiquée que dans la lagune de Bizerte.

2-1 Les huîtres :

Elles sont présentes sur toutes nos côtes, de la zone des marées jusqu'à 30 m de profondeur. Elles préfèrent les eaux salées, même si on peut la trouver dans les estuaires.

2-2- les moules :

En Tunisie, *Mytilus galloprovincialis* a été signalée sur les côtes de l'Afrique du nord et dans la lagune de Bizerte avec l'espèce *Perna perna*. Sa présence a été indiquée à la Goulette [36,37] et sur l'ensemble des côtes nord du littoral tunisien de Bizerte au Cap Bon [38]. Plus récemment, elle a été décrite au delà du Cap Bon.

2-3- les palourdes :

Les palourdes se rencontrent, à l'état naturel, dans les zones côtières particulièrement bien abritées. Les gisements peuvent présenter d'exceptionnelles densités dans les lagunes saumâtres communiquant avec la mer.

MATERIELS & METHODES

I- MATERIELS :**1- Mollusques bivalves :**

Les échantillons de mollusques bivalves vont colligés pendant la période de février 2008 et Mai 2008 : 8 lots d'échantillons de moule, 6 lots d'échantillons de huître et 9 lots d'échantillons de palourde collectés à l'état vivant sans subir l'étape préconisée de purification (Tableau 2).

Les échantillons de mollusques bivalves ont été collectés au niveau de différents points de prélèvements localisés sur différents sites d'exploitation : Tunis, Bizerte et Gabès.

Ces échantillons ont été maintenus au froid (glacière réfrigérée) jusqu'à leur réception au laboratoire afin de maintenir la qualité et la quantité des microorganismes souvent présents dans les échantillons du moment de prélèvement jusqu'à leur analyse.

2- Témoin positif :

La réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) nécessite l'emploi de témoins positifs. Le témoin positif employé est un échantillon moule contaminé artificiellement une suspension avec de selle de patient hépatite A positif en phase aigue (excrétion de virus à forte concentration dans les selles).

Tableau 2 : Les échantillons analysés :

Zone de production	Nombre d'échantillons	Période de collection
Huître Bizerte	HB0	03/02/2008
Palourde Gabès	PG1	11/02/2008
Moule Tunis	MT1	11/02/2008
Huître Bizerte	HB1	25/02/2008
Moule Bizerte	MB1	25/02/2008
Moule Tunis	MT2	03/03/2008
Palourde Gabès	PG2	04/03/2008
Moule Bizerte	MB2	10/03/2008
Huître Bizerte	HB2	10/03/2008
Palourde Gabès	PG3	02/04/2008
Huître Bizerte	HB3	18/04/2008
Moule Bizerte	MB3	18/04/2008
Palourde Gabès	PG4	30/04/2008
Palourde Tunis	PT1	13/02/2008
Moule Bizerte	MB4	07/05/2008
Huître Bizerte	HB4	07/05/2008
Palourde Gabès	PG5	03/05/2008
Moule Bizerte	MB5	18/05/2008
Huître Bizerte	HB5	18/05/2008
Palourde Gabès	PG6	13/05/2008
Moule Tunis	MT3	25/03/2008
Palourde Tunis	PT2	27/02/2008
Palourde Tunis	PT3	10/03/2008

II- METHODES :

1- Préparation des échantillons de mollusques bivalves

Pour chaque lot, les coquilles sont débarrassés de corps étrangers présents sur leurs coquilles par un brossage sous l'eau de robinet, puis lavés abondamment (au moins 4 fois) à l'eau stérile. Après ouverture des coquilles, la chair et le liquide inter valvaire sont recueillis dans des flacons stériles à raison de 50 g chacun d'eux.

Une conservation à -20°C au plus est préconisée jusqu'à l'extraction virale.

2- Préparation du témoin positif

2-1- Préparation des selles

Une dilution des selles 50% dans du PBS stérile a été réalisée. Ensuite, on centrifuge à 30 minutes à 3000 rpm pour éliminer les grosses particules par une centrifugation de 10000 rpm pendant 15 minutes.

2-2- Contamination artificielle :

On ajoute les selles diluées 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} dans du PBS à 50 g de chair d'un échantillon négatif (MB1).

Le mélange est agité une heure à température ambiante.

3- Extraction et concentration des virus de l'hépatite A :

3-1- Principe :

L'étape d'extraction et de concentration consiste à extraire et concentrer les virus par élution- centrifugation à partir des échantillons de coquillages.

Les méthodes d'extraction et de concentration des virus mettent à profit les propriétés des macromolécules protéiques constitutives de la capsid virale. Cette étape nécessite le broyage des tissus et liquide inter valvaire en présence d'une solution éluant à pH alcalin permettant de modifier les conditions du milieu par rapport d'ions et par variation du pH, entraînant ainsi l'inversion du potentiel de charge des particules virales et leur libération dans la phase liquide. Dans le présent travail, le Tampon glycine pH9.5 a été utilisé.

Le broyage est réalisé avec un mixeur Silent-Crusher permettant d'aboutir à un broyat homogène. Le mélange obtenu a subi les étapes de clarification et décontamination dans le but d'éliminer les débris cellulaires et les macromolécules qui sont susceptibles d'inhiber certaines réactions de biologie moléculaire.

Le virus de l'hépatite A présent en faible quantité dans le surnageant, est concentré par l'addition de PEG₆₀₀₀ qui favorise la précipitation du virus en suspension.

Le précipité préalablement formé, après une étape d'incubation, est récupéré après centrifugation.

