

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE DE TUNISIE

Département des Ressources Animales, Halieutiques
&
des Technologies Agro-alimentaires

MASTERE EN SCIENCES ET TECHNOLOGIE DES ALIMENTS Option : Qualité et Sciences des Aliments

**Optimisation d'une méthode de détection du virus de l'hépatite A
dans les coquillages et étude de l'effet des radiations gamma sur le
génom viral**

Élaborée par : AMRI Islem

Soutenu le 1^{er} Novembre 2008

JURY

Mr: ROMDHANE Mouhamed Salah
Mr. MAAROUFI Abderrazek
Mr. SLIM Amine
Mme. HMAIED Fatma :

Président
Membre
Membre
Encadreur

Mémoire réalisée au Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire au Centre
National des Sciences et Technologies Nucléaires(CNSTN)

2007/2008

REMERCIEMENTS

Monsieur TRABELSI Adel, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, Directeur du Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires. Je le remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail au CNSTN.

Madame HMAIED Fatma, Maître-assistante au Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires. Promotrice de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance pour sa disponibilité, ses conseils et ses critiques pertinentes qui m'ont permis de mener à terme ce travail.

Madame BARKALLAH Insaf, chef d'unité de Microbiologie et Biologie Moléculaire au Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires et Monsieur SAIDI Mouldi, Maître de conférences au CNSTN, sous directeur de la recherche environnement et vie. Je les remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de leur unité.

Mr. ROMDHANE Mouhamed Salah, Professeur à l'INAT (Institut National Agronomique de Tunisie). Je le remercie de me faire l'honneur d'avoir accepté de présider le jury de ce Mastère.

Monsieur MAAROUFI Abderrazek, Maître de Conférences à l'Institut Pasteur de Tunis. Je le remercie de me faire l'honneur de juger ce travail.

Monsieur SLIM Amine, Professeur en médecine au laboratoire de Virologie du CHU Charles Nicoles de Tunis et à la faculté de médecine de Tunis. Je le remercie pour l'intérêt constant qu'il a manifesté. Je le remercie également de me faire l'honneur de juger ce travail.

Mr. MEJRI Slah, coordinateur du mastère Sciences et Technologie des aliments. Je le remercie pour sa gentillesse et sa disponibilité lors de ce mastère.

Madame LOISY Fabienne, Directrice scientifique du CEERAM et LEBEAU Benoit, Président Directeur Général du CEERAM . Je les remercie pour leur gentillesse et leur aide.

Aux membres de l'Unité de radiotraitement au Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires. Je les remercie pour leur gentillesse et leur disponibilité, lors de l'irradiation. Je suis particulièrement reconnaissante à Messieurs, KARAIEM Mokthar, BEN BETAIEB Nassreddine et TRABELSI Zied.

Aux membres de l'Unité de Microbiologie et biologie Moléculaire au Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires. Nous les remercions pour leur aide et leur chaleur amicale. Je suis particulièrement reconnaissante à BEN MILOUD Nejla, DRISS Rim, DHIB Soukeina, CHAIBOUNI Ines, Helel Salma, LAZIM Hadeer, MEZHOUH Karim, SGHAIER Haithem, SLAMA Nedra et MANKAI Houda.

Aux membres du laboratoire des denrées alimentaires de l'IRVT. Nous les remercions pour leur aide et leur chaleur amicale.

Je ne saurais oublier de remercier Monsieur BEN CHERIFA Hichem directeur de la Société Tunisie Lagune de nous avoir facilité la collection des échantillons.

Je tiens également à remercier Monsieur BEN MASOUD Taieb, Chef service du laboratoire de biochimie de l'hôpital d'enfants de Tunis et Omar pour leur aide.

Sans oublier de remercier tout le personnel du CNSTN.

DEDICACES

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle d'amour et d'altruisme. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour. Je ne saurais jamais les remercier pour tous leurs sacrifices sans lesquels je ne serai jamais parvenue à réaliser tant de succès

A mes très chers frères Amen et Nefaa et leurs fiancées Mouna et Rim

A mes chères amies

A tous les membres des familles AMRI, MBARKI et KHMIRI

A la mémoire de ma chère grand-mère

A toute la famille BESBES

A toutes les personnes qui ont su me témoigner leur amour et leur soutien aux moments difficiles

Je dédie cette mémoire de mastère

Liste des Tableaux et des Figures

➤ Figures

Figure 1 : Diffusion des virus entériques dans l'environnement et en milieu industriel.

Figure 2: Observation en microscopie électronique des particules du VHA.

Figure 3: Représentation schématique du génome du virus de l'hépatite A.

Figure 4: Evolution des marqueurs clinico-biologiques au cours de l'hépatite A.

Figure 5 : Schéma de désintégration du cobalt 60.

Figure 6 : Radiolyse de l'eau.

Figure 7 : La source radioactive Cobalt 60 du CNSTN.

Figure 8: Les différentes positions de la source.

Figure 9 : Analyse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par RT-Nested-PCR des ARN extraits des coquillages par la technique E1 (a) et la technique E2 (b).

Figure 10 : Analyse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par RT-Nested-PCR des produits d'amplification des ARN extraits des coquillages.

Figure 11 : Taux de contamination par le VHA selon l'espèce de mollusques bivalves.

Figure 12 : Analyse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par RT-Nested-PCR des produits d'amplification des ARN extraits des chairs irradiées des coquillages.

➤ Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques génomiques de la souche VHA HM-175.

Tableau 2 : Les échantillons de mollusques bivalves analysés.

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

Tableau 4 : Composition du milieu réactionnel pour la synthèse de l'ADN complémentaire.

Tableau 5 : Composition du milieu réactionnel pour la 1^{ère} PCR.

Tableau 6 : Composition du milieu réactionnel pour la 2^{ème} PCR.

Tableau 7 : Taux de détection par RT-PCR du VHA par les 2 techniques E1 et E2.

Tableau 8: Taux de détection par RT-Nested-PCR du VHA par les 2 techniques S et K.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des résultats de détection des virus de l'hépatite A dans les coquillages par RT-PCR.

Tableau 10: Fréquence de détection par zone de production des VHA recherchés dans les échantillons de mollusques bivalves collectés.

Tableau 11 : Recherche des Salmonelles et d'*E.coli* dans les coquillages contaminés par le VHA.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMV :	Avian Myoblastosis virus
ARN :	Acide ribonucléique
BET :	Bromure d'éthidium
dNTP :	désoxyribonucléosides triphosphate
EDTA :	Ethylene diamine tetra acetic acid
h :	heure
IFREMER :	Institut Français de Recherche et de l'Exploitation de la Mer
Kb :	Kilo base
Kev :	Kilo électron Volt
kGy :	kilogray
M :	Molaire
MeV :	Million électron Volt
mg :	milligramme
min :	minute
ml :	millilitre
mM :	milli molaire
NCR :	non coding region
pb :	paire de base
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCR:	Polymerase chain reaction
PEG :	Polyéthylène Glycol
PFU :	Plaque Forming Unit
pH :	potentiel d'hydrogène
Qsp :	Quantité suffisante pour
RT :	Reverse Transcription
RNase :	Ribonuclease
rpm :	rotation par minute
SRSV :	Small Round Structured Viruses
s :	Seconde
Taq :	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE :	Tris Borate EDTA
TIAC:	Toxi-infections Alimentaire Collective
U :	Unité
UV :	Rayons ultraviolets
UTR :	Untranslated Region
V :	Volt.
VP :	Viral Protein
VHA :	Virus de l'hépatite A
VHE :	Virus de l'hépatite E
µg :	Microgramme
µl :	Microlitre
µM :	Micromolaire
°C :	Degré Celsius

SOMMAIRE

Introduction	1
A- Contamination des mollusques bivalves par les virus entériques	3
B- Caractéristiques générales du virus de l'hépatite A	5
I- Classification	5
II- Morphologie et structure	5
II-1 Organisation génomique	6
II-2 Protéines du VHA	8
III- Propriétés physico-chimiques	8
IV- Épidémiologie et modes de transmission	9
IV-1 Modes de transmission	9
IV-1-1 Transmission féco-orale	9
IV-1-2 Transmission nosocomiale	9
IV-1-3 Transmission parentérale	9
IV-2 Répartition géographique	10
V- Infection par le virus de l'hépatite A	11
V-1 Signes cliniques	11
V-2 Physiopathogénèse	11
VI- Diagnostic virologique	12
VI-1 Diagnostic direct	12
VI-2 Diagnostic indirect	12
VII- Prévention et traitement	12
C- Détection du virus de l'hépatite A dans les mollusques bivalves	12
I- Extraction	13
II- RT-PCR	14
D- Les rayonnements ionisants	14
I- Les rayonnements directement ionisants	14
II- Les rayonnements indirectement ionisants	15
II-1 Rayons gamma	15
III- Doses d'irradiations absorbées	16
VI- Effets de l'ionisation sur le milieu	16
VI-1 Effets chimiques ; la radiolyse de l'eau	16
VI-2 Effets biologiques de l'ionisation	17
VI-2-1 Effet sur les acides nucléiques	17
VI-2-2 Effet sur les protéines, les glucides et les lipides	18
VI-2-3 Effet sur les microorganismes	18
V- Applications industrielles de l'irradiation	19
Matériel et Méthodes	
A- Matériel	20
I- Mollusques bivalves	20
II- Selles	20
III- Source d'irradiation	20
B- Méthodes	22
I- Méthodologie d'extraction du virus de l'hépatite A à partir des échantillons de mollusques bivalves	22
I-1 Préparation des échantillons de mollusques bivalves	22
I-2 Extraction et concentration des virus	22
I-2-1 Principe	22
I-2-2 Protocole expérimental	22
I-2-2 a\ Extraction des virus	22

I-2-2 b\ Concentration des virus	23
I-2-2 c\ Décontamination des concentrats	23
II- Extraction et purification de l'ARN viral à partir des échantillons de mollusques bivalves et des selles	24
II-1 Extraction et purification de l'ARN viral partir des échantillons de mollusques bivalves	24
II-1-1 Extraction par une méthode Chimique	24
II-1-1-1 Principe	24
II-1-1-2 Protocole expérimental	24
II-1-2 Extraction par le Kit PureLink Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen)	25
II-1-2-1 Principe	25
II-1-2-2 Protocole expérimental	25
II-2 Extraction et purification de l'ARN viral à partir des selles par le Kit QIAmp Viral RNA (Qiagen)	26
II-2-1 Principe	26
II-2-2 Protocole expérimental	26
III- Détection des génomes viraux par RT-Nested-PCR	27
III-1 Principe de RT-PCR	27
III-2 Protocole expérimental	27
III-2-1 Choix des amorces	27
III-2-2 Synthèse de l'ADN complémentaire	28
III-2-3 Nested PCR	28
IV- Visualisation des produits amplifiés	30
IV-1 Principe	30
IV-2 Protocole expérimental	30
V- Recherche de Salmonelles <i>et d' E.coli</i> dans les échantillons de coquillages contaminés par le virus de l'hépatite A	30
V-1 Recherche des Salmonelles	30
V-2 Recherche d' <i>E.coli</i>	31
VI- Contamination artificielle et exposition à l'irradiation gamma	32
Résultats	
A- Recherche du VHA dans des coquillages Tunisiens	33
I- Choix d'une technique d'extraction et de concentration des virus	33
II- Choix d'une technique d'extraction et de purification de l'ARN viral	35
III- Evaluation de la contamination virale dans les échantillons de coquillages	36
IV- Evaluation de la contamination bactérienne dans les échantillons de coquillages révélés contaminés par le VHA	39
B- Etude de l'effet des radiations gamma sur le génome viral du VHA	40
Discussion	
A- Recherche du VHA dans des coquillages Tunisiens	42
I- Choix d'une technique d'extraction et de concentration des virus	43
II- Choix d'une technique d'extraction et de purification de l'ARN viral	44
III- Evaluation de la contamination virale dans les échantillons de coquillages	47
IV- Recherche d'une corrélation entre la contamination bactérienne et virale dans les coquillages	49
B- Etude de l'effet des radiations gamma sur le génome viral du VHA	50
Conclusion	52
Références Bibliographiques	54

INTRODUCTION

La sécurité sanitaire des aliments est un problème important de santé publique. Cette sécurité ne concerne pas seulement les réglementations ou les bonnes pratiques d'hygiène mais également les conditions dans lesquelles la population consomme les aliments. Parmi les éléments importants qui intéressent la sécurité sanitaire des aliments, on trouve la qualité microbiologique des produits. Les professionnels de l'agro-alimentaire ont été souvent sensibilisés aux risques d'apparition de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) suite à la consommation de produits contaminés par des germes bactériens pathogènes ou des parasites. En effet, Au sein des industries, des mesures permettant de garantir la qualité sanitaire des aliments mis sur le marché ont d'ailleurs été mises en place depuis un certain nombre d'années (optimisation des barèmes des traitements technologiques, formation du personnel à l'hygiène et à la sécurité, plan HACCP...). Toutefois, la problématique virale en agroalimentaire a été pendant longtemps sous-estimée. Le rôle des aliments dans la transmission des infections virales est une notion récente. Les principaux virus humains susceptibles de contaminer les aliments sont les virus nus, capables de résister dans l'environnement et donc essentiellement les virus présentant un cycle de multiplication entérique. Ces virus, excrétés dans les fèces de malades ou de porteurs sains, sont très nombreux et appartiennent à plusieurs familles virales. Parmi eux, le virus de l'hépatite A et les norovirus qui sont épidémiologiquement les plus significatifs.

Les mollusques bivalves sont des denrées alimentaires consommées dans le monde entier et dotées d'une valeur nutritionnelle et diététique intéressante. Ces mollusques faisant l'objet d'une exploitation de pêche ou d'aquaculture représentent en Tunisie une richesse dont les enjeux économiques sont importants. Cependant, 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 gastroentérites ou des hépatites A et une menace pour le secteur conchylicole. Commercialisés à l'état vivant, ces coquillages peuvent constituer un réservoir de souches virales suite à leur consommation. En Tunisie, à partir de 1995, un programme de la surveillance et d'inspection des zones de production des mollusques bivalves est installé. Il

est basé sur 3 types de surveillance périodique : le réseau de surveillance microbiologique (REMI), de phytoplancton marin et de biotoxine (REPHY) et des contaminants chimiques nocifs (RECNO). Le réseau de surveillance microbiologique est tenu de contrôler régulièrement la contamination bactérienne des coquillages destinés à la consommation humaine pendant la période de production et avant leur mise sur le marché. Cette surveillance est basée exclusivement sur les indicateurs bactériens de contamination fécale principalement *Escherchia coli* et les entérocoques fécaux, bactéries témoins de contamination fécale. Cependant, ces indicateurs, faiblement corrélés à la présence de microorganismes pathogènes, révèlent leurs limites en matière de prévention du risque sanitaire. Ainsi, le recours aux méthodes sensibles s'avère nécessaire pour détecter les virus entériques.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés en premier lieu à la recherche du virus de l'hépatite A (VHA) dans les coquillages Tunisiens collectés à partir de différentes zones de production et sur les cotes de Tabarka. Nous avons procédé à la comparaison de deux méthodes d'extraction et de concentration des VHA quant à leur capacité de détection par RT-Nested-PCR. De plus, une évaluation d'un kit d'extraction des acides nucléiques par comparaison à une méthode chimique décrite dans la littérature a été effectuée. Par la suite, nous avons adopté les techniques d'extraction des virus et des ARN viraux les plus efficaces pour la recherche du VHA dans les échantillons des mollusques bivalves d'origine tunisienne prélevés en milieu naturel et dans des zones de production avant l'étape de purification. En outre, nous avons étudié l'effet de l'irradiation gamma sur le génome viral.

Nous exposerons dans ce travail une revue des données bibliographiques portant sur la contamination des mollusques bivalves par les virus entériques et sur le virus de l'hépatite A. Les effets des radiations gamma ont été également étudiés dans cette revue bibliographique. Nous développerons dans la première partie de cette étude, les résultats et les commentaires concernant le choix d'une méthode d'extraction et de concentration virale et l'évaluation de la pertinence d'un kit commercial pour la recherche du VHA dans des coquillages Tunisiens. Dans la deuxième partie, nous présenterons et nous commenterons les résultats de l'effet des radiations gamma sur le génome viral. Enfin, une conclusion du travail est proposée.

A- Contamination des mollusques bivalves par les virus entériques :

Les mollusques bivalves sont des denrées alimentaires consommées dans le monde entier. Ils sont dotés d'une valeur nutritionnelle et diététique intéressante, souvent vantée car leur chair est particulièrement riche en protéines (10 g de protéines par 100 g de chair), en glucides tels que les polysaccharides (6 g par 100 g 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 (Jamet, 1992). Ces mollusques filtrent l'eau et concentrent les microorganismes et les toxines ; les risques sont multiples : bactéries, virus entériques et biotoxines produites par le phytoplancton. En effet, la consommation des coquillages constitue le principal moyen de transmission des virus entériques à l'homme (Desenclos et al., 1991). Ces virus sont très nombreux et appartiennent à plusieurs familles virales. Ils peuvent être classés en trois catégories:

- les virus qui provoquent des gastro-entérites : astrovirus, rotavirus, adénovirus entériques, calicivirus (virus *Norwalk-like* ou norovirus et *Saporo-like*) ;
- les virus des hépatites à transmission féco-orale : virus des hépatites A (VHA) et E (VHE);
- les virus provoquant d'autres pathologies comme les entérovirus (méningites, atteinte cardiaque, paralysie).

Cependant, seuls les norovirus et le virus de l'hépatite A ont été clairement impliqués dans la provocation d'épidémies après consommation de mollusques bivalves (Desenclos et al., 1991 ; Le Guyader et al., 1996 ; Sugieda et al., 1996) et après baignade (Mahoney et al., 1992).

De part leur tropisme pour les cellules de la muqueuse intestinale, les virus entériques sont retrouvés en forte quantité dans les selles des individus infectés (10^3 à 10^{10} particules virales/gramme de selles) (Metcalf et al., 1995). Ce haut niveau d'excrétion associé à leur remarquable capacité de persistance dans l'environnement permet une diffusion large de ces virus qui sont rapidement retrouvés dans les eaux de ruissellement, ainsi que dans les eaux usées et les décharges solides associées aux activités humaines. La contamination résultante des eaux de surface ou souterraines va entraîner une contamination des mollusques bivalves filtreurs, des produits agricoles irrigués ou encore des eaux potables récréatives, autant de voies de contamination potentielles pour l'homme qui, une fois infecté, va amplifier le phénomène en excréant de nouveau des virus infectieux en quantité importante (figure 1).

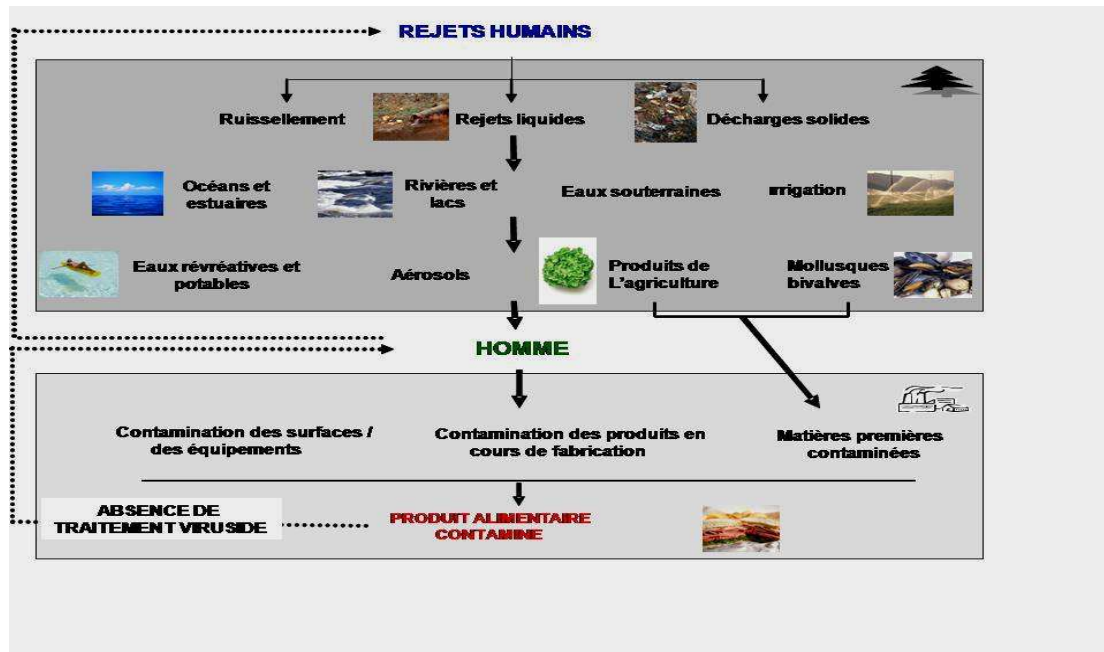


Figure 1 : Diffusion des virus entériques dans l'environnement et en milieu industriel (adapté de Metcalf et al., 1995).

