



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Mise en évidence du caractère infectieux des adénovirus par  
culture cellulaire couplée à une hybridation *in situ***

Présenté par M<sup>elle</sup> BRAGARD Tamara

Master 2 de Microbiologie spécialité  
« Microbiologie Environnementale et Sanitaire »

Projet encadré par  
Dr Leslie Ogorzaly  
Dr Henry-Michel Cauchie

---

# *Remerciements*

---

Je remercie M<sup>r</sup> Henry-Michel Cauchie, PhD et responsable de l'unité Environnement, Risque et Santé, de m'avoir accueilli au sein du service de microbiologie pour la réalisation de mon stage de master 2, ainsi que M<sup>me</sup> Leslie Ogorzaly, PhD et maitre de stage, pour ses nombreux conseils autant pratiques que théoriques, sa précieuse aide à la rédaction du rapport et son soutien durant ces 6 mois de stage.

Je remercie également M<sup>r</sup> Lucien Hoffmann, PhD et directeur scientifique du département Environnement & Agro-Biotechnologies, de m'avoir permis de réaliser mon projet de recherche dans son département

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe, Cécile, Christian, Blandine, Delphine, Adeline et Sébastien, pour leur attention, leur gentillesse et leur disponibilité. Ces 6 mois au sein du département Environnement et Agro-biotechnologie ont été pour moi une expérience enrichissante et valorisante. Merci beaucoup du temps que vous m'avez consacré et des connaissances que vous m'avez apporté tout au long de ce stage.

---

# *Liste des abréviations*

---

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**ADP** : Adenovirus Death Protein  
**ARN** : Acide Ribonucléique  
**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger  
**db** : double brin  
**CAR** : Cocksackie and Adenovirus Receptor  
**E** : Early  
**ECP** : Effet cytopathogène  
**FACS** : Fluorescent Activated Cell Sorting  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**HAdVs** : Human Adenoviruses  
**HAdV2** : Human Adenovirus type 2  
**HAdV41** : Human Adenovirus type 41  
**HEK** : Human Embryonic Kidney  
**ICC-PCR** : Integrated-Cell-Culture Polymerase Chain Reaction  
**ITR** : Inverted Terminal Repeat  
**kb** : kilobase  
**L** : Later  
**MB** : Molecular Beacon  
**mW** : milliwatt  
**n** : nombre d'échantillon  
**nt** : nucléotide  
**NPPUC** : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes  
**pb** : paire de base  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**p.i** : Post-Infection  
**PFA** : paraformaldéhyde  
**PFU** : Unité Formant Plage  
**RT-PCR** : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction  
**sb** : simple brin  
**UA** : Unité arbitraire  
**UV** : Ultra-Violet

---

# *Sommaire*

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. LES ADÉNOVIRUS HUMAINS (HADV) .....</b>	<b>2</b>
A. TAXONOMIE ET POUVOIR PATHOGÈNE .....	2
B. STRUCTURE DES ADÉNOVIRUS .....	3
C. CYCLE DE MULTIPLICATION DES ADÉNOVIRUS.....	4
<b>II. LES ADÉNOVIRUS HUMAINS DANS L'ENVIRONNEMENT .....</b>	<b>5</b>
A. CONCENTRATION DANS LES EAUX.....	6
B. PERSISTANCE ET SURVIE DES ADÉNOVIRUS INFECTIEUX .....	6
<b>III. METHODES DE DETECTION DES ADÉNOVIRUS INFECTIEUX.....</b>	<b>8</b>
A. METHODE DU NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP) .....	8
B. METHODE DES PLAGES DE LYSÉ (PLAQUE ASSAY).....	8
C. FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING ASSAY (FACS).....	9
D. INTEGRATED-CELL-CULTURE (RT)-PCR (ICC-(RT)-PCR) .....	9
E. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> ET MOLECULAR BEACON (MB).....	10

## MATERIELS ET METHODES

<b>I. ADÉNOVIRUS ET CELLULE-HÔTE .....</b>	<b>12</b>
A. CULTURE CELLULAIRE .....	12
1. <i>Entretien de la lignée HEK 293A</i> .....	12
a) Composition du milieu de croissance .....	12
b) Composition du milieu de maintenance .....	12
c) Décongélation des cellules HEK 293A .....	12
d) Trypsination .....	13
2. <i>Préparation des cellules pour la microscopie confocale</i> .....	13
a) Coatage des chambres de culture.....	13
b) Culture des cellules HEK 293A en chambre de culture .....	13
B. INFECTION DES CELLULES.....	13
a) Quantification des adénovirus infectieux type 2 .....	14
b) Infection des cellules en chambre de culture .....	14
<b>II. DESIGN ET SPECIFICITE DES MOLECULAR BEACONS (MB) .....</b>	<b>14</b>
A. PCR EN TEMPS REEL.....	15
1. <i>Extraction de l'ADN</i> .....	15
2. <i>PCR en temps réel</i> .....	15
B. OPTIMISATION DE L'HYBRIDATION HADV/MB .....	15
C. COLORATION, FIXATION ET PERMEABILISATION DES CELLULES .....	16
D. MICROSCOPIE CONFOCALE A BALAYAGE LASER.....	17

## RESULTATS

<b>I. MOLECULAR BEACON: APPARIEMENT ET CONDITIONS D'HYBRIDATION EX SITU .....</b>	<b>18</b>
A. HYBRIDATION DE LA SONDE MB HADV-C.....	18
1. <i>Réactions simples</i> .....	18
2. <i>Réactions croisées</i> .....	18
B. HYBRIDATION <i>EX SITU</i> .....	19



1.	<i>Influence de la température</i>	20
2.	<i>Effet de la dénaturation de l'ADN avant hybridation</i>	20
3.	<i>Effet de la concentration en molecular beacon à 37°C</i>	20
4.	<i>Effet de la concentration en ADN cible de l'HAdV2</i>	21
<b>II.</b>	<b>DETERMINATION DU CARACTERE INFECTIEUX DES ADENOVIRUS : HYBRIDATION <i>IN SITU</i></b>	<b>21</b>
A.	CONTROLES EXPERIMENTAUX	22
1.	<i>Contrôles négatifs</i>	22
2.	<i>Contrôle positif : Détection de l'hybride synthétique au sein des cellules HEK 293A</i>	22
B.	MARQUAGES CELLULAIRES	23
1.	<i>Fixation des tapis cellulaires</i>	23
2.	<i>Concentrations en molecular beacon</i>	25
C.	TESTS D'INFECTIOSITE	25
1.	<i>Test en conditions extrêmes</i>	25
2.	<i>Tests aux concentrations environnementales</i>	26
3.	<i>Durée post-infection</i>	26

<b>DISCUSSION - CONCLUSION - PERSPECTIVES</b>
---

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>
------------------------------------

<b>ANNEXE</b>
---------------

---

*Etude  
bibliographique*

---

La présence de micro-organismes pathogènes dans l'environnement, et plus particulièrement dans les ressources hydriques, peut être à l'origine de problèmes de santé publique (Figure 1). Principalement d'origine fécale, ces micro-organismes posent un problème majeur quant au devenir de la qualité de l'eau. Selon le rapport de l'Institut de Veille Sanitaire datant du mois d'août 2008, 10 épidémies d'origine hydrique ont eu lieu en France lors de ces 10 dernières années (Therre et al. 2009). Que ce soit des maladies véhiculées par les eaux récréatives ou les eaux de consommation, aucun pays n'est épargné et tous sont confrontés à cette problématique. Divers micro-organismes (bactéries, parasites et virus) peuvent être responsables d'épidémies telle que celle de cryptosporidiose de Milwaukee (Wisconsin, USA) en 1993, qui toucha près de 403 000 personnes et fait une centaine de décès (Mac Kenzie et al. 1994). Trente à 40% des maladies d'origines hydriques seraient causées par des virus. En 1994, une contamination d'un réseau d'eau en Finlande suite à une crue a provoqué une épidémie de gastro-entérites (GE) et a touché près de 25 à 50% de la population (Kukkula et al. 1997). Les principaux agents retrouvés lors de cette épidémie étaient des virus entériques, et plus précisément un adénovirus, un norovirus et un rotavirus. Un autre exemple est la consommation de mollusques contaminés par le virus de l'hépatite A en Chine ayant touché 300 000 personnes en 1988 (Halliday et al. 1991). Selon une étude menée par Sinclair et al. (2009), 45% des épidémies survenues suite à une baignade seraient dues à la présence de norovirus, suivi à 24% par les adénovirus, à 18% pour l'echovirus, à 7% pour l'hépatite A et à 5% pour le coxsackievirus (Figure 2).

Pourtant, la recherche de virus dans les eaux de boisson, dans les eaux de baignade et dans les eaux usées n'est pas un paramètre inclus dans les réglementations européennes. Généralement, la présence de bactéries fécales indicatrices (*E. coli*) dans un échantillon démontre la contamination de la ressource par des matières fécales susceptibles de véhiculer des bactéries, des virus ou des parasites pathogènes. Cette méthode, plus simple et moins onéreuse que la recherche virologique, a permis d'améliorer le suivi de la qualité de l'eau. Néanmoins, depuis 1998, la US Environmental Protection Agency a établi une liste de contaminants d'origine chimiques (104) et microbiologiques (12) susceptibles d'être présents dans les eaux potables (Candidat Contaminant List, CCL 3) qui pourrait être soumise à réglementation. Parmi les candidats microbiens reconnus comme groupes prioritaires, on trouve les adénovirus, les calicivirus, les entérovirus et le virus de l'hépatite A. Parmi eux, les adénovirus sont retrouvés continuellement dans les eaux durant l'année. Dans une étude réalisée par un consortium européen, lors de la période estivale, les adénovirus ont été détectés dans 36,4% des échantillons d'eaux récréatives, alors que les norovirus, dont la

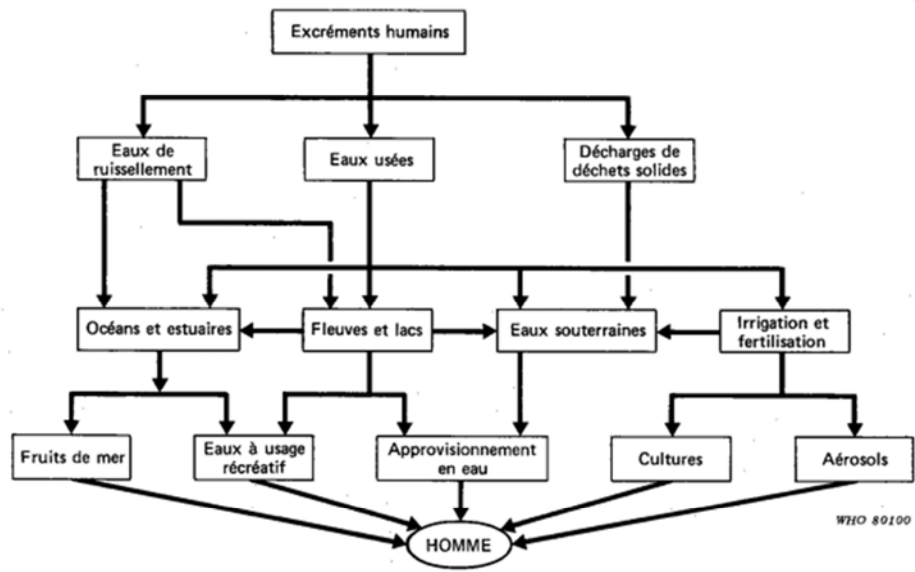


Figure 1 : Voies de transmission des virus entériques humains.

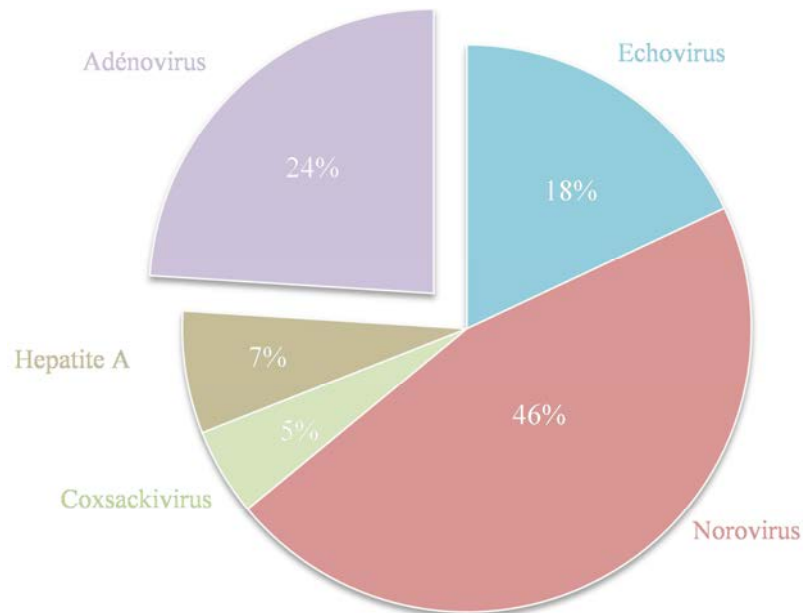


Figure 2 : Epidémies dans les eaux récréatives. Adapté de Sinclair et al. 2009.

prévalence est hivernale, n'ont été détectés que dans seulement 9,4% des échantillons (Wyn-Jones et al. 2011).