3-2- Protocole expérimental :

Deux méthodes d'extraction et concentration des virus de l'hépatite A ont été utilisées dans le présent travail afin d'optimiser les techniques d'analyse :

3-2-1- Première technique d'extraction (T1) :

Pour l'extraction, 50 g sont homogénéisés dans un mixeur Sillent Crasher dont la tige est passée à l'autoclave après chaque utilisation. Le broyat est soumis à une agitation pendant 15 minutes à température ambiante en présence de 150 ml de tampon basique (0,2M de glycine -0,15 M Na Cl) ; ce tampon permet la floculation des virus dans le surnageant. Après une étape de centrifugation du mélange broyat et tampon à 8500 g pendant 15 minutes à +4°C. On ajoute au surnageant obtenu un volume égal d'extrait de viande de bœuf à 3% et l'on ajuste le pH à 3,5 avec une solution HCl. L'ensemble est agité pendant 30 minutes à température ambiante et centrifugé à 8500 g pendant 20 minutes à +4°C ; le culot est remis en suspension dans 10 ml de tampon phosphate (PBS) auquel est ajouté du polyéthylène glycol (PEG₆₀₀₀ à 50%) à un quart de volume final.

Le pH est ensuite ajusté à 7,2 et le mélange est incubé pendant une nuit. Le lendemain, le mélange est centrifugé à 8500g pendant 45 minutes à +4 °C et le culot est dissout dans 10 ml de PBS.

Pour empêcher la contamination des extraits ainsi obtenus, une décontamination est réalisée avec des filtres à seringue 0.22 µm (Miller-GS membrane). Ces échantillons sont conservés à -20°C pour les manipulations ultérieures.

3-2-2- Deuxième technique d'extraction (T2) :

50 g de tissus et de liquide inter valvaire des coquillages ont été broyés par un mixeur Sillent Crasher et on ajoute 150 ml de tampon basique 0,2 M glycine-0,15 M Na Cl (pH=9,5). L'ensemble est mélangé, sous agitation, pendant 15 min à la température ambiante. Une centrifugation de 8500 g pendant 15 min à +4°C est effectuée. Le surnageant représente l'extrait viral.

L'extrait est concentré ensuite selon la méthode de concentration au PEG : une solution PEG₆₀₀₀ 50% (500g PEG, 75g Na Cl, qsp 1000 ml PBS) dans un rapport de ¼ (v/v)est ajoutée à l'extrait obtenu. La solution est incubée une nuit à 4°C.

Le précipité formé est récupéré par centrifugation à 8500 g à +4°C pendant 60 min. Par la suite, le culot est remis en suspension dans 10 ml de tampon phosphate (PBS, pH=7,2).

La décontamination de solution se fait par l'ajout de 500 µl d'une solution d'antibiotiques et d'antifongiques (pénicilline 10000 IU/ml, streptomycine 100 mg/ml, 25ml de fungizone) à la concentration final. Enfin le mélange est incubé à +4°C pendant 24 heures puis congelés à -20°C.

4- Extraction et purification de l'ARN viral à partir des échantillons de mollusques :

4-1- Principe :

Dans la plupart des cas, la libération l'ARN viral est obtenue par l'action d'agents dénaturants des protéines. Ceci permet non seulement de dégrader la capsid virale mais aussi d'inactiver les ribonucléases présentes dans le milieu.

Dans le présent travail, l'extraction virale est réalisée par la voie enzymatique en présence de détergent.

4-2- Protocole expérimental :

Un échantillon, de 400 µl d'extrait de coquillages est mis en présence de 10 µl de protéinase K (20 mg/ml) dans un tube eppendorf stérile et incubé à 56°C pendant 60 min. Par la suite 400 µl du mélange phénol-chloroforme-alcoolisoamylique 25/24/1 (v/v/v) (Promega). L'ensemble est homogénéisé pendant 15 secondes.

Après une étape de centrifugation à 17000 g à +4°C pendant 15 min, le surnageant est transféré dans un autre tube eppendorf contenant 40 µl d'acétate de sodium 3M pH 5,5 et 900 µl d'éthanol absolu glacial. Pour favoriser le mélange, les tubes sont retournés pendant 10 secondes et placés une nuit à -20°C).

Les échantillons sont ensuite centrifugés à 17000 g à +4°C pendant 30 min, le surnageant est enlevé délicatement et le culot est repris dans 500 µl d'éthanol 75% et centrifugé à 17000 g pendant 15 min à +4°C. Après élimination complète du surnageant, le culot est séché pendant 1 heure dans une étuve à 37°C et repris dans 30 µl d'eau ultra pure stérile contenant 3 µl de RN Asine (inhibiteur de l'activité ribonucléase). Cet extrait est conservé à -80°C pour les manipulations ultérieures.

5- Détection du génome viral par RT- PCR :

La technique utilisée est une RT-PCR dont le protocole est une modification d'une Nested PCR publié dans la littérature [26].

5-1- Principe de la transcription inverse

Dans la plupart des cas, la libération l'ARN viral est obtenue par l'action d'agents dénaturants des protéines. Ceci permet non seulement de dégrader la capsid virale mais aussi d'inactiver les ribonucléases présentes dans le milieu.

Dans le présent travail, l'extraction virale est réalisée par la voie enzymatique en présence de détergent.

