

---

# RECHERCHE DU PARVOVIRUS B19 DANS LES MANIFESTATIONS ARTICULAIRES CHRONIQUES EN MILIEU HOSPITALIER TUNISIEN

F. REGAYA<sup>1\*</sup>, R. KHELIFA<sup>3</sup>, R. ZOUARI<sup>2</sup>, M. KCHIR<sup>2</sup>, M. KAROUF<sup>1</sup> & R. ESSID<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Banque du sang, Hôpital Charles Nicolle à Tunis.

<sup>2</sup> Service de Rhumatologie, Hôpital Charles Nicolle à Tunis.

<sup>3</sup> Service des Laboratoires, Hôpital Habib Thameur à Tunis.

\* Auteur à contacter

---

## RESUME

L'infection par le Parvovirus B19 est souvent associée à des manifestations articulaires aiguës ou chroniques suggérant un rôle étiologique du virus dans ces pathologies. Dans ce travail, nous avons recherché une corrélation possible entre l'infection par le Parvovirus B19 et certains types de rhumatismes inflammatoires chroniques. Pour cela, les marqueurs sérologiques de ce virus ont été dépistés chez une population de 100 patients. Tous ces patients étaient tunisiens, appartenant aux deux sexes, consultants ou hospitalisés dans le service de Rhumatologie à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis. Une centaine de donneurs de sang ont été pris comme population témoin. Des essais immunoenzymatiques spécifiques de type ELISA (Biotrin International, France) ont été utilisés pour la détection des IgM et des IgG spécifiques. D'autre part, l'ADN du Parvovirus a été recherché par PCR nichée dans le liquide synovial de 14 patients. Les résultats obtenus indiquent que les IgG spécifiques au virus étaient présentes dans les sérums de 80,7% des patients et 43% des témoins. Par contre, aucun des sérums testés n'a présenté d'IgM spécifiques au virus. Des prélèvements de liquide synovial ont pu être obtenus à partir de 14 patients positifs pour les IgG anti-Parvovirus B19 et ont été testés pour la présence d'ADN viral. Aucun de ces prélèvements n'a été trouvé positif. Les résultats de notre étude sérologique renforcent l'hypothèse d'une association entre l'infection à Parvovirus B19 et les pathologies articulaires. Toutefois, l'absence d'ADN viral détectable dans le liquide synovial des patients séropositifs testés indique un rôle plutôt indirect du virus dans ces pathologies.

**Mots clefs :** Parvovirus B19, Rhumatismes inflammatoires chroniques, ELISA, PCR nichée.

---

## ABSTRACT

Parvovirus B19 infection is often associated with acute and chronic joint diseases thus suggesting an etiologic role for the virus in these pathologies. In this work, we looked for a possible correlation between Parvovirus B19 infection and certain types of chronic inflammatory rheumatismal affections for serological markers of Parvovirus B19 infection. All patients were Tunisians of both sexes, who presented at the service of Rheumatology of the Charles Nicolle Hospital, Tunis. One hundred blood donors were taken as controls. Specific Immunoenzyme Assays of the ELISA type (Biotrin International, France) were used to detect anti-Parvovirus IgG and IgM. On the other hand, viral DNA was sought by nested PCR in synovial fluid from 14 patients. The data obtained indicate that specific anti-Parvovirus B19 IgG was detectable in the sera of 80,7% of patients and 43% of controls. In contrast, none of the sera was found positive for specific IgM antibodies. Synovial fluid samples could be collected from 14 anti-Parvovirus B19 seropositive patients and were tested for the presence of viral DNA. None of the samples was found positive. The results of our serological study reinforce the hypothesis that Parvovirus B19 infection is associated with rheumatismal joint affections. However, the lack of detectable viral DNA in synovial fluid of the tested seropositive patients points to an indirect role of the virus in these joint disorders.

**Key words:** Parvovirus B19, chronic inflammatory Rheumatismal affections, ELISA, nested PCR.

## INTRODUCTION

Le Parvovirus B19 continue à poser d'importants problèmes épidémiologiques, un peu partout dans le monde. D'après certaines études<sup>1,2,3</sup>, il y aurait une relation entre l'infection par le Parvovirus B19 et certaines manifestations articulaires aiguës ou chroniques. Une symptomatologie articulaire a été retrouvée dans 70% des cas d'infection par ce virus chez l'adulte et dans 10% des cas chez l'enfant<sup>3</sup>.