Généralement, la recherche de virus dans des échantillons environnementaux est réalisée par des techniques de biologie moléculaire comme la PCR (Polymerase Chain reaction) (Jothikumar et al. 2005; Poddar, 1999). Cette technique prend en compte les particules virales infectieuses, non infectieuses mais également les génomes dits « libres ». Par conséquent, elle n'est pas représentative du risque auquel peut être soumise la population. La méthode de référence lorsque l'on s'intéresse au caractère infectieux d'un virus, est la culture cellulaire, attendant l'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) caractéristique de la multiplication du virus. Cette méthode, bien que souvent longue (11 jours à 21 jours pour les adénovirus) permet de discriminer les particules virales infectieuses pouvant être à l'origine des risques pour la santé humaine, des particules non infectieuses et de l'ADN libre. C'est pourquoi, de nombreuses recherches portent sur le développement de méthodes de détection rapides des virus entériques infectieux dans l'environnement.

## **I. Les adénovirus humains (HAdV)**

Les adénovirus, membres de la famille des *Adenoviridae*, ont été mis en évidence chez une grande variété d'hôtes, incluant des représentants de chaque grande classe de vertébrés (des poissons aux mammifères). Selon le comité international de taxonomie des virus, cette famille est actuellement divisée en cinq genres *Aviadenovirus* (8 espèces), *Atadenovirus* (5 espèces), *Siadenovirus* (5 espèces), *Ichadenovirus* (1 espèce) et *Mastadenovirus* (25 espèces) (Harrach et al. 2012).

### **A. Taxonomie et pouvoir pathogène**

Les adénovirus humains (HAdVs) appartiennent tous au genre *Mastadenovirus*, mais on trouve également au sein de ce genre des espèces virales responsables de pathologies chez d'autres mammifères (bovins, équins, ovins...). A l'heure actuelle, 54 types (ou sérotypes) ont été répertoriés chez l'homme. Ils sont répartis en 7 espèces, nommées de A à G (Tableau 1), sur base de leurs propriétés immunologiques et biologiques; comme par exemple leurs réponses à des anticorps neutralisant, leurs capacités à agglutiner les globules rouges ainsi que des analyses génomiques et structurales.

Ces virus peuvent induire une grande variété de pathologies (Mena and Gerba 2009), même si la plupart des infections sont asymptomatiques (Harrach et al., 2012). Certains types d'adénovirus peuvent toutefois être préférentiellement associés à un type de pathologie. A

Tableau 1: Classification des différents types d'adénovirus humains, leurs cellules hôtes et leurs récepteurs cellulaires. Adapté de (Cupelli and Stehle 2011).

<b>Espèces</b>	<b>Types</b>	<b>Infection</b>	<b>Récepteur</b>
<b>A</b>	12, 18, 31	Intestin	CAR
<b>B</b>	16, 21, 50	Voies respiratoires, yeux	CD46
	11, 34, 35	Voies respiratoires et urinaires, yeux	CD46
	3, 7, 11, 14	Voies respiratoires et urinaires, yeux	DSG-2
<b>C</b>	1, 2, 5, 6	Voies respiratoires	CAR
<b>D</b>	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30	Yeux, Intestin	CAR
	32, 33, 36, 38, 39, 42-49, 51		
	8, 19, 37	Yeux	Acide sialique
<b>E</b>	4	Voies respiratoires, yeux	CAR
<b>F</b>	40, 41	Intestin	CAR
<b>G</b>	52	Intestin	/

titre d'exemple, les types 8, 19 et 37 sont responsables de conjonctivites (Kaneko et al. 2009), alors que les types 3, 4 et 7 vont provoquer des maladies respiratoires pouvant être à l'origine d'épidémies chez les militaires (McNeill et al. 2000). Les adénovirus entériques types 40 et 41 (espèce F) ainsi que le type 31 (espèce A) sont fréquemment responsables de gastro-entérites infantiles. Ils se placent au deuxième ou troisième rang des virus provoquant des troubles digestifs, après les norovirus et les rotavirus. Les gastro-entérites à adénovirus sont caractérisées par une poussée de fièvre, des crampes abdominales, des nausées, des vomissements et des diarrhées. La période d'incubation dure sept à huit jours et la période d'excrétion peut s'étendre jusqu'à 14 jours. (Stevenson and Mautner 2003). Une étude canadienne réalisée entre 1983 et 1986, a montré que 16,9% des infections intestinales ont été causées par l'adénovirus type 40, 18% par l'adénovirus type 31 et 38% par l'adénovirus type 41 (Brown, 1990).

Ainsi, ces 3 types sont susceptibles d'être répandus dans l'environnement via les matières fécales. Toutefois, quelle que soit leur cellule hôte chez l'homme, la plupart des types sont capables de se multiplier au niveau du tractus digestif et sont, par conséquent, excrétés dans les selles des personnes infectées, au même titre que les adénovirus dits entériques (Mena and Gerba 2009). Lee et al. (2012) ont montré la présence d'adénovirus de type 2, 3, 4, 7, 31 et 37 chez des enfants atteints de gastro-entérites.

#### B. Structure des adénovirus

Les adénovirus sont des virus non enveloppés de structure icosaédrique composés de 20 facettes triangulaires et mesurant de 90 à 100 nm de diamètre. Il s'agit des seuls virus dits entériques à posséder un ADN double brin (db) linéaire de 26 à 44 kb selon le type viral. Ces virus possèdent treize protéines structurales, dont sept constituent la capsid. Ces dernières sont réparties en deux groupes : les protéines majeures, au nombre de trois (l'hexon (II), le penton (III) et la fibre (IV)) qui composent la majeure partie de la capsid, et les protéines mineures (IIIa, VI, VIII, IX) servant à stabiliser cette capsid. Les 20 facettes triangulaires sont chacune constituées de 12 hexons, qui est une protéine homo-trimérique (720 hexons au total forment la capsid) (El Bakkouri et al. 2008; Russell, 2009) (Figure 3). Les six autres protéines sont associées à l'ADN viral (V, VII (empactage), Mu, Protéine Terminale (TP), IVa2 et une protéase nécessaire à la libération des virions). Le génome viral possède à ses 2 extrémités des régions ITR (séquences répétées inversées) permettant au génome linéaire double brin de se circulariser. La protéine terminale (TP) ayant un rôle de protection contre la dégradation est également présente aux 2 extrémités.

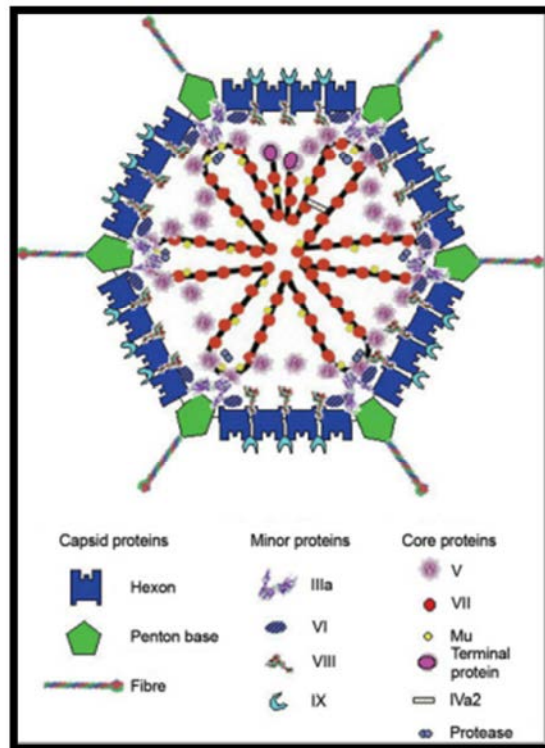


Figure 3 : Représentation schématique de la structure des adénovirus ((Russell, 2009))



### C. Cycle de multiplication des adénovirus

Différents cycles cellulaires peuvent être réalisés lors de l'infection d'une cellule hôte par un adénovirus. Lorsque les cellules sont sensibles et permissives, un cycle lytique est mis en place par le virus, lui permettant de se multiplier. Cela aboutit à une lyse de la cellule hôte, entraînant la libération de virions dans l'espace intercellulaire. Une protéine de mort cellulaire (ADP= Adenovirus Death Protein (E3)) est nécessaire pour la réalisation d'un cycle lytique et permettre au virus de se propager d'une cellule à l'autre plus rapidement (Doronin et al. 2003; Tollefson et al. 1996). En effet, des cellules infectées avec une souche sauvage d'adénovirus de type 2 montre une lyse cellulaire en seulement 3 jours post-infection (p.i.), contre 6 à 7 jours p.i. pour les souches mutées dans le gène E3 (Tollefson et al. 1996). Egalement, lorsque les cellules sont sensibles mais non permissives les adénovirus peuvent effectuer soit un cycle transformant, pouvant être à l'origine de tumeurs au sein de l'organisme, soit un cycle abortif. Dans les deux cas, le virus ne produira pas de nouvelles particules virales, il lui sera donc impossible d'infecter d'autres cellules voisines. (El Bakkouri et al. 2008).

La Figure 4 montre le déroulement de l'infection et de la multiplication virale. Lorsque l'infection virale a lieu, la première étape est la reconnaissance de la cellule-hôte par le virus (Figure 4). Il a été montré que le principal récepteur intervenant dans la liaison entre le virus et la cellule hôte est le récepteur « Cocksackievirus and Adenovirus Receptor » (CAR), ubiquitaire à la surface des tissus cellulaires humains, mais il en existe d'autres (CD46, DSG-2, acide sialique) (Cupelli and Stehle 2011; El Bakkouri et al. 2008; Wolfrum and Greber 2013). L'association du récepteur CAR avec la tête de la fibre du virus induit un changement de conformation rendant accessible le motif RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) situé à la base du penton. Après l'attachement, les complexes virus-récepteurs migrent vers des vésicules de clathrine (protéine structurale) qui forment les endosomes englobant les particules virales à l'intérieur de la cellule (Meier and Greber 2003; Russell, 2000; Smith et al. 2010) (Figure 5a). Le pH des endosomes s'abaisse et les particules virales perdent leurs fibres et leurs pentons. Ce changement conformationnel des virus entraîne la rupture des endosomes et la libération des virions partiellement décapsidés dans l'espace cellulaire. Ces particules sont ensuite acheminées jusqu'au noyau via un réseau de microtubules, pour aboutir à la pénétration de l'ADN viral et de ces protéines associées dans le noyau (Ketner, 1999) (Figure 5b).

Le cycle de multiplication des adénovirus est généralement divisé en 2 phases, une phase dite précoce (Early = E) et une dite tardive (Later = L), séparées par la réplication de l'ADN viral. Ce cycle s'initie environ 30 minutes après l'attachement du virus à la cellule

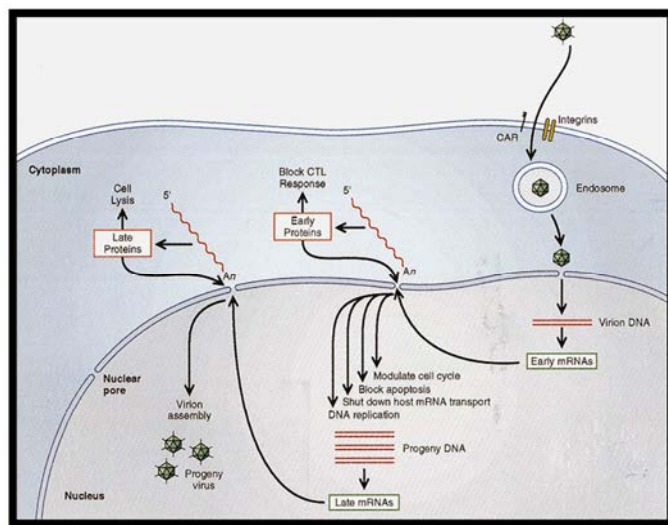


Figure 4: Représentation d'un cycle de multiplication des adénovirus dans une cellule hôte [1]

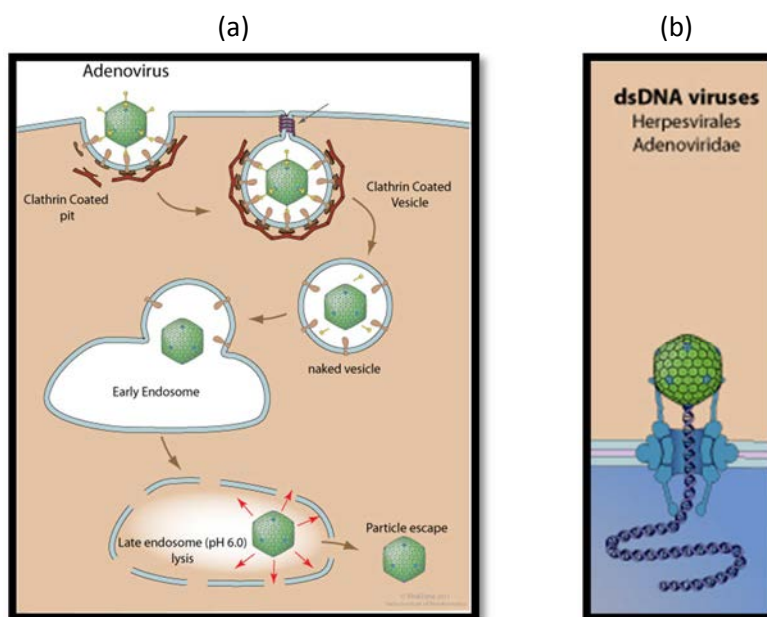


Figure 5: Représentation des mécanismes (a) d'endocytose de l'adénovirus et (b) injection du matériel génétique dans le noyau cellulaire [2]

hôte. Les premiers gènes à être exprimés sont les gènes de la phase précoce (Figure 6). La protéine E1A dérègle l'entrée en phase S (phase de duplication de l'ADN cellulaire) du cycle cellulaire de la cellule l'hôte et va induire la transcription des gènes E1B, E2A, E2B, E3 et E4. Les protéines E2A et E2B interviennent dans la machinerie de réplication de l'ADN viral, les protéines E3 jouent un rôle dans la lutte contre la réponse immunitaire de l'hôte et les gènes E4 codent des protéines régulatrices (Molinier-Frenkel and Boulanger 2003). Les protéines produites lors de la phase tardive, à savoir L1 (protéine IIIa), L2 (protéine III, V, VII), L3 (protéine VI, II) et L4 (protéine VIII) permettent l'assemblage des virions alors que L5 (protéine IV) permet l'absorption et la pénétration du virus dans la cellule. La réplication de l'ADN s'effectue dans le noyau de la cellule infectée. A la fin d'un cycle de multiplication du virus, une cellule contiendrait environ  $10^4$  virions.