5-2- Synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN viral

La transcription inverse a été effectuée à l'aide de l'enzyme reverse transcriptase AMV et l'amorce antisens AS1 (Invitrogen). Un mélange réactionnel est préparé en combinant 1 µl de dNTP, 2 µl d'amorce AS1 (tableau 3), 1.5 U AMV reverse transcriptase et 2.88 µl d'eau Ultra pure. A ce mélange réactionnel sont ajoutées 10 µl de l'ARN des échantillons. La transcription inverse est réalisée 60 minutes à 42°C, suivie d'une dénaturation à 99°C pendant 5 minutes.

5-3- Principe de la Nested PCR

La Nested PCR fait intervenir deux PCR successives, la deuxième PCR étant réalisée avec deux amorces qui PCR doivent bien évidemment être complémentaires d'une région située à l'intérieur du fragment amplifié lors de la première PCR. C'est donc une méthode encore plus sensible que la PCR, mais il est nécessaire de prendre des précautions pour éviter les risques de contamination.

5-4- Protocole du Nested PCR

La Nested PCR se fait en deux étapes successives : Un mélange réactionnel de 45 µl de volume a été préparé pour la 1^{ère} PCR contenant 23,5 µl d'eau ultra pure, 5 µl de tampon 10X, 4 µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP, 5 µl d'amorce AS1 (10mM), 5µl d'amorce S2 (10 mM) et 2.5 U de l'enzyme Taq polymérase (Promega) (tableau 3). A ce mélange réactionnel, sont ajoutés 5 µl d'ADNc.

Le mélange réactionnel de la 2^{ème} PCR comprend : 23,5 µl d'eau ultra pure, 5 µl de tampon 10X, 4 µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP, 5 µl d'amorce AS4 (10mM), 5µl d'amorce S3 (10 mM) et

2.5 U de l'enzyme Taq polymérase. A ce mélange réactionnel sont ajoutés 5 µl d'ADN amplifié, obtenu lors de l'amplification.

Tableau 3 : Séquences des amorces de la région P1 utilisée dans la 1^{er} et 2^{ème} PCR

Les amorces	Séquences de nucléotides (5' à 3')	Positions*	Polarités
AS1	CATATGTATGGTATCTCAACAA	1092-1113	antisens
S2	CAGGGGCATTTAGGTTT	698-714	sens
S3	TGATAGGACTGCAGTGA	836-854	sens
AS4	CCAATTTTGCAACTTCATG	1029-1047	antisens

* positions selon la souche (VHA) HM-175.

L'amplification lors de la première et la deuxième PCR est effectuée selon les conditions décrites ci dessous :

Une étape de dénaturation initiale de 7 minutes à 95°C est suivie d'une série de 30 cycles d'amplifications, chaque cycle présente les étapes suivantes :

- Une étape de dénaturation de l'ADN de 25 secondes à 95°C.
- Une étape d'hybridation des amorces de 10 secondes à 49°C
- Une étape d'élongation de 1 minutes à 70°C+

Enfin, une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 minutes.

Pour la Nested PCR, deux témoins négatifs (eau distillée stérile) correspondant respectivement à la 1^{ère} et la 2^{ème} PCR ont été utilisés pour détecter une éventuelle contamination et un témoin positif est utilisé pour s'assurer du bon déroulement de l'amplification.

5-5- Visualisation des produits amplifiés

5-5-1- Principe

L'électrophorèse est une technique analytique couramment utilisée en raison de sa simplicité. Elle permet en outre de visualiser les molécules d'acides nucléiques, de les séparer et de déterminer leur taille. Le groupement phosphoryle de chaque nucléotide a une polarité négative. Il y a donc une répartition homogène des charges, ce qui confère aux molécules d'acides nucléiques une charge électrique globale proportionnelle à leur taille. Les molécules d'acide nucléiques chargées négativement vont migrer de la cathode vers l'anode au cours d'une électrophorèse et seront séparées en fonction de leur taille.

L'électrophorèse analytique est employée afin d'identifier et séparer des fragments d'ADN. Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées pouvant migrer dans un champ électrique. La vitesse de migration de l'ADN dépend du nombre de paire de bases et de la concentration du gel en agarose. L'ADN peut être visualisé sur le gel grâce au bromure d'éthidium (BET) qui présente une fluorescence orange lorsqu'il est présenté à une source de rayons UV courts (environ 300 nm).

5-5-2- Protocole

5 µl d'ADN amplifié sont mélangés avec 2 µl de solution de dépôt (annexe 2). L'ensemble est déposé sur gel d'agarose à 1.5 % dans du Tris Borate EDTA (TBE) contenant 0.5 µg/ml de la solution de Bromure d'éthidium (BET). La migration de l'ADN est effectuée par électrophorèse sous une tension de 80 V. L'ADN amplifié est visualisé sous UV et photographié par le gel Doc EQ System (BIORAD).

Le marqueur de taille 100 pb (Invitrogen) a été utilisé pour la détermination de la taille des bandes. La taille des produits attendus est de 211 pb avec les amorces S₃/AS₄.

RESULTATS & DISCUSSION

I- Résultats:

Pour choisir la méthode d'extraction et de concentration la plus adaptée aux échantillons, deux méthodes ont été comparées quant à leur capacité à détecter par RT-PCR. Pour cela, deux techniques d'extraction et de concentration ont été appliquées sur la totalité de la chair du moule contaminé artificiellement (MB1) par les selles de VHA à différentes dilutions : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} .

Après l'extraction et l'élution de particules virales contenues dans la totalité de la chair des échantillons de coquillages par les techniques T1 et T2, une concentration au PEG₆₀₀₀ suivie d'une décontamination est préconisée afin d'éliminer les agents toxiques. Ensuite, une RT-PCR a été appliquée sur les extraits génomiques bruts des échantillons de mollusques bivalves.