Bien que les filières de traitement des eaux usées urbaines permettent de réduire très nettement la pollution carbonée, azotée et phosphorée, les procédés de désinfection ne sont pas aussi bien maîtrisés et sont relativement peu efficaces vis-à-vis des microorganismes. Selon le type de procédé d'épuration, l'abattement des teneurs en microorganismes est plus ou moins important. Il est pour les virus de 10^1 à 10^2 pour un traitement par boue activée et de 10^2 à 10^4 dans le cas d'un lagunage (Courtois, 1993). Un traitement tertiaire de désinfection (chloration, ozonation, rayons ultraviolets, ultrafiltration ou lagunage tertiaire) peut être lié en place pour assurer un meilleur abattement de la teneur en microorganismes. L'efficacité de ce traitement a été démontrée pour certains virus (Lazarova et al. 1999). Certaines espèces sont difficilement inactivées et les coûts d'investissement et d'exploitation de ces procédés sont souvent très élevés (Gerba et al., 2002). Ces virus sont alors retrouvés dans le milieu hydrique après rejet en mer et/ou rivières d'eaux usées peu ou pas assainies.

Ainsi, les virus entériques rejetés dans le milieu hydrique sont fortement dilués et s'adsorbent sur les particules organiques ou minérales en suspension, formant ainsi des agrégats qui sédimentent sous l'effet de leur poids. Les quantités de virus retrouvés dans les sédiments sont importantes puisqu'elles atteignent souvent 10^2 à 10^3 particules par gramme (Crenn et al., 1999). La couche sédimentaire est très facilement remise en suspension par des marées, tempêtes ou des opérations de dragage et peut éventuellement contaminer les

coquillages à proximité (Crenn et al., 1999). Les microorganismes associés à des particules ou des fèces sont à leur tour absorbés par les bivalves (Le Saux et al., 2003). La présence des virus entériques a été rapportée à de nombreuses reprises dans la chair des bivalves (Schwartzbrod, 1995 ; Lipp et Rose, 1997).

Les virus sont susceptibles de s'adsorber à différents niveaux d'organes des bivalves (muqueuses du tube digestif, hépatopancréas, branchies, tissus périphériques-manteau, muscles...) (Cliver et al., 1983) avec une localisation préférentielle au niveau de l'estomac et de l'hépatopancréas (Romalde et al., 1994). Le facteur de concentration est favorisé du fait de la tendance des particules virales à s'adsorber ou s'agréger entre elles. Dans les coquillages, il est plusieurs dizaines de fois supérieur à celui du pathogène dans l'eau environnante. De plus, les liaisons ioniques entre les particules virales et les polysaccharides du mucus des coquillages peuvent provoquer une hyper-accumulation des virus (Le Saux et al., 2003). Ainsi, les mollusques bivalves sont susceptibles non seulement de retenir mais aussi d'accumuler des virus. Cette bio-accumulation est un phénomène très rapide (Mitchell et al., 1966). Il a été prouvé que les virus entériques adsorbés par les bivalves étaient susceptibles d'être rejetés dans le milieu hydrique et qu'il existe un véritable cycle de bioaccumulation-relargage (Landry et al., 1982 ; Gaillot et al., 1988). Enfin, des brassages secondaires peuvent les transporter loin de leur lieu de rejet (plus de 5Km) (Desenclos, 1996).

B- Caractéristiques générales du virus de l'hépatite A :

I- Classification :

Le VHA appartient à la famille des *Picornaviridae* qui comprend cinq genres 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. Il n'existe qu'un seul sérotype de VHA chez l'homme (Lemon et Binn, 1983 ; Lemon et al., 1987). Ce virus comprend 6 génotypes (Lu et al., 2004).

II- Morphologie et structure :

En microscopie électronique, le VHA se présente sous forme de particules sphériques non enveloppées de 27 à 32 nm de diamètre, avec une capsidie à symétrie cubique constituée de 32 sous unités ou capsomère (figure 2). Chaque capsomère est constitué de quatre protéines virales : VP1, VP2, VP3 et VP4. Le génome viral est une molécule d'ARN linéaire et monocaténaire de polarité positive d'environ 7.5 Kb (Melnick., 1992 ; Debord et al., 1998).

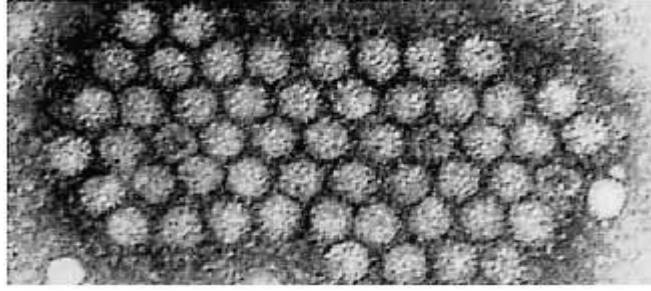


Figure 2: Observation en microscopie électronique des particules du VHA (Locarnini et al. 1974).

II-1 Organisation génomique :

Le génome du VHA, comme celui des autres *Picornavirus*, peut être schématiquement divisé en trois régions (figure 3 et tableau 1). A l'extrémité 5' se trouve une région non codante appelée 5'NCR (Non Coding Region) ou 5'UTR (Untranslated Region) de 735 nucléotides à laquelle est fixée une protéine VPg. Cette région est la plus conservée du génome viral (Cianciara, 2000). Ainsi, l'amplification par RT-PCR de cette région peut être utilisée pour la détection des différentes souches de VHA (Brown et al., 1991). Les mutations au niveau de la région 5'NCR facilitent l'adaptation du VHA en culture des cellules (Emerson et al., 1992 ; Funkhouser et al., 1994). Mais, elles ne sont pas retrouvées chez toutes les souches adaptées en culture. Par ailleurs, elles ne semblent pas jouer un grand rôle dans la virulence virale (Domingo, 1986). Cette région présente une structure complexe en tige-boucle qui renferme le site d'entrée interne du ribosome, IRES du VHA (Cohen et al., 1989) et est composée de double hélices et de boucles.

L'extrémité 3' du génome, constituée d'une petite région non codante de 63 nucléotides, est terminée par une queue polyadénylée (figure 3).

Entre les deux régions non codantes, se trouve un seul cadre de lecture ouvert de 6681 nucléotides, qui code pour une polyprotéine de 2227 acides aminés, précurseur subdivisé en 3 domaines dénomés P1 (clivé en protéines structurales VP1, VP2, VP3, VP4), P2 et P3 (clivé en protéines non structurales) (Rueckert et al., 1984) .

Les fonctions des protéines 2A, 2B et 2C du domaine P2 ne sont pas encore parfaitement identifiées ; 2B pourrait être un stabilisateur de la particule et 2C pourrait participer à la réplication virale (Dever et al., 1987) et avoir une activité hélicase et de liaison aux dNTPs. Quant à la protéine 2A, alors que chez les entérovirus, elle a une fonction protéasique, chez le VHA elle paraît être dépourvue de cette activité (Jia et al., 1993). Le rôle exact de cette protéine reste encore inconnu (Beard et al., 2001), elle pourrait faire partie des

protéines de structure associées à VP1 et assurerait l'assemblage des protéines de la capside en pentamères.

L'analyse comparative des séquences nucléotidiques, au niveau de la jonction VP1/2A, de plusieurs souches du VHA isolées dans différentes régions du monde a permis de distinguer 7 génotypes du VHA. Les virus de génotype I, II et III ont été isolés à partir de cas humains, les virus appartenant aux 3 autres génotypes (IV, V et VI) ont été isolés à partir d'espèces simiennes ayant développé une maladie ressemblant à l'hépatite A (Lu et al., 2004).

Les 4 protéines constituant P3 ont des fonctions identifiées : 3A serait le précurseur de la protéine VPg dont elle permettrait l'attachement au génome viral ; 3B est la protéine VPg, elle-même, 3C a une activité protéasique assurant les différents clivages de la polyprotéine et 3D est considérée comme la polymérase du virus (tableau 1, figure 3).

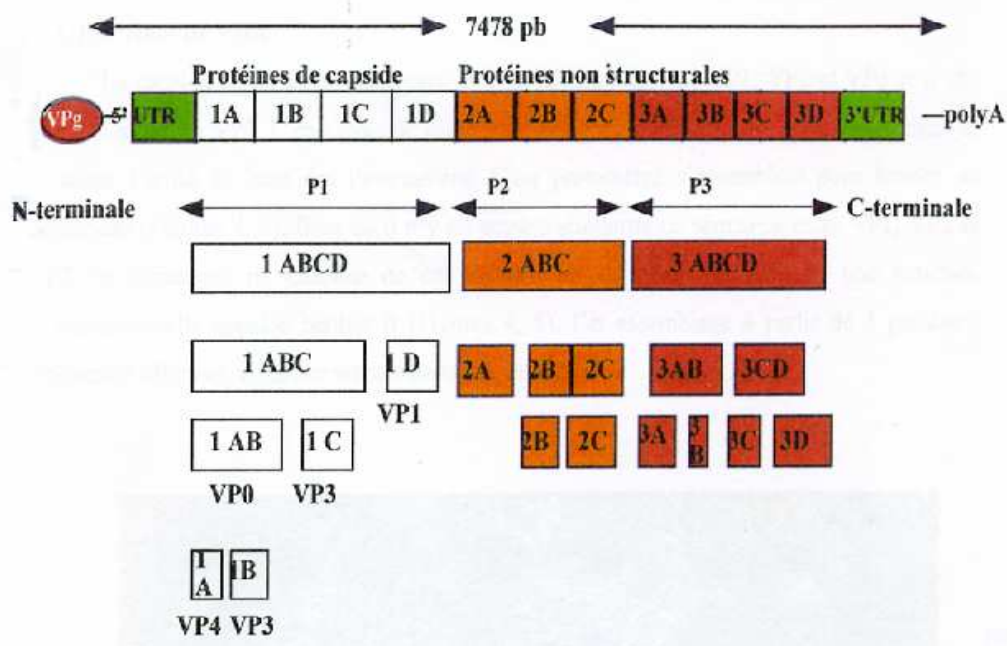


Figure 3: Représentation schématique du génome du virus de l'hépatite A (Centers for Disease Control and Prevention, 2004).

Tableau 1 : Caractéristiques génomiques de la souche VHA HM-175 (Hollinger et Ticehurst, 1996).

Segments du génome de VHA		Positions des nucléotides	Position des acides aminés et de la polyprotéine	Fonction proposée
5'NC		1-735		initiation de la traduction
P1	1A	735-3029	1-765	Protéine de la capsid
	1B	735-803	1-23	VP4
	1C	804-1469	24-245	VP2
	1D	1470-2207	246-491	VP3
P2	2A	2208-3107	492-765	VP1
	2B	3030-5000	766-1422	Protéine non structurale
	2C	3108-3995	766-836	Morphogénèse
P3	3A	3675-3995	837-1087	Culture cellulaire
	3B	3996-5000	1088-1422	transcription
	3C	5001-7415	1423-2227	Synthèse ARN
	3D	5001-5222	1423-1496	Protéine non structurale et VPg
	3E	5223-5291	1497-1519	Pré-VPg
3'NC	3F	5292-5948	1520-1738	VPg
	3G	5249-7415	1739-2227	Protéase
		7416-7478		ARN polymérase
				terminaison de la translation, poly(A)

II-2 Protéines du VHA :

La capsid du VHA est composée de 3 protéines majeures VP1, VP2, VP3 et d'une protéine mineure VP4. L'ensemble de ces 4 protéines forme un complexe appelé protomère et constitue l'unité de base des *Picornavirus*. Cinq protomères s'assemblent pour former un pentamère. Bien qu'il n'y ait aucune similarité de séquences entre VP1, VP2 et VP3, le repliement de chacune de ces chaînes est le même, et présente une structure tridimensionnelle appelée barillet B. Cet assemblage à partir des 3 protéines différentes offre aux virus une surface antigénique variée.

III- Propriétés physico-chimiques :

Le VHA se distingue par une résistance relative plus élevée que celle des entérovirus, aux agents physiques 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 utilisées 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) (Debord et al., 1998).

IV- Épidémiologie et modes de transmission :

IV-1 Modes de transmission :

IV-1-1 Transmission féco-orale :

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 (Blaine et al., 2001). 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'aliments contaminés. Des épidémies ont été associées à la consommation de fruits de mer crus ou mal cuits, de fruits ou de légumes crus ou de manière plus générale, d'aliments qui ne peuvent pas subir une inactivation virale par la chaleur. L'importation d'aliments contaminés à partir de pays à forte endémicité pourrait devenir une source importante d'épidémies dans les pays développés (Fiore, 2004).

IV-1-2 Transmission nosocomiale :

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 (Goodman, 1985). Le VHA peut ainsi occasionner des infections nosocomiales, la transmission s'effectuant le plus souvent au moment où le patient source est en phase asymptomatique.

IV-1-3 Transmission parentérale :

La transmission parentérale du VHA est plus rare, mais des cas sont régulièrement décrits. Il s'agit d'hépatites A postransfusionnelles (Garraud et al., 2004), ou liées à l'utilisation de médicaments dérivés du sang (Mannucci et al., 1994), ou encore transmises par toxicomanie intraveineuse (Grinde et al., 1997). 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, liées à des contacts oroanaux (Henning et al., 1995).

IV-2 Répartition géographique :

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 (Jacobsen et Koopman, 2004) 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 épidémique. Là encore, le contact direct reste le mode de transmission le plus fréquent (Cuthbert, 2001).

En Tunisie, l'hépatite A reste une infection fréquente, survenant essentiellement chez l'enfant. Dans une étude récente, il a été montré qu'il y avait une endémicité encore très élevée du VHA dans notre pays puisque 84 % des enfants sont déjà atteints par le virus durant les cinq premières années de leur vie (Rezig et al., 2008).

Exemples d'épidémies d'hépatite A liées à la consommation de mollusques bivalves:

De nombreuses études épidémiologiques démontrent le rôle des coquillages dans des épisodes épidémiques d'hépatite virale A. L'épidémie la plus importante est celle survenue à Shanghai avec 300 000 cas liés à la consommation de coques prélevées dans un site insalubre (Lees, 2000). En 1991, lors d'une épidémie aux États-Unis, le VHA a été détecté dans des coquillages (échantillons confisqués et congelés, et échantillons prélevés dans la zone de production) (Lees, 2000). Des coquillages (coquinas clams) importés congelés du Pérou et mis dans des paellas ont été responsables d'au moins 183 cas d'hépatite A en Espagne.

Aux États-Unis et au Canada, une épidémie a touché 213 personnes ayant consommé des fraises congelées (Hutin et al., 1999). Entre novembre 2000 et juin 2001, 54 cas d'hépatite A survenus en Suède seraient dus à la consommation de salade de type « roquette » importée (Nygard et al., 2001). Parallèlement à ces données, une étude a montré que le conditionnement sous atmosphère contrôlée de ce type d'aliment n'a pas d'action inactivante sur ce virus (Bidawid et al., 2001)

V- Infection par le virus de l'hépatite A :

V-1 Signes cliniques:

Une période d'incubation silencieuse qui dure en moyenne 30 jours, avec des extrêmes allant de 15 à 50 jours selon la quantité du virus à laquelle la personne a été exposée, précède la phase pré-ictérique. Au cours de cette phase, dont la durée varie de un jour à 2 semaines, 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 ces 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 des selles, un brunissement des urines et un signe biologique majeur : l'élévation des transaminases sériques témoins 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 un 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 asymptomatiques de bons pronostiques (Buisson et al., 1994 ; Buisson et Teyssou, 1995).

V-2 Physiopathologie de l'infection par le VHA :

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 où il va se multiplier dans les hépatocytes. Le VHA a un tropisme hépatique, la réplication s'effectue dans le foie. Le virus est rejeté dans les canicules biliaires et éliminé avec les selles qui constituent la principale source de contamination.

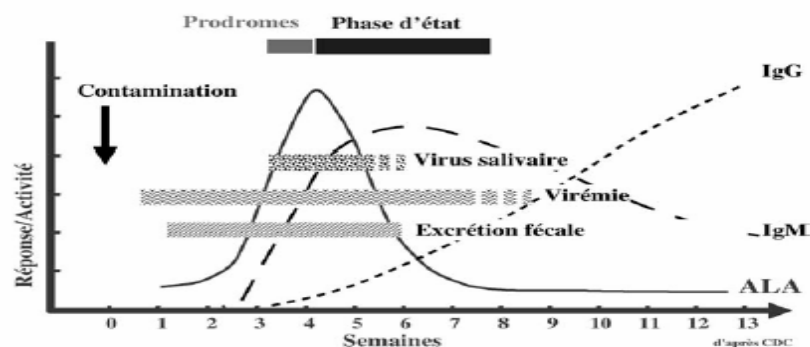


Figure 4: Evolution des marqueurs clinico-biologiques au cours de l'hépatite A (Roque-Afonso et al. 2006).

VI- Diagnostic virologique :

VI-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 immuno-microscopie 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).

VI-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...).

VII- Prévention et traitement :

Certaines mesures d'hygiène peuvent diminuer le risque de contracter 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. Par ailleurs, un vaccin anti-VHA existe depuis 1992. Il s'agit d'une souche HM175 adaptée sur des cellules diploïdes humaines MRC-5 inactivée par le formol et adsorbée à l'hydroxyde d'aluminium.

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.

C- Détection du virus de l'hépatite A dans les mollusques bivalves :

La recherche des VHA dans les coquillages est complexe du fait de l'adsorption de ces virus sur des particules ou en agrégats et de la sensibilité nécessaire pour prendre en considération la faible concentration virale susceptible d'être trouvée dans les échantillons. Plusieurs techniques mettent en évidence une contamination virale dans des échantillons

cliniques ou de l'environnement. A l'heure actuelle les deux principales techniques sont la culture cellulaire et la biologie moléculaire (Gantzer et al., 1998)

La méthode de référence généralement utilisée pour la détection des particules virales est la culture cellulaire, méthode sensible et quantitative basée sur l'observation d'un effet cytopathique (ECP) et/ou d'une lyse des cellules permissives. Cette méthode a pour avantage de renseigner sur la présence de virus infectieux (capable d'infecter productivement une cellule hôte). Lourde à mettre en œuvre et peu adaptée à des analyses de routine nécessitant un rendu rapide des résultats, la culture cellulaire est difficilement applicable pour le VHA qui présente une croissance lente sur culture cellulaire et n'entraîne pas d'effet cytopathique.

Le développement de la biologie moléculaire permet d'envisager des techniques rapides, spécifiques et très sensibles telles que l'hybridation moléculaire ou l'amplification génique (PCR) pour l'analyse de la contamination virale (Atmar et al., 1995 ; Le Guyader et al., 1994). Ainsi, les techniques d'amplification génomique constituent le seul outil d'analyse possédant une sensibilité suffisante pour détecter les faibles niveaux de contamination en virus dans les coquillages (Metcalf et al., 1995). En revanche, la présence d'ARN par RT-PCR n'indique pas nécessairement la présence de virus infectieux. La fragilité de l'ARN en milieu extérieur suggère que celui-ci est toujours encapsidé (Tsai et al., 1995). L'efficacité de l'amplification par RT-PCR dépend de deux facteurs : l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques et de la pureté de ces derniers.