Les données concernant la durée du cycle de multiplication des adénovirus sont peu nombreuses et parfois contradictoires. La publication de Russel (2000) indique une durée du cycle répliatif de 10 h à 14 h, 6 h à 8 h pour la phase précoce et de 4 h à 6 h pour la phase tardive. Selon les données recueillies, la durée d'un cycle de multiplication pourrait être liée à la lignée cellulaire mais également au type viral. Dans le premier cas, sur une lignée de cellule épithéliale humaine de type HeLa, le cycle des adénovirus aurait une durée de 20 h à 24 h (Molinier-Frenkel and Boulanger 2003), alors que le cycle de l'adénovirus type 2 en lignée de fibroblastes humain (IMR-90) serait divisé en 4 phases et pourrait s'étendre à plus de 42 h (Zhao et al. 2007). Il a également été rapporté que tous les types d'adénovirus appartenant au groupe C auraient un cycle de réplication de 36 h (Sharp, 1984).

## **II. Les adénovirus humains dans l'environnement**

Bien que la virologie ne soit pas incluse dans les paramètres fondamentaux à rechercher, les eaux de baignade (Directive 2006/7/CE) et de consommation (Directive 98/83/CE) sont tout de même soumises à réglementation et se doivent de respecter les normes imposées. Certaines zones aquatiques telles que les eaux utilisées pour l'irrigation, la conchyliculture (Directive 79/923/CEE) et les eaux de baignades requièrent une certaine qualité microbiologique allant d'un niveau « excellent » à « insuffisant ». Les stations d'épuration visant à traiter les eaux usées n'appliquent pas toutes un traitement de désinfection, de même que les traitements appliqués (ultra-violet (UV), ozonation, chloration...) ne permettent pas d'éliminer tous les micro-organismes présents dans les rejets. Il existe plus de 140 types de virus pathogènes pouvant être excrétés dans les fèces, comprenant entre autres 34 types d'echovirus et plus de 30 types d'adénovirus, et donc

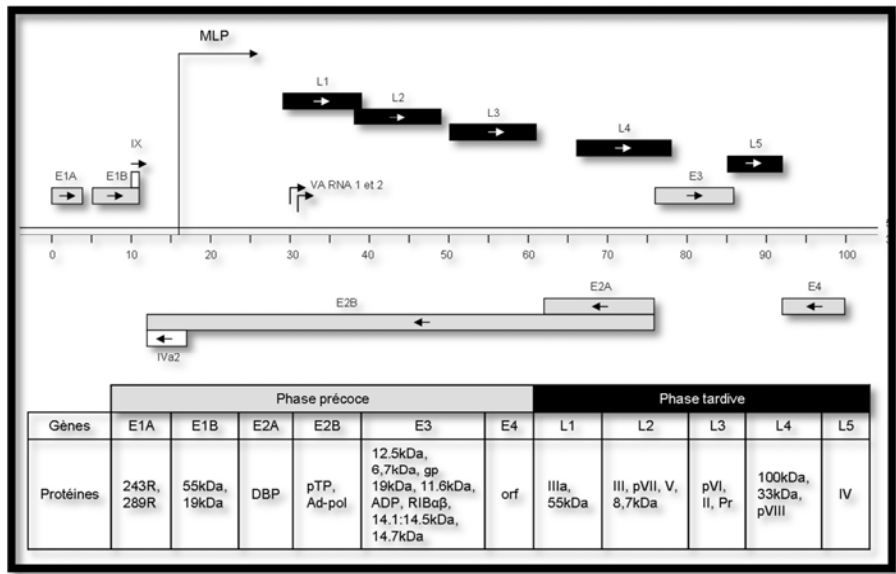


Figure 6 : Organisation du génome de l'adénovirus de type 2. Les gènes E sont les gènes précoces et les gènes L sont les gènes tardifs. MLP = Promoteur Majeur Tardif [3]

susceptibles d'être retrouvés dans les eaux [4]. Dépendant du type de virus, la dose infectieuse est comprise entre 10 et 1000 particules virales. Or, selon le document technique « les virus entériques dans l'eau potable », la concentration en virus entériques dans les eaux usées seraient de 100 à 10000 particules infectieuses/L, de 1 à 100 particules infectieuses/L dans les eaux de surfaces contaminées ou de 1 à 10 particules infectieuses/100 L dans les eaux de surface moins contaminées, et de 0 et 200 particules infectieuses/100 L dans les eaux souterraines.

#### A. Concentration dans les eaux

Les adénovirus, contrairement à d'autres virus entériques, peuvent être excrétés toute l'année par les personnes infectées (supérieure à  $10^6$  particules virales/grammes de selles sur une durée de 10 jours (Tableau 2)), avec une augmentation en hiver (Haramoto et al. 2007). Que ce soit dans les eaux usées, les eaux récréatives, les eaux de consommation et même dans les eaux souterraines, du génome d'adénovirus humain a pu être retrouvé. Ils ont pu être identifiés dans de nombreux échantillons d'eaux usées à travers le monde (Tableau 3), avec des concentrations comprises entre  $10^4$  et  $10^7$  copies de génome/L. L'étude d'Ahmed et al. (2010) indique la présence de génome d'adénovirus humains dans 100% des échantillons d'effluents primaires pour seulement 12,5% dans les effluents secondaires. Ainsi, les traitements appliqués lors de l'assainissement de l'eau permettent un taux d'abattement non négligeable de la concentration en adénovirus. Les adénovirus humains sont également présents dans les eaux de surface (Tableau 4), à des concentrations plus faibles que celles retrouvées dans les eaux usées. Elle varie de  $10^2$  à  $10^3$  copies de génome/L, et l'étude d'Albinana-Gimenez et al. (2006) montre qu'un traitement de potabilisation appliqué a permis de diminuer la concentration en adénovirus humains de  $2 \log_{10}$ . Egalement, une étude sur des échantillons d'eaux souterraines a montré la présence de génome d'adénovirus de type 41 (7/60) (Ogorzaly et al. 2010). De même, lorsqu'il est recherché, le caractère infectieux des adénovirus dans des échantillons environnementaux est régulièrement mis en évidence (Choo and Kim 2006; Lee and Jeong 2004; Ogorzaly et al. 2013; Wyn-Jones et al. 2011).

#### B. Persistance et survie des adénovirus infectieux

Les adénovirus semblent plus résistants dans l'environnement que d'autres virus entériques (Enriquez and Gerba 1995), ce qui pourrait expliquer en partie leur forte concentration dans les eaux. L'étude de Rigotto et al. (2011) montrent que 301 jours sont nécessaires pour obtenir une réduction de  $4 \log_{10}$  de la survie des adénovirus type 2 et 41, à

Tableau 2: Principaux virus excrétés dans les fèces [4].

Virus	Durée moyenne d'excrétion fécale	Concentration virale/ gramme de selles
Adénovirus	10 jours	$>10^6$
Norovirus/Sapporovirus	3 jours	$>10^6$
Rotavirus	10 jours	$>10^{10}$
Entérovirus	1 mois	$10^3-10^6$
Virus de l'hépatite A	3 semaines	$10^9$
Virus de l'hépatite E	2 semaines	$10^9$
Astrovirus	12 jours	$>10^6$

Tableau 3: Présence et concentration des adénovirus humains dans les eaux usées.

Type d'eaux usées	Localisation	Méthode de détection	Concentration / Fréquence	Références
Effluent primaire	Australie	PCR	100% (n=18)	(Ahmed et al. 2010)
Effluent secondaire	Australie	PCR	12.5% (n=16)	(Ahmed et al. 2010)
Eaux usées	Nouvelle-Zélande	PCR en temps réel	$1,87.10^3-4,6.10^5$ cg/100mL	(Dong et al. 2010)
Eaux usées	Etats-Unis	PCR en temps réel	$2,2.10^4$ cg*/L	(Rodriguez et al. 2013)
Eaux usées	Espagne	PCR en temps réel	$1,4.10^7$ cg/L	(Albinana-Gimenez et al. 2006)
Effluent primaire	Maroc	PCR	66% (n=9)	(Amdiouni et al. 2012)
Effluent secondaire	Maroc	PCR	22% (n=9)	(Amdiouni et al. 2012)

\*cg : copies de génome

Tableau 4: Présence et concentration des adénovirus humains dans les eaux de surface.

Type d'eau	Localisation	Méthode de détection	Concentration / Fréquence	Références
Eau douce	Europe	PCR en temps réel	41,1% (n=928)	(Wyn-Jones et al. 2011)
Eau de mer	Europe	PCR en temps réel	27,4% (n=482)	(Wyn-Jones et al. 2011)
Fleuve	Etats-Unis	PCR en temps réel	$2,6.10^3$ cg*/L	(Aslan et al. 2011)
Lac	Etats-Unis	PCR en temps réel	$1,1.10^2$ cg/L	(Aslan et al. 2011)
Rivière	Espagne	PCR en temps réel	$4.10^2$ cg/L	(Albinana-Gimenez et al. 2006)
piscine (1) intérieure (2) extérieure	Afrique du sud	Nested-PCR	(1) 15,4% (n=26), (2) 21,1% (n=38), et 10,7% (n=28)	(van Heerden et al. 2005)

\*cg : copies de génome

une température est de 19°C. De même, Ogorzaly et al. (2010) démontrent que le génome de l'adénovirus est plus persistant à des températures froides (aucune diminution de génome sur 400 jours à 4°C) que lorsqu'il est exposé à des températures ambiantes. En effet, le temps de survie ( $T_{90}$ ) est estimé à 278 jours lorsque la température est de 20°C. (De plus, une étude réalisée par Scheid et Schwarzenberger (2012), montre qu'une amibe, *Acanthamoeba* pourrait être un réservoir d'adénovirus leur permettant de résister plus favorablement aux stress environnementaux.

Concernant les traitements de désinfection, les adénovirus ont été décrits comme étant plus résistants aux rayonnements UV que d'autres virus entériques (Gerba et al. 2002; Thurston-Enriquez et al. 2005a), notamment grâce à son génome ADN double brin. Une diminution de la concentration en adénovirus de type 2 de 99,99% nécessite une exposition aux rayonnements UV de 160 mW/cm<sup>2</sup>, pour une exposition de 28 mW/cm<sup>2</sup> servant à inactiver les echovirus 2. En revanche, ils sont décrits comme étant sensibles à la chloration (Thurston-Enriquez et al. 2003; Thurston-Enriquez et al. 2005a). Ko et al. (2003) ont exposé l'adénovirus type 2 et l'adénovirus type 41 à des concentrations en chlore libre, démontrant qu'une concentration de 1 mg de chlore.min.L<sup>-1</sup> était suffisante pour ne plus détecter d'ARNm du gène de l'hexon, donc pour perdre le caractère infectieux du virus. Egalement, une étude montre qu'une concentration en ozone de 0,07 à 0,6 mg/L min est nécessaire pour éliminer 99,99% des adénovirus alors qu'une concentration de seulement 0,01 à 0,03 mg/L min est nécessaire pour le Calicivirus félin (Thurston-Enriquez et al. 2005b).

Malgré sa sensibilité à certains traitements de désinfection, quelques études ont mis en évidence la présence de génome d'adénovirus humains type 2, 40 et 41 dans les eaux de consommation traitées, à hauteur de 5% (van Heerden et al. 2005). Cependant, compte tenu de leur fréquence de détection dans les eaux de l'environnement à des concentrations variables, les adénovirus humains ont peu souvent été incriminés dans des épidémies virales d'origine hydrique. Généralement, ces épidémies sont principalement dues à des norovirus ou des rotavirus, au cours desquelles sont parfois également retrouvés des adénovirus (cf tableau 2 de Hamza et al. (2011)). La récente épidémie liée à l'eau dans lequel adénovirus était le seul agent en cause date des années 2000 en Australie, lorsque 40% des élèves d'un établissement scolaire ont été atteints de fièvre pharyngo conjonctivale suite à une baignade dans une piscine (Harley et al. 2001) (Tableau 5).

Au vu de l'ensemble des caractéristiques et particularités décrites ci-dessus, à savoir une forte présence dans les eaux, une survie accrue dans les eaux et une meilleure résistance à certains traitements de désinfection en comparaison aux autres virus entériques, les

Tableau 5: Epidémies de fièvre pharyngo-conjonctivale à adénovirus de 1951 à 2000. Adapté de (Sinclair et al. 2009).