Les efficacités relatives des différentes techniques d'extraction et de concentration sont appréciées d'après le taux de détection positifs du VHA sujet à une amplification par RT-PCR (tableau 4).

Tableau 4: Résultats de détection de VHA par différentes techniques d'extraction.

	Solution mère	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
T1	++	+	+	+	-
T2	++	++	++	++	+

++ : Echantillons positif

+ : Echantillon faiblement positif

- : Echantillons négatif

Des différences d'efficacité d'amplification ont été observées en fonction de la méthode d'extraction et de concentration. La technique T2 présente des performances supérieures aux techniques T1. En effet, T2 affiche le rendement le plus élevé.

La technique d'extraction T2 retenue lors de la première étape de ce travail a été appliquée sur 23 échantillons de coquillages.

Brièvement après l'extraction et l'élution des virus à partir d'une prise d'essai de 50 g de broyat de coquillages selon la technique retenue sont concentrés d'après la technique décrite par Lewis et Metcalf [39].

Ensuite, les acides ribonucléiques des virus des échantillons sont extraits à l'aide d'une méthode enzymatique.

Les extraits génomiques obtenus ont été amplifiés par RT-PCR pour la détection du VHA.

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Résultats de détection des virus de l'hépatite A par RT-PCR de mollusques bivalves tunisiens.

lots	Point de prélèvement	Date de prélèvement (2008)	Résultat de la RT-PCR
MB1	Bizerte	25/02	-
MB2	Bizerte	10/03	-
HB1	Bizerte	25/02	+
HB2	Bizerte	10/03	-
MT1	Tunis	11/02	-
MT2	Tunis	03/03	-
PG1	Gabès	11/02	-
PG2	Gabès	03/03	+
HB0	Bizerte	04/02	-
MB3	Bizerte	18/04	-
HB3	Bizerte	18/04	-
PG3	Gabès	01/04	-
PG4	Gabès	28/04	-
PT1	Tunis	13/02	-
MB4	Bizerte	07/05	-
HB4	Bizerte	07/05	-
PG5	Gabès	03/05	-
MB5	Bizerte	18/05	-
HB5	Bizerte	18/05	-
PG6	Gabès	13/05	-
MT3	Tunis	25/03	-
PT2	Tunis	27/02	-
PT3	Tunis	10/03	-

+ : résultat positif par RT-PCR

- : résultat négatif par RT-PCR

Il ressort que la détection de VHA par RT-PCR a révélé deux lots positifs sur l'ensemble des lots d'échantillons analysés. Ce qui correspond à une fréquence de 8.6%. Les résultats obtenus par le présent travail montrent une contamination par le VHA des échantillons de Palourde (PG2) et d'Huître (HB1).



Figure 4 : Révélation du produit amplifié par RT - PCR en utilisant les amorces S3/AS4.

M : Marqueur de taille; 1 : Blanc du 1^{ère} PCR ; 2 : Blanc du 2^{ème} PCR ; 3 : Moule Bizerte contaminée MB1⁺ (témoin positif) ; 4 : Echantillon négatif (MT3) ; 5 : Huître Bizerte (HB1) ; 6 : Palourde Gabès (PG2)

II- Discussions :

La méthode de choix pour la détection du virus de l'hépatite A dans les coquillages est la RT-PCR. Cependant les méthodes d'extractions ne sont pas toujours compatibles avec une amplification génomique.

En effet, dans certains cas, les substances inhibitrices peuvent être extraites et concentrées au même temps que les ARN viraux. Cet effet inhibiteur est d'autant plus notable que le nombre de copie de génome viral dans l'échantillon est faible [40]. Le degré d'efficacité de la détection virale par RT-PCR dans les coquillages résulte ainsi de deux facteurs : l'efficacité de la méthode d'extraction utilisée et le degré de pureté finale de l'acide nucléique extrait [41].

La technique adaptée d'extraction et de concentration des particules virales se distingue principalement par l'absence de l'extrait de bœuf, l'ajout de NaCl et la forte concentration en PEG.

Une évaluation de la contamination virale d'échantillon de mollusques bivalves collectés de milieux de production (Tunis, Bizerte et Gabès) a fait l'objet de la deuxième partie de ce travail.

2-1- Rendement des deux techniques d'extraction et de concentration (T1 et T2) :

Dans la première partie de cette étude une sélection d'un protocole d'extraction et de concentration du virus de l'hépatite A de la chair des mollusques bivalves a été effectuée en testant deux techniques décrites dans les littératures. La comparaison de leur capacité à détecter par RT-PCR les acides du virus de l'hépatite A a permis de résoudre le problème de concentration viral qui reste faible dans la chair des mollusques bivalves ainsi que le problème d'interférence des substances inhibitrices lors de l'étape de détection.

Des différences d'efficacité de détection des virus de l'hépatite A ont été observées entre les deux techniques (T1 et T2) utilisant la totalité de la chair des bivalves. Ces deux techniques se distinguent par la présence d'extrait de bœuf, la concentration en PEG₆₀₀₀ et l'ajout de NaCl. La technique d'extraction et de concentration T2 offre l'avantage d'être plus rapide (moins d'étapes d'extraction).

On n'ajoute pas l'extrait de bœuf dans le tampon. Ce dernier (extrait de bœuf) est connu pour son rôle inhibiteur en RT-PCR.