I- Extraction :

L'extraction doit comporter les étapes suivantes : élution, concentration virale, extraction des ARN puis purification. L'élution correspond à une mise en contact de l'échantillon avec un tampon alcalin enrichi ou non en extrait de bœuf, ce qui permet d'obtenir une désorption des virus et leur récupération dans le tampon. Ces virus peuvent ensuite être concentrés par ultracentrifugation ou précipitation en présence de polyéthylène glycol (PEG).

Les méthodes classiques d'extraction et de purification sont utilisées avec des étapes de purification destinées à éliminer les nombreux inhibiteurs des enzymes reverse-transcriptase ou Taq DNA polymérase, utilisées dans la RT-PCR. Brièvement, l'extraction des acides nucléiques peut être réalisée par lyse enzymatique (protéinase K), par lyse chimique (thiocyanate de guanidium) ou par simple ébullition, ces étapes étant suivies de phases de purification et de précipitation (Le Guyader et al., 2000). 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).

II- RT-PCR :

La technique de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier spécifiquement une séquence d'ADN définie en plusieurs millions d'exemplaires. Cette technique consiste en une répétition cyclique de trois étapes thermiques successives : une dénaturation des acides nucléiques, une hybridation des amorces spécifiques sur les séquences cibles et une extension des amorces par la Taq ADN polymérase. L'amplification de l'ARN par PCR nécessite une étape enzymatique préalable de reverse transcriptase (RT) pour transformer l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) avant son amplification par PCR.

La confirmation de la spécificité de l'amplification par une étape d'hybridation est nécessaire, surtout dans les échantillons de l'environnement (Pommeuy et Le Guyader, 1998). Cette étape supplémentaire présente également l'intérêt d'augmenter la sensibilité et permet de détecter entre 10 et 100 génomes viraux. Certaines méthodes privilégient l'utilisation de la PCR nichée ou semi-nichée qui s'avère d'une meilleure sensibilité.

Le développement de la PCR en temps réel permet d'aborder l'aspect quantitatif de la PCR. Les différentes méthodes développées jusqu'alors pour le diagnostic clinique présentent une sensibilité satisfaisante pour être utilisées avec les échantillons de l'environnement et les aliments. La possibilité d'estimer la charge virale des échantillons, sous réserve d'un strict contrôle des phases de concentration, extraction et purification, sera très utile dans l'avenir pour évaluer le risque sanitaire de la présence de ces virus dans l'environnement ou les aliments.

D- Les rayonnements ionisants :

Le traitement par les rayonnements ionisants constitue une méthode susceptible d'être utilisée dans le domaine agro-alimentaire, comme alternative ou comme complément aux techniques classiques : thermiques ou chimiques (Vasseur, 1991). Les rayonnements ionisants, suivant leur nature, sont classés en deux catégories :

I- Les rayonnements directement ionisants :

Ils sont constitués de particules chargées qui délivrent directement à la matière leur énergie, par le jeu des forces coulombiennes s'exerçant entre elles et les atomes du milieu. Les transferts d'énergie dépendent des masses des particules en mouvement et il y a lieu de

distinguer entre particules chargées lourdes (protons, deutérons, alpha, ions lourds) et électrons, positrons.

II- Les rayonnements indirectement ionisants :

Ils sont électriquement neutres et sont susceptibles de transférer une importante fraction ou la totalité de leur énergie en une seule interaction à des particules chargées.

- Les rayonnements électromagnétiques X ou γ qui agissent par l'intermédiaire d'électrons secondaires qui ionisent le milieu.

- Les neutrons qui, par collision, donnent naissance à des protons de recul ou des noyaux lourds de recul et qui, une fois ralentis, sont capturés par les noyaux des atomes du milieu traversé.

Nous ne parlerons ici que des rayonnements utilisés industriellement, c'est-à-dire dont l'énergie se situe dans la gamme de quelques dizaines de keV à 10 MeV.

Il existe 3 différents types de rayons utilisés par l'ionisation : les rayons gamma, les rayons X et les électrons accélérés. Nous allons détailler les rayons gamma qui sont utilisés dans notre travail.

II-1 Rayons gamma :

Les atomes radioactifs sont instables. Ils se réorganisent spontanément pour former un noyau stable grâce à l'émission de rayonnements. Toutes les transformations du noyau s'accompagnent en général d'une forte émission d'énergie sous forme de rayonnement γ qui est un rayonnement électromagnétique comme la lumière visible mais avec une fréquence et une énergie plus élevées (1.25 MeV pour Cobalt 60) (figure 5). Pendant ces transformations, le noyau est dans un état excité. L'émission γ se produit à l'occasion du retour à l'état fondamental, de la même façon que des électrons excités de l'atome émet une lumière visible lorsqu'ils reviennent à l'état fondamental (Le Corre et Venaille, 1989). Cette émission se produit à des énergies bien déterminées qui correspondent à des différences de niveaux d'énergie du noyau. On les appelle des raies (Vasseur., 1991). Prenons comme exemple, la désintégration du noyau de cobalt qui est utilisé comme source dans l'installation pilote du CNSTN décrite dans ce travail.

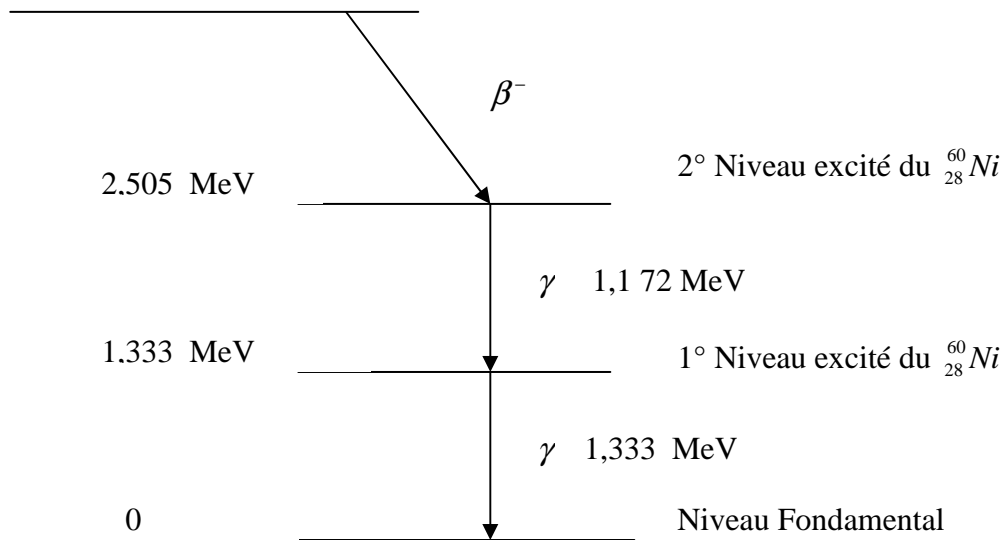


Figure 5 : Schéma de désintégration du cobalt 60 (Vasseur, 1991).

III- Doses d'irradiations absorbées :

La dose d'irradiation est la quantité d'énergie de rayonnement absorbée par la matière. Elle utilise une unité appelée Gray (Gy). Dans les premiers travaux l'unité était le rad (1 Gy = 100 rad ; 1 kGy = 1000 Gy). Les autorités internationales de salubrité et de sûreté ont approuvé la sûreté de l'irradiation pour tous les aliments jusqu'à une dose de 10.000 Gy (10kGy). L'évaluation récente d'un groupe d'étude expert international désigné par l'Organisation des Aliments et de l'Agriculture (FAO), l'Agence Internationale d'Energie Atomique (AIEA) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a prouvé que les aliments traités selon les bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication à toute dose inférieure à 10 kGy est également sûre pour la consommation. En terme de rapport d'énergie, un gray correspond à une énergie de 1 joule absorbé par Kilogramme de produit irradié. La dose maximum de 10 kGy est équivalente à l'énergie calorifique exigée pour augmenter la température de l'eau de 2.4°C (International Consultative Group on Food Irradiation, 1999).

VI- Effets de l'ionisation sur le milieu :

VI-1 Effets chimiques ; la radiolyse de l'eau :

Le principal effet de l'irradiation est la radiolyse de l'eau, ainsi on obtient des radicaux libres OH^\bullet et H^\bullet qui se combinent à d'autres molécules pour faire des radicaux d'oxydation (figure 6), principalement :

- Le radical H^\bullet va se recombiner et donner de l'hydrogène (H_2) (Foods J., 1991).

- Le radical OH^\bullet va se recombiner avec lui même pour donner H_2O_2 qui est un oxydant très efficace. On parle de phénomène d'auto oxydation (Foods J., 1991).

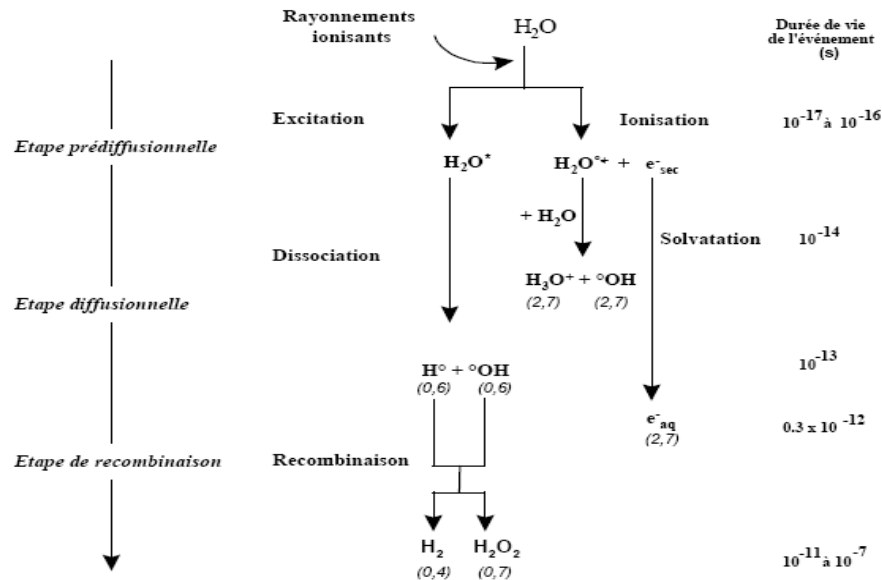


Figure 6 : Radiolyse de l'eau (Bensasson et al, 1993).

Les radicaux libres représentent des espèces chimiques à durée de vie extrêmement courte et très réactives (ils possèdent un électron célibataire). Ils se combinent soit pour reconstituer la molécule initiale par effet cage, soit pour donner naissance à ce que l'on appelle les produits de radiolyse.

VI-2 Effets biologiques de l'ionisation :

VI-2-1 Effet sur les acides nucléiques :

Il est aujourd'hui admis que les molécules d'ADN et d'ARN sont les molécules cibles des effets biologiques produits par les rayonnements ionisants (Pouget et al., 2000). Les rayonnements ionisants entraînent différents types de lésions :

-Hydroxylation des bases ou des sucres : formation des radicaux libres et très réactifs dont l'hydrogène H^\bullet et l'hydroxyle OH^\bullet qui participent à leur tour à la création d'autres perturbations de la matière ionisée (Cadet et al., 2004).

- Ruptures des brins : formation de ruptures simples au niveau de la liaison entre la base et le sucre d'un nucléotide, ou entre le sucre et le phosphate, ce qui provoque la rupture au niveau des brins des molécules. Une grande partie de ces ruptures simples est produite par

l'intermédiaire de radicaux OH, il s'agit d'un événement relativement fréquent (Tubiana et al., 1986). Les ruptures doubles (dix fois plus rares) sont des cassures intéressant simultanément les deux brins de la molécule d'ADN à des niveaux très voisins (Siddiqi et Bothe, 1987).

-Pontage : des pontages illégitimes peuvent se produire entre les bases d'un même brin ou entre des bases appartenant à deux brins différents (Vasseur., 1991).

VI-2-2 Effet sur les protéines, les glucides et les lipides :

Au contact entre les protéines et les ondes ionisantes, la plus grande partie de l'énergie d'ionisation est utilisée pour casser ou dénaturer les protéines provoquant la modification de leur structure secondaire, tertiaire et quaternaire. Il est à noter que la moyenne de dénaturation des protéines par ionisation est très inférieure à celle provoquée par la chaleur (Diehel, 1990).

L'action sur les glucides est mineure : certaines macromolécules peuvent éventuellement être fractionnées mais le traitement n'engendre pas la formation de nouveaux produits (Vasseur, 1991).

L'effet des radiations sur les molécules lipidiques est significatif. En présence d'oxygène l'auto-oxydation des lipides est accélérée ce qui provoque la formation d'hydroperoxydes qui se transforment à leur tour en des substances carbonyles (Rémita ,2001).

VI-2-3 Effet sur les microorganismes :

Si les effets des rayonnements ionisants sont communs à tous les microorganismes, leur radiosensibilité diffère selon leur position taxonomique. Cette différence de radiosensibilité peut être évaluée à partir des valeurs de D_{10} (c'est-à-dire de la dose absorbée provoquant la destruction de 90% de la population initiale) qui sont définies pour chaque genre et espèce (Le Corre et Venaille. ,1989).

Plusieurs espèces de bactéries et de champignons responsables de l'altération des aliments sont généralement sensibles à l'irradiation et peuvent être inactivées par des faibles et moyennes doses de rayonnement (Frazier et al., 1988).

En raison de leur petite taille et leur organisation génomique, les virus se sont révélés beaucoup plus résistants que les bactéries, les parasites et les champignons (Farkas, 1989; Patterson, 1993; Monk et al., 1995).

Plusieurs études ont déterminé la valeur D_{10} pour l'inactivation de différents types de virus particulièrement dans les cultures cellulaires et les échantillons biologiques et environnementaux. Cependant, les travaux concernant l'effet des rayonnements ionisants sur les virus dans les aliments sont peu nombreux (Heidelbaugh et Giron, 1969 ; Sullivan et al., 1973 ; Mallett et al., 1991 ; Bidawid et al., 2000). Les valeurs de D_{10} trouvées lors de ces études varient de 2 à 7 kGy.

V- Applications industrielles de l'irradiation :

L'irradiation gamma est mise en œuvre pour la stérilisation de dispositifs médicaux, de produits pharmaceutiques ou cosmétiques et la conservation de produits alimentaires. À faible dose, l'irradiation sert à inhiber la germination (pommes de terre, oignons, ail, gingembre), à désinsectiser et déparasiter les céréales, les plantes légumineuses, les fruits frais et secs (Shengfu et al. ,1993), les poissons et viandes, à ralentir le processus physiologique de décomposition de certains fruits et légumes frais. À dose moyenne, l'ionisation par irradiation permet la prolongation de la conservation des poissons frais, des fraises et des raisins (Cetinkaya et al. ,2006), l'élimination des agents d'altération et des micro-organismes pathogènes sur les fruits de mer, les volailles et viandes (produits frais ou congelés), et l'amélioration technique des aliments, par exemple l'augmentation du rendement en jus de raisin ou la diminution de la durée de cuisson des légumes déshydratées (Kamat et al. ,2003).

À forte dose, l'ionisation permet la stérilisation industrielle des viandes, volailles et fruits de mer, des aliments prêts à l'emploi, des rations hospitalières, et la décontamination de certains additifs et ingrédients alimentaires comme les épices, les gommes, les préparations d'enzymes. Ces techniques d'irradiation de produits de consommation peuvent être autorisées car, à l'issue de leur traitement, ces produits ne présentent aucune radioactivité artificielle ajoutée (Takahashi. ,2004).

L'irradiation est récemment utilisée comme méthode de protection des aliments pour augmenter la sécurité alimentaire, la qualité et la commercialisation des aliments comme les plats cuisinés (Barkia et al, 2007).

A- MATERIEL :

I- Mollusques bivalves :

Notre travail a porté sur 60 échantillons de mollusques bivalves. Entre Décembre 2007 et Juillet 2008, 19 lots d'échantillons de moules (*Mytilus galloprovincialis*), 11 lots d'échantillons d'huitres (*Crassostrea gigas*) et 24 lots d'échantillons de palourdes (*Tapes Decussatus*) ont été collectés, à l'état vivant sans subir l'étape préconisée de purification, à partir de 5 zones de conchyliculture du nord et du sud de la Tunisie : Lac de Tunis, Canal de Tunis, Menzel Jemil, Faroua et Gabes. 6 lots d'échantillons de moules ont été également prélevés sur les cotes de Tabarka entre Juillet 2007 et Février 2008.

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.

Tableau 2 : Les échantillons de mollusques bivalves analysés

Zones de production	Espèce	Nombre d'échantillons	Période de collecte
Menzel Jemil	Moule	11	Janvier 2008- Juin 2008
	Huitre	11	Janvier 2008- Juin 2008
Faroua	Moule	8	Décembre 2007-Juillet 2008
Lac de Tunis	Palourde	8	Décembre 2007-Juillet 2008
Canal de Tunis	Palourde	8	Décembre 2007-Juillet 2008
Gabès	Palourde	8	Décembre 2007-Juillet 2008
Tabarka	Moule	6	Juillet 2007-Février 2008

II- Selles :

Une suspension virale extraite à partir des selles d'un enfant de 8 ans atteint d'hépatite A a été utilisée comme témoin positif. Ces selles ont été titrées à 8×10^6 copies/g de selles.

III- Source d'irradiation :

L'unité d'irradiation est constituée d'une cellule d'irradiation abritant la source (Figure 7), d'un labyrinthe, d'une salle de commande, d'un laboratoire de dosimétrie, d'un hall de stockage des produits ionisés et non ionisés et de deux chambres froides.



Figure 7 : La source radioactive Cobalt 60 du CNSTN

La source radioactive télescopique est constituée de deux cylindres coaxiaux contenant chacun 4 crayons de cobalt 60 de 45.2 cm de long. Ces derniers sont disposés et encapsulés suivant une symétrie axiale (figure 8). Le stockage de cette source se fait à sec dans un container cylindrique constitué d'acier et de plomb permettant aussi son transport.

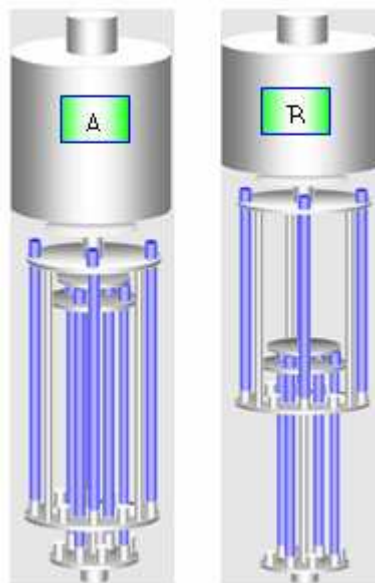


Figure 8: Les différentes positions de la source

A- La source est active (émettrice de rayonnement dans la cellule)

B- La source est encapsulée dans le container

✓ *Les Dosimètres utilisés pour l'irradiation :*

La détermination de la dose reçue au cours du traitement ionisant, est effectuée grâce à des dosimètres étalonnés constitués de solution de FRICK. Les mesures sont faites avec une précision de 5%.

B- METHODES :

I- Méthodologie d'extraction du virus de l'hépatite A à partir des échantillons de mollusques bivalves :

I-1 Préparation des échantillons de mollusques bivalves:

Pour chaque lot, les coquillages 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. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à l'extraction virale.

I-2 Extraction et concentration des virus :

I-2-1 Principe :

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 éluante à pH alcalin permettant de modifier les conditions du milieu par apport 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, 2 solutions tamponnées ont été utilisées : une solution NaCl /extrait de bœuf et une solution glycine/NaCl. 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 dans le but d'éliminer les débris cellulaires et les macromolécules qui sont susceptibles d'inhiber certaines réactions de biologie moléculaire.