<b>Années</b>	<b>Lieu</b>	<b>Source</b>	<b>Type</b>	<b>Référence</b>
<b>1951</b>	Colorado	Piscine	/	Cokburn (1953)
<b>1954</b>	Canada	Piscine	/	Ormsby H.L. et al. (1955)
<b>1955</b>	Suède	Lac	3	Kjellen et al. (1957)
<b>1959</b>	Japon	Piscine	3	Kaji M. et al. (1961)
<b>1960</b>	Japon	Piscine	3	Kaji M. et al. (1961)
<b>1966</b>	Washington	Piscine	3	Foy et al. (1968)
<b>1973</b>	Kansas	Piscine	7	Caldwell et al. (1974)
<b>1977</b>	Georgie	Piscine	3	Martone et al. (1980)
<b>1977</b>	Georgie	Piscine	4	D'Angelo L.J. et al. (1979)
<b>1982</b>	Oklahoma	Piscine	7	Turner et al. (1987)
<b>1991</b>	Caroline du Nord	Etang	3	Moore et al. (1993)
<b>1995</b>	Grèce	Piscine	/	Papapetropoulou and Vantarakis (1998)
<b>2000</b>	Australie	Piscine	3	Harley et al. (2001)



adénovirus ont été proposés comme indicateurs de contamination virale humaine par différents auteurs (Pina et al. 1998; Silva et al. 2011; Wyn-Jones et al. 2011).

### **III. Méthodes de détection des adénovirus infectieux**

L'intérêt de développer des techniques permettant de déterminer le caractère infectieux d'un virus est de mettre en évidence un éventuel risque pour la santé humaine. Les méthodes de détection par biologie moléculaire généralement utilisées prennent en compte les particules virales mais également l'ADN libre, sans différencier les particules non infectieuses des particules infectieuses. En effet, certaines particules présentes dans l'environnement peuvent être lésées ou dépourvues de capacité de multiplication, n'étant donc plus infectieuses et ne présentant aucun risque pour la population.

#### **A. Méthode du Nombre le Plus Probable (NPP)**

Il s'agit d'une méthode statistique de quantification en milieu liquide, applicable à divers micro-organismes. Dans le cas où l'étude porte sur la détection de particules virales infectieuses, une microplaque est utilisée dans laquelle est mis en contact le virus avec la lignée cellulaire adaptée à la multiplication du virus étudié, permettant la mise en évidence d'un effet cytopathogène (ECP). Cette quantification est réalisée sur au moins 3 dilutions successives de la suspension virale à quantifier, chaque dilution étant inoculée dans 40 puits. La durée d'infection variant selon le type d'adénovirus, le temps au bout duquel sera effectué le dénombrement des puits positifs sera donc fonction du virus (allant de 11 à 21 jours pour les adénovirus). L'utilisation de la table de « Mac Grady » permet de déterminer le « Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes » (NPPUC) contenu dans un échantillon et de pouvoir calculer son titre.

#### **B. Méthode des plages de lyse (Plaque assay)**

Le principe de « plaque assay » visent à énumérer les virus infectieux, qui vont être révélés au cristal violet. A partir de la suspension-mère du virus, des dilutions logarithmiques sont effectuées avant d'être inoculées sur une culture cellulaire en monocouche, puis recouverte d'un milieu nutritif gélosé permettant au virus de se propager aux cellules voisines, formant ainsi des plages de lyse. Pour faciliter la visualisation des cellules non infectées des cellules infectées et lysées par le virus, un colorant peut être ajouté, le cristal violet (colore les membranes des cellules). Cette technique ne peut être appliquée qu'aux virus produisant des

ECP. Une étude menée par Rigotto et al. (2011) utilise cette technique pour le dénombrement des adénovirus infectieux dans des eaux de surface et des eaux souterraines. Cromeans et al. l'ont également appliqué pour les adénovirus 40 et 41, réduisant le temps de détection de 3-4 semaines à 9 jours.

C. Fluorescence-Activated Cell Sorting Assay (FACS)

Li et al. (2010b) ont réalisé, dans un premier temps, pour la détection des adénovirus infectieux dans des échantillons d'eaux environnementales, en remplaçant chez l'adénovirus type 5 le gène E1A par le gène de la "Green Fluorescent Protein" (GFP). Les cellules HEK 293A infectées par ce virus modifié vont ainsi exprimer la GFP pendant la multiplication virale. La quantification des cellules infectées est ensuite réalisée par cytométrie de flux. L'étape suivante a été réalisée avec des anticorps marqués spécifiques soit de la protéine l'hexon soit de la protéine E1A sur l'adénovirus type 2 et 41. Les résultats montrent que selon la cible choisie, la sensibilité n'est pas la même. Le gène de la GFP est plus sensible que la protéine de l'hexon qui elle est plus sensible que la protéine E1A. L'obtention des résultats varie de 1 à 3 jours avec cette méthode et a permis de détecter des adénovirus infectieux dans des échantillons d'eaux usées et d'estimer la concentration en adénovirus grâce à une courbe standard soit 10 à 165 UFP/100 mL.

D. Integrated-Cell-Culture (RT)-PCR (ICC-(RT)-PCR)

Cette technique couple la culture cellulaire à une technique de biologie moléculaire, la PCR ou RT-PCR (Reverse Transcription-PCR), et permet la détection des virus entériques en seulement quelques jours (Hamza et al. 2011). Les virus s'étant multipliés dans les cellules, leur matériel génétique va pouvoir être isolé puis amplifié à l'aide d'amorces spécifiques du virus recherché. Contrairement aux adénovirus, d'autres virus entériques, comme par exemple le virus de l'hépatite A qui ne produit pas d'ECP peut également être identifié par ICC-RT-PCR (Jiang et al. 2004). D'autres chercheurs ont également appliqué cette méthode aux astrovirus (Grimm et al. 2004) et aux rotavirus (Li et al. 2010a). Une étude réalisée par Ambiouini et al. (2012) a mis en évidence la présence d'adénovirus et d'entérovirus infectieux dans 10 échantillons d'eaux usées (n=22). Egalement, Rodriguez et al. (2013) ont montré que sur les  $1,5 \cdot 10^6$  copies de génomes retrouvées dans les eaux usées,  $3,8 \cdot 10^3$  étaient des particules d'adénovirus infectieuses. Sur une eau du robinet, Lee et al. (2002) ont retrouvé des adénovirus et des entérovirus infectieux dans 15 échantillons (n=23) soit une présence de 65,2%. L'étude de Wyn-jones et al. (2011) montre des adénovirus infectieux dans 47% et

20% d'échantillons d'eaux de mer (n= 482) et d'eau douce (n=226). Dong et al. (2010) ont même retrouvé des adénovirus dans les eaux de pluies à hauteur de 40% (2/5), et dans les eaux de mer à 60% (3/5). De même, Ogorzaly et al. (2013) ont montré qu'une durée d'incubation de 2 jours était suffisante pour doubler la concentration en ADN adénoviral. .

#### E. Hybridation *in situ* et molecular beacon (MB)

La « molecular beacon » ou « balise moléculaire » est une sonde oligonucléotidique simple brin de structure tige-boucle, permettant de localiser une séquence d'acide nucléotidique connue (Tyagi and Kramer 1996). La boucle (15 à 25 nucléotides (nt)) est la région complémentaire à la séquence nucléotidique recherchée, la tige (5 à 7 nt) maintient le fluorochrome (porté par l'extrémité 3' ou 5') de manière covalente à proximité du quencher (extincteur) (porté par l'autre extrémité) qui capte la fluorescence émise par le fluorochrome (Monroy-Contreras and Vaca 2011). Ainsi, lorsque la molecular beacon est libre en solution, elle ne pourra émettre une fluorescence. En revanche, lorsqu'elle va rencontrer sa séquence complémentaire, il va se produire un changement conformationnel : la boucle se linéarise en s'hybridant sur sa séquence cible et forme l'hybride (Figure 7). Ainsi, la distance entre le fluorochrome et le quencher sera telle que le transfert d'énergie entre les deux molécules ne pourra plus s'effectuer, le quencher ne captera plus la fluorescence émise par le fluorochrome. La fluorescence est alors mesurable. L'hybridation de la molecular beacon avec sa cible est plus stable et se fait de façon spontanée car elle implique un plus grand nombre de nucléotide contrairement à l'hybridation de la tige de la molecular beacon (ayant une longueur inférieure à celle de l'hybride). Une étude menée par Tan et al. (2004) a permis de mettre en évidence la rapidité à laquelle l'hybridation de la sonde avec sa cible est réalisée. Sur les 400 molecular beacons analysées, 349 sondes se sont hybridées rapidement (87,5%) montrant une augmentation rapide de la fluorescence, et seulement 51 sondes ont réagi de façon plus lente (12,5%).

Différentes études décrivent l'utilisation des sondes molecular beacon pour la détection de pathogènes viraux après culture cellulaire. L'étude menée par Yeh et al. (2008) rapporte la détection du virus de l'hépatite A dans des cellules hôtes et montre que lorsque l'on utilise une molecular beacon non spécifique d'une séquence cible, la fluorescence obtenue est nulle. Selon les données de Wang et al. (2005), le pourcentage de cellules infectées par le coxsackievirus B6 passe de 14% à 4 h post infection (p.i.) à 90% après 24 h p.i. De même, Dunams et al. (2012) ont réalisé une étude sur la détection de l'adénovirus de type 2 et des echovirus, démontrant qu'après seulement 7 h p.i. avec 1 unité formant plaque

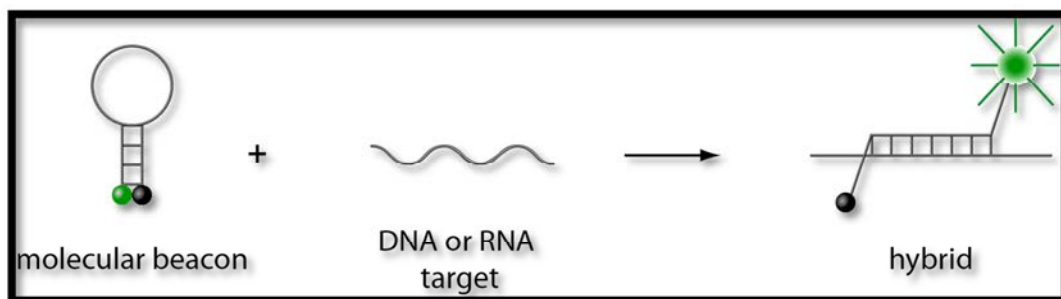


Figure 7: Mécanisme d'hybridation de la molecular beacon sur sa cible [5].

(PFU), l'adénovirus a pu être détecté à l'aide de molecular beacon. Il n'aura fallu que 2 h p.i. à l'adénovirus pour être détecté avec 100 PFU. Les études citées précédemment ont pu établir une corrélation entre le nombre de PFU (obtenus par une méthode de titration classique) et le nombre de cellules infectées.

### **Objectif de l'étude et démarche expérimentale**

Le but de cette étude est de développer et d'optimiser une méthode de détection des adénovirus humains infectieux basée sur la culture cellulaire couplée à une hybridation *in situ*. Dans ce contexte, l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique de type molecular beacon pour visualiser la présence des ARN messager (ARNm) viraux pourrait se révéler être une méthode prometteuse, comme suggéré par l'étude de Dunams et al. (2012) sur la détection spécifique de l'adénovirus type 2. Notre étude a pour but de détecter un plus large spectre de types d'adénovirus humains, incluant les types entériques. Le choix du gène, de la zone d'intérêt ainsi que le travail sur les séquences d'adénovirus disponibles et le design des molecular beacon avaient préalablement été réalisé par l'équipe de recherche. En raison de son caractère conservé au sein du groupe des adénovirus, le gène de l'hexon a été sélectionné (codant pour la protéine majeure de la capsid virale) pour mener cette étude. Deux sondes molecular beacon ont été dessinées, une sonde spécifique des adénovirus types 40 et 41, et une sonde spécifique des adénovirus appartenant à l'espèce C comprenant l'adénovirus type 2.

Dans un premier temps, la mise au point de cette méthode a été réalisée à l'aide d'une souche virale de laboratoire, l'adénovirus humain type 2, en vue d'une application ultérieure aux adénovirus entériques ainsi qu'à des échantillons environnementaux. La première étape de notre démarche scientifique (i) a été de valider le design de la sonde oligonucléotidique. La seconde étape (ii), réalisée *ex situ*, visait à déterminer les conditions optimales d'hybridation de la molecular beacon avec sa cible. Enfin, la troisième étape (iii) a été la visualisation *in situ* de l'hybridation, après infection des cellules avec une suspension virale connue. Différentes heures « post infection » ont été analysées afin de mettre en évidence la transcription du gène de l'hexon comme preuve du caractère infectieux de l'adénovirus. Egalement, la visualisation des compartiments cellulaires a été observée grâce à des marquages nucléaires et membranaires afin de pouvoir estimer le pourcentage de cellules infectées. La détection et l'analyse de la fluorescence a été réalisée par microscopie confocale à balayage laser.

---

***Matériels  
et  
Méthodes***

---

## **I. Adénovirus et cellule-hôte**

### **A. Culture cellulaire**

La lignée cellulaire utilisée dans cette étude est la lignée HEK 293A (R705-07, Life Technologies). La lignée HEK 293, établie à partir de cellules embryonnaires primaires de rein humain, est génétiquement modifiée par de l'ADN d'adénovirus type 5 ayant intégré les gènes E1A et E1B (Graham et al. 1977) permettant la multiplication des adénovirus humains, y compris les types 40 et 41 (Brown et al. 1984). La lignée HEK 293A est un subclone de la lignée HEK 293 ayant une capacité d'adhésion au support plus élevée que les cellules HEK 293. Les cellules ont été utilisées entre les passages 5 et 30.