En effet, certains additifs utilisés lors de l'élution peuvent s'avérer inhibiteurs en RT-PCR alors qu'ils sont sans effet en culture. Le faible rendement de la technique T1 confirme

le caractère inhibiteur de l'extrait de bœuf [42, 43]. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits en littérature utilisant dans la majorité des cas des tampons à base de glycine [44, 45, 46 et 47].

Dans notre travail, sur les deux techniques testées (T1 et T2), la technique T2 à base de glycine uniquement affiche le rendement le plus élevé. Par conséquent, cette technique sera choisie afin d'améliorer le taux de détection des particules virales à partir de la totalité de la chair des mollusques bivalves.

2-2- Evaluation de la contamination virale des mollusques bivalves :

Les coquillages filtreurs accumulent les virus présents dans l'environnement. La faible concentration de ces virus dans les coquillages est liée à leur contamination passive. Ces concentrations sont à leur tour suffisantes pour provoquer l'infection à l'homme. En effet, l'ingestion de 10 à 100 particules virales infectieuses est largement suffisante pour induire l'infection [48]. Ainsi, le recours aux approches moléculaires pour une détection sensible des virus entériques dans les coquillages est indispensable.

La réaction de polymérisation en chaîne précédée par la reverse transcription est la méthode de détection choisie dans cette étude.

De plus, cette approche moléculaire a pour but de détecter le génome viral sans fournir d'information supplémentaire sur le caractère infectieux du virus [49]. La culture cellulaire reste la méthode de référence pour la mise en évidence du pouvoir infectieux viral, mais la faible sensibilité de cette technique limite son utilisation. De plus, le virus de l'hépatite A est difficilement cultivable.

Les résultats de détection moléculaire des virus de l'hépatite A recherchés obtenus sur les 23 lots d'échantillons de mollusques bivalves prélevés à partir des sites de production tunisiens montrent qu'environ 8.6% des échantillons sont contaminés.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans différentes études analogues obtenus par des équipes de recherche issues de pays européens ou des Etats-Unis [50, 51, 52, 53].

Le point notable dans cette étude est le pourcentage d'échantillons de coquillages positifs en hépatite A (8.6%). Le VHA est endémique en Tunisie. Ce virus circule activement dans la population : 58% de la population âgées de moins de 15 ans est porteuse d'anticorps anti- VHA. Ce virus présente une résistance particulière aux traitements d'épuration [34], et peut persister longtemps dans le milieu extérieur, dans l'eau, les aliments, sur les surfaces sèches et sur les mains de volontaire artificiellement contaminés [54] expliquant ainsi la

contamination fréquentes des lots de coquillages. Une récente étude a montré la large étendue de circulation sur ce virus en Italie touchant plusieurs secteurs d'activité entre autre la conchyliculture [55].

CONCLUSION

Lorsque les virus sont recherchés dans les coquillages, différents problèmes sont rencontrés. Tout d'abord, l'adsorption du virus au niveau des différents organes des mollusques avec une localisation préférentielle au niveau de l'estomac et de l'hépatopancréas impose l'emploi d'une méthode d'extraction pour décrocher le virus de son support. Par ailleurs, en l'absence de multiplication virale, les taux de contamination infectant les coquillages sont faibles. Ces faibles concentrations virales nous contraignent à concentrer les virus et à utiliser des techniques de détection particulièrement sensibles. Enfin, ces coquillages sont aussi des milieux de composition chimique complexe. Ce qui est susceptible d'interférer avec le système de détection mis en œuvre et d'empêcher la détection virale. Ainsi, la qualité d'extraction des acides nucléiques, la sensibilité et la spécificité de la RT-PCR sont essentielles pour leur mise en évidence.

L'intérêt de cette étude est d'optimiser une technique de détection du virus de l'hépatite A dans les mollusques bivalves par la technique RT-PCR et d'évaluer la contamination virale des coquillages d'origine Tunisiennes prélevés du milieu naturel et de site de productions avant l'étape de purification.

Les techniques d'amplifications géniques utilisées pour la mise en évidence ces virus entériques, sont aujourd'hui bien adoptées à la virologie de l'environnement. Elles sont globalement rapides, sensibles et ont l'avantage de détecter des virus non cultivables. Il faut également souligner qu'en plus de la charge en virus infectieux, d'autres facteurs peuvent intervenir dans le déclenchement d'une infection. En effet, les personnes immunodéprimées, stressées et les enfants peuvent constituer une population à risque.