Les virus présents en faible quantité dans le surnageant, sont concentrés par l'addition de PEG 6000 qui favorise leur précipitation en suspension. Le précipité préalablement formé, après une étape d'incubation, est récupéré après centrifugation.

I-2-2 Protocole expérimental :

I-2-2 a) Extraction des virus :

Deux techniques d'extraction virale E1 et E2 ont été utilisées et comparées :

- **E1** : La première est une technique d'extraction par une solution glycine-NaCl décrite par Sobsey et al.,1978 : 50 g de tissus et de liquide intervalvaire des coquillages sont homogénéisés dans un mixeur Silent Crusher à 10000 rpm pendant 5 min . 150 ml de tampon

0,2M glycine-0,15M NaCl (annexe) (pH=9,5) sont ajoutés au broyat. L'ensemble est mélangé, sous agitation, pendant 15 min à température ambiante puis centrifugé à 8500 g pendant 15 min à +4°C.

▪ **E2** : La deuxième technique d'extraction décrite par Alouini et Sobsey (1995) utilise une solution NaCl-extrait de bœuf. Elle consiste à homogénéiser 50 g de tissus et de liquide intervalvaire des coquillages dans un mixeur Silent Crusher à 10000 rpm pendant 3 min en présence de 50 ml de la solution NaCl 0,3 M. 350 ml d'une solution tampon (7% d'extrait de bœuf-0,3 M de NaCl) (annexe) (pH=7,5) sont ajoutés au broyat. L'ensemble est homogénéisé de nouveau dans le mixeur puis agité magnétiquement pendant 15 min à température ambiante. Une centrifugation de 7500 rpm pendant 20 min à +4°C est effectuée.

Après l'étape de clarification, les surnageants obtenus à partir de la technique E1 et E2 sont récupérés et les pH sont ajustés à 7,2.

Pour comparer ces 2 techniques, une contamination artificielle des coquillages a été effectuée avec des dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} d'une suspension de selles d'un patient VHA positif ayant un titre viral de $8 \cdot 10^6$ copies/g de selles. Après broyage de la chair et le liquide intervalvaire dans le Silent Crusher, chaque dilution de la suspension virale est ajoutée à 50 g de chaque broyat. Il est à signaler que pour chaque technique, un échantillon de coquillages est contaminé artificiellement sans que la suspension de selles subisse une dilution (échantillon non dilué). Une agitation est réalisée pendant une heure à température ambiante. Par la suite, ces échantillons contaminés sont soumis aux deux techniques d'extraction E1 et E2 décrites précédemment. Les produits d'amplification obtenus par RT-Nested-PCR à partir des extraits viraux sont analysés sur gel d'agarose.

I-2-2 b) Concentration des virus :

Le surnageant est concentré par le PolyEthylène Glycol 6000 (PEG 6000) (Lewis et Metcalf, 1988). La solution de PEG 6000 à 50% (annexe) est ajoutée à l'extrait obtenu dans un rapport de ¼ (v/v). La solution est incubée une nuit à 4°C. Le précipité formé est récupéré par centrifugation à 8500g à 4°C pendant 55 min. Le culot est remis en suspension dans 10 ml de tampon phosphate (PBS, pH=7,2) (annexe).

I-2-2 c) Décontamination des concentrats :

Une décontamination au chloroforme est ensuite réalisée, suivie d'une clarification du surnageant par centrifugation à 1500g pendant 40 min à 4°C. Le surnageant obtenu est

récupéré, son pH est ajusté à 7,2 et est conservé à -20°C jusqu'à l'étape d'extraction de l'ARN viral.

II- Extraction et purification de l'ARN viral à partir des échantillons de mollusques bivalves et des selles :

II-1 Extraction et purification de l'ARN viral partir des échantillons de mollusques bivalves:

II-1-1 Extraction par une méthode Chimique :

II-1-1-1 Principe :

L'extraction de l'ARN viral est réalisée par la voie enzymatique en présence d'un détergent. Ceci permet non seulement la lyse des virus mais aussi l'inactivation des ribonucléases présentes dans le milieu.

II-1-1-2 Protocole expérimental :

L'extraction de l'ARN viral est réalisée selon la technique Sdiri et al.,(2006). Un échantillon de 400 μl du surnageant obtenu lors de la première étape d'extraction et concentration est mis en présence de 10 μl de protéinase K (20 mg/ml) (annexe) 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) sont ajoutés au mélange surnageant-protéinase K. L'ensemble est homogénéisé pendant 15 secondes. Après une étape de centrifugation à 17000 g à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 15 min, le surnageant est transféré dans un autre tube eppendorf contenant 40 μl d'acétate de sodium 3M pH 5,5 (annexe) et 900 μl d'éthanol absolu glacial. Pour homogénéiser, les tubes sont retournés pendant 10 secondes et placés deux heures à -80°C . Les échantillons sont ensuite centrifugés à 17000 g à $+4^{\circ}\text{C}$ 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 $+4^{\circ}\text{C}$. Après élimination complète du surnageant, le culot est séché pendant 1 heure et demi 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 afin d'être utilisé par la suite pour la détection des génomes viraux par RT-Nested-PCR.

II-1-2 Extraction par le Kit PureLink Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen):

II-1-2-1 Principe :

Les ARN des virus présents dans le surnageant obtenu lors de la première étape d'extraction et de concentration virale sont extraits et purifiés en utilisant le Kit commercial PureLink Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen). Le principe de cette méthode consiste à une liaison sélective de l'ARN à une membrane de gel en silice d'une colonne. Les contaminants de l'ARN sont éliminés après rinçage de la colonne par le tampon de lavage. L'ARN fixé sur la colonne est élué dans l'eau RNase free. L'échantillon subit en premier lieu la lyse en présence du tampon de lyse qui contient l'isothiocyanate de guanidine hautement dénaturant et possédant les propriétés d'inactivation des RNases assurant ainsi l'isolement de l'ARN intact.

II-1-2-2 Protocole expérimental :

Le protocole expérimental a été fourni par le Kit d'extraction et de purification de l'ARN viral PureLink Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen). Dans un tube stérile de 10 µl sont ajoutés 1 ml du surnageant obtenu lors de la première étape d'extraction et de concentration à 1 ml de tampon de lyse et 1 ml d'éthanol absolu. L'ensemble est vortexé pendant 10 s. A partir de ce mélange, 700 µl sont transférés sur une colonne puis centrifugés à 12000 g pendant 15 s. Le tube collecteur est par la suite vidé et l'opération est répétée jusqu'à avoir passé tout l'échantillon. Deux rinçages de la colonne sont réalisés avec 500 µl d'une solution de lavage II suivis de deux centrifugations de 12000 g pendant 15 s. Par la suite, une centrifugation de 12000 g pendant 1 min est réalisée. La colonne, placée sur un tube de 1,5 ml, est éluée avec 50 µl d'eau RNase free puis incubée 1 min à température ambiante et centrifugée à 13000 g pendant 2 min. Le produit de l'éluion est conservé à -80°C afin d'être utilisé par la suite pour la détection des génomes viraux par RT-Nested-PCR.

L'efficacité d'extraction du Kit a été comparée avec celle de la technique Sdiri et al.,(2006) sur 13 lots de coquillages (palourdes) pour la recherche des virus de l'hépatite A.

II-2 Extraction et purification de l'ARN viral à partir des selles par le Kit QIAmp

Viral RNA (Qiagen) :

Préparation des selles :

Après homogénéisation de l'échantillon de selles, 5 g sont additionnées à 10 ml d'une solution de PBS stérile. L'ensemble est centrifugé pendant 30 min à 3000 rpm. Le surnageant est récupéré puis centrifugé 15 min à 10000 rpm. Cette opération est renouvelée jusqu'à ce que le surnageant ne soit plus trouble.

II-2-1 Principe :

Ce type d'extraction est basé sur le principe de capture des acides nucléiques par la silice (Qiagen). Les contaminants de l'ARN sont éliminés après rinçage de la colonne par les tampons de lavage. L'ARN fixé sur la colonne est élué dans un tampon d'éluion (eau RNase free contenant 0,04% sodium azide). La lyse est réalisée avec un tampon contenant la thiocyanate de guanidine hautement dénaturante et permettant l'inactivation des RNases pour assurer l'isolement de l'ARN intact. L'ARN carrier ajouté à ce tampon permet d'améliorer la liaison de l'ARN viral à la membrane de gel de silice de la colonne et de limiter la dégradation de l'ARN.

II-2-2 Protocole expérimental :

L'extraction de l'ARN viral à partir des selles est réalisée grâce au Kit QIAmp viral RNA (Qiagen). Dans un tube eppendorf sont ajoutés 140 µl du surnageant à 560 µl de tampon de lyse AVL-RNA carrier. Après 10 min d'incubation à température ambiante, 560 µl d'éthanol sont ajoutés permettant la précipitation des protéines. Après transfert de 630 µl du mélange sur la colonne, le mélange est centrifugé à 8000 rpm pendant 1 min. Le tube collecteur est par la suite vidé et l'opération est répétée jusqu'à avoir passé tout l'échantillon. La colonne est ensuite rincée avec 500 µl de tampon de lavage AW1 puis centrifugé 1min à 8000 rpm, puis rincée une seconde fois par 500 µl de tampon de lavage AW2 suivie d'une centrifugation de 3 min à 14000 rpm. Par la suite, une centrifugation de 14000 rpm pendant 1 min est réalisée. La colonne, placée sur un tube de 1,5 ml, est éluée avec 60 µl de tampon AVE, suivie d'une minute d'incubation à température ambiante et d'une centrifugation à 8000 rpm pendant 1 min. Le produit de l'éluion est conservé à -80°C afin d'être utilisé par la suite pour la détection des génomes viraux par RT-Nested-PCR.

III- Détection des génomes viraux par RT-Nested-PCR :

III-1 Principe de RT-PCR :

La réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase chain reaction) constitue la méthode de choix pour une détection rapide, sensible et spécifique des pathogènes viraux dans les aliments et dans l'environnement. L'amplification d'une portion nucléotidique de l'ARN génomique nécessite la synthèse de brin d'ADN appelé complémentaire à l'aide d'une reverse transcriptase, en présence d'oligonucléotides synthétiques et d'amorces antisens du côté 3'. L'ADNc ainsi synthétisé constitue à son tour une matrice pour la synthèse de plusieurs copies d'ADN. Le nombre de copies dépend du nombre de cycles d'amplification. L'amplification nécessite l'emploi de paires d'amorces spécifiques des régions à amplifier. Par conséquent, à partir d'une seule séquence, plusieurs copies de la région amplifiée sont obtenues en quelques heures seulement. D'où l'utilité de cette technique dans la détection des virus entériques présents en quantité infime dans les aliments et dans l'environnement (Metcalf et al., 1995). 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'amorces du côté 3' de chaque brin d'ADN par diminution progressive de la température jusqu'à la température d'hybridation.
- Une étape d'extension des amorces par l'intermédiaire d'une enzyme de polymérisation ou ADN polymérase thermostable.

Dans le présent travail, des RT-Nested-PCR ont été réalisées afin d'augmenter la sensibilité de détection des génomes viraux. Cette technique fait intervenir deux PCR successives, la deuxième PCR étant réalisée avec deux amorces qui 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 des précautions doivent être prises pour éviter les risques de contamination.

III-2 Protocole expérimental :

III-2-1 Choix des amorces :

Nous avons ciblé une séquence au niveau de la région P1 du génome du VHA selon Croci et al., (2006). Les amorces utilisées lors de cette étude sont celles décrites dans le tableau 3.

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

Amorces	Séquences de nucléotides (5' à 3')	Positions*	Polarités
AS1	CATATGTATGGTATCTCAACAA	1092-1113	Antisens
S2	CAGGGGCATTTAGGTTT	698-714	Sens
S3	TGATAGGACTGCAGTGACT	836-854	Sens
AS4	CCAATTTTGCAACTTCATG	1029-1047	Antisens

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

III-2-2 Synthèse de l'ADN complémentaire :

La transcription inverse a été effectuée à l'aide de l'enzyme reverse transcriptase AMV et l'amorce antisens AS1. Un mélange réactionnel est préparé en combinant 1 µl de dNTP, 2 µl d'amorce AS1, 4 µl de tampon RT 5x, 0,12 µl AMV reverse transcriptase et 2,88 µl d'eau ultra pure (tableau 4). A ce mélange réactionnel sont ajoutés 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 min.

Tableau 4 : Composition du milieu réactionnel pour la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)

Constituant	Fabriquant	Concentration finale
AMV (10 U/µl)	Promega	0,06 U/µl
Tampon 5x	Promega	1 x
Amorce AS1(10 µM)	Invitrogen	1 µM
dNTP (20 mM)	Invitrogen	1 Mm
ARN	10 µl pour un volume réactionnel de 20 µl	

III-2-3 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, 5 µl d'amorce S2 (tableau 5) et 2,5 U de l'enzyme Taq polymérase. 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, 5 µl d'amorce S3 (10 µM) et 2,5 U de

l'enzyme Taq polymérase (tableau 6). A ce mélange réactionnel sont ajoutés 5 µl d'ADN amplifié, obtenu lors de la 1^{ère} amplification.

Tableau 5 : Composition du milieu réactionnel pour la 1^{ère} PCR

Constituant	Fabriquant	Concentration finale
Tampon 10x	Invitrogen	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	Invitrogen	2 mM
Amorce AS1 (10 µM)	Invitrogen	1 µM
Amorce S2 (10 µM)	Invitrogen	1 µM
dNTP (20 mM)	Invitrogen	0,8 mM
Taq polymérase (5 U/µl)	Invitrogen	0,05 U/µl
ADN _c	5 µl pour un volume réactionnel de 50 µl	

Tableau 6 : Composition du milieu réactionnel pour la 2^{ème} PCR

Constituant	Fabriquant	Concentration finale
Tampon 10x	Invitrogen	1 x
MgCl ₂	Invitrogen	2 mM
Amorce S3	Invitrogen	1 µM
Amorce AS4	Invitrogen	1 µM
dNTP	Invitrogen	0,8 mM
Taq polymérase (5 U/µl)	Invitrogen	0,05 U/µl
ADN amplifié	5 µl pour un volume réactionnel de 50 µl	

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 minute 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 (selles d'un enfant de 8 ans atteint d'hépatite A) est utilisé pour s'assurer du bon déroulement de l'amplification.

IV-Visualisation des produits amplifiés :

IV-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 émet une fluorescence orange lorsqu'il est présenté à une source de rayons UV courts (environ 300 nm).

IV-2 Protocole expérimental :

5 µl d'ADN amplifié sont mélangés avec 2 µl de solution de dépôt. L'ensemble est déposé sur un gel d'agarose à 2 % dans du Tris Borate EDTA (TBE) (annexe) 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 attendue des produits amplifiés de la 2^{ème} PCR est de 211 pb.

V- Recherche de Salmonelles et d'*E.coli* dans les échantillons de coquillages contaminés par le virus de l'hépatite A :

V-1 Recherche des Salmonelles :

25 g de la chair et du liquide inter valvaire de l'échantillon de coquillage sont prélevés aseptiquement puis transférés dans un sac stérile contenant 225 ml d'eau peptonnée tamponnée. L'ensemble est homogénéisé au stomacher et incubé à 37°C pendant 24h (SM).

Par la suite, 1 ml de (SM) estensemencé dans un tube à essai stérile contenant 9 ml de bouillon sélénite-cystine puis incubé pendant 24 h à 37°C. De plus, 1 ml de (SM) estensemencé de nouveau dans un tube à essai stérile contenant 9 ml de bouillon Rappaport-vassiliadis puis incubé pendant 24 h à 43°C. Sur des boites pré-coulées de deux milieux sélectifs Héктоen et SS Agar, des ensemencements en stries sont réalisés à partir des deux tubes. Sur le milieu Héктоen, les colonies caractéristiques de *Salmonella* sont lisses et de couleur rose alors que celles présentes sur milieu SS Agar sont incolores transparentes avec ou sans centre noir. Si le développement est faible ou s'il n'y a pas de colonies typiques de *Salmonella*, une autre incubation des boites à 37°C durant 18 à 24 h est réalisée. Pour la confirmation, on choisit une colonie bien isolée et on l'ensemence sur un milieu Kligler. Après incubation 24 h à 37°C, le milieu Kligler fournit 4 renseignements principaux la fermentation du glucose, la fermentation du lactose, la production de gaz et la formation d'H₂S. Les colonies suspectes de Salmonelle sont ensuite identifiées par le système API 20E. La lecture des résultats est réalisée par le logiciel Api lab.

V-2 Recherche d'*E.coli* :

75 g de la chair et du liquide inter valvaire de l'échantillon de coquillage sont prélevés aseptiquement puis transférés dans un flacon stérile contenant 150 ml d'une solution de Tryptone sel (TS). L'ensemble est broyé avec le Silent Crusher pendant 2 min à 13500 rpm puis incubé à température ambiante pendant 30 min. Par la suite, 525 ml de TS sont ajoutés au mélange ; l'ensemble est appelé S1. 3 ensemencements sont réalisés :

- 10 ml de S1 sontensemencés dans 5 tubes à essai stériles contenant 10 ml de Glutamate modifié double
- 1 ml de S1 estensemencé dans 5 tubes à essai stériles contenant 10 ml de Glutamate modifié simple
- 1 ml de S1 est ajouté à 9 ml de TS puis 1 ml de ce mélange etensemencé dans 5 tubes à essai stériles contenant 10 ml de Glutamate modifié simple

Les tubes sont par la suite incubés 24 h à 37°C. Si la couleur mauve vire vers le jaune après incubation, il y a présence d'*E.coli*. Pour la confirmation, sur des boites pré-coulées de TBX, des ensemencements en stries sont réalisés à partir des tubes révélés positifs. Après incubation 24 h à 44°C, on obtient des colonies bleues. Grâce au tableau NPP, on détermine le nombre d'*E.coli* présent dans l'échantillon.

VI- Contamination artificielle et exposition à l'irradiation gamma

Une contamination artificielle de 6 échantillons de palourde a été effectuée avec une suspension de selles VHA ; 1,5 ml de la suspension virale est ajouté à 50 g de chaque échantillon après extraction de la chair et le liquide intervalvaire. Une agitation est réalisée pendant une heure à température ambiante. Les échantillons sont transférés dans des tubes Falcon stériles. Par la suite, ils sont exposés à l'irradiation Gamma avec les doses suivantes 5, 10, 15, 20, 25 et 30 kGy à un débit de dose de 134 Gy/min. La durée du traitement est variable selon la dose. Un échantillon témoin a été traité de la même manière mais sans exposition aux radiations gamma. Lors des traitements d'ionisation les expériences sont réalisées à une température ambiante de 25°C

A- Recherche du VHA dans des coquillages Tunisiens :

Le présent travail a pour objectif principal d'évaluer la contamination virale par le VHA dans des échantillons de coquillages Tunisiens (moule, palourde et huitre) par l'utilisation de la RT-Nested-PCR. Pour la recherche des VHA, il est d'abord nécessaire de réaliser une extraction et une concentration des virus présents ou adsorbés sur les différents organes des mollusques puis une extraction et une purification des génomes viraux. Ainsi, nous avons procédé à la comparaison de deux méthodes d'extraction et de concentration des VHA quant à leur capacité de détection du génome du VHA par RT-Nested-PCR. En outre, nous avons évalué la pertinence d'un kit d'extraction des acides nucléiques par comparaison à une méthode chimique décrite dans la littérature.

I- Choix d'une technique d'extraction et de concentration des virus :

Dans le but de choisir une technique sensible et spécifique d'extraction des virus de l'hépatite A dans les échantillons de coquillages collectés, deux méthodes décrites dans la littérature ont été comparées quant à leur capacité à détecter le génome du VHA par RT-Nested-PCR. La première technique E1 consiste à utiliser la glycine dans le tampon de chlorure de sodium, la deuxième méthode E2 est basée sur l'utilisation de l'extrait de bœuf à 7%. Des expériences de contamination artificielle de 14 échantillons de coquillages (révélés négatifs par RT-Nested-PCR) avec différentes dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} d'une suspension de selles d'un patient VHA positif ont été réalisées.