Chez l'enfant, les principales manifestations rhumatologiques se présentent sous forme d'arthralgies à évolution rapide et sans complications, apparaissant dans l'organisme vers le cinquième jour après l'infection.

Chez l'adulte, les manifestations rhumatologiques associées à l'infection par le Parvovirus B19 sont riches et variées, et on note un syndrome pseudo-grippal, des myalgies qui disparaissent rapidement<sup>4</sup>, et le plus souvent des arthrites aiguës<sup>5,6</sup>, avec une fréquence de l'ordre de 60%.

L'infection par le Parvovirus B19 a été également retrouvée lors du passage de la polyarthrite rhumatoïde aiguë à la polyarthrite rhumatoïde chronique, ce qui a suggéré que ce virus serait l'agent étiologique de la polyarthrite rhumatoïde<sup>5,7</sup>. Les mécanismes d'une telle étiologie virale sont encore inconnus, mais pourraient impliquer soit une pathologie auto-immune<sup>8,9,10</sup>, soit une infection articulaire<sup>11,12</sup>.

Il est important d'élargir les études épidémiologiques à d'autres types de manifestations articulaires et à d'autres populations afin de vérifier l'association du parvovirus B19 avec ces maladies articulaires. Ceci permettrait une meilleure orientation des recherches sur les mécanismes immunologiques et virologiques capables de contribuer au développement des arthropathies.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle du Parvovirus B19 dans l'étiologie de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres affections rhumatismales articulaires chroniques.

Nous avons effectué une étude sérologique et moléculaire pour la recherche de l'infection au Parvovirus B19 chez une population de patients Tunisiens atteints de ces différentes maladies.

## POPULATIONS ET METHODES

### 1- POPULATIONS

Notre étude a été conduite sur une centaine de patients des deux sexes, d'âges variables, consultants ou hospitalisés dans le service de Rhumatologie de l'hôpital Charles Nicolle à Tunis et classés dans différents tableaux cliniques de rhumatisme inflammatoire chronique (Tableau I).

Les différents cas étaient répartis comme suit : polyarthrite rhumatoïde<sup>5,5</sup>, spondyloarthrite<sup>20</sup>, monoarthrite<sup>8</sup>, lupus érythémateux<sup>6</sup>, oligoarthrite<sup>6</sup>, arthrite chronique juvénile<sup>5</sup>. La population témoin est constituée de 100 donneurs de sang, des deux sexes, fidélisés à la banque du sang de l'hôpital Charles Nicolle. L'âge moyen de la population cible était de 41 ans et celui de la population témoin de 42 ans. Les sex ratio (masculin /féminin) étaient de 0,72 et de 0,66 pour les groupes cible et témoin, respectivement.

### 2. METHODES

#### 2-1 PRÉLÈVEMENTS

Les prélèvements de sang ont été effectués par ponction veineuse et les sérums correspondants ont été aliquotés puis conservés à -20°C pour l'analyse sérologique.

**Tableau I - Caractéristiques des populations étudiées**

Type d'arthropathie	Nombre de patients	Fréquence(%)	Age (Années)		Sexe	
			Intervalle	âge moyen	Masculin	Féminin
Polyarthrite rhumatoïde	55	55	16 à 72	46	17	38
Spondyloarthrite	20	20	16 à 61	38	14	6
Monoarthrite	8	8	18 à 60	37	6	2
Lupus érythémateux	6	6	21 à 78	51	0	6
Oligoarthrite	6	6	29 à 51	40	3	3
Arthrite chronique juvénile	5	5	18 à 38	31	2	3
Total des patients	100	100	16 à 78	41	42	58
Témoins	100	100	16 à 55	42	40	60

Le liquide synovial a été extrait des articulations arthritiques par ponction stérile. Ce liquide a été par la suite aliquoté et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour l'étude moléculaire.

## 2-2 RECHERCHE DES IgG ET IgM SPÉCIFIQUES AU PARVOVIRUS B19

La recherche des anticorps spécifiques au Parvovirus B19 a été effectuée à l'aide de deux kits commerciaux : B19 IgM EIA et B19 IgG EIA<sup>13</sup> (Biotrin International, France).

## 2-3 RECHERCHE DES FACTEURS RHUMATOÏDES

Les facteurs Rhumatoïdes (FR) ont été détectés à l'aide d'un test d'agglutination de particules de latex sensibilisées par des gamma-globulines humaines (Rhumatest, Pasteur production, Tunis, Tunisie).