#### **1. Entretien de la lignée HEK 293A**

##### **a) Composition du milieu de croissance**

Le milieu de croissance est composé de DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium supplémenté avec du Glutamax (2 mM) et du glucose (4,5 g/L), Life Technologies), dans lequel est ajouté du sérum de veau (Invitrogen) non inactivé à la chaleur en concentration finale 5% et des acides aminés non essentiels en concentration finale 1%. Le milieu de croissance est appelé DMEM 5%.

##### **b) Composition du milieu de maintenance**

Le milieu de maintenance est composé de DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium supplémenté avec du Glutamax (2 mM) et du glucose (4,5 g/L), Life Technologies), dans lequel est ajouté du sérum de veau non inactivé à la chaleur en concentration finale 2% et des acides aminés non essentiels en concentration finale 1%. Le milieu de maintenance est appelé DMEM 2%.

##### **c) Décongélation des cellules HEK 293A**

Un millilitre de suspension cellulaire de la lignée HEK 293A est décongelé au bain-marie à 37°C, et l'ensemble des cellules est inoculé dans une flasque de culture (Nunc) de 75 cm<sup>2</sup> contenant 25 mL de milieu de croissance DMEM 5%. Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère humide enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules sont fixées au support, le milieu de culture est changé, puis incubé pendant une nuit dans les mêmes conditions. Lorsque le tapis cellulaire a atteint 80 à 90% de confluence, les cellules sont trypsinées.

#### d) Trypsination

La trypsine est une enzyme utilisée pour dissocier le tapis cellulaire afin d'obtenir des cellules individualisées en rompant les liaisons protéiques.

Le tapis cellulaire, après élimination du milieu de croissance, est rincé avec 10 mL de D-PBS (Dubelcco's Phosphate Buffer Saline, Invitrogen). Une fois le D-PBS éliminé, la trypsine (TrypLE, Invitrogen) est ajouté à raison de 2 mL durant 1 à 5 minutes à température ambiante. Afin de neutraliser l'action de la trypsine, 3 mL de milieu de croissance DMEM 5% sont ajoutés. La concentration cellulaire est déterminée avec un compteur de cellules automatique (Scepter, Millipore) après avoir effectué deux dilutions successives ( $1/10^{\text{ème}}$  et  $1/100^{\text{ème}}$ ). La concentration finale à ensemercer est de  $7.10^4$  cellules/mL, le volume initial ( $V_i$ ) à ajouter à 50 mL de milieu de croissance en flasque de 175 cm<sup>2</sup> sera déterminé en fonction de la concentration initiale ( $C_i$ ).

### 2. Préparation des cellules pour la microscopie confocale

#### a) Coatage des chambres de culture

Les chambres de culture miniatures utilisées pour les tests d'infectiosité (LabTek II, Nunc) comportent 8 puits, et sont préalablement coatées afin de favoriser l'adhésion des cellules au fond des puits. La solution de coatage, substrat d'adhésion, préparée dans du milieu DMEM brut sans sérum, est composée de fibronectine en concentration finale 0,01 mg/mL, de collagène bovin type I en concentration finale 0,03 mg/mL et d'albumine de sérum bovin en concentration finale 0,01 mg/mL. La solution de coatage a été ajoutée à raison de 200 µL/puits puis incubé pendant 1 nuit à 37°C. Le milieu est ensuite éliminé et les chambres de culture prêtes à être utilisées.

#### b) Culture des cellules HEK 293A en chambre de culture

A partir d'une suspension cellulaire de la lignée HEK 293A,  $5.10^4$  cellules sont ajoutés par puits (dans un volume de 500 µL), puis incubé à 37°C, avec une atmosphère contenant 5% CO<sub>2</sub> pendant 2 à 4 jours.

### B. Infection des cellules

Les virus modèles utilisés sont l'adénovirus type 2 (HAdV2, LCPME, Nancy) stock initialement reçu de l'Health Protection Agency Culture Collection (NCPV213), et l'adénovirus type 41 (HAdV41, ATCC VR-930). La mise au point de l'intégralité de cette méthode de détection a été réalisée à l'aide de l'adénovirus humain type 2.



a) Quantification des adénovirus infectieux type 2

Cette étape de quantification permet de déterminer la concentration de travail de départ pour la suite des manipulations. La méthode utilisée est la méthode du nombre le plus probable d'unités cytopathogènes (NPPUC). L'apparition d'un ECP (Figure 8) est suivie sur 11 jours. Le titrage est effectué en microplaques 96 puits.

A partir de la lignée cellulaire HEK 293A, une suspension cellulaire contenant  $3,3 \cdot 10^4$  cellules/mL est préparée dans du milieu de maintenance DMEM 2%. A partir de la suspension virale à titrer, des dilutions en cascade (au  $1/10^{\text{ème}}$ ) sont réalisées dans un volume final de 3 mL de DMEM 2%. Seules les dilutions de  $10^{-3}$  à  $10^{-10}$  seront utilisées. Par dilution, 40 puits sont inoculés ; les 2 dernières colonnes de chaque microplaque servant de puits témoins. La suspension cellulaire est déposée à raison de 200  $\mu\text{L}$ /puits, à laquelle est ajoutée 50  $\mu\text{L}$ /puits de suspension virale. Dans les puits témoin, 50  $\mu\text{L}$  de DMEM 2% sont déposés à la place des 50  $\mu\text{L}$  de suspension virale. Les microplaques sont ensuite incubées à 37°C, avec une atmosphère contenant 5%  $\text{CO}_2$  pendant 11 jours. La suspension virale d'HAdV2 utilisée lors manipulations a été titrée à  $1,7 \cdot 10^9$  NPPUC/mL.

b) Infection des cellules en chambre de culture

Une gamme de dilution du virus est préparée à partir de la solution mère titrée à  $1,7 \cdot 10^9$  NPPUC/mL, jusqu'à avoir une concentration de  $10^0$  NPPUC/200  $\mu\text{L}$  (soit  $5 \cdot 10^0$  NPPUC/mL). Sur un tapis cellulaire de 2 à 4 jours, 200  $\mu\text{L}$ /puits de la dilution de la suspension virale que l'on souhaite étudier sont déposés, puis incubés 1 h à 37°C, avec une atmosphère contenant 5%  $\text{CO}_2$ . La solution virale est ensuite éliminée et 3 lavages sont effectués avec le milieu de maintenance. Un volume de 200  $\mu\text{L}$  de DMEM 2% est déposé dans chaque puits infecté, et l'infection se déroule à différents temps.

## **II. Design et spécificité des molecular beacons (MB)**

Sur base des alignements de séquences réalisés, le gène de l'hexon a été choisi comme gène d'intérêt pour le design des sondes oligonucléotidiques molecular beacon. Le design a été réalisé par le support technique d'Eurogentec à l'aide du logiciel Beacon Designer (Premier Biosoft).

Afin de vérifier l'hybridation de la molecular beacon des adénovirus espèce C, dont fait partie l'HAdV2, sur sa cible, des tests d'appariements simples (MB HAdV-C/ADN HAdV2) et des tests d'appariements croisés (MB HAdV-C/ ADN HAdV41) ont été réalisés.

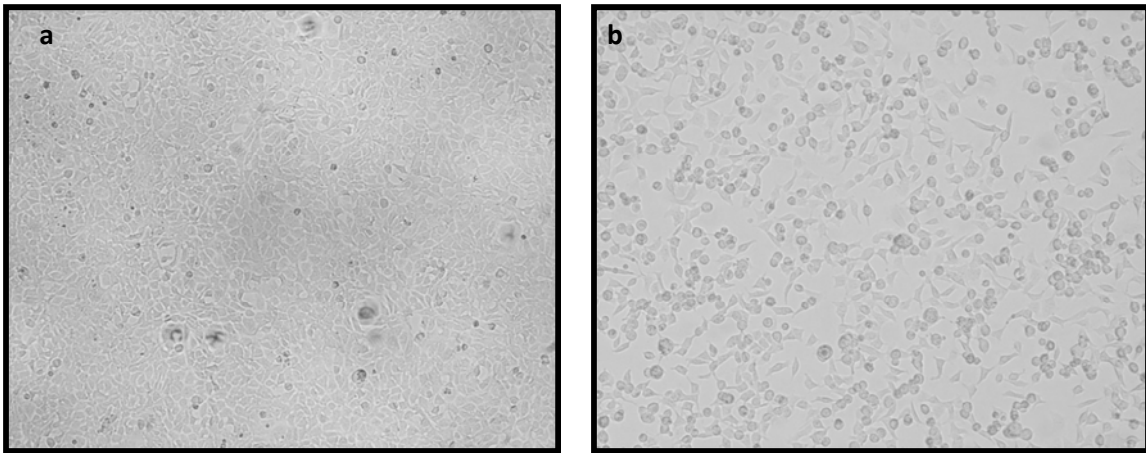


Figure 8 : Observation des cellules HEK 293A non infectées (a) et infectées (b) avec l'adénovirus type 2 au microscope inversé. Grossissement 100x.

Le gène ciblé de l'adénovirus est une partie du gène de l'hexon, exprimé lors de la phase tardive. Les séquences des molecular beacon de l'adénovirus espèce C (Figure 9) et de l'adénovirus espèce F sont présentées dans le Tableau 6. Le Tableau 7 présente les longueurs d'onde des fluorochromes choisis.

#### A. PCR en temps réel

Une série de dilutions en cascade au  $1/10^{\text{ème}}$  de l'adénovirus type 2 a été réalisée à partir de la suspension virale à  $1,7 \cdot 10^9$  NPPUC/mL, jusqu'à une concentration de  $10^0$  NPPUC/mL.

##### 1. Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait à l'aide du kit QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen), à partir de 140  $\mu$ L d'échantillon à analyser, avec une élution de 100  $\mu$ L de tampon AVE.

##### 2. PCR en temps réel

Le kit qPCR Master Mix Plus Low ROX (Eurogentec) est utilisé. Cette réaction nécessite l'ajout de MasterMix Low ROX en concentration finale 1X. La concentration finale des amorces sens (5'-GCA-TTA-AGT-TTG-ACA-GCA-TTT-G-3') et anti-sens (5'-ATT-AAA-GGA-CTG-GTC-GTT-GG-3') utilisée est 500 nM. La sonde utilisée est la molecular beacon des adénovirus espèce C (MB HAdV-C) en concentration finale de 300 nM. L'ajout d' $H_2O$  « DNase RNase free » (Life Technologies) permet d'ajuster le volume réactionnel à 25  $\mu$ L. L'amplification est réalisée avec le système 7500Fast Real-Time PCR (Life Technologies) selon les conditions suivantes : une étape initiale d'activation de la polymérase (95°C, 10 min) suivie de 50 cycles (95°C, 15 s ; 60°C, 1 min).

#### B. Optimisation de l'hybridation HAdV/MB

Les tests d'hybridation de l'adénovirus de type 2 sont effectués à l'aide d'un ADN simple brin (sb) synthétique (5'-CAT-GGC-CCA-CAA-CAC-GGC-CTC-CAC-GCT-GGA-AGC-CAT-GCT-3'). L'hybridation est réalisée en microplaque 96 puits à fond transparent dans un volume final de tampon d'hybridation (1 mM de  $MgCl_2$ , et 200 mM de Tris-HCL, pH 8) de 200  $\mu$ L. Différentes concentrations en molecular beacon (100, 50 et 25 nM) et en ADN cible (200, 100, 50, 25 et 5 nM) ont été utilisées. Le fluorochrome porté par la molecular beacon de l'HAdV2 est le Cy5 excité à 650 nm et émettant à 680 nm. Les filtres d'excitation et

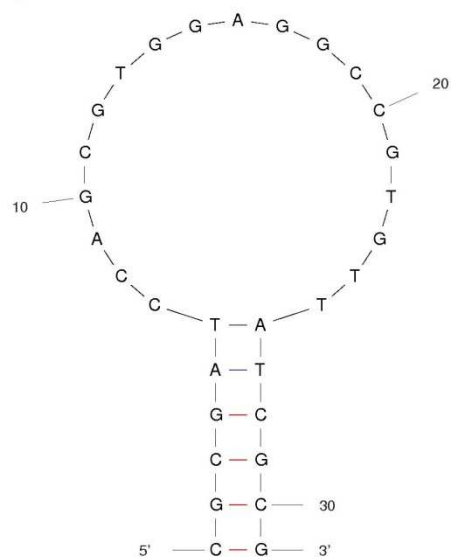


Figure 9 : Représentation schématique de la molecular beacon des adénovirus appartenant à l'espèce C.

Tableau 6: Séquences nucléotidiques des molecular beacons dessinées pour la détection des adénovirus appartenant à l'espèce C (MB HAdV-C) et des adénovirus de l'espèce F (MB HAdV-F). Les parties soulignées constituent la tige.

Séquences (5' - 3')	
<b>MB HAdV-C</b>	Cy5- <u>CGC-GATCCA</u> -GCG-TGG-AGG-CCG-TGT- <u>TAT</u> -CGC-G-BHQ-2
<b>MB HAdV-F</b>	6-FAM- <u>CGC-GAT-CCC</u> -ACG-ATC-CAG-CAC-GCC-GCC- <u>ATC-GCC</u> -BHQ-1

Tableau 7 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des fluorochromes portés par les molecular beacons.