Il apparaît important de continuer à développer dans un souci d'assurance qualité des méthodes simples de détection des virus. Les recherches doivent se poursuivre en prenant en compte l'interférence de nouveaux pathogènes tels que le virus de l'hépatite E ou le virus Aïchi. La mondialisation facilitant les échanges, il est également nécessaire de réaliser des études épidémiologiques afin de collecter des données cliniques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]: **Hedberg, C., MacDonald, K. and Osterholm, M. 1994.** Changing epidemiology of food-borne disease: a Minnesota perspective. *Clin Infection Dis*; 18: 671-682.
- [2]: **Kohn, M., Farley, T. Ando, T. Curtis, M. Wilson, S. Jin, Q. Monroe, S. Baron, R. McFarland, L. And Glass, R. 1995.** An outbreak of Norwalk virus gastro-enteritis associated with eating raw oysters. *JAMA*; 273:466-471.
- [3]: **Djuretic, T., Wall, P.G., Ryan, M., Evans, H.S., Adak, G.K., and Cowden, J.M. 1996.** General epidemiology of infectious intestinal disease in England and Wales 1992 to 1994. *CDR Review*: R57-63.
- [4]: **Di Grolamo, R. Liston, J. and Mathches, J. 1977.** Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. *Appl. Environ. Microbiol.*33, 19-25.
- [5]: **Mitchell, J. R. Presnell, M. W. Akin, E. Cummins, J. M. and Liu O.C. 1966.** Accumulation and elimination of Poliovirus by the eastern oyster. *Amer.J. epid.*84: 40-50.
- [6]: **Gaillot, D. Terver, D. Finance, C. and Schwartzbrod, L. 1988.** Improved method for contamination of mussels by Poliovirus. *Int.J. food Microbiol.* 6, 333-339.
- [7]: **Landry, E. F. Vaughn, J. M. Vical, T; J. and Mann, R. 1982.** Inefficient accumulation of low levels of monodispersed and feces-associated Poliovirus in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1362-1369.
- [8]: **Di Grolamo, R. Liston, J. and Mathches, J. 1975.** Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. *Appl. Environ. Microbiol.*29:260-264.
- [9]: **Metcalf, T. G. Mullin, B. Eckerson, D. Moulton, E. and Larkin, E. P. 1979.** Bioaccumulation and depuration of Enter viruses by the self shelled clam, *Mya arenaria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:275-282.
- [10]: **Baron, D. 1986.** Etude des problemes méthodologiques posés par la mise en evidence d'une conatamination virale des coquillages comestibles, cas de l'hûître. *Rap. Minist. Environnement*, n°85166, PARIS.
- [11]: **Bedford, A. J. Williams, G. and Bellamy, A. R. 1978.** virus accumulation by the rock oyster *Crassostrea glomeration*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 1012-1018.
- [12]: **Metcalf, T. G. Moulton, E. and Eckerson, D. 1980b.** Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:141-152.
- [13]: **Schwab, K.J. Neil, F.H. Estes, M. K. Metcalf, T.G. and Atmar, R.L. 1998.** Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. food Prot.*61:1674-1680.

- [14]: **Sugieda, M. Nakjima, S. 1996.** Outbreaks of Norwalk-like virus associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiol. Infect.* 116: 339-346.
- [15]: **Atmar, R.L., Neil, F.H., Romald, J.L.1995.** Detection of Norwalk virus and Hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3014-3018.
- [16] : **Myrmel, M., Berg, E.M., Rimstad, E. and B. Grinde. 2004.** Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl. Environ. Microbiol* 70: 2678-268
- [17] : **Nishida, T., Kimura, H., Saitoh, M., Shinohara, M., Kato, M., Fukuda, S., Munemura, T., Mikami, T., Kawamoto, A., Akiyama, M., Kato, Y., Nishi, K., Kozawa, K. and O. Nishio. 2003.** Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5782-5786.
- [18]: **Formiga-Cruz, M. Tofino-Quesada, G. Bofill-Mas, S. Lees, D.N. Henshilwood, K. Allard, A.K. Conden-Hansson, A.C. Hernroth, B.E. Vantarakis, A. Tsibouxi, A. Papapetropoulou, M.D. et Girones, R.2002.** Distribution of human Virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden and the United Kingdom; *Appl. Environ. Microbiol.*; 68 (12) 5990-5998.
- [19] : **Beuret, C., Baumgartner, A. and J. Schlupe. 2003.** Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2292-2297.
- [20] : **Le Guyader, F. Dubois, E. Menard, D. Pommepuy, M.Haugarreau, L. Miossec, L.2000.** Three year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*66:3241-3248.
- [21]: **Shieh C., Y. Ralph B., S. Woods Jacqueline, W. et Kevin C., R.2003.** molecular surveillance of enterovirus and Norwalk-like virus in oyster relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Appl. Environ. Microbiol.*;69 (12):7130-7136.
- [22] **Kingsley, D.H., Meade, G.K. and G.P. Richards. 2002.** Detection of both hepatitis A virus and Norwalk-like virus in imported clams associated with food-borne illness. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3914-3918.
- [23] **Mullendore, J.L., Sobsey, M.D. and Y.S.C. Shieh. 2001.** Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. *J. Virol. Meth.* **94**: 25-35.
- [24] **Di Pinto, A., Forte, V.T., Tantillo, G.M., Terio, V. and C. Buonavoglia. 2003.** Detection of hepatitis A virus in shellfish (*Mytilus galloprovincialis*) with RT-PCR. *J. Food Prot.* **66**: 1681-1685.

- [25] Casas, N. and E. Sunen. 2001. Detection of enterovirus and hepatitis A virus RNA in mussels (*Mytilus* spp.) by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 90: 89-95.
- [26]: Croci L., Losio MN., Suffredini E, Pavoni E., Di Pasquale S., Fallacara F. and Arcangeli G. 2007. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. *Int. J. Food Microbiol.* 114(2): 252-257.
- [27] Muniain-Mujika, I., Calvo, M., Lucena, F. and R. Girones. 2003. Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 75-85.
- [28]: Sunen, E., Casas, N., Moreno, B. and C. Zigorraga. 2004. Comparison of two methods for the detection of hepatitis A virus in clam samples (*Tapes* spp.) by reverse transcription-nested PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 147-154.
- [29]: Mattheews, R.E. 1982. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology.* 17: 1-199.
- [30]: Melnick JL. 1992. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine.* 10 (1): S24-6.
- [31]: Pozzetto B. 1997. Entérovirus et virus de l'hépatite A. virologie moléculaire médicale, collection Génie Génétique 2. Tec et Doc Lavoisier et Edition Médicales Internationnales, Paris : p.287-297.
- [32] : Debord.T, Buisson Y. 1998. Les hépatites virales d'origine entérique. *Bull. Soc. Pach. Ex.* 91: 428-431.
- [33]: Hollinger F. E., Ticehurst J.R. 1996. Hepatitis A virus. In: fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. et al, ed. *Fields Virology, and Third Edition.* Lippincott-Raven, Philadelphia: 735-782.
- [34]: Nüesch J.P.F., Weitz M., Siegel G. 1993. Proteins specifically binding to the 3' untranslated region of hepatitis A virus RNA in persistently infected cells. *Arch Virol;* 128: 65-79.
- [35]: Blaine Hollinger F, and. S. U. E. 2001. Hepatitis A. P799-840.
- [36]: Jacobsen KH, Kopman JS. 2004. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol Infect;* 132: 1005-22.
- [37]: Cuthbert JA. 2001. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev.* 14 (1) : 38-58.
- [38]: Wheeler C, Vogt TM, Armstrong GL, Vaughan G, Weltman A, Nainan OV, et al. 2005. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *N Engl J Med;* 353:890.
- [39]: Fiore AE. 2004. Hepatitis A transmitted by food. *Clin Infect Disp;* 38: 705-715.