La sensibilité et la spécificité de chaque technique d'extraction ont été évaluées et comparées après amplification par RT-Nested-PCR. Les produits d'amplification à partir des extraits viraux des coquillages contaminés en utilisant les 2 techniques d'extraction ont été analysés sur gel d'agarose après migration électrophorétique. Les 2 techniques d'extraction nous ont permis d'obtenir des bandes spécifiques du génome du VHA (211pb) pour les 2 échantillons mères correspondant à chaque technique. Cependant, des différences d'efficacité d'amplification ont été notées en fonction de la méthode d'extraction utilisée et en fonction de la dilution. La limite de détection observée a été la dilution 10^{-5} pour la technique E1 et 10^{-3} pour la technique E2 (figure 9). Ainsi, la comparaison des deux techniques d'extraction E1 et E2 après la contamination artificielle des coquillages a montré une sensibilité meilleure avec la technique E1.

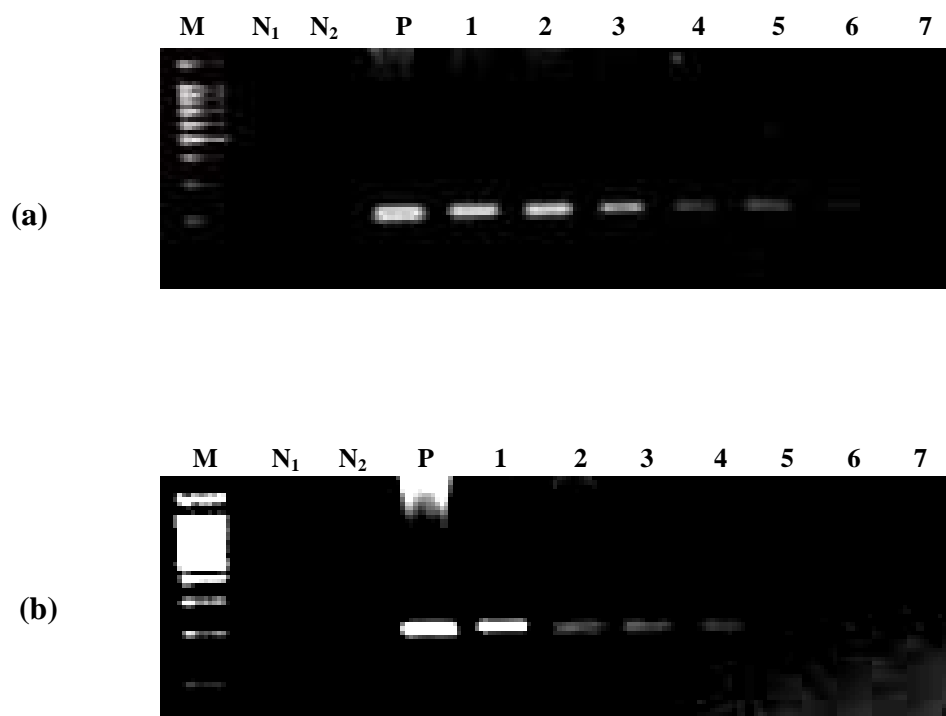


Figure 9 : Analyse sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification par RT-Nested-PCR des ARN extraits des coquillages par la technique E1 (a) et la technique E2 (b).

M : marqueur de taille de 100 pb ; P : témoin positif ; N₁ : témoin négatif de la première amplification ; N₂ : témoin négatif de la deuxième amplification ; 1 : produits d'amplification par RT-Nested-PCR des ARN extraits des coquillage n'ayant pas subi de dilution (échantillon mère) ; 2-7 : produits d'amplification par RT-Nested-PCR des ARN extraits des coquillages ayant subi une série de dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁶ de la suspension du VHA ; 2 : 10⁻¹ ; 3 : 10⁻² ; 4 : 10⁻³ ; 5 : 10⁻⁴ ; 6 : 10⁻⁵ ; 7 : 10⁻⁶.

Les résultats obtenus pour les 2 techniques d'extraction et de concentration suite à la contamination artificielle ont été confirmés par la recherche des VHA dans 13 lots d'échantillons contaminés naturellement par ce virus (échantillons pris au hasard). Les efficacités relatives des 2 techniques E1 et E2 ont été appréciées d'après le taux de détection du VHA sujet à une amplification par RT-PCR (tableau 7).

Tableau 7 : Taux de détection par RT-PCR du VHA par les 2 techniques E1 et E2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Résultats
E1	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	61%
E2	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	15%

+ : Echantillons positifs

- : Echantillons négatifs

Des différences d'efficacité d'amplification ont été également observées en fonction de la méthode d'extraction utilisée. La technique E1 présente des performances supérieures à la technique E2 ; elle affiche le rendement le plus élevé. A la lecture de ces résultats, la technique d'extraction par la glycine a été retenue dans cette étude pour la recherche des VHA dans les coquillages.

II- Choix d'une technique d'extraction et de purification de l'ARN viral :

La technique d'extraction E1 retenue lors de la première partie de ce travail pour le choix d'une technique d'extraction et de concentration virale a été appliquée sur les 13 lots d'échantillons de coquillages. Après l'extraction et l'élution des virus à partir d'une prise d'essai de 50 g de broyat selon la technique E1, les produits d'élution obtenus sont concentrés d'après la technique décrite dans la partie matériel et méthodes par Lewis et Metcalf (1988). Les acides ribonucléiques des VHA des différents échantillons sont extraits par 2 méthodes : une méthode chimique (S) décrite par Sdiri et al., (2006) et une méthode (K) utilisant un Kit commercial PureLink Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen). Les extraits génomiques obtenus ont été amplifiés par RT-Nested -PCR pour la détection des VHA. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 8.

Tableau 8: Taux de détection par RT-Nested-PCR du VHA par les 2 techniques S et K

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Résultats
S	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	61%
K	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	23%

+ : Echantillons positifs

- : Echantillons négatif

Nous avons constaté que tous les échantillons trouvés positifs par la méthode (K) l'ont également été par la méthode (S). Toutefois, la méthode chimique (S) a permis de détecter 8 échantillons positifs. Par contre, l'application du Kit réalisée sur le même matériel a révélé 3 lots positifs sur l'ensemble des lots d'échantillons analysés. Ainsi, la méthode chimique a été retenue dans cette étude pour la recherche des VHA dans les coquillages.

III- Evaluation de la contamination virale dans les échantillons de coquillages:

Nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la contamination virale des échantillons de moules, de palourdes et d'huitres collectés à l'état vivant sans subir l'étape de purification. Les techniques E1 et S retenues respectivement pour le choix d'une technique d'extraction et concentration virale et pour l'évaluation de la pertinence du kit commercial PureLink Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen) ont été appliquées sur 60 lots d'échantillons de coquillages. Les extraits génomiques obtenus ont été amplifiés par RT-Nested-PCR pour la détection des VHA. Le tableau 9 illustre les résultats obtenus.

Ainsi, le produit d'amplification spécifique du virus de l'hépatite A de 211 pb de taille (figure 10) a été détecté dans 17/60 échantillons de coquillages analysés, ce qui correspond à une fréquence de 28%.

L'analyse des résultats de la recherche moléculaire du VHA dans les échantillons de coquillages, présentés dans le tableau récapitulatif montre que les palourdes sont les mollusques bivalves les plus contaminés par le VHA : 11 échantillons de palourde sont révélés positifs sur 24 échantillons de palourdes collectés. Ce qui correspond à un pourcentage de 45,83%. Concernant les échantillons de moule issus des différentes zones étudiées, nous avons détecté le génome du VHA dans 5 échantillons sur 25 échantillons de moules; soit un pourcentage de 20%. Un seul échantillon d'huitre est contaminé par le VHA sur 11 échantillons d'huitres. Ce qui correspond à un pourcentage de 9,09% (figure 11).

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des résultats de détection des virus de l'hépatite A dans les coquillages par RT-PCR

Lot N°	Espèce	Zone de Production	Date de prélèvement	Contamination par le virus de l'hépatite A
1	M	Tabarka	17/07/2007	-
2	M	Tabarka	19/08/2007	-
3	M	Tabarka	12/10/2007	-
4	M	Tabarka	22/11/2007	-
5	P	Gabès	11/12/2007	-
6	M	Faroua	19/12/2007	+
7	P	Lac de Tunis	23/12/2007	+
8	P	Canal de Tunis	23/12/2007	-
9	P	Gabès	08/01/2008	-
10	H	Menzel Jemil	10/01/2008	-
11	M	Menzel Jemil	10/01/2008	-
12	M	Faroua	15/01/2008	-
13	P	Canal de Tunis	16/01/2008	+
14	P	Lac de Tunis	16/01/2008	+
15	M	Menzel Jemil	29/01/2008	-
16	H	Menzel Jemil	29/01/2008	-
17	M	Tabarka	31/01/2008	-
18	P	Gabès	07/02/2008	+
19	M	Faroua	11/02/2008	+
20	P	Canal de Tunis	12/02/2008	-
21	P	Lac de Tunis	12/02/2008	+
22	M	Tabarka	13/02/2008	-
23	M	Menzel Jemil	15/02/2008	-
24	H	Menzel Jemil	15/02/2008	-
25	M	Menzel Jemil	28/02/2008	-
26	H	Menzel Jemil	28/02/2008	-
27	P	Gabès	04/03/2008	+
28	M	Menzel Jemil	14/03/2008	-
29	H	Menzel Jemil	14/03/2008	+
30	M	Faroua	17/03/2008	-
31	P	Canal de Tunis	19/03/2008	+
32	P	Lac de Tunis	19/03/2008	+
33	M	Menzel Jemil	28/03/2008	+
34	H	Menzel Jemil	28/03/2008	-
35	P	Gabès	08/04/2008	-
36	M	Menzel Jemil	11/04/2008	+
37	H	Menzel Jemil	11/04/2008	-
38	M	Faroua	22/04/2008	-
39	P	Canal de Tunis	29/04/2008	+
40	P	Lac de Tunis	29/04/2008	+
41	M	Menzel Jemil	30/04/2008	-
42	H	Menzel Jemil	30/04/2008	-
43	M	Faroua	13/05/2008	+
44	P	Gabès	15/05/2008	-
45	M	Menzel Jemil	19/05/2008	-
46	H	Menzel Jemil	19/05/2008	-
47	P	Canal de Tunis	20/05/2008	-
48	P	Lac de Tunis	20/05/2008	-
49	M	Menzel Jemil	30/05/2008	-
50	H	Menzel Jemil	30/05/2008	-
51	M	Menzel Jemil	06/06/2008	-
52	H	Menzel Jemil	06/06/2008	-
53	M	Faroua	20/06/2008	-
54	P	Canal de Tunis	24/06/2008	+
55	P	Lac de Tunis	24/06/2008	-
56	P	Gabès	25/06/2008	-
57	M	Faroua	01/07/2008	-
58	P	Canal de Tunis	08/07/2008	-
59	P	Lac de Tunis	08/07/2008	-
60	P	Gabès	16/07/2008	-

M : moule ; P : palourde ; H : huitre

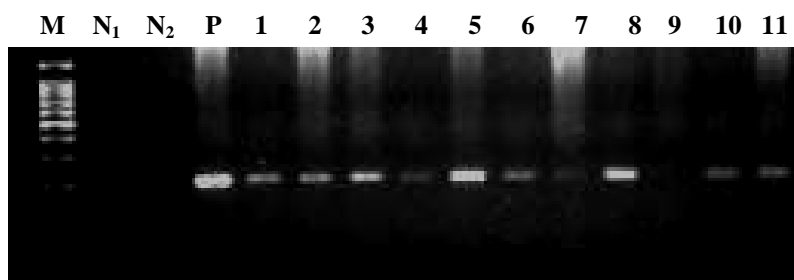


Figure 10 : Analyse sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification par RT-Nested-PCR des produits d'amplification des ARN extraits des coquillages

M : marqueur de taille de 100 pb ; P : témoin positif ; N₁ : témoin négatif de la première amplification ; N₂ : témoin négatif de la deuxième amplification ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 : prélèvements de coquillages positifs pour le VHA ; 9 : prélèvement négatif pour le VHA.

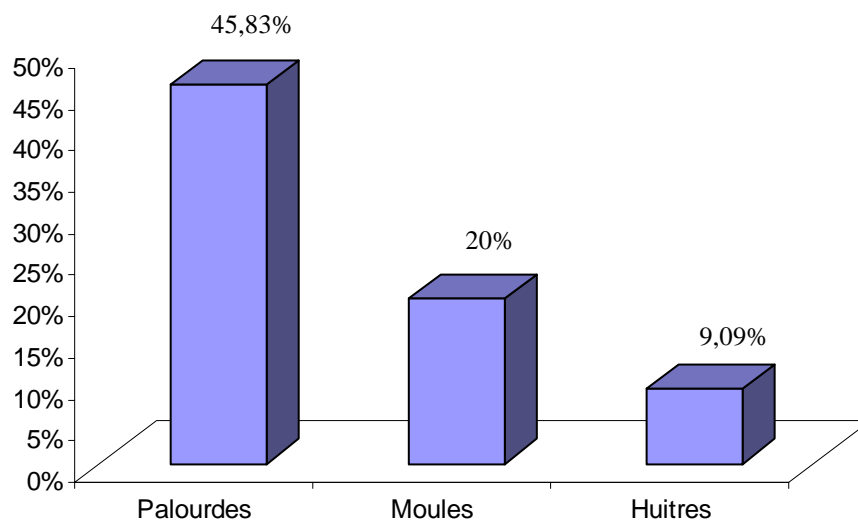


Figure 11 : Taux de contamination par le VHA selon l'espèce de mollusques bivalves

En outre, on note une contamination assez élevée par le VHA pour les échantillons collectés pendant la période hivernale.

L'étude de la contamination virale a visé différents échantillons de coquillages collectés à partir de 5 zones d'élevage de mollusques bivalves (lac de Tunis, canal de Tunis, Faroua, Menzel Jemil et Gabes). Des échantillons de moules ont été également prélevés sur les cotes de Tabarka. La recherche des VHA dans ces échantillons révèle que les VHA sont fréquents dans les prélèvements du lac et du canal de Tunis ; 62% et 50% des échantillons de coquillages de provenance de ces zones respectivement sont contaminés par le VHA. La zone de production Faroua montre un taux de contamination moins élevé en VHA avec un taux de 37% suivie par la zone Gabes soit 25%. Une faible fréquence de contamination par le VHA est notée pour les échantillons de Menzel Jemil (13%). Les lots de moule collectés sur les cotes de Tabarka sont indemnes du VHA (tableau 10)

Tableau 10: Fréquence de détection par zone de production des VHA recherchés dans les échantillons de mollusques bivalves collectés.

Zone de collecte	Fréquence de contamination par le VHA
Lac de Tunis	62% (5/8)
Canal de Tunis	50% (4/8)
Faroua	37% (3/8)
Menzel Jemil	13% (3/22)
Gabes	25% (2/8)
Tabarka	0% (0/6)

IV- Evaluation de la contamination bactérienne dans les échantillons de coquillages révélés contaminés par le VHA:

Les résultats obtenus montrent une présence virale au niveau des coquillages à raison de 28%. En effet, sur 60 échantillons de mollusques bivalves collectés, 17 échantillons sont révélés positifs. Des analyses bactériologiques ont été réalisées sur ces 17 échantillons de coquillages contaminés par le VHA (tableau 11). Les Salmonelles ne sont pas présentes dans les échantillons analysés. En outre, la présence d'*E.coli* a été notée dans tous les échantillons de mollusques bivalves. Certains coquillages montrent une contamination assez élevée par *E.coli* qui est considéré le principal indicateur de contamination fécale. Cependant, il est à

signaler qu'un grand nombre de ces coquillages contaminés par le VHA présente une faible contamination par *E.coli* (échantillons 6, 7, 13, 14, 29, 33, 36, 39, 43).

Tableau 11 : Recherche des Salmonelles et d'*E.coli* dans les coquillages contaminés par le VHA

Lot N°	Espèce	Zone de Production	Date de prélèvement	Salmonelle dans 25g	<i>E.coli</i> /100g
6	M	Faroua	19/12/2007	absence	20
7	P	Lac de Tunis	23/12/2007	absence	37
13	P	Canal de Tunis	16/01/2008	absence	78
14	P	Lac de Tunis	16/01/2008	absence	840
18	P	Gabès	07/02/2008	absence	18
19	M	Faroua	11/02/2008	absence	170
27	P	Gabès	04/03/2008	absence	700
29	H	Menzel Jemil	14/03/2008	absence	40
21	P	Lac de Tunis	12/02/2008	absence	1400
31	P	Canal de Tunis	19/03/2008	absence	2100
32	P	Lac de Tunis	19/03/2008	absence	470
33	M	Menzel Jemil	28/03/2008	absence	18
36	M	Menzel Jemil	11/04/2008	absence	20
39	P	Canal de Tunis	29/04/2008	absence	92
40	P	Lac de Tunis	29/04/2008	absence	120
43	M	Faroua	13/05/2008	absence	36
54	P	Canal de Tunis	24/06/2008	absence	310

B- Etude de l'effet des radiations gamma sur le génome viral du VHA:

Afin d'étudier l'effet des radiations gamma sur le virus de l'hépatite A dans les coquillages, 6 échantillons de palourde (chair et liquide intervalvaire) ont été contaminés avec une suspension de selles VHA titrée à $8 \cdot 10^6$ copies/g de selles puis exposés aux radiations gamma à des doses de 5, 10, 15, 20, 25 et 30 kGy à un débit de dose de 134Gy/min. A la suite de l'irradiation, la technique E1 retenue lors de la première partie de ce travail pour le choix d'une technique d'extraction et concentration virale a été appliquée sur chaque échantillon irradié. Les produits d'éluion obtenus sont concentrés d'après la technique décrite dans la partie matériel et méthodes. Les acides ribonucléiques des VHA sont extraits par la méthode chimique décrite par Sdiri et al., (2006). Les extraits génomiques ont été amplifiés par RT-Nested-PCR pour la détection des VHA. Les produits d'amplification par RT-Nested-PCR à partir des extraits viraux des échantillons irradiés après contamination par le VHA ont été analysés sur gel d'agarose après migration électrophorétique. Un échantillon témoin a été traité de la même manière mais sans exposition aux radiations gamma.

Des bandes spécifiques du génome du VHA ont été obtenus (211pb) jusqu'à une dose de 20 kGy. Les résultats illustrés par la figure 12 montrent que l'intensité des bandes diminue progressivement en fonction de l'augmentation des doses de radiation. A partir de la dose 25 kGy, la RT-Nested-PCR n'a pas permis la détection de l'ARN viral.

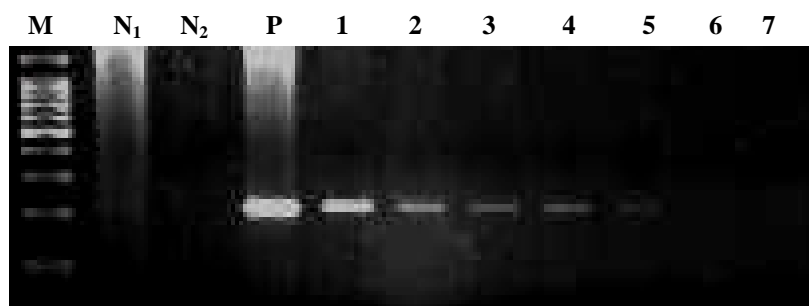


Figure 12 : Analyse sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification par RT-Nested-PCR des produits d'amplification des ARN extraits des chairs irradiées des coquillages

M : marqueur de taille de 100 pb ; P : témoin positif ; N₁ : témoin négatif de la première amplification ; N₂ : témoin négatif de la deuxième amplification ; 1 : produit d'amplification par RT-Nested-PCR de l'ARN extrait de la chair de coquillage sans être exposé aux radiations gamma ; 2, 3, 4, 5, 6, 7 : produits d'amplification par RT-Nested-PCR des ARN extraits de la chair des coquillages après exposition aux rayons gamma ; 2 : 5 kGy ; 3 : 10 kGy ; 4 : 15 kGy ; 5 : 20 kGy ; 6 : 25 kGy ; 7 : 30 kGy.