## 2-4 RECHERCHE DE L'ADN VIRAL

L'ADN viral a été recherché par PCR nichée (Nested PCR) dans le liquide synovial de 14 patients. Dix de ces patients étaient atteints de polyarthrite

un contrôle positif constitué par une dilution appropriée d'ADN du Parvovirus B19 provenant du liquide amniotique d'un cas d'anasarque foeto-placentaire (Professeur Hédi Rzig, centre de néonatalogie la Rabta, Tunis). Nous avons aussi inclus l'ADN de la lignée cellulaire lymphoblastoïde Raji comme contrôle négatif pour l'ADN viral, et un blanc sans ADN cible. Le seuil de sensibilité de cette PCR nichée a été estimé à environ 50 à 100 équivalent de génome /ml. En plus, pour nous assurer de la bonne qualité de nos extraits d'ADN, chacun de ces extraits a été soumis à une amplification contrôle effectuée sur le gène de la  $\beta$ -globine en présence du couple d'amorces BG1 (5'-CCATCTATTGCTTACATTTGCT-3') et BG2 (5'-TCTGTCTCCACATGCCAGTTT-3') de 22 bases chacune, qui flanquent une séquence de 250 pb de ce gène. Toutes les amplifications ont été effectuées dans un thermocycleur modèle 9600, Perkin Elmer Applied Biosystems, selon le programme suivant :

Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Extension finale
94°C/5min	94°C/45sec	55°C/30s	72°C/1min	72°C/7min
1 étape	2 5 c y c l e s			1 étape

Rhumatoïde, deux souffraient de monoarthrite et deux d'oligoarthrite. Après extraction de l'ADN génomique de ces liquides par une méthode standard au phénol-chloroforme, la PCR est conduite selon la procédure d'Edison<sup>14</sup> modifiée par Kerr et al, (1995)<sup>5</sup>. La première amplification est effectuée en présence d'un couple de primers

P1 (5'-AATACACTGGTTTTATGGGCCGCC-3') et P6 (5'CATTGCTGGTTATAACCACAGGT-3'), oligonucleotides de 24 bases chacun. Ces primers délimitent une séquence de 284 pb (nt 1399- 1682) dans la région codant pour la protéine non structurale NS1 du virus. Au terme de cette première amplification, 2  $\mu\text{l}$  de chaque amplifiat sont utilisés pour une deuxième amplification par des primers internes P2 (5'-AATGAAACTTTCCATTTAATGATGTAG-3') et P5 (5'-CTAAAATGGCTTTTGCAGCTTCTAC - 3') , de 28 et 25 bases respectivement.

Ces primers délimitent une séquence de 103 pb (nt 1498- 1600) à l'intérieur de la première séquence de 284 pb de la région NS1 du virus.

Dans chaque série d'amplification, nous avons inclus

## 2-5 ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique des résultats sérologiques a été effectuée utilisant le test du  $\chi^2$ .

## RESULTATS

### 1- ANALYSE SEROLOGIQUE

Afin de rechercher une éventuelle corrélation entre l'infection au Parvovirus B19 et certains types de rhumatismes inflammatoires chroniques, nous avons dépisté les marqueurs sérologiques de ce virus dans une population de 100 patients Tunisiens atteints de différentes affections rhumatismales chroniques.

Sur un total de 100 sérums, 22 étaient positifs pour le facteur rhumatoïde et ont été écartés. Les autres échantillons (78) ont été testés pour les anticorps anti-Parvovirus B19 et 63 parmi eux (80.7%) ont été trouvés positifs pour les IgG spécifiques. Aucun de ces sérums n'a été trouvé positif pour les IgM (Tableau II).

Dans la population témoin (100 donneurs de sang) aucun sérum n'a été trouvé positif pour les IgM, et 43 (43%) étaient positifs pour les IgG.