- [40]: **Goodman RA. 1985.** Nosocomial hepatitis A. *Ann Intern Med*; 103: 452-454.
- [41]: **Garraud O, Conductier R, Odent- Malaure M, Carrieres J, Chopart P, Brenas et al. 2004.** Silent transfusion- transmitted hepatitis A virus infection in an infant. *Transfusion*; 44: 1121-2.
- [42]: **Mannucci PM, Gdovin S, Gringeri A, Colombo M, Mele A, Schinania N, et al. 1994.** Transmission of hepatitis A to patients with haemophilia by factor VIII concentrates treated with organic solvent and detergent to inactivate viruses. The Collaborative Group. *Ann Intern Med*; 120: 1-7.
- [43]: **Grinder B, Stene-Johansen K, Sharma B, Hoel T, Jensenius M, Skaug K. 1997.** Characterisation of an epidemic of hepatitis A virus involving intravenous drug abusers- infection by needle sharing? *J Med Virol*; 53:69-75.
- [44]: **Henning KJ, Bell E, Braun J, Barker ND. 1995.** A community-wide outbreak of hepatitis A: risk factors for infection among homosexual and bisexual men. *Is J Med*; 99:132-6.
- [45]: **Buisson. Y, V Cuyck-Grndre. H.1994.** Le diagnostic des hépatites virales transmises par voie féco-orale. *Méd Mal Inféct* ; 24 ; 604-9.
- [46] : **Buisson. Y, Teyssou.R.1995.** Les virus des hépatites à transmission féco-orale. *Med Trop*; 55 :305-312.
- [47] : **Schwartzbrod L, 1992.** Mollusques bivalves et santé publique, du risque à la prévention. Edition Ecole Nationale de la Santé Publique.
- [48] : **Jamet. J. 1992.** Les mollusques bivalves comme denrée animale, pp 29-35 In Lensen, J. (Ed) mollusques bivalves et santé publique du risqué à la prévention. Ecole Nationale de santé publique. Rennes.
- [49]: **pallary, P.1921.**Histoire de la moule d’Afrique. *Bulletin de la société et d’histoire.*
- [50] : **Ricci, E. 1955.** Essai sur la myticulture en Tunisie. *Bull. Sta. Oceanogr. Salambo*, 39-46, pp 25.
- [51]: **Lubet, P. Gimazane, J.P.Pruns, G. 1981.** Etude de cycle de reproduction de *Mytilus galloprovincialis* (LMK). Mollusque Lamellibranche à la limite de son aire de répartition comparaison avec les autres secteurs de cette aire. *Haliotis*, 157-170, pp11.
- [52]: **Lewis G.D et Metcalf T.G.1988.** polyethylene glycol percipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A virus and human rotavirus, from oysters, water and sediment samples. *Appl. Environ. Microbial.* 54.
- [53]: **Jaykus L.A. DE léon R et Sobsey M.D.1996.** A virion concentration oligoprobe hybridation. *App. Environ. Microbiol.*62 :2074-2080.

- [54] : **Bosh, A. Sanchez, G. Pinto, R.M .Abad, F.X. Pommepuy, M and Le guayder, F.2003.** method for virus detection in molluses : validation and standardisation. Molluscan shellfish safety, Edts Villalba et al.app. 333-340.
- [55]: **Stetler, R.E Moris, M.E. et Saffermann, R.S.1992.** processing procedures for recovering enteric viruses from wastewater studdes. J. virol. Methods. 40:67-76.
- [56]:**Schab, K.J. De léon, R. et Sobsey, M.D.1995.** concentration and purification of beef extrat mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A and Norwalk virus by reverse Transcription PCR. App. Environ. Microbial.61:531-537.
- [57]: **Atmar, R.L. Metcalf, T.G. Neil, F.H. et Estes, M.K.1993.** detection of enteric viruses in oyster by using the polymerase chain reaction. Appl. Microbial.59:631-635.
- [58]: **Jaykus, L.A. De léon, R. et Sobsey, M.D.1993.** application of RT-PCR for the detection of enteric viruses in oyster. Water. Sci. technol.27:49-53.
- [59]: **Hafliger, D. Gilgen, M. Luthy, J. et Hubner, P.1997.** Semi nested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in sea food. Int. j. food. Microbial.37:27-36.
- [60]: **Cromeans, T.L. Nainan, O.V. et Margolis S.H. 1997.** detection of hepatitis A virus in oyster meat. Appl. Env. Microbial.63:2460-2463.
- [61]: **Lees, D.2000.** viruses and bivalve shellfish. Inter. J. food; 59:81-116.
- [62]: **Sobsey, M.D. Battigelli, D.A. Shin, G.A. Newland, S.1998.** RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and waste water. Wat. Sci. tech.38:91-94.
- [63]: **Le Guyader, F. Dubois, E. Menard, D. Pommepuy, M.1994.** detection of hepatitis A virus, rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription seminested PCR. Appl. Environ. Microbial;60:3665-3671.
- [64]: **Deloince, R. Levèque, F. Grance, J.M. et Trepo, C.1994.** epidémiologie de l'hépatite virale A. gastroenterol. Clin. Biol. 18 :354-361.
- [65] : **Marion, K. et Erwin, D.2004.** food borne viruses : an emerging problem ; 90(1) 23-41.

Annexes

Préparation des réactifs utilisés selon les techniques T₁ et T₂

1. Tampon ₁ : Extrait de bœuf 3%

Réactifs	Quantité en (g)
Extrait de bœuf	3
Eau purifiés stérile	Qsp 100 ml
Agitation magnétique, Autoclave pendant 20 min.	

2. Tampon ₂ : Glycine 0,2 M- 0,15 M NaCL, pH 9,5

Réactifs	Quantité en (g)
Glycine	15,02
NaCL	8,766
Eau purifié stérile	Qsp 1 L
Agitation magnétique, Ajustement du pH à 9,5 avec une solution NaOH 5 M, Autoclave pendant 20 min.	

3. PBS : Phosphate Buffer Saline (pH 7,2)

Réactifs	Quantité en (g)
Chlorure de sodium (Na CL)	8
Chlorure de potassium (KCL)	0,2
Orthophosphate di-sodium (Na ₂ HPOH)	1,44
Orthophosphate de potassium (RH ₂ PO ₄)	0,24
Eau distillée	800 ml
Ajustement de pH à 7,2 avec du HCL	
Eau distillée	Qsp 1000 ml
Autoclave pendant 20 min	

4. Tampon de reconstitution de la protéinase K (PK)

Réactifs	Volume
0,04 M Tris-HCL pH 7,5	2 ml (solution mère 2 M)
0,02 M Na ₂ -EDTA	4 ml (solution mère 0,5 M)
2% SDS	20 ml (solution mère 10%)
Eau ultra-pure stérile	Qsp 100 ml
Pas d'autoclave	

5. Acétate de sodium 3 M, pH 5,5

Réactifs	Quantité
C ₂ H ₃ O ₂ Na	40,82
Eau distillée	Qsp 100 ml
Ajuster de pH à 5,5 avec HCL	
Autoclave pendant 20 min.	

6. TBE 10x, pH 8,3

Réactifs	Quantité
Tris base	108
Acide Borique	56
EDTA (0,5 M, pH 8)	20 ml
Eau distillée stérile	Qsp 1 L
Filtration pour prévenir la précipitation	

7. Solution de dépôt

On mélange 0.3 % de bleu de bromophénol ; 0.3 % de xylène cyanol, 36% glycérol

Nom et Prénom : ZITOUNI Moncef

Titre : Détection de virus de l'hépatite A dans les coquillages en Tunisie

Résumé :

Ce projet de fin d'études s'est développé selon deux axes : le choix d'une méthode d'extraction et de concentration du virus de l'hépatite A en testant deux techniques T1 et T2 décrites dans la littérature et l'évaluation des rendements de ces deux techniques. Notre travail a porté sur 23 échantillons de mollusques bivalves prélevés à partir des sites de productions Tunisiens. Sur les deux techniques testées T1 et T2, La technique T2 à base de glycine uniquement affiche le rendement le plus élevé. L'amplification enzymatique en chaîne précédée par la réverse transcription est la méthode de détection choisie dans cette étude. Les résultats de la détection moléculaire des virus de l'hépatite A par RT-Nested PCR ont montré qu'environ 8,6% des échantillons sont contaminés.

Mots clefs : virus de l'hépatite A, mollusques bivalves, réverse transcription, PCR, contamination alimentaire

Title: Detection of hepatitis A in shellfish in Tunisia

Abstract:

Our study was aimed at developing a method of extraction and concentration of hepatitis A. We used two methods T1 and T2 described previously in the literature. 23 samples shellfish from different area of Tunisia were included in this study. Technique T2 based only on glycine revealed the highest yield. The reverse transcription followed by polymerase chain reaction was performed in this study in order to investigate HAV in our samples. The results of molecular analyses of shellfish showed that 8.6% of the samples were contaminated.

Keywords: hepatitis A virus, shellfish, reverse transcription, PCR, Food contamination

العنوان : عزل فيروس إيباتيت "أ" عند غلال البحر في تونس

ملخص:

تضمنت دراستنا اختيار طريقة خاصة لعزل فيروس إيباتيت "أ" في غلال البحر بواسطة تقنيتين وقع استعمالهما في أبحاث منشورة سابقا. و قد قمنا باخذ 23 عينة من غلال البحر من مختلف المناطق المنتجة لها بتونس. كما اجرينا اختبارات جزئية باستعمال تقنية RT-Nested PCR للبحث عن هذا الفيروس و قد اظهرت النتائج وجوده بنسبة 8.6% من مجموع العينات.

الكلمات المفاتيح:

فيروس الالتهاب الكبدي أ، غلال البحر، التلوث الغذائي، بيولوجيا جزئية