A- Recherche du VHA dans des coquillages Tunisiens :

Le VHA est la cause la plus fréquente d'hépatites virales aiguës, en particulier dans les pays en voie de développement dans lesquels les conditions d'hygiène et le niveau socioéconomique sont souvent peu élevés (Buisson et Teyssou, 1995 ; Buisson, 1996). Dans ces régions, l'infection par le virus de l'hépatite A ne pose pas de problème majeur de santé publique; elle atteint généralement l'enfant à un âge très jeune donnant une infection bénigne le plus souvent asymptomatique. En revanche, dans les pays industrialisés, le VHA devient une menace pour la santé publique du fait de la diminution importante de la séroprévalence et de l'augmentation du risque épidémique notamment dans la population adulte (Roque-Afonso et al., 2006). Ainsi, l'hépatite A peut engendrer des répercussions socioéconomiques importantes liées aux hospitalisations et aux arrêts de travail et à l'augmentation potentielle du nombre de cas graves. Il est donc impératif de respecter certaines conduites d'hygiène et de disposer de techniques permettant une détection fiable aussi bien chez l'homme que dans son alimentation. C'est pour cette raison que nous avons tenté d'optimiser une méthode de détection des VHA dans les mollusques bivalves qui ont la réputation d'être la principale source alimentaire d'hépatite A.

La détection des virus entériques humains chez les mollusques bivalves nécessite des méthodes sensibles et spécifiques en raison des faibles niveaux de contamination mais aussi de l'hétérogénéité de la chair de ces animaux. De ce fait, une extraction suivie d'une élution et d'une étape de concentration des virus à partir de la chair des mollusques bivalves sont indispensables. La méthode permettant la détection des virus entériques infectieux est fondée sur l'isolement sur culture cellulaire *in vitro*. Or, c'est une technique lourde, longue et coûteuse. De plus, elle ne permet pas de détecter tous les virus du milieu hydrique car certains parmi eux ne se multiplient pas sur système cellulaire ou se multiplient très mal ou très lentement tel que le VHA qui est difficilement cultivable. D'où le recours aux techniques de biologie moléculaire qui sont rapides, sensibles et spécifiques. Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature pour la détection de l'ARN viral dans les coquillages (Le Guyader et al., 1994 ; Atmar et al., 1995 ; Croci et al., 1999). De nombreuses études ont montré le succès de la PCR pour la détection des virus dans les coquillages artificiellement contaminés dans les laboratoires. Toutefois, les études concernant la détection des VHA dans les coquillages naturellement contaminés par les techniques de la biologie moléculaire sont peu nombreuses (Essebai-Elamri et Aouni, 2006 ; Desenclos et al., 1991 ; Le Guyader et al., 1994, 2000 ; Croci et al., 1999).

L'utilisation de la RT-Nested-PCR pour la détection du VHA dans les extraits de mollusques bivalves a été suggérée pour sa sensibilité, puisque des faibles concentrations en VHA sont attendues dans les coquillages (Severini et al., 1993 ; Hafliger et al., 1997 ; Muniain-Mujika et al., 2000).

Dans le présent travail, la méthode de choix pour la détection des VHA dans les échantillons de mollusques bivalves est la RT-Nested-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 copies de génome viral dans l'échantillon est faible (Jaykus et al., 1996). 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 (Bosch et al., 2003).

Dans la première partie de cette étude, nous nous sommes intéressés à choisir une méthode d'extraction et de concentration des VHA présents dans les tissus des mollusques bivalves en testant 2 techniques décrites dans la littérature. Une évaluation d'un kit d'extraction des acides nucléiques par comparaison à une méthode chimique décrite dans la littérature a été réalisée. Par la suite, une recherche des VHA dans les différents échantillons de mollusques bivalves à partir des différentes zones a été effectuée.

I- Choix d'une technique d'extraction et de concentration des virus :

Les virus entériques peuvent être présents ou adsorbés sur différents organes des mollusques (muqueuses du tube digestif, hépatopancréas...) (Cliver et al., 1983). Il est donc nécessaire d'extraire les particules virales adsorbées sur les tissus. De plus, ces virus sont relativement en faible quantité dans les coquillages contaminés. Ainsi, une étape de concentration est indispensable après l'extraction. En effet, l'extraction des virus est réalisée avec des solutions éluantes dans des conditions physico-chimiques particulières : pH alcalin et force ionique élevée qui entraînent l'inversion du potentiel de charges des particules virales et leur libération dans la phase liquide (Herrmann et al., 1988). Les solutions éluantes se répartissent en 2 catégories suivant leur mode d'action : (i) les éluants protéiques qui correspondent à des solutions tamponnées de pH alcalin enrichies en sels minéraux et en protéines (extrait de bœuf, lait écrémé...). Ces dernières entrent en compétition avec les protéines de la capsidie pour la fixation

sur les sites d'adsorption du support. Les sels minéraux, quant à eux, limitent l'inactivation des virus et favorisent la dispersion moléculaire (Baron, 1985) (ii) les éluants chaotropiques qui contiennent des substances actives (glycine, tween 80, EDTA...) responsables d'un déséquilibre thermodynamique et qui déstabilisent les structures moléculaires.

Parmi les différentes méthodes d'extraction rapportées dans la littérature, deux ont été comparées lors de ce travail quant à leur capacité à détecter le génome du VHA par RT-Nested - PCR. Elles se distinguent par la nature de la solution éluante : elles utilisent une élution par une solution de glycine (Sobsey et al., 1978) pour la technique (E1) et une solution de chlorure de sodium et d'extrait de bœuf (Alouini et Sobsey, 1995) pour la technique (E2). L'efficacité et la sensibilité des 2 techniques d'extraction E1 et E2 ont également été étudiées lors de la contamination artificielle des échantillons de coquillages avec des dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} d'une suspension de selles d'un patient hépatite A positif et lors de l'évaluation de la contamination virale de 13 échantillons de coquillages contaminés naturellement par le VHA.

La comparaison des deux techniques d'extraction E1 et E2 après la contamination artificielle des différents échantillons de coquillages a montré une sensibilité meilleure avec la technique E1. Cette sensibilité a été évaluée par l'utilisation des différentes dilutions de la suspension de selles VHA. De plus, la recherche des VHA dans les échantillons de coquillages contaminés naturellement a révélé que la technique E1 présente des performances supérieures à la technique E2 en affichant le rendement le plus élevé.

Le faible rendement de la technique E2 confirme le caractère inhibiteur de l'extrait de bœuf décrit par plusieurs auteurs (Stetler et al., 1992 ; Schwab et al., 1995). Nos résultats sont en accord avec ceux décrits en littérature utilisant dans la plupart des cas des tampons à base de glycine (Atmar et al., 1993 ; Jaykus et al., 1993 ; Hafliger et al., 1997 ; Cromeans et al., 1997).

Ainsi, dans le présent travail, la technique E1 à base de glycine affiche le rendement le plus élevé. Par conséquent, cette technique a été choisie afin d'améliorer le taux de détection des particules virales à partir de la totalité de la chair des mollusques bivalves.

II- Choix d'une technique d'extraction et de purification de l'ARN viral :

La recherche des génomes viraux s'effectue la plupart du temps à partir de concentrats viraux obtenus à partir de grands volumes de tissus de coquillages. Or, les méthodes de concentration concentrent non seulement les virus mais aussi de nombreuses macromolécules

susceptibles d'interférer avec les réactions enzymatiques mises en jeu lors de la RT-PCR. A ce jour, aucune étude systématique d'identification de ces substances n'a été entreprise mais l'action inhibitrice du glycogène, des polysaccharides acides, des protéines et des ARN non cibles à fortes concentrations a été démontrée (Jaykus et al., 1993 ; Jaykus et al., 1995 ; Cromeans et al., 1997). Afin d'améliorer le rendement des réactions enzymatiques de RT-PCR, il est donc nécessaire d'inclure des étapes d'élimination de ces produits et donc de purification. Par ailleurs, il est nécessaire de procéder à l'extraction de l'ARN viral en dénaturant les capsides virales. La méthode d'extraction chimique (S) a été validée sur des échantillons de coquillages et d'eaux usées contaminés naturellement par des virus entériques (Sdiri et al., 2006). Elle présente des inconvénients (méthode longue, comportant de nombreuses étapes pouvant entraîner des pertes d'acides nucléiques) et des avantages (pas d'équipements lourds, réactifs peu chers).

Depuis quelques années, la pertinence de kits d'extraction simples et rapides a été démontrée pour l'extraction de l'ARN des virus dans les selles de malades (Traoré et al., 2000 ; Lees, 2000 ; Atmar et al., 2001). Bien que ces kits soient coûteux, ils offrent la possibilité d'avoir une méthode rapide, reproductible et facilement applicable. Nous avons donc décidé de comparer un kit d'extraction avec la méthode chimique en terme d'efficacité d'extraction. Notre choix s'est orienté vers le kit d'extraction PureLink Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen). A notre connaissance, il n'existe pas de kit dédié à l'extraction des acides nucléiques des coquillages. Le kit EZBA Mollusc RNA (Omega Bio-Tech) n'étant pas efficace pour les coquillages, mais plutôt destiné aux mollusques terrestres, arthropodes et asticots (Ribao et al., 2004). L'efficacité des kits Invitrogen a été démontrée lors de différentes études cliniques. Ces kits sont basés sur une lyse en tampon thiocyanate de guanidine, suivie d'une fixation sur des colonnes de gel de silice, puis une élution de l'ARN. C'est une méthode donc proche de celle décrite par Boom et al., (1990) recommandée pour extraire les ARN des coquillages dans de nombreuses méthodes (Hafliger et al., 1997; Lees, 2000 ; Muniain-Mujika et al., 2000).

Le virus, généralement adsorbé sur des particules, est accumulé dans les coquillages naturellement contaminés après persistance dans l'environnement. Au contraire, dans le cas de la contamination artificielle, l'inoculum est rajouté directement dans un broyat de coquillages avec un temps de contact court. Nous avons choisi de comparer les deux méthodes d'extraction directement sur des coquillages prélevés en milieu naturel. L'effet matrice pouvant être important

pour les coquillages, la comparaison a été faite sur des échantillons de palourdes (Hafliger et al., 1997).

Tous les échantillons trouvés positifs par le kit d'extraction l'ont également été par la méthode (S). Toutefois, la méthode chimique (S) a permis de détecter un plus grand nombre d'échantillons positifs en VHA que l'extraction par le kit. Le kit PureLink Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen) semble avoir une efficacité d'extraction des ARN viraux inférieure à celle de la méthode chimique. La sensibilité inférieure observée avec le kit pourrait avoir un impact considérable lors d'étude sur un site où la contamination se situe souvent en limite de détection.

Pourtant depuis quelques années, des kits d'extraction sont de plus en plus utilisés pour extraire les ARN des coquillages (Beuret et al., 2003 ; Shieh et al., 2003 ; Sunen et al., 2004). Un autre système de purification sur colonne Qiashredder Homogenizer (Qiagen) a montré une meilleure élimination des inhibiteurs, une filtration des débris insolubles, une diminution de la viscosité et par conséquent une suspension plus facile du culot de l'ARN final par rapport à une méthode chimique « méthode Baylor » (Sair et al., 2002).

Le kit PureLink Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen) ne nous a pas apporté entière satisfaction, une adaptation aux coquillages étant sans doute nécessaire. La concentration par le PEG peut constituer un des éléments limitant pour le kit en diminuant l'efficacité de la colonne.

Dans la méthode chimique, la lyse des virus par la protéinase K apparaît efficace. Le kit permet quant à lui, d'éliminer les inhibiteurs (Sair et al., 2002). Il pourrait être intéressant de tester une combinaison entre les deux méthodes avec (1) une étape de lyse par la protéinase K, au lieu de la lyse par le tampon du kit à base de guanidinium isothiocyanate, (2) une étape de centrifugation sur la colonne, (3) les différentes étapes de fixation- élution sur colonnes de silice permettant l'élimination des inhibiteurs. Une telle méthode permettrait également d'évaluer d'éventuelles pertes d'ARN viraux lors des différents passages sur colonne en comparaison avec la méthode chimique.

Sans remettre en cause l'efficacité de la protéinase K, afin de simplifier la méthode chimique, il pourrait être intéressant d'évaluer la pertinence de réactifs tels que le Trizol, RNazol ou Tri-reagent, mélanges de guanidinium isothiocyanate, de phénol et de chloroforme (Myrmel et al., 2004 ; Kingsley et al., 2002 ; Sair et al., 2002 ; Schwab et al., 2000 ; Arnal et al., 1999).

III- Evaluation de la contamination virale dans les échantillons de coquillages:

Les résultats de détection moléculaire des virus de l'hépatite A recherchés sur les 60 lots d'échantillons de mollusques bivalves prélevés à partir des sites de production tunisiens et à partir de la région de Tabarka ont montré qu'environ 28 % des échantillons sont contaminés. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans différents travaux analogues étudiés par des équipes de recherche Tunisiennes et européennes (Essebai-Elamri et Aouni, 2006 ; Desenclos et al., 1991 ; Le Guyader et al., 1994, 2000).

Le point notable dans cette étude est le pourcentage d'échantillons de coquillages positifs en hépatite A (28 %). Le VHA est endémique en Tunisie. Ce virus circule activement dans la population; dans une étude réalisée par Rezig et al., (2008), il a été montré qu'il y avait une endémicité encore très élevée du VHA dans notre pays puisque 84 % des enfants sont déjà atteints par le virus durant les cinq premières années de la vie. Par ailleurs, dans l'environnement, ce virus présente une résistance particulière aux traitements d'épuration (Schwartzbrod, 1992) et peut persister longtemps dans le milieu extérieur, dans l'eau, les aliments et sur les surfaces sèches (Deloince et al., 1994) expliquant ainsi la contamination fréquente des lots de coquillages.

De plus, la présence de l'ARN du VHA dans les échantillons de coquillages avec cette fréquence montre que ces mollusques sont collectés à partir d'environnement contaminé et que le taux de circulation du VHA est assez élevé. En effet, l'activité conchylicole, développée à proximité des côtes, est directement conditionnée par les facteurs environnementaux et la qualité du milieu marin. 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 gastroentérites ou des hépatites A et une menace pour le secteur conchylicole.

Les échantillons de mollusques bivalves contaminés par le VHA dans notre étude sont collectés principalement pendant la période hivernale. La contamination assez remarquable des lots de coquillages par le VHA peut être expliquée par le fait que les virus entériques se concentrent dans les tissus des mollusques bivalves préférentiellement pendant la période hivernale (Le Guyader et al., 2000).

L'analyse des résultats de la recherche moléculaire du VHA dans les échantillons de coquillages, a montré que les palourdes sont les mollusques bivalves les plus contaminés par le

VHA. Les palourdes se révèlent plus contaminés que les moules et les huitres probablement à cause de leur mode de vie. En effet, les palourdes vivent enfouies dans les sédiments tandis que les moules et les huitres vivent à la surface des sédiments. De ce mode de vie, les espèces fouisseuses concentrent des quantités importantes de virus (Le Guyader et al., 1994). De plus, la chair des moules est plus riche en inhibiteurs (De Leon et Jaykus, 1997).

Cette étude a pour objectif également d'évaluer l'ampleur de la contamination des zones de production de mollusques bivalves du Nord et du Sud de la Tunisie par le VHA. La recherche des VHA dans ces échantillons révèle que ces virus sont fréquents dans les prélèvements du Lac et du Canal de Tunis (respectivement 62% et 50%). Il est possible que le virus de l'hépatite A est endémique dans cette région. Les échantillons de coquillages collectés sur les cotes de Tabarka sont dépourvus de VHA. Il semble que ces mollusques sont collectés à partir d'environnement non contaminé.

Actuellement, les techniques d'amplification génomique constituent le seul outil d'analyse possédant une sensibilité suffisante pour détecter les faibles niveaux de contamination en virus dans les mollusques bivalves (Metcalf et al., 1995). Cependant, la présence d'ARN par RT-PCR n'indique pas nécessairement la présence de virus infectieux. D'après les études réalisées avec des entérovirus ou du VHA, la perte de pouvoir infectieux n'est pas toujours accompagnée de la perte du signal de RT-PCR mais la perte du signal d'amplification correspond à une perte d'infectiosité (Metcalf et al., 1995 ; Kingsley et Richards, 2003). En revanche, une étude a démontré que le signal généré par RT-PCR pour le VHA était bien corrélé à la présence de virus infectieux (Bhattacharya et al., 2004).

Par ailleurs, afin de réduire l'incidence de l'infection par le VHA, des campagnes de sensibilisation ciblées pour les consommateurs doivent être renforcées (Cuthbert, 2001), en montrant les procédures adéquates pour la préparation des aliments et leur consommation. En particulier pour les moules qui doivent être consommées après avoir été suffisamment cuites. Une importance particulière doit être également accordée à la durée et à la température de cuisson étant donné que la chair des mollusques bivalves peut protéger les virus de l'effet inactivant de la chaleur (Crocì et al., 1999). En outre, la vaccination contre l'hépatite A pour les personnes voyageant dans les zones à haute endémicité est fortement recommandée.

IV- Recherche d'une corrélation entre la contamination bactérienne et virale dans les coquillages:

Comme mentionné précédemment, la seule méthode permettant de détecter des virus entériques infectieux est fondée sur l'isolement sur cultures cellulaires *in vitro*. Or, c'est une technique lourde, longue, coûteuse et ne permet pas de détecter tous les virus du milieu hydrique. Certes il est possible de mettre en évidence l'acide nucléique viral par RT-PCR qui est une technique rapide, très sensible et relativement peu coûteuse. Cependant, la présence de génome dans un milieu hydrique ne peut pas, dans l'état actuel des connaissances, être considérée comme témoin de la présence d'un virus infectieux. Elle peut simplement signifier que les coquillages analysés ont été soumis à une contamination virale. Par ailleurs, compte-tenu de la densité virale et de l'état très souvent adsorbé des virus dans le milieu hydrique, il est nécessaire, avant de procéder à l'isolement, d'extraire les virus à partir des tissus de coquillages, ce qui contribue à la complexité de l'analyse. Vu la difficulté de détecter en routine les virus entériques infectieux, la surveillance virologique pourrait être fondée sur la détection d'organismes indicateurs de la présence de virus entériques humains. La surveillance des coquillages et des eaux conchylicoles est uniquement fondée sur des analyses bactériologiques, le paramètre virologique n'est jamais pris en compte. Le contrôle microbiologique est basé sur la recherche de coliformes fécaux (C.F.) ou d'*E. coli*. De plus, ces mollusques doivent être exempts de Salmonelles. En effet, d'après certaines études les Analyses des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* peuvent donner une valeur prédictive limitée pour les virus pathogènes tels que les entérovirus (Gerba, 1979), Norwalk-like virus (NLV) et l'hépatite infectieuse, causée par le virus de l'hépatite A (Desenclos et al., 1991).

Les analyses bactériologiques des 17 échantillons de coquillages contaminés par le VHA montrent une contamination par *E.coli* et une absence de Salmonelle. Cependant, la contamination de ces mollusques bivalves est variable d'un échantillon à un autre. En effet, 9 échantillons positifs pour le VHA révèlent une faible contamination par *E.coli* montrant une absence de corrélation entre la contamination virale et bactérienne.