	MB HAdV-C	MB HAdV-F
<b>Fluorochromes</b>	<u>Cy5</u>	<u>FAM</u>
<b>Excitation (nm)</b>	650	490
<b>Emission (nm)</b>	680	525

d'émission utilisés lors de la lecture de fluorescence sont donc 590/35 et 680/90. La lecture est réalisée dans un lecteur de microplaques avec le logiciel GEN 5 1.08 (BioTek).

Le protocole d'hybridation de l'adénovirus a été créé de façon à pouvoir suivre la cinétique des réactions. Une première étape consiste à ajouter uniquement le tampon d'hybridation afin de réaliser la première mesure de fluorescence servant de contrôle négatif. Les mesures de fluorescence sont effectuées toute les 5 secondes sur une durée d'une minute. La deuxième étape consiste en l'ajout de la molecular beacon en concentration voulue. Après agitation, les relevés de fluorescence sont également effectués toute les 5 secondes sur une durée de 2 minutes. La dernière étape consiste en l'ajout de la concentration voulue de cible (du brin d'ADN synthétique). Après agitation, la cinétique est suivie durant plusieurs heures, une mesure de fluorescence est effectuée toutes les deux minutes.

### C. Coloration, fixation et perméabilisation des cellules

Le marquage cellulaire a pour but de rendre visible par microscopie des organites ou des membranes et de permettre la numération des cellules. A ces fins, deux types de marqueurs ont été utilisés. Les marquages membranaire et nucléaire sont effectués avec des lectines conjuguées à de la rhodamine (RL-10852, Vector Labs) et du Hoescht 33342 (H3570, Life Technologies), respectivement. Le Tableau 8 montre les différentes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisées lors des marquages cellulaires.

Différents fixateurs ont été testés : le paraformaldéhyde dilué à 4% (PFA 4%), le méthanol glacé, la solution de Carnoy (éthanol, acide acétique, chloroforme) et PFA 4% stabilisé avec 10% de méthanol.

Le protocole défini au cours de cette étude est le suivant. La membrane est marquée à l'aide de 100 µL/puits de la solution de lectines diluée au 1/500<sup>ème</sup>, puis incubé à 37°C pendant 10 min suivi d'un lavage. La fixation des cellules est effectuée en ajoutant 150 µL/puits de PFA 4% pendant 10 min à 4°C, suivi de 2 lavages successifs (le PFA 4% est formé à chaud en dissolvant 0,4 g de PFA dans 8 mL d'eau additionné de 5 µL de NaOH 1 M. 1 mL de PBS est ajouté puis la solution est filtrée sur 0,22 µm). La perméabilisation est effectuée avec 100 µL/puits de Triton X-100 dilué à 0,1 % pendant 5 min à 4°C, suivi de 2 lavages. L'ajout de 200 µL/puits d'hybride et/ou d'ADN seul et/ou de la molecular beacon est effectué puis incubé au minimum 2 h à 37°C (utilisation des conditions définies par les tests d'hybridations effectués au préalable). Les hybrides et/ou ADN et/ou molecular beacon n'ayant pas pénétré dans les cellules sont éliminés par 2 étapes de lavages. La dernière étape

Tableau 8 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la rhodamine et du Hoechst 33342.

	<b>Rhodamine</b>	<b>Hoechst 33342</b>
<b>Excitation (nm)</b>	541	343
<b>Emission (nm)</b>	572	483

est le marquage du noyau avec 100 µL/puits du fluorochrome Hoechst 33342, dilué au 1/10 000<sup>ème</sup>.

L'ensemble des lavages sont effectués avec 200 µL/puits de milieu DMEM sans phénol red (le milieu a été choisi sans indicateur de pH afin d'éviter des interférences lors des mesures de fluorescence). Les volumes sont éliminés à l'aide d'une seringue afin de minimiser les remous sur le tapis et d'éviter son décollement.

#### D. Microscopie confocale à balayage laser

Le microscope confocale à balayage laser utilisé dans cette étude (LSM 510, Zeiss) est équipé de plusieurs lasers possédant chacun des longueurs d'ondes spécifiques (Tableau 9). Toutes les observations microscopiques sont réalisées à l'objectif X63 à immersion à l'eau.

Le logiciel d'acquisition d'image utilisé (LSM 510 Meta, Zeiss) est fourni avec l'équipement. La lumière émise par le laser (lumière monochromatique) correspondant à la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome est réfléchi sur l'échantillon par la présence d'un miroir dichroïque. Le laser balaye l'échantillon en X et en Y, et excite le fluorochrome. La lumière d'émission résultant de l'échantillon traverse le miroir dichroïque et passe au travers d'un filtre qui permet de sélectionner la longueur d'onde d'émission du fluorochrome. La présence d'un pinhole avant le photomultiplicateur permet de laisser passer la lumière (les photons) provenant uniquement du plan focal (du point illuminé), la lumière émise par les plans non focaux étant stoppée par ce dernier. La lumière émanant des différents fluorochromes est captée par le photomultiplicateur pour être amplifiée et transformée en signaux électriques dont l'intensité est proportionnelle au nombre de photons perçus.

Tableau 9 : Lasers disponibles et longueurs d'ondes du microscope confocal à balayage laser.

<b>Lasers</b>	<b>Longueur d'onde (nm)</b>	<b>Fluorochromes</b>
<b>Argon/2</b>	458, 477, 488, 514	FAM
<b>Hélium-Néon (HeNe) 594</b>	594	/
<b>Hélium-Néon (HeNe) 543</b>	543	Rhodamine
<b>Hélium-Néon (HeNe) 633</b>	633	Cy5
<b>Diode 405-30</b>	405	Hoechst 33342



---

## *Résultats*

---

En vue d'utiliser les molecular beacons pour détecter la présence d'adénovirus dans des échantillons environnementaux, une étape d'optimisation se révèle indispensable. Le premier objectif a été de montrer l'hybridation de la molecular beacon de l'espèce C sur l'adénovirus de type 2. Le second objectif a été de visualiser l'hybridation *ex situ* de la sonde sur sa cible en suivant la cinétique de la réaction. Enfin, les conditions d'hybridation définies ont été appliquées à la recherche des adénovirus infectieux par hybridation *in situ*.

## **I. Molecular beacon: appariement et conditions d'hybridation ex situ**

### **A. Hybridation de la sonde MB HAdV-C**

Afin de vérifier le bon appariement de la sonde molecular beacon avec sa séquence cible, la molecular beacon et ses amorces associées ont été utilisées lors d'une amplification génomique par PCR en temps réel. En effet, les sondes molecular beacons peuvent être utilisées au même titre que les sondes TaqMan. Le but de cette expérience n'était pas de quantifier ou de valider un système de détection par PCR, mais simplement d'observer l'hybridation de la molecular beacon sur l'ADN d'adénovirus. Ainsi, l'expérience a été réalisée avec des conditions génériques d'amplification, sans aucune optimisation au préalable.

#### 1. Réactions simples

Une gamme de dilution d'ADN d'adénovirus de type 2 a été réalisée puis amplifiée par PCR en temps réel. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 10a. Pour chaque dilution, l'évolution de la fluorescence ( $\Delta R_n$ ) en fonction du nombre de cycles d'amplification a été suivie. Les courbes représentent les 7 concentrations testées, de  $10^6$  à  $10^0$  NPPUC/mL. Pour chaque concentration, on observe une augmentation de l'intensité de fluorescence, même pour de faibles concentrations en adénovirus ( $10^1$  NPPUC/mL). De plus, on observe également que la valeur de Ct évolue avec la concentration en ADN d'adénovirus, cette valeur étant inversement proportionnelle à la concentration d'ADN (Tableau 10). Cette étape permet de montrer que la molecular beacon HAdV-C s'hybride bien sur le génome de l'HAdV2.

#### 2. Réactions croisées

Dans le but de vérifier le non appariement de la molecular beacon HAdV-C avec d'autres séquences que sa cible, une réaction croisée est effectuée en utilisant l'ADN de

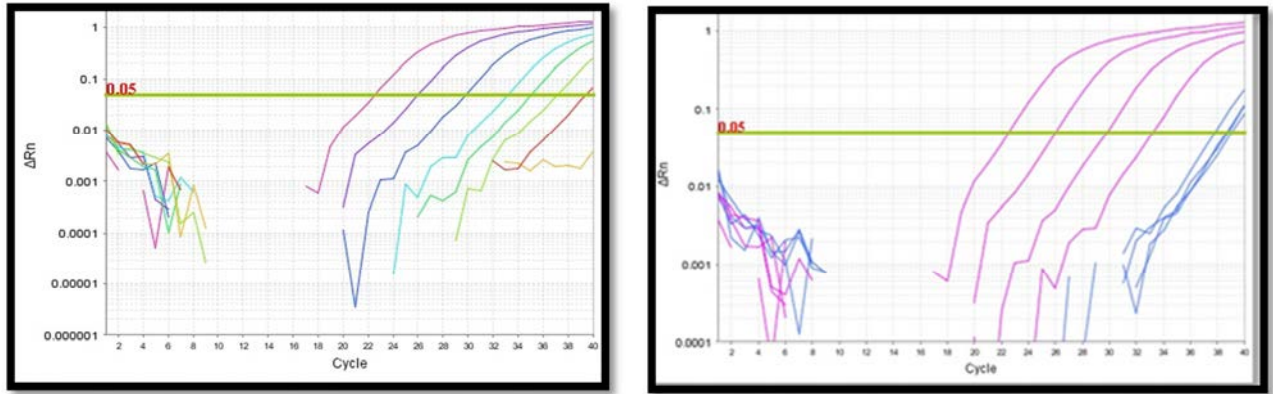


Figure 10 : Courbes d'amplification d'une gamme de dilution d'adénovirus type 2 obtenues par PCR en temps réel avec le système amorces + MB HAdV-C. (a) concentration en HAdV2 de  $10^6$  (courbe rose) à  $10^0$  (courbe rouge) NPPUC/mL, (b) concentration en HAdV2 (rose) et HAdV41 (bleu) de  $10^6$  à  $10^3$  NPPUC/mL.

Tableau 10: Tableau indicatif des valeurs de Ct en fonction de la concentration en adénovirus type 2.

HAdV (NPPUC/mL)	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$	$10^0$
Valeurs de Ct HAdV2	23	26	29	33	35	37	39
Valeurs de Ct HAdV41	38	39	39	39	/	/	/

---

l'HAdV41 (Figure 10b). Les courbes en roses représentent l'hybridation de l'HAdV2 avec la molecular beacon HAdV-C. Les courbes en bleues, quant à elles, représentent l'ADN de l'HAdV41 en présence de la molecular beacon HAdV-C. Ainsi, à concentrations équivalentes en HAdV2 et en HAdV41 en présence de la même concentration de molecular beacon HAdV-C, aucun profil d'amplification n'a été observé pour l'HAdV41.

## B. Hybridation *ex situ*

L'objectif de cette étape était d'optimiser les conditions d'hybridation entre la sonde molecular beacon et sa cible, ici, un ADN simple brin synthétique. L'utilisation de cet ADN sb synthétique permet (i) de mimer le comportement de l'ARNm et (ii) de disposer d'une quantité de matériel génétique conséquente et maîtrisable pour la réalisation des tests. Ainsi, il a été possible d'apprécier, pour des concentrations données en cible et en molecular beacon, (i) le temps nécessaire à la formation de la totalité des hybrides, (ii) le temps au cours duquel les molecular beacons sont capables d'émettre une fluorescence et (iii) d'indiquer à partir de combien de temps les molecular beacons ont atteint leur maximum d'intensité de fluorescence. L'intensité de fluorescence obtenue est exprimée en unité arbitraire (UA), et dépend du paramétrage du lecteur de microplaque.

L'influence de différents paramètres expérimentaux sur l'hybridation a été étudiée, à savoir:

- ✓ la température à laquelle se déroule l'hybridation (25°C ou 37°C)
- ✓ la dénaturation de l'ADN cible
- ✓ la concentration en molecular beacon
- ✓ la concentration en ADN synthétique de l'HAdV2.

Les concentrations utilisées pour tester la température (1) et la dénaturation de l'ADN (2) ont été fixées à 50 nM pour la molecular beacon et à 100 nM pour l'ADN synthétique [5]. Le témoin négatif permet de vérifier que la fluorescence ne provient pas d'un constituant du tampon d'hybridation. Aucune fluorescence n'a été détectée dans chacun des tests effectués. De même, le témoin MB dans lequel est ajouté la molecular beacon sert à visualiser la fluorescence de base émise par cette dernière. On observe une faible augmentation de l'intensité de fluorescence lorsque la molecular beacon est ajoutée.

---

### 1. Influence de la température :

Nous avons choisi la température de 25°C puisqu'il s'agit de la température ambiante, retrouvée généralement au sein des laboratoires. Le choix de la température de 37°C correspond, quant à elle, à la température de culture des cellules.

A 25°C (Figure 11, courbes bleues), au bout de 3 h, l'intensité de fluorescence obtenue est légèrement inférieure à 100 UA. Lorsque l'on se place à 37°C (Figure 11 courbes rouges), l'intensité de fluorescence de 135 UA est atteinte en moins d'une heure seulement, pour atteindre une intensité de fluorescence de 220 UA à 3 h. Ainsi, lorsque la température passe de 25°C à 37°C, la vitesse de réaction d'hybridation est favorisée.

### 2. Effet de la dénaturation de l'ADN avant hybridation :

Ce paramètre, bien qu'inenvisageable lors de l'hybridation *in situ*, a été réalisée afin de voir si les structures secondaires que peut prendre un acide nucléique n'affectent pas l'hybridation. L'étape de dénaturation de l'ADN est effectuée à 95°C pendant 5 minutes. Elle a pour but d'éliminer les structures secondaires du simple brin d'ADN qui peuvent gêner l'hybridation de la molecular beacon sur sa séquence cible.

A 25°C, l'allure des courbes avec dénaturation (courbe bleu foncée) et sans dénaturation (courbe bleu claire) est quasiment identique et varie très peu entre elles. Le maximum de fluorescence qui a pu être atteint approche de 100 UA au bout de 3 h. A 37°C, la courbe représentant l'ADN dénaturé (courbe rouge foncée) est légèrement plus élevée jusqu'à environ 1 h 30 min, traduisant une vitesse de réaction légèrement augmentée, puis s'infléchit pour laisser apparaître un plateau, indiquant que la réaction commence à être limitante en molecular beacon. A partir de 1 h 30 min, l'écart entre les courbes ADN dénaturé (courbe rouge foncée) et ADN non dénaturé (courbe rouge claire) est moindre. Au bout de 2 h 30 min, une intensité de fluorescence de 200 UA a pu être atteinte pour l'ADN dénaturé, il n'aura fallu que 30 minutes de plus à l'ADN non dénaturé pour atteindre cette intensité de fluorescence, soit 3 h.

### 3. Effet de la concentration en molecular beacon à 37°C :

Ce test a été réalisé dans le but d'aiguiller le choix de la concentration en molecular beacon à utiliser lors des tests d'hybridation *in situ*. Trois concentrations en molecular beacon ont été analysées (100, 50 et 25 nM) en présence d'une concentration fixe en ADN cible (100 nM). Plus la concentration en molecular beacon est élevée plus l'intensité de fluorescence est élevée (Figure 12). Au bout de 2 h, les intensités de fluorescences mesurées étaient de 300,

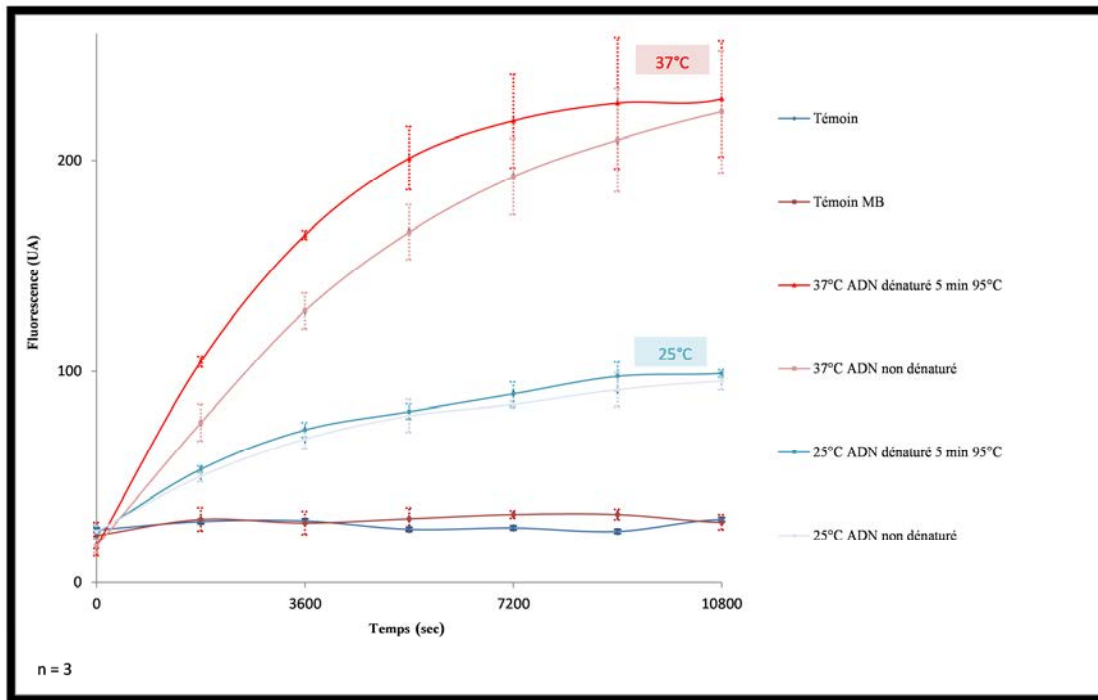


Figure 11 : Evolution de l'intensité de fluorescence (Unité Arbitraire, UA) en fonction du temps à 25°C et à 37°C: Influence de la dénaturation de l'ADN cible sur l'hybridation.

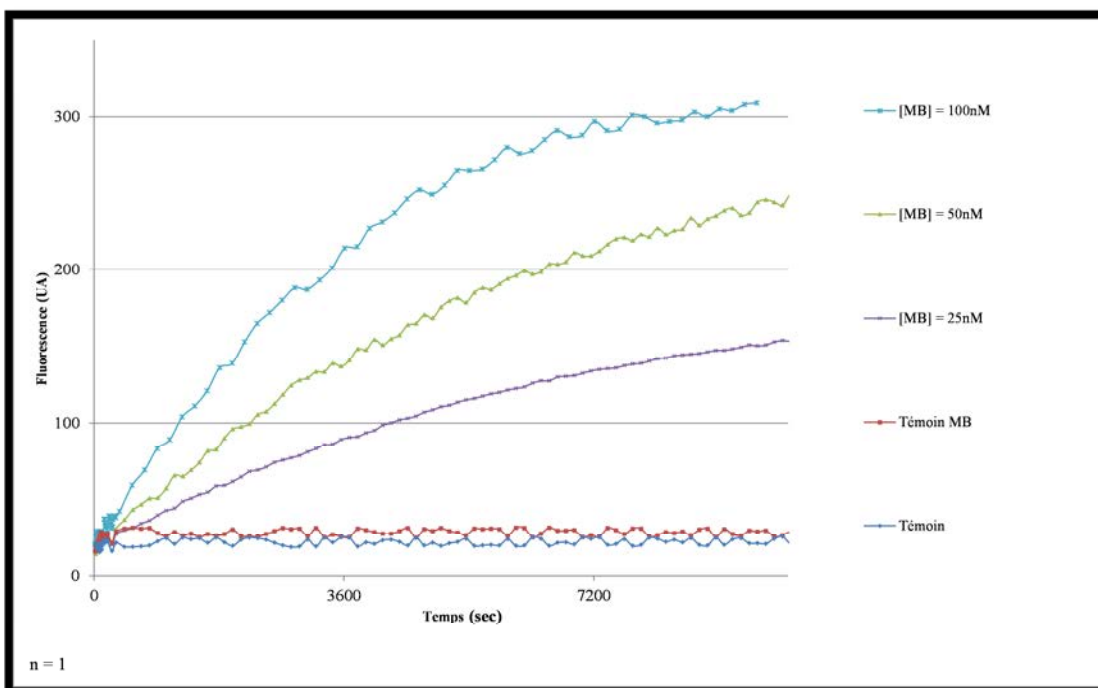


Figure 12 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps à 37°C: Influence de la concentration en molecular beacon pour une concentration en ADN de 100 nM.

---

200 et 100 UA pour des concentrations en molecular beacon de 100, 50 et 25 nM, respectivement. Nous avons donc choisi la concentration en MB de 100 nM afin de favoriser un maximum d'hybridation. Cette concentration sera ultérieurement testée lors des expériences d'hybridation *in situ*.

#### 4. Effet de la concentration en ADN cible de l'HAdV2 :

Différentes concentrations en ADN cible (200, 100, 50, 25 et 5 nM) ont été mises en contact avec une concentration en molecular beacon de 100 nM. Plus la concentration en ADN est élevée (200 nM), plus il y a d'hybridation avec une intensité de fluorescence pouvant atteindre 600 UA au bout de 2 h (Figure 13). A partir de 25 nM, une fluorescence est détectée (100 UA à 2 h). Pour des concentrations inférieures à 25 nM, la fluorescence mesurée est équivalente à celle du contrôle MB.

Le choix d'avoir testé différentes concentrations en ADN cible permet de démontrer que lorsque les tests de détection de l'adénovirus seront réalisés *in vivo*, même si la concentration en adénovirus infectieux est faible, le signal correspondant à l'hybridation de la molecular beacon sur l'ARNm cible de l'adénovirus devrait pouvoir être perceptible, bien que la fluorescence ne soit pas très élevée.

En conclusion :

- ✓ l'hybridation *in situ* sera réalisée à 37°C
- ✓ un temps de contact minimum de 2 h 30 min entre la molecular beacon et les cellules préalablement infectées sera nécessaire pour obtenir un maximum d'hybridation
- ✓ un hybride synthétique formé *ex vivo* (concentration en molecular beacon à 100 nM et concentration en ADN sb à 100 nM) sera utilisé comme témoin positif lors des tests d'hybridation *in situ*.

## **II. Détermination du caractère infectieux des adénovirus : Hybridation *in situ***

Les différents tests sont effectués sur des tapis cellulaires âgés de 2 à 4 jours. La permissivité des cellules a été testée. Pour ce faire, une gamme de concentrations de  $10^6$  à  $10^1$  HAdV2/puits a été inoculée sur un tapis cellulaire de HEK 293A. Les cellules présentant toutes un ECP à différents temps post-infection, la multiplication du virus a donc eu lieu,

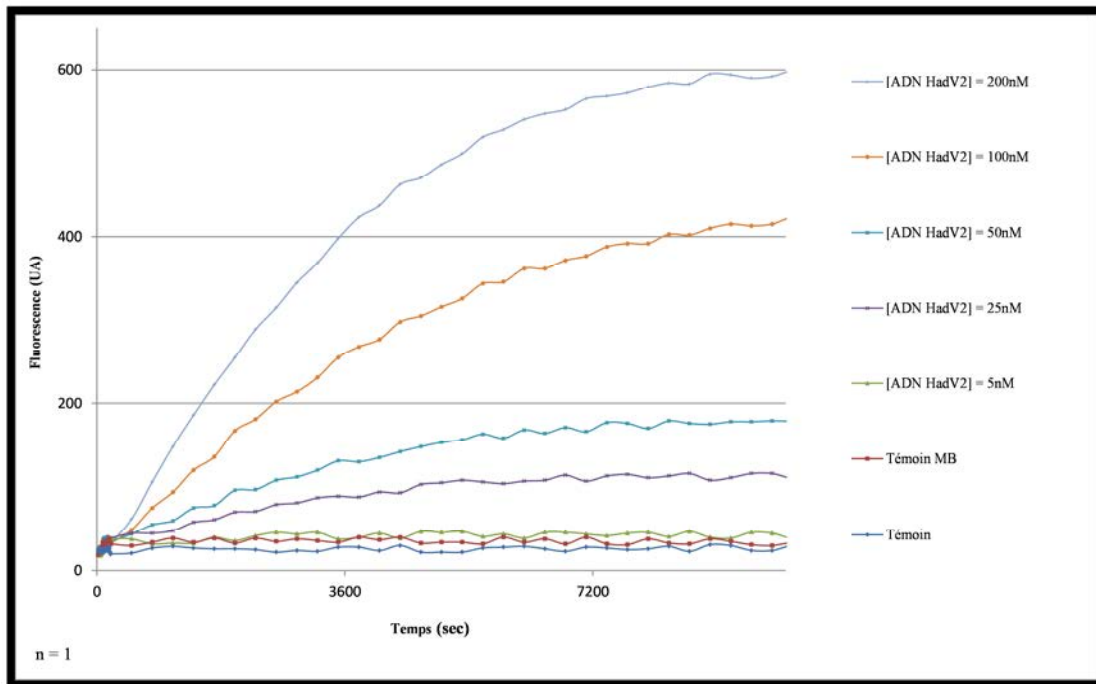


Figure 13 : Evolution de l'intensité de fluorescence (UA) en fonction du temps à 37°C: Influence de la concentration en ADN cible pour une concentration en molecular beacon de 100 nM.



même aux concentrations les plus faibles. D'une part, les cellules sont bien permissives aux HAdV2, et, d'autre part, l'HAdV2 est bien infectieux. De plus, le traitement de coatage réalisé n'influe pas sur la permissivité des cellules HEK 293A.

Le développement méthodologique de cette partie consiste en la réalisation des marquages cellulaires et la visualisation de l'infection par microscopie confocale. Les images sélectionnées font partie des images les plus représentatives de ce que peut présenter le puits analysé.

#### A. Contrôles expérimentaux

##### 1. Contrôles négatifs

La première étape des observations au microscope confocal à balayage laser a été de réaliser des puits témoins pour contrôler la possible auto-fluorescence d'un des constituants du système, à savoir un puits contrôle négatif (1), un puits témoin MB seul (2) et un puits ADN cible seul (3).

1) Afin de voir si la fluorescence ne provient pas d'une autre molécule que de la molecular beacon marquée avec le fluorochrome Cy5, un puits contrôle négatif de cellules HEK 293A sans aucun marquage est excité à la longueur d'onde d'excitation du Cy5, soit 650 nm (Figure 14) :

→ Aucun signal n'a été observé démontrant qu'il n'y a pas d'auto fluorescence des cellules.

2) Lorsque la molecular beacon est ajoutée au tapis cellulaire HEK 293A non infecté (Figure 15) :

→ Le signal obtenu correspond au signal basal qu'émet la molecular beacon lorsqu'elle n'est pas hybridée. Ce signal avait déjà été observé lors des tests d'hybridation *ex situ* effectués initialement pour déterminer les meilleures conditions d'hybridation.

3) Un puits est également réalisé avec ajout de l'ADN cible de l'adénovirus seul (Figure 16) :

→ Aucune fluorescence n'a été observée démontrant également que l'ADN de l'adénovirus ne fluoresce pas à la longueur d'onde d'excitation du Cy5.

##### 2. Contrôle positif : Détection de l'hybride synthétique au sein des cellules HEK 293A

Lorsque la sonde molecular beacon est hybridée sur sa cible, le fluorochrome Cy5 est éloigné du quencher qui permettra au fluorochrome, lorsque celui-ci sera excité par le laser,

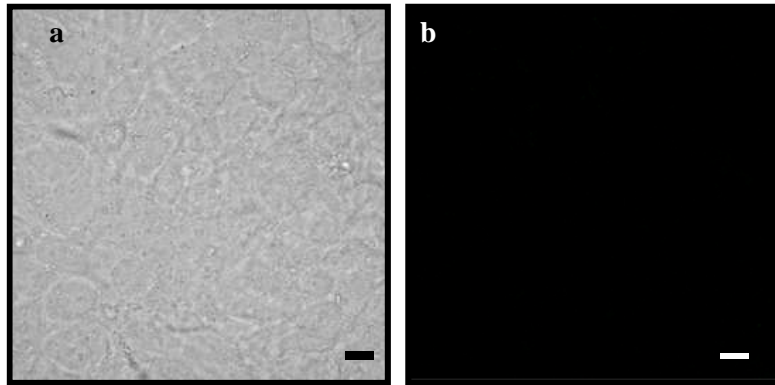


Figure 14 : Cellules HEK 293A non infectées, fixées au PFA 4%, perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min, 4°C) non marquées (contrôle négatif). Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x. (a) contraste de phase (b) fluorescence (Cy5), barre = 20 µm.

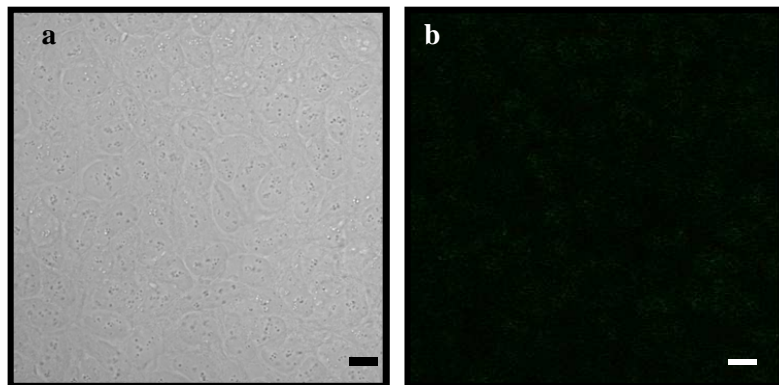


Figure 15 : Cellules HEK 293A non infectées, fixées au PFA 4%, perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min, 4°C) en présence de la molecular beacon MB HAdV-C (100 nM, 1 h, °C ambiante). Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x. (a) contraste de phase (b) fluorescence (Cy5), barre = 20 µm.

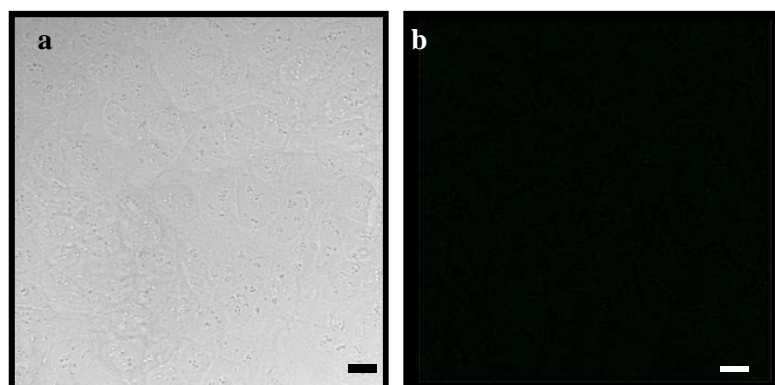


Figure 16 : Cellules HEK 293A non infectées, fixées au PFA 4%, perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min, 4°C) en présence d'ADN cible (ADN synthétique, 100 nM, 1 h, °C ambiante). Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x. (a) contraste de phase (b) fluorescence (Cy5), barre = 20 µm.

d'émettre une fluorescence qui sera captée par le photomultiplicateur. A cette longueur d'onde, il est possible d'observer l'apparition de signaux fluorescents plus ou moins intenses et diffus dans le noyau, correspondant à l'hybride ADN HAdV2/MB HAdV-C formé *ex situ* (Figure 17). L'utilisation de l'hybride permet d'obtenir des informations de différentes natures :

- ✓ il nous renseigne sur la morphologie que pourra avoir le signal correspondant à l'hybride ARNm HAdV2/MB HAdV-C dans les cellules infectées. Les signaux de l'hybride sont généralement localisés au sein des noyaux cellulaires, et sont répartis de manière homogène sur l'ensemble du tapis cellulaire d'un puits de la chambre de culture.
- ✓ il sert à confirmer la perméabilisation des cellules. Cette étape permet de démontrer que la perméabilisation est importante pour visualiser la fluorescence et détecter les signaux correspondant à l'hybride. La figure 18 montre un puits contenant des cellules non perméabilisées qui ne permet pas l'expression de signaux fluorescents de l'hybride. Les quelques signaux fluorescents présents correspondent très certainement à l'hybride, qui a pu pénétrer dans une cellule suite à une lésion dans la membrane cellulaire. Il est donc probable que les cellules infectées nécessitent également un traitement de perméabilisation pour permettre à la molecular beacon de pénétrer dans les cellules.
- ✓ à démontrer que la solution de molecular beacon utilisée est intacte.

## B. Marquages cellulaires

Les marquages cellulaires sont utilisées dans le but de quantifier les cellules infectées et non infectées et de permettre la localisation des signaux correspondant à la molecular beacon avec l'ARNm de l'adénovirus type 2.

Un puits avec un marquage membranaire et nucléaire est représenté sur la Figure 19. Les couleurs des membranes et des noyaux ont été choisies en fonction des spectres d'émission situés dans le rouge pour la rhodamine et le bleu pour le Hoechst 33342. Le fluorochrome porté par la molecular beacon possédant une longueur d'onde d'émission hors du spectre visible, nous avons choisi de le faire apparaître en vert.

### 1. Fixation des tapis cellulaires

Il est nécessaire d'adapter le fixateur en fonction du constituant cellulaire que l'on souhaite observer. Quatre solutions ont été appliquées sur la lignée cellulaire HEK 293A : la

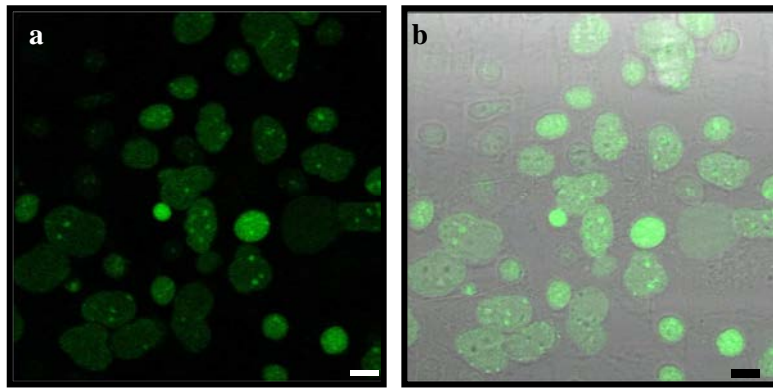


Figure 17 : Cellules HEK 293A non infectées, fixées au PFA 4%, et perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min, 4°C) en présence de l'hybride (MB HAdV-C 100 nM, ADN HAdV2 100 nM, 2 h 30 min, 37°C). Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x. (a) fluorescence (Cy5), (b) image fusionnée contraste de phase/Cy5, barre = 20 µm

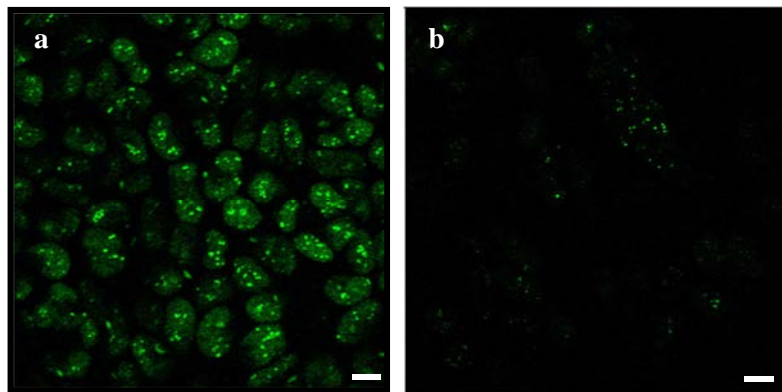


Figure 18 : Visualisation de l'hybride au sein des cellules HEK 293A non infectées, fixées au PFA 4%, (a) perméabilisées en présence de l'hybride (MB HAdV-C 50 nM, ADN HAdV2 100 nM, 1 h, T amb), (b) non perméabilisées en présence de l'hybride (MB HAdV-C 50 nM, ADN HAdV2 100 nM, 1 h, T amb). Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x, barre = 20 µm.

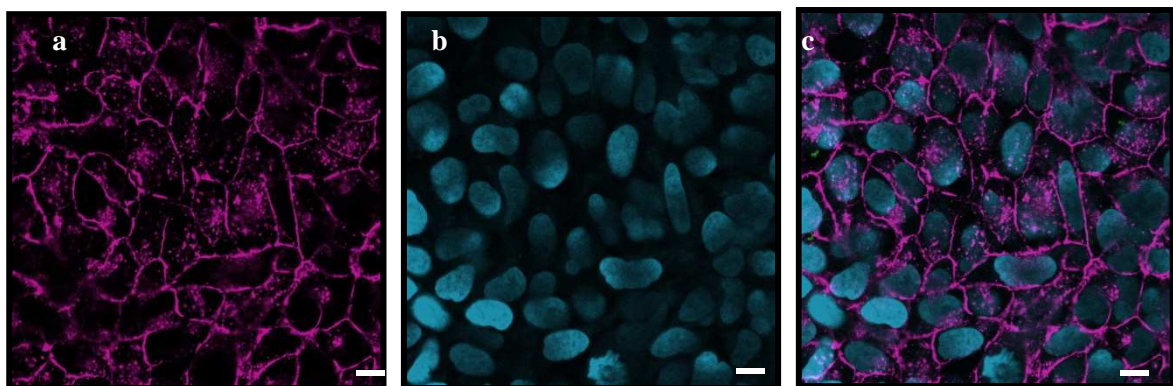


Figure 19 : Marquages de la lignée cellulaire HEK 293A non infectée, fixées au PFA 4%, perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min, 4°C) (a) membrane plasmique des cellules colorée à la rhodamine (b) noyaux des cellules marqués au Hoechst 33342, (c) image fusionnée. Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x, barre = 20 µm.

---

solution de Carnoy, le méthanol glacé, le PFA 4% stabilisé avec 10% de méthanol, et PFA 4%. Selon le fixateur utilisé, la morphologie du signal de l'hybride observé est parfois différente (Figure 20).

- ✓ La fixation avec la solution de Carnoy laisse apparaître un signal de l'hybride diffus retrouvé dans l'espace intercellulaire.
- ✓ L'utilisation du méthanol permet de visualiser le signal de l'hybride au sein des noyaux cellulaires, mais avec une intensité de fluorescence faible. Sur quelques champs du puits fixé au méthanol, le marquage nucléaire est parfois très diffus et de mauvaise qualité.
- ✓ La solution de PFA 4% stabilisée avec 10% de méthanol présente les signaux de l'hybride sous forme de spots fluorescents très nets et localisés dans les noyaux des cellules.
- ✓ La solution de PFA 4% montre un signal de l'hybride également au sein des noyaux cellulaires, se présentant comme un signal diffus dans tout le noyau avec quelques spots d'une intensité de fluorescence élevée.

Bien que le rôle des fixateurs ne soit pas de fixer les cellules au support mais de figer les structures cellulaires afin de permettre leurs observations en microscopie, l'adhérence des tapis cellulaires au support a pu être également évaluée lors de cette étape. Les tapis cellulaires fixés au méthanol ou à la solution de Carnoy, étaient intacts à la fin des marquages. Quand les cellules étaient fixées au PFA 4% / 10% méthanol ou au PFA 4%, les tapis cellulaires se décollaient parfois du support.

En conclusion, la solution de Carnoy et la solution de méthanol révèle une fluorescence correspondant à l'hybride mais le signal est très aléatoire au sein de l'ensemble du tapis cellulaire. La solution de PFA 4% et la solution de PFA additionné de 10% de méthanol permettent d'obtenir des marquages cellulaires nets des noyaux et des membranes cellulaires, homogènes sur l'ensemble des puits, et permettent de détecter l'hybride de manière uniforme souvent localisés au sein des noyaux cellulaires avec des spots d'une intensité de fluorescence élevée. Ces deux derniers fixateurs donnant des résultats comparables, la solution de PFA 4% a été préférée pour la fixation.