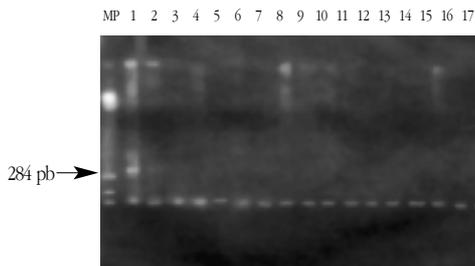
**Tableau II - Prévalence des anticorps anti-Parvovirus B19 dans les populations étudiées**

Populations	Nombre de sérums testés	Nombre de sérums positifs pour les anticorps anti-B19		Prévalence des anticorps anti-B19 (%)	
		IgG	IgM	IgG	IgM
Patients	78	63	0	80,7	0
Témoins	100	43	0	43	0

La différence entre ces prévalences d'IgG observées au niveau des populations cible et témoin était statistiquement significative à 5% ( $\chi^2=27,33$ ). La répartition des patients séropositifs pour les IgG selon la pathologie est représentée dans le tableau III : 35 (77%) sur 45 cas de polyarthrite rhumatoïde, 17 (99%) sur 18 cas de spondyloarthrite, 5 (100%) sur 5 cas de monoarthrite, 2 (66%) sur 3 cas de lupus érythémateux, 2 (66%) sur 3 cas d'arthrite chronique juvénile, et 2 (50%) sur 4 cas d'oligoarthrite.

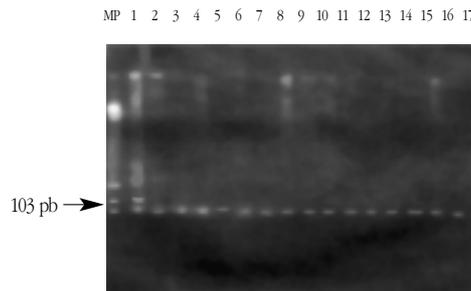
**2- ANALYSE MOLECULAIRE**

Nous avons pu collecter du liquide synovial chez 10 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, 2 atteints d'oligoarthrite et 2 de monoarthrite. Tous ces patients étaient séropositifs pour les IgG anti-B19. Aucun de ces liquides synoviaux n'a été trouvé positif pour l'ADN du Parvovirus B19, par PCR nichée (Figures 1 et 2). Par contre, nous avons pu amplifier la séquence de 250 pb du gène de la  $\beta$ -globine (house-keeping gene) dans tous les échantillons (figure 3).



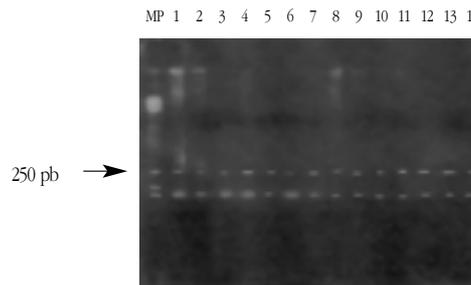
**Figure 1- Première phase de la PCR nichée en présence des primers externes P1, P6**

MP : Marqueur de poids moléculaire (50 pb Boehringer)  
 1 : Contrôle positif  
 2 : Contrôle négatif  
 3-12 : Amplifiats de malades atteints de polyarthrite rhumatoïde.  
 13 et 14 : Amplifiats de malades atteints d'oligoarthrite.  
 15 et 16 : Amplifiats de malades atteints de monoarthrite.  
 17 : Blanc sans ADN.



**Figure 2- Deuxième phase de la PCR nichée en présence des primers internes P2, P5**

MP : Marqueur de poids moléculaire (50 pb Boehringer).  
 1 : Contrôle positif.  
 2 : Contrôle négatif.  
 3-12 : Amplifiats de malades atteints de polyarthrite rhumatoïde.  
 13 et 14 : Amplifiats de malades atteints d'oligoarthrite.  
 15 et 16 : Amplifiats de malades atteints de monoarthrite.  
 17 : Blanc sans ADN.



**Figure 3- Amplification d'une séquence de 250 pb du gène de la  $\beta$ -globine en présence des primers spécifiques BG1 et BG2.**

MP : Marqueur de poids moléculaire (50 pb boehringer).  
 Pistes (1 à 10)  $\Rightarrow$  Malades atteints de polyarthrite rhumatoïde.  
 Pistes (11 et 12)  $\Rightarrow$  Malades atteints d'oligoarthrite.  
 Pistes (13 et 14)  $\Rightarrow$  Malades atteints de monoarthrite.

## DISCUSSION

Différents tableaux cliniques d'arthrites aiguës ou chroniques semblent être associés avec l'infection au Parvovirus B19<sup>4</sup>, mais le rôle du virus dans le développement de ces arthropathies n'est pas encore bien établi. Le Parvovirus B19 a été pendant longtemps incriminé dans l'étiologie de l'arthrite rhumatoïde<sup>5</sup>.

Toutefois, des études plus poussées ont montré par la suite l'absence d'association du virus avec cette maladie et ont suggéré que ce virus provoquerait des symptômes difficiles à distinguer de l'arthrite rhumatoïde<sup>12, 15, 16</sup>.

Dans ce travail, nous nous sommes proposés de vérifier l'existence d'une association entre l'infection au Parvovirus B19 et certaines manifestations rhumatologiques chroniques.

Pour cela, nous avons d'abord recherché les marqueurs sérologiques du virus (IgM et IgG anti-Parvovirus B19) dans une population de 100 patients atteints de différentes arthropathies et dans une population témoin constituée par 100 donneurs de sang. Vingt deux sérums ont été écartés suite à la détection du facteur rhumatoïde pouvant interférer avec les tests immunoenzymatiques utilisés. Nos résultats indiquent que 80.7% des sérums qui ont pu être testés étaient positifs pour les IgG anti-Parvovirus B19 contre seulement 43% de positifs dans le groupe témoin. Ces prévalences sont similaires à celles rapportées par d'autres<sup>13</sup> pour des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. La prévalence de l'infection au Parvovirus B19 apparaît donc significativement plus élevée dans le groupe des patients, ce qui suggère la possibilité d'une association entre le virus et les arthropathies étudiées. Il serait intéressant de noter que la prévalence des IgG anti-Parvovirus B19 était variable en fonction du type d'arthropathie (tableau III).

La prévalence la plus élevée a été observée dans les cas de spondyloarthrite (99%) et de monoarthrite (100%). Dans les situations de polyarthrite rhumatoïde la prévalence des IgG spécifiques au virus était seulement de 77%. Une association du Parvovirus B19 avec la spondyloarthrite et la monoarthrite serait plausible, mais une telle conclusion nécessite d'autres études utilisant des effectifs beaucoup plus élevés. L'absence d'anticorps de type IgM dans les deux groupes étudiés élimine une infection aiguë par le Parvovirus B19.

La présence seulement d'anticorps du type IgG peut correspondre à une infection ancienne complètement résolue, mais n'exclue pas la possibilité d'une répllication virale persistante dans les tissus infectés. En effet, d'après certaines études<sup>16, 17</sup>, une persistance constante d'ADN viral a été identifiée dans le tissu synovial de sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde, avec une sérologie positive pour les IgG et négative pour les IgM spécifiques au Parvovirus B19.

A fin de vérifier une telle possibilité, nous avons essayé de détecter l'ADN viral par PCR nichée dans le liquide synovial de dix patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, de deux patients atteints d'oligoarthrite et de deux autres atteints de monoarthrite.

Les deux paires d'amorces utilisées dans cette PCR ont été choisies dans une région hautement conservée du génome viral, située au milieu du gène NS1 (nt 1390- 1794)<sup>18</sup>.

Ceci permet un maximum d'appariement des amorces avec l'ADN viral en dépit des variations potentielles que peut présenter le génome viral dans les échantillons testés. Aucun des prélèvements testés n'a été positif pour l'ADN viral dans les limites de sensibilité de la PCR utilisée (50 à 100 équivalents de génome/ml). Ceci pourrait s'expliquer par :

**Tableau III - Prévalence des IgG anti-Parvovirus B19 dans les différentes formes d'arthropathies**

POPULATIONS	NOMBRE DE SERUMS	SERUMS POSITIFS POUR LES IgG ANTI-B19	
		NOMBRE	FREQUENCE (%)
Polyarthrite Rhumatoïde	45	35	77
Spondyloarthrite	18	17	99
Monoarthrite	5	5	100
Lupus érythémateux disséminé	3	2	66
Arthrite chronique juvénile	3	2	66
Oligoarthrite	4	2	50

- l'absence d'infection persistante, et il s'agirait dans ce cas d'infections anciennes complètement résolues, ou

- les quantités d'ADN viral en présence seraient trop faibles pour être détectées par la PCR utilisée.

Les présents résultats ne permettent pas de trancher entre ces deux éventualités, d'autres investigations seraient souhaitables.

A la lumière des présents résultats, il semble que l'infection au Parvovirus B19 soit associée à différents types d'arthropathies chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, la spondyloarthrite et la monoarthrite. Si d'autres études plus poussées confirment l'absence d'ADN viral dans le liquide synovial de tels patients, il faudrait alors penser au Parvovirus B19 en tant que facteur déclencheur d'une pathologie auto-immune qui peut évoluer, après résolution de l'infection aiguë, vers différents types d'arthropathies chroniques.

## REFERENCES

### BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1- **A.D. Woolf, G.V. Campion, A. Chishick et al.** (1989). Clinical manifestations of human Parvovirus B19 in adults. *Arch Intern Med*; **149** : 1153-1156.
- 2- **M. Deband.** (1992). Manifestations rhumatologiques des infections à Parvovirus B19. *L'actualité rhumatologique* : 37-47
- 3- **S. J. Naides et al.** (1992). Parvovirus B19 infection. *Rheumatic Diseases Clinics North America* ; **19** : 457-475
- 4- **S. J. Naides, E. J. Howard, Swach. N. J.** (1992). Rheumatologic manifestations of human Parvovirus B19 infection in adults. *Arthritis Rheum* ; **33** : 1279- 1309
- 5- **J. R. Kerr, J. P. Cartron, M. D. Curran, J. E. Morre** (1995). A study of the role of Parvovirus B19 in rheumatoid arthritis. *British Journal Paediatrics*; **102** : 720-722
- 6- **Pelkonen P.M** (1988). Juvenile arthritis with oligo-articular onset. *Baillier's Clinical Rheumatology* ; **12** : 273-286
- 7- **M. Karmochkine** (1995). Infection humaine par le Parvovirus B19. *Rev Med Interne* ; **16**: 905-912
- 8- **A. N. Crouson, C. M. Magro and M. R. Dawood.** (2000). A causal role for Parvovirus B19 infection, in adult dermatomyositis and other auto-immune syndromes. *Journal Cutaneous Pathology*; **27**: 505.
- 9- **A. Chehal ; A. Sharara, J. Haidar et al.** (2002). Acute viral hepatitis A and Parvovirus B19 infections complicated by pure red cell aplasia and autoimmune hemolytic anemia. *J Hepatol*; **37** : 163-165
- 10- **H. Lechmann, P. Landenberg and S. Modrow.** (2003). Parvovirus B19 infection and autoimmune disease. *Autoimmune Rev*; **2** : 218-223
- 11- **B. Dijkman, M. Salimans et al.,** (1988). Human Parvovirus B19 DNA in synovial fluid. *Arthritis Rheum* ; **31** : 279-281
- 12- **S. Nikkari, R Lukkainen, T Mottonen O. Meurman, P. Hannonen, M. Skurnik, P. Toivanen.** (1994). Does Parvovirus B19 have a role in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* ; **53** (2) : 106- 111.
- 13- **M. Salimans, Van bussel MJ, Brown CS et al.,** 1992. Recombinant Parvovirus B19 capsides as a new substrate for detection of B19 specific IgG and IgM antibodies by an enzyme linked immunosorbent assay. *Journal Virological Methods*; **39** : 247-258
- 14- **L. Edison Durigon, Dean D. ErdmanL. G et al.** (1993). Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human Parvovirus B19 DNA. *Journal of virological methods* ; **44** : 155- 165.
- 15- **D. Peterlana, A. Puccetti, R. Beri, M. Ricci, S. Simeoni, L. Borgato, L. Scila, S. Crue, R. Corrocher, C. Lunardi.** (2003). The presence of Parvovirus B19 VP and NS1 genes in the synovium is not correlated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*; **30** (9) : 1907-1910.
- 16- **S. Nikkari.** (1995). Persistence of Parvovirus B19 in synovial fluid and bone marrow. *Ann Rheum Dis* ; **54** : 597-600
- 17- **M. Soderlund, R. Von Esson, J. Haapassari, U. Kustala, O. Kiviluoto, K. Hedman.** (1997). Persistence of Parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet* ; **349** (9058) : 1038-1039.

- 18- **Ro. Shade, Mc. Blundell, SF. Cotmore, P. Tattersall, CR Astell.** (1986). Nucleotide sequence and genome organisation of human Parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *Virology*; **58**: 921- 936

### **REMERCIEMENTS**

Nous remercions le Professeur Abdellatif Bou dabous (responsable du Laboratoire de Microbiologie à la Faculté des Sciences de Tunis) et l'ensemble de son équipe pour leur précieuse aide scientifique et le Secrétariat d'Etat à la Recherche Scientifique et la Maîtrise de la Technologie pour le financement de ce travail.