Ces coquillages sont collectés à partir des zones qui sont principalement classées dans la catégorie B (< 4600 *E. coli*/100 g de la chair des mollusques bivalves) qui est considérée comme insalubre exploitable, à partir de laquelle les mollusques bivalves peuvent être exploités mais traités avant d'être commercialisés. D'après certains auteurs, le contrôle bactériologique peut être

suffisant pour apprécier la contamination virale d'origine humaine dans les sites où la pollution fécale est fortement impliquée (Le Guyader et al., 2000; Kingsley et al., 2002). Par ailleurs, certaines études ont montré des différences au niveau des taux de réduction des bactéries et des virus au cours des traitements des coquillages (Richards et al., 1983; Richards, 1988). Il apparaît que les coliformes thermotolérants et *E. coli* sont plus sensibles à l'action des désinfectants que les virus entériques (Schwartzbrod, 1995).

En effet, il existe des données analytiques (Gerba et al., 1979) et épidémiologiques (Stetler et al., 1992) qui montrent que des eaux et des mollusques bivalves, considérés comme conformes aux normes bactériologiques, contenaient des virus entériques humains.

B- Etude de l'effet des radiations gamma sur le génome viral du VHA:

De nombreuses études épidémiologiques ont démontré le rôle des aliments en particulier les coquillages dans des épisodes épidémiques d'hépatite virale A. Ainsi, les flambées alimentaires de ce virus soulignent la nécessité d'étudier des moyens permettant son inactivation (Dalton et al., 1996 ; Anon, 1997). En effet, bien que la chaleur a été considérablement utilisée avec succès pour inactiver plusieurs agents pathogènes, la cuisson ne permet pas de garantir l'innocuité des mollusques bivalves (Crocchi et al., 2005). Par exemple, une flambée d'hépatite A a été rapportée après la consommation d'huitres ayant subi différents types de cuisson (Mc Donnell et al., 1997). Par ailleurs, l'irradiation aux rayons gamma présente une méthode efficace pour la décontamination des aliments (OMS, 1981, 1994; Diehl, 1992; Patterson, 1993; Monk et al., 1995; Farkas, 1998). Le traitement par les rayonnements gamma a fait l'objet de plusieurs études pour l'inactivation des bactéries (Clavero et al., 1994; Monk et al., 1994; Monk et al., 1995; Farkas, 1998) et parasites (Sivinski, 1985; Dubey and Thayer, 1994) dans les aliments. Actuellement, plus de 40 types d'aliments dans plus de 32 pays sont soumis à ce type de traitement permettant ainsi la destruction des microorganismes et des parasites susceptibles de les contaminer et la prolongation de la durée de vie de produits alimentaires (Olszyna- Marzys, 1992; Farkas, 1998).

Par conséquent, nous nous sommes intéressés à déterminer l'effet des rayonnements gamma sur le génome du virus de l'hépatite A en exposant 6 échantillons de palourdes contaminés artificiellement par une suspension de selles VHA (titrées à 8×10^6 copies/g de selles) aux radiations gamma à des doses de 5, 10, 15, 20, 25 et 30 kGy à un débit de dose de 134

Gy/min. L'analyse de l'effet des radiations gamma a permis de mettre en évidence un effet dose-dépendant avec une disparition de l'ARN viral à partir de la dose 25 kGy. Ainsi, la RT-Nested-PCR a permis l'amplification des séquences de la région P1 du génome du VHA pour les doses 5, 10, 15 et 20 kGy . Ces séquences ne sont plus amplifiables pour les doses 25 et 30 kGy. Les résultats obtenus confirment le fait que les acides nucléiques constituent la principale cible des radiations gamma (Pouget et al., 2000). L'efficacité des radiations gamma dépend de plusieurs facteurs tels que la taille du virus, le type du produit alimentaire et la température d'exposition (Patterson, 1993 ; Farkas, 1998).

A notre connaissance, il n'existe pas de travaux qui ont porté sur l'étude de l'effet des radiations gamma sur l'ARN viral dans les aliments. Toutefois, il est à signaler qu'une étude réalisée par Pruss et al., (2002) a montré qu'à partir des doses 30 et 40 kGy les séquences du VIH n'étaient plus amplifiables par PCR . Ce qui témoigne de la résistance des virus aux radiations gamma. Des travaux antérieurs utilisant la culture cellulaire ont montré que l'application d'une dose de 2 kGy a permis l'inactivation de 90% de la population du VHA dans les huitres et les palourdes (Mallet et al., 1991). En outre, Bidawid et al., (2000) ont étudié l'effet des radiations gamma pour inactiver le VHA sur des échantillons de laitue et de framboises. Les valeurs de D_{10} du VHA trouvées sont comprises entre 2,7 et 3 kGy respectivement pour les laitues et les framboises.

L'utilisation de doses élevées modifie sensiblement certaines caractéristiques des denrées et les rend inacceptables pour le consommateur. En effet, les autorités internationales de salubrité et de sûreté ont approuvé la sûreté de l'irradiation pour tous les aliments jusqu'à une dose 10kGy. L'évaluation récente d'un groupe d'étude expert international désigné par l'Organisation des Aliments et de l'Agriculture (FAO), l'Agence Internationale d'Energie Atomique (AIEA) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a prouvé que les aliments traités selon les bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication à toute dose inférieure à 10 kGy est également sûre pour la consommation. Ainsi, afin de réduire la dose élevée (25 kGy), il est possible de combiner le traitement par ionisation avec un autre procédé.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Ce travail s'est développé selon deux axes de recherche : l'évaluation de la contamination par le virus de l'hépatite A des mollusques bivalves d'origine Tunisienne prélevés du milieu naturel et de zones de production avant l'étape de purification et l'étude de l'effet des radiations gamma sur le génome du VHA.

Pour la recherche des VHA dans les mollusques bivalves, nous avons procédé à la comparaison de 2 méthodes d'extraction et de concentration E1 et E2 quant à leur capacité de détection du génome du VHA par RT-Nested-PCR. En outre, nous avons évalué la pertinence d'un kit d'extraction des acides nucléiques par comparaison à une méthode chimique. L'extraction et l'élution du tissu entier des coquillages par le tampon glycine-NaCl utilisé pour la technique E1 présente des performances supérieures au tampon extrait de bœuf-NaCl exploité par la technique E2. Les résultats obtenus confirment le caractère inhibiteur de l'extrait de bœuf. L'étude de la pertinence du kit d'extraction des acides nucléiques a révélé une sensibilité inférieure par rapport à la méthode chimique.

L'application des techniques optimisées à la recherche des VHA dans les prélèvements de coquillages a montré qu'environ 28% des échantillons sont contaminés par le VHA. La recherche moléculaire de ce virus par RT-Nested-PCR dans les échantillons de coquillages a révélé que les palourdes sont les mollusques bivalves les plus contaminés par le VHA. Une large prévalence du VHA dans les prélèvements des mollusques bivalves collectés à partir de la zone de Tunis (Canal de Tunis et Lac de Tunis) a été notée. Les analyses bactériologiques des 17 échantillons de coquillages contaminés par le VHA ont révélé une contamination par *E.coli* et une absence de *Salmonelle*. Cependant, la contamination de ces mollusques bivalves est variable d'un échantillon à un autre. En effet, 9 échantillons positifs pour le VHA ont montré une faible contamination par *E.coli* témoignant d'une absence de corrélation entre la contamination virale et bactérienne.

La production de mollusques bivalves est d'une importance économique en Tunisie. La majeure partie de la production de ces mollusques est exportée vers l'Union Européenne. Les produits de la mer peuvent alors être responsables de la dissémination des virus via l'échange commercial. De plus, le marché local, en particulier les secteurs touristiques et hôteliers est également fort demandeur. Ainsi, pour la protection des consommateurs, il est indispensable de préserver la qualité des eaux côtières. Des efforts devraient donc être faits pour limiter les apports d'eaux contaminées à proximité des parcs conchylicoles en équipant

les stations d'épuration de systèmes efficaces de désinfection des eaux ou en recourant au lagunage et aux rejets hors des zones de production. Des systèmes d'alerte adaptés, prenant en compte la surveillance des épidémies virales dans la population et les évènements susceptibles de dégrader la qualité des eaux (fortes précipitations, dysfonctionnement des stations d'épuration), pourraient être mis en place.

Notre travail a permis d'évaluer le taux de contamination des mollusques bivalves tunisiens par le VHA dans le but d'améliorer les moyens de surveillance contribuant à une production conchylicole de qualité sanitaire satisfaisante. Pour aboutir à des résultats plus représentatifs, il serait intéressant d'augmenter le nombre de zones exploitées et l'effectif des échantillons. Des études ultérieures seraient nécessaires afin de réaliser le typage moléculaire des souches du VHA détectées dans les coquillages.

En outre, ce travail a permis d'étudier l'effet des rayonnements gamma sur le génome du virus de l'hépatite A. Nous avons mis en évidence un effet dose-dépendant avec une disparition de l'ARN viral à partir de la dose 25 kGy. Toutefois, l'évaluation récente d'un groupe d'étude expert international a prouvé que les aliments traités selon les bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication à toute dose inférieure à 10 kGy est également sûre pour la consommation. Ainsi, il est intéressant de combiner ce traitement avec un autre procédé afin de diminuer la dose de radiations gamma.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALOUINI M.D. and SOBSEY S.** 1995. Evaluation of an extraction precipitation method from recovering hepatitis A virus and poliovirus from hardshell Palourdes (*Mercenaria mercenaria*). *Wat. Sci. Technol.* 5-6: 465-469.
- ANONYMOUS** 1997. Hepatitis A associated with consumption of frozen strawberries - Michigan, March 1997. *Morb. Mortal Wkly. Rep.* 46: 288-289.
- ARNAL C., FERRE AUBINEAU V., BESSE B., MIGNOTTE B., SCHWARTZBROD L. and S. BILLAUDEL.** 1999. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. *J. Virol. Methods* 77: 17-26.
- ATMAR R.L., METCALF T.G., NEIL F.H. and ESTES M.K.** 1993. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *App. Environ. Microbiol.* 59: 631-635.
- ATMAR, R.L. and M.K. ESTES.** 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 15-37.
- ATMAR R.L., NEILL F.H., ROMALDE J.L., LE GUYADER F., WOODLEY C.M., METCALF T.G. and M.K. ESTES.** 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3014-3018.
- BARKIA I.** 2007. Effet de l'irradiation sur les plats cuisinés à base de pâte et de viande hachée : Cas de la Lasagne.; Projet de Fin d'Etudes. Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT).
- BARON D.** 1985. Recherche des virus hydriques humains dans l'environnement marin (eaux, sédiments, mollusques bivalves), et épidémiologie des viroses transmises par les mollusques bivalves. Thèse pharmacie.
- BEARD M.R., COHEN L., LEMON S.M. and MARTIN A.** 2001. Characterization of recombinant hepatitis A virus genomes containing exogenous sequences at the 2A/2B junction. *J. Virol.* 75:1414-26.
- BENSASSON, R.V., LAND E.J. and TRUSCOTT T.G.** 1993. Light and ionizing radiation: generation of excited states and radicals. *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine* p. 249-289, Oxford University Press, New York.
- BEURET C., BAUMGARTNER A. and SCHLUEP J.** 2003. Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2292-2297.
- BHATTACHARYA S.S., KULKA M., LAMPEL K.A., CEBULA T.A. and B.B. GOSWAMI.** 2004. Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. *J. Virol. Methods* 116: 181-187.

- BIDAWID S., FARBER J.M., SATTAR S.A.** 2000. Inactivation of hepatitis A (HAV) in fruits and vegetables by gamma irradiation. *Int. J. Food Microbiol.* 57: 91-97.
- BIDAWID S., FARBER J.M., SATTAR S.A.** 2001. Survival of hepatitis A virus on modified atmosphere-packaged (MAP) lettuce. *Food Microbiol.* 18: 95-102.
- BLAINE HOLLINGER F, and S. U. E.** 2001. Hepatitis A virus, p.799-840. In: David Knipe P, editor. *Fields Virology*, Fourth edition ed, vol.1.lippincott Williams and Wilkins.
- BOOM R., SOL C.J., SALIMANS M.M., JANSEN C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN P.M. and VAN DER NOORDAA. J.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503.
- BOSCH A., SANCHEZ G., PINTO R.M., ABAD F.X. POMMEPUY M. and LE GUYADER F.** 2003. Methods for virus detection in molluscs: validation and standardisation. *Molluscan Shellfish Safety*, Edts Villalba et al., pp. 333-340.
- BROWN E.A., DAY S.P., JANSEN R.W. and LEMON S.M.** 1991. The 5' non translated region hepatitis A virus RNA : secondary structure and elements required for translation in vitro. *J Virol.* 65: 5828-38.
- BUISSON Y and TEYSSOU R.** 1995. Les virus des hépatites à transmission féco-orale. *Med. Trop.* 55: 305-312.
- BUISSON Y.V., COURSAGET P. and VAN CUYCK-GRANDRE H.** 1994. Le diagnostic des hépatites virales transmises par voie féco-orale. *Med. Mal. Infect.*; 24: 604-609.
- CADET J., BELLON S, DOUKI T, FRELON S, GASPARUTTO D, MULLER E, POUGET JP, RAVANAT JL, ROMIEU A, SAUVAIGO S.** 2004. Radiation-induced DNA damage: formation, measurement, and biochemical features. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 23: 33-43.
- CLAVERO M.R.S., MONK J.D., BEUCHAT L.R., DOYLE M.P. and BRACKETT R.E.** 1994. Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonellae*, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2069-2075.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2004. Hepatitis surveillance report no.59.U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC., Atlanta, Ga.
- CETINKAYA. N, OZYARDIMCI. B, DENLI. HE, IC. E.** 2006. Radiation processing as a post-harvest quarantine control for raisins, dried figs and dried apricots. *Radiation Physics and Chemistry* 75: 424-431.
- CIANCIARA J.** 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in Poland and Eastern Europe. *Vaccine.* 18: 68-70
- CLIVER D.O., ELLENDER R. D. and SOBSEY M.D.** 1983. Methods to detect viruses in foods: testing and interpretation of results. *J. Food. Prot.* 46: 345-357.

- COHEN J.I., FEINSTONE S. and PURCELL R.H.** 1989. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J. Infect. Dis.* 160: 887-90.
- COURTOIS G.** 1993. Sources de contamination microbienne des coquillages. L'assainissement du milieu in ELZIERE-PAPAYANNI et al. Coquillages. Informations Techniques des Services Vétérinaires Français, Paris. pp.337-349.
- CRENN I., GOURMELON M. et LE CANN P.** 1999. Microbiologie sanitaire des sédiments. In ALZIEU A. et coll., Dragages et environnement marin. IFREMER. pp. 39-55.
- CROCI L., CICCOSZI M., DE MEDICI D., DI PASQUALE S., FIORE A., MELE A., TOTI L.** 1999. Inactivation of hepatitis A virus in heat treated mussels. *J. Appl. Microbiol.* 87: 884-888.
- CROCI L., DE MEDICI D., DI PASQUALE S. and TOTI L.** 2005. Resistance of hepatitis A in mussels subjected to different domestic cooking. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 139-144.
- CROCI L., LOSIA M.N., SUFFREDINI E., PAVONI E., DI PASQUALE S., FALLACARA F. and ARCANGELI G.** 2006. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern adriatic sea. *Int. J. Food Microbiol.* 114: 252-257.
- CROMEANS T.L., NAINAN O.V. and MARGOLIS H.S.** 1997. Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2460-2463.
- CUTHBERT J.A.** 2001. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev.* 14: 38-58.
- DALTON C.B., HADDIX A, HOFFMAN R.E. and MAST E.E.** 1996. The cost of foodborne outbreak of hepatitis A in Denver. *Colorado Arch. Intern. Med.* 156: 1013-1016.
- DE LEON R. and JAYKUS L.A.** 1997. Detection of the presence of bacteria and viruses in shellfish. pp 203-212. In manual of environment microbiology. Hurst C. J., Knudsen G. R., McInerney M. J., Stetzenbach L. D. et Walter M. V. (eds) ASM Press, Washington, D. C.
- DEBORD T and BUISSON Y.** 1998. Les hépatites virales d'origine entérique. *Bull. Soc. Pach. Exp.* 91: 428-431.
- DELOINCE R., LEVEQUE F., CRANCE J.M. and TREPO C.** 1994. Epidemiologic de l'hepatite virale A. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 18 : 354-361.
- DESENCLOS J.C.** 1996. Epidemiologie des risques toxiques et infectieux liés à la consommation de mollusques bivalves. *Rev. Epidemiol. Santé Publique* 44: 437-454.
- DESENCLOS J.C., KLONTZ K.C., WILDER M.H., NAIMAN O.V, MARGOLIS H.S. and GUNN R.A.** 1991. A multistate outbreak of hepatitis A caused by the consumption of raw oysters. *Am. J. Puplic Health* 81: 1268-1272.
- DEVER T.E., GLYNIAS M.J. and MERRICK W.C.** 1987. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing *Porc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 1814-1818.

- DIEHEL J.F.** 1990. Safety of irradiated foods. Marcel Dekker, INC. *New York and Basel. USA.* P.129.
- DIEHL J.F.** 1992. Food irradiation: is it an alternative to chemical preservation? *Food Addit. Contam.* 9: 409-416.
- Domingo E.C.** 1986. Virology and clinical manifestations of hepatitis virus infections. *Phil. J. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 7-11.
- DUBEY J.P. and THAYER D.W.** 1994. Killing different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *J. Parasitol.* 80: 764-767.
- EMERSON S. U., Y.K. HUANG C. MCRILL, M. LEWIS, and PURCELL R.H.** 1992. Mutation in both the 2B and 2C genes of hepatitis A virus are involved in adaptation to growth in cell culture . *J. Virol.* 66: 650-654
- ESSEBAI ELAMRI D. AND OUNI M.** 2006. Reverse transcriptase polymerase chain reaction detection of hepatitis A virus in naturally contaminated mussels (*Mytilus edulis*). *J. Food Safety* 27: 286-299.
- FARKAS J.** 1989. Microbiological safety of irradiated foods: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 9: 1–15.
- FARKAS J.** 1998. Irradiation as a method for decontaminating food: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 189–204.
- FIGLIORE AE.** 2004. Hepatitis A transmitted by food. *Clin. Infect. Disp.* 38: 705-715.
- FOODS J.** 1991. Interactions des rayonnements et de la matière. In : Vasseur J.P., Ionisation des produits alimentaires. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris. p. 161-181.
- FRAZIER W.C. and WESTHOFF D.C.** 1988. Preservation by radiation. In *Food Microbiology* (Fourth edition). Mc Graw-Hill. New York, NY. p.25.
- FUNKHOUSER A.W., PURCELL R.H., D'HONDT E., and EMERSON S.U.** 1994. Attenuated hepatitis A virus: genetic determinants of adaptation to growth in MRC-5 cells. *J. Virol.* 68: 148-57.
- GAILLOT D., TERVER D. FINANCE C. and SCHWARTZBROD L.** 1988. Improved method for contamination of mussels by polioviruses. *Int. J. Food. Microbiol.* 6: 333-339.
- GANTZER C, DUBOIS E, CRANCE J.M, BILLAUDEL S, KOPECKA H, SCHWARTZBROD L, POMMEPUY M and LE GUYADER F .** 1998. Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. *Oceanologica Acta* 21: 983-992.
- GARRAUD O, CONDUCTIER R, ODENT- MALAURE M, CARRIERES J, CHOPART P and BRENAS.** 2004. Silent transfusion- transmitted hepatitis A virus infection in an infant. *Transfusion* 44: 1121-1122.

- GERBA C.P., GOYAL S.M., LA BELLE, CECHI I. and BODGAN G.F. 1979.** Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of *Entéroviruses* in marine waters. *Am. J. publ. Health* 69: 1116-1119.
- GERBA C.P., GRAMOS D.M. and NWACHUKU N. 2002.** Comparative inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5167-5169.
- GOODMAN R.A. 1985.** Nosocomial hepatitis A. *Ann. Intern. Med.* 103: 452-454.
- GRINDE B, STENE-JOHANSEN K, SHARMA B, HOEL T, JENSENIUS M and 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.
- HAFLIGER D., GILGEN M., LUTHY J. and P. HUBNER. 1997.** Semi nested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 37: 27-36.
- HEIDELBAUGH N.D. and GIRON D.J. 1969.** Effect of processing on recovery of poliovirus from inoculated foods. *Food Sci.* 34: 239-241.
- HENNING K.J., BELL E, BRAUN J and BARKER ND. 1995.** A community-wide outbreak of hepatitis A: risk factors for infection among homosexual and bisexual men. *Is. J. Med.* 99: 132-136.
- HERRMANN J.E., HUDSON RW., PERRON-HENRY D.M., KURTZ J.B. and BIACKLOW N.R. 1988.** Antigenic characterisation of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus specific monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 161: 226-229.
- HOLLINGER B. and TICEHURST J.R. 1996.** Hepatitis A virus. pp 735-782. In Fields B.N., Knipe D.M. (Eds) *Fields Virology*, Sd Eds, Raven Press, New York.
- HUTIN Y.F.H., POOL V., CRAMER E.H. and NAINAN O.V. 1999.** A multistate foodborne outbreak of hepatitis A. *Engl. J. Med.* 340: 595-602.
- INTERNATIONAL CONSULTATIVE GROUP ON FOOD IRRADIATION (ICGFI, 1999).** A series of Fact Sheet, Facts about food irradiation.p.18.
- JACOBSEN KH and KOOPMAN J.S. 2004.** Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol. Infect.* 132: 1005-1022.
- JAMET J. 1992.** Les mollusques bivalves comme denrée animale. pp 29-35. In Lensen, J. (Ed) *mollusques bivalves et santé publique du risque à la prévention.* Ecole Nationale de Santé Publique. Rennes.
- JAYKUS L.A., DE LEON R. and SOBSEY M.D. 1993.** Application of RT-PCR for the detection of enteric viruses in oysters. *Wat. Sci. Technol.* 27: 49-53.
- JAYKUS L.A., DE LEON R. and SOBSEY M.D. 1995.** Development of a molecular method for the detection of enteric viruses in oysters. *J. Food. Prot.* 58: 1357-1362.

- JAYKUS L.A., DE LEON R. and SOBSEY M.D.** 1996. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2074-2080.
- JIA X.Y., SUMMERS D.F. and EHRENFELD E.** 1993. Primary cleavage of the HAV capsid protein precursor in the middle of the proposed 2A coding region. *Virology* 193: 515-519.
- KAMAT A., PINGULKAR K., BHUSHAN B., GHOLAP A. and THOMAS P.** 2003. Potential application of low dose gamma irradiation to improve the microbiological safety of fresh coriander leaves. *Food Control* 14: 529-537.
- KINGSLEY D.H. and RICHARDS G.P.** 2003. Persistence of hepatitis A virus in oysters. *J. Food Protec.* 66: 331-334.
- KINGSLEY D.H., MEADE G.K. and RICHARDS G.P.** 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.
- LANDRY E. F., VAUGHIN J. M., VICALE 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.
- LAZAROVA V., SAVOYE P. and JANEX M.L.** 1999. Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. *Wat. Sci. Technol.* 40: 203-213.
- LE CORRE F. et VENAILLE L.** 1989. Traitements ionisants. In : Microbiologie Alimentaire. Volume1, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, p. 345-368.
- LE GUYADER F., DUBOIS E., MENARD D. and POMMEPUY M.** 1994. Detection of hepatitis A virus, Rotavirus and Enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3365-3371.
- LE GUYADER F., NEIL F.H., ESTES M.K., MONROE S.S., ANDO T. and ATMAR R.L.** 1996. Detection and analyses of small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4268-4272.
- LE GUYADER F., HAUGARREAU L., MIOSSEC L., DUBOIS E. and POMMEPUY M.** 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3241-3248.
- LE SAUX J.C., POMMEPUY M. and CAPRAIS M.P.** 2003. Evaluation et adaptation d'un système de purification des coquillages pour l'élimination des virus entériques. Rapport final. IFREMER, OFIMER, CNC, Prat Ar Coum. Fév. 2003. 48 p.
- LEES D.** 2000. Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 81-116.
- LEMON S.M. and BINN L.N.** 1983. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.* 148: 1033-1039.

- Lemon, S. M., S. F. Chao, R. W. Jansen, L.N. Binn, and J. W. LeDuc.** 1987. Genomic heterogeneity among human and non human strains of hepatitis A virus. *J. Virol.* 61:735-42
- LEWIS G.D. and METCALF T.G.** 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A virus and human rotavirus, from oysters, water and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1983-1988.
- LIPP E.K. and ROSE J.B.** 1997. The role of seafood in food born diseases in the United States of America. *Rev. Sci. Thec. Off. Int. Epiz.* 16: 620-640.
- LOCARNINI S.A, FERRIS A.A., STOTT A.C. and GUST I.D.** 1974. The relationship between a 27-n virus like particle and hepatitis A as demonstrated by immune electron microscopy. *Interviol.* 4: 110-118.
- LU L., CHING K.Z., DE PAULO S., NAKANO T., SIEGL G., WEITZ M. And ROBERTSON B.H.** 2004. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J. Gen. Virol.* 85:2943-2952.
- MAHONEY F.J., FARLEY T.A., KELSO K.Y., WILSON S.A., HORAN J.M. and MC FARLAND L.M.** 1992. An outbreak of hepatitis A associated with swimming in a public pool. *J. Infect. Dis.* 165: 613- 618.
- MALLET J.C., BEGHIAN L.E., METCALF T.G. and KAYLOR J.D.** 1991. Potential of irradiation technology for improving shellfish sanitation. *J. Food Safety* 11: 231–245.
- MANNUCCI PM, GDOVIN S, GRINGERI A, COLOMBO M, MELE A and SCHINANIA N.** 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.
- MC DONNELL S., KIRKLAND K.B., HLADY W.G., ARISTEGUIETA C., HOPKINS R.S. MONROE, S.S and GLASS R.I.** 1997. Failure of cooking to prevent shellfish associated viral gastroenteritis. *Archives of Internal Medicine* 157: 111 –116.
- MELNICK J.L.** 1992. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine* 10: 24-26.
- METCALF T.G., MELNICK J.L. and ESTES M.K.** 1995. Environmental microbiology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology - a trip of over 50 years. *Ann. Rev. Microbiol.* 49: 461-487.
- MITCHELL J.R., PRESNELL M.W., AKIN E., CUMMITNS J.M. and LIU O.C.** 1966. Accumulation and elimination of poliovirus by the eastern oysters. *Am. J. Epid.* 84: 40-50.
- MONK J.D., BEUCHAT L.R. and DOYLE M.P.** 1995. Irradiation inactivation of foodborne microorganisms. *J. Food Prot.* 58: 197–208.
- MONK J.D., CLAVERO M.R.S., BEUCHAT L.R., DOYLE M.P. and BRACKETT R.E.** 1994. Irradiation inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in 10w- and high-fat frozen and refrigerated ground beef. *J. Food Prot.* 57: 969-974.

- MUNIAIN MUJICA I., GIRONES R. and LUCENA F.** 2000. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. *J. Virol. Meth.* 89: 109-118.
- MYRMEL M., BERG E.M., RIMSTAD E. and GRINDE B.** 2004. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl. Environ. Microbiol* 70: 2678-2684.
- NYGARD K., ANDERSSON Y., LINDKVIST P., ANCKER C., ASTEBERG I., DANNETUN E., EITREM R., HELLSTROM L., INSULANDER M., SKEDEBRANT L., STENQVIST K. et GIESECKE J.** 2001. L'importation de salade "roquette" partiellement responsable de l'augmentation de l'incidence de l'hépatite A en Suède, 2000-2001. *Eurosurveillance* 6: 151-153.
- OLSZYNA-MARZYS A.E.** 1992. Radioactivity and food preservation. *Nutrition Rev.* 50: 162–165.
- OMS.** 1981. Wholesomeness of irradiated food. Report of a joint *FAO/IAEA/WHO* expert committee in food irradiation. WHO Technical Report Series 659. Geneva, Switzerland.
- OMS.** 1994. Safety and nutritional adequacy of irradiated food. WHO Report. WHO, Geneva, Switzerland, p. 161.
- PATTERSON M.F.** 1993. Food irradiation and food safety. *Rev. Med. Microbiol.* 4: 151–158.
- POMMEPUY M. and LE GUYADER F.** 1998. Molecular approaches to measuring microbial marine pollution. *Curr. Opi. Biotech.* 9: 292-299.
- POUGET J.P., RICHARD M.J. and CADET J.** 2000. Thèse : Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : Mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées. *Université Paris XI, Faculté de Médecine Paris-Sud.*
- PRUSS A., KAO M., GOHS U., KOSCIELNY J., VON VERSEN R. and PAULI G.** 2002. Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. *Biologicals* 30: 125-133.
- REMITA S.** 2001. De la peroxydation lipidique radioinduite : les facteurs déterminants l'oxydabilité des lipides. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79: 144-153.
- REZIG D., OUNEISSA R., MHIRI L., MEJRI S., HADDAD-BOUBAKER S., BEN ALAYA N. and TRIKI H.** 2008. Seroprevalences of hepatitis A and E infections in Tunisia. *Pathol. Biol.* 56: 148-153.
- RIBAO C., TORRADO I., VILARINO M.L. and ROMALDE. J.L.** 2004. Assessment of different commercial RNA-extraction and RT-PCR kits for detection of hepatitis A virus in mussel tissues. *J. Virol. Meth.* 115: 177-182.
- RICHARDS G.P.** 1988. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. *J. Food Protect.* 51: 218-251.

- RICHARDS P.D., FLETCHER G.C., BUISSON D.H. and FREDERICKSEN S.**, 1983. Virus depuration of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in New Zealand. *N. Z. J. Sci.* 26: 9–13.
- ROMALDE J.L., ESTES M.K., SZUCS G., ATMAR R.L., WOODLEY C.M. and METCALF T. G.** 1994. In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1921-1926.
- ROQUE-AFONSO A.M., MACKIEWICZ V. and DUSSAIX E.** 2006. Le virus de l'hépatite A: actualités Hepatitis A virus: an update. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 21: 202–209.
- RUERCKERT R.R. and WINNERS E.** 1984. Systemic nomenclature of picornavirus proteins. *J. Virol.* 50:957-959.
- SAIR A.I., SOUZA D.H.D., MOE C.L. and JAYKUS L.A.** 2002. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J. Virol. Meth.* 100: 57-69.
- SCHWAB K.J., DE LEON R. and SOBSEY M.D.** 1995. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A and Norwalk virus by reverse transcription PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 531-537.
- SCHWAB K.J., NEILL F.H., FANKHAUSER R.L., DANIELS N.A., MONROE S.S., BERGMIRE SWEAT D.A., ESTES M.K. and ATMAR R.L.** 2000. Development of methods to detect "Norwalk-like viruses" (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: Application to a food-borne NLV outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 213-218.
- SCHWARTZBROD L.** 1992. Mollusques bivalves et sante publique, du risque à la prévention. Edition Ecole Nationale de la Santé Publique.
- SCHWARTZBROD L.** 1995. Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sewage sludge in agriculture and aquaculture. WHO ed. Genève.
- SDIRI K., KHELIFI H., BELGHITH K. And OUNI M.** 2006. Comparison of cell culture and RT-PCR for the detection of enterovirus in sewage and shellfish. *Pathol. Biol.* 54: 280-284.
- SEVERINI G.M., MESTRONI L., FALASCHI A., CAMERINI F. and GRACE M.** 1993. Nested Polymerase Chain Reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1345–1349.
- SHENGFU Y., YUANHU Z., BINGSON C. and SUQIN Z.** 1993. Effects of cobalt-60 γ -ray irradiation on fresh-keeping and storage of kiwi fruits. *Radiation physics and Chemistry* 42: 339-334.
- SHIEH Y.C., BARIC R.S., WOODS J.W. and Calci K.R.** 2003. Molecular surveillance of enterovirus and Norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7130-7136.
- SIDDIQI M.A. and BOTHE E.** 1987. Single and double strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. *Radiat. Res.* 112: 449-463.

- SIVINSKI J.S.** 1985. Control of trichinosis by low-dose irradiation of pork. *Food Irrad. Newsl.* 9: 8.
- SOBSEY M.D., CARRICK R.J. and JENSEN H.R.** 1978. Improved methods for detecting enteric viruses in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 121-128.
- STETLER R.E., MORRIS M.E. and SAFFERMANN R.S.** 1992. Processing procedures for recovering enteric viruses from wastewater sludges. *J. Virol. Methods* 40: 67-76.
- STETLER R.E., WALTRIP S.C. and HURST C.J.** 1992. Virus removal and recovery in the drinking water treatment strain. *Wat. Res.* 26: 727-731.
- SUGIEDA M., NAKAJIMA K. and NAKAJIMA S.** 1996. Outbreak of Norwalk like virus associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiol. Infect.* 116: 339-346.
- SULLIVAN R., FASSOLITIS A.C., LARKIN E.P., READ Jr. R.B. and PEELER J.T.** 1973. Inactivation of thirty viruses by gamma radiation. *Appl. Microbiol.* 22: 61-65.
- SUNEN E., CASAS N., MORENO B. and ZIGORRAGA C.** 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.
- TAKAHASHI T.** 2004. Trend of radiation sterilization business in Japan and how to develop new applications. *Radiation Physics and Chemistry* 71: 541-544.
- TRAORE O., BELLIOU G., MOLLAT C., PILOQUET H., CHAMOIX C., LAVERAN H., MONROE S.S. and BILLAUDEL S.** 2000. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *J. Clin. Virol.* 17: 151-158.
- TSAI Y.L., TRAN B. and PALMER C.J.** 1995. Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 363-366.
- TUBIANA M., DUTREIX M. and WAMBERSIE A.** 1986. Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et les chromosomes. In Radiobiologie, Hermann, Paris. p. 33-71.
- VASSEUR J.P.** 1991. Ionisation des produits alimentaires. Collection Sciences et Techniques Alimentaires. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris. pp18-20.

ANNEXES

1. Tampon 1: Glycine 0,2 M- 0,15 M NaCl, pH 9,5

Réactifs	Quantité en (g)
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	15,02
Chlorure de sodium (NaCl)	8,766
Eau purifiée stérile (H ₂ O)	Qsp11
Agitation magnétique, ajustement du pH à 9,5 avec une solution NaOH,	
Autoclavage	

2. Tampon 2 : Extrait de bœuf 7%-NaCl (0,3 M), pH 7,5

Réactifs	Quantité en (g)
Extrait de bœuf	70
Chlorure de sodium (NaCl)	10
Eau purifiée stérile (H ₂ O)	Qsp11
Agitation magnétique, ajustement du pH à 7,5 avec une solution de HCl,	
Autoclavage	

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

Réactifs	Quantité en (g)
Chlorure de sodium (NaCl)	8
Chlorure de potassium (KCl)	0,2
Orthophosphate di-sodium (Na ₂ HPO ₄)	1,44
Orthophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	0,24
Eau distillée	800 ml
Ajustement de pH à 7,2 avec du HCl	
Eau distillée	Qsp 1000 ml
Autoclavage	

4. Polyéthylène glycol PEG 6000 (50%)

Réactifs	Quantité en (g)
$\text{CH}_2\text{OH}(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{-CH}_2\text{OH}$	500
Chlorure de sodium (NaCl)	75
Eau ultra pure stérile	Qsp1l

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

Réactifs	Volumes (μl)
Tris-HCL pH 7,5	40
CaCl_2	20
Glycérol	500
Eau ultra-pure stérile	440

6. Acétate de sodium 3 M, pH 5,5

Réactifs	Quantité (g)
$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$	40,8
Eau distillée	80 ml
Ajuster de pH à 5,5 avec HCl	
Eau distillée	Qsp 100 ml
Autoclavage	

7. TBE 10x, pH 8,3

Réactifs	Quantité
Tris base	108 g
Acide Borique	56 g
EDTA (0,5 M, pH 8)	20 ml
Eau distillée stérile	Qsp 1 l

8. Préparation des réactifs du Kit PureLink Micro- to-Midi total RNA purification system (Invitrogen):

Tampon de Lyse :

- 10 µl de β-mercapthéthanol
- 1 ml de la solution de lyse

Tampon de lavage :

Ajouter 60 ml d'éthanol 100% au tampon de lavage II

9. Préparation des réactifs du Kit QIAmp Viral RNA (Qiagen) :

Tampon de lyse AVL-RNA carrier :

- Ajouter 310 µl du tampon AVE à 310 µg de RNA-carrier lyophilisé
- Selon le nombre d'échantillons à analyser, les volumes d'AVL et de RNA-AVE sont choisis pour la préparation de la solution de lyse d'après les équations suivantes :

$$n * 0,56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} * 10 \text{ µl/ml} = z \text{ ml}$$

n : nombre d'échantillons à analyser

y : le volume à prélever à partir du tampon AVL

z : le volume à ajouter au tampon AVL

Tampon de lavage :

AW1 : Ajouter 125 ml d'éthanol 100% au tampon AW1

AW2 : Ajouter 160 ml d'éthanol 100% au tampon AW2

10. Préparation des milieux de culture :

Eau peptonée tamponnée :

Tryptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
pH 7,2	

Sélénite-Cystine – Bouillon :

Tryptone :	5 g
Lactose :	4 g
Phosphate disodique :	10 g
Sodium sélénite :	4 g
L-Cystine :	0,010g
pH: 7	

Rappaport Vassiliadis soja (RVS) – Bouillon :

Peptone papaïnique de soja :	4,50 g
Chlorure de sodium :	7,20 g
Phosphate monopotassique :	1,26 g
Phosphate dipotassique :	0,18 g
Chlorure de magnésium anhydre :	13,40 g
Vert de Malachite (oxalate) :	36 mg.

pH 5,2.

Hektoen – Gélose :

Peptone pepsique de viande :	12,0 g
Extrait autolytique de levure :	3,0 g
Lactose :	12,0 g
Saccharose :	12,0 g.
Sels biliaires :	9,0 g
Salicine :	2,0 g.
Sodium chlorure :	5,0 g
Sodium thiosulfate :	5,0 g
Citrate ferrique ammoniacal :	1,50 g
Bleu de bromothymol :	0,065 g
Fuschine basique :	0,040 g
Agar agar :	13,5 g

pH: 7,6.

SS Agar-Gélose :

Peptone pancréatique de viande :	5,0 g
Extrait de viande :	5,0 g
Lactose :	10,0 g
Sels biliaires :	8,5 g
Sodium citrate :	10,0 g
Sodium thiosulfate :	8,5 g
Citrate de fer ammoniacal :	1,0 g
Vert brillant :	0,33 mg
Rouge neutre :	25 mg
Agar agar :	15,0 g

pH: 7,0.

Kligler :

Tryptone :	20,0 g
Extrait autolytique de levure :	3,0 g
Extrait de viande :	3,0 g
Glucose :	1,0 g
Lactose :	10,0 g
Sodium chlorure :	5,0 g
Sodium thiosulfate :	0,5 g
Citrate ferrique ammoniacal :	0,5 g
Rouge de phénol :	0,025 g

Agar agar : 15,0 g
pH : 7,4.

Glutamate-Bouillon :

Glutamate de sodium : 6,35 g
Formiate de sodium : 0,25 g
L (-) cystine : 20 mg
Acide L (-) aspartique : 24 mg
L (+) arginine (chlorhydrate) : 24 mg
Lactose : 10,00 g
Thamine : 1 mg
Acide nicotinique : 1 mg
Acide pantothénique : 1 mg
Sulfate de magnésium : 0,1 g
Citrate ferrique ammoniacale : 10 mg
Chlorure de calcium : 10 mg
Phosphate dipotassique : 0,9 g
Pourpre de Bromocrésol : 10 mg
pH : 6,9

TBX-Gélose :

Tryptone 20,0 g
Sels biliaire n°3 1,5 g
BCIG 75 mg
Agar bactériologique type 9,0 g
pH 7,2.

Tryptone sel-Bouillon :

Tryptone 1,0 g
Chlorure de sodium 8,5 g
pH 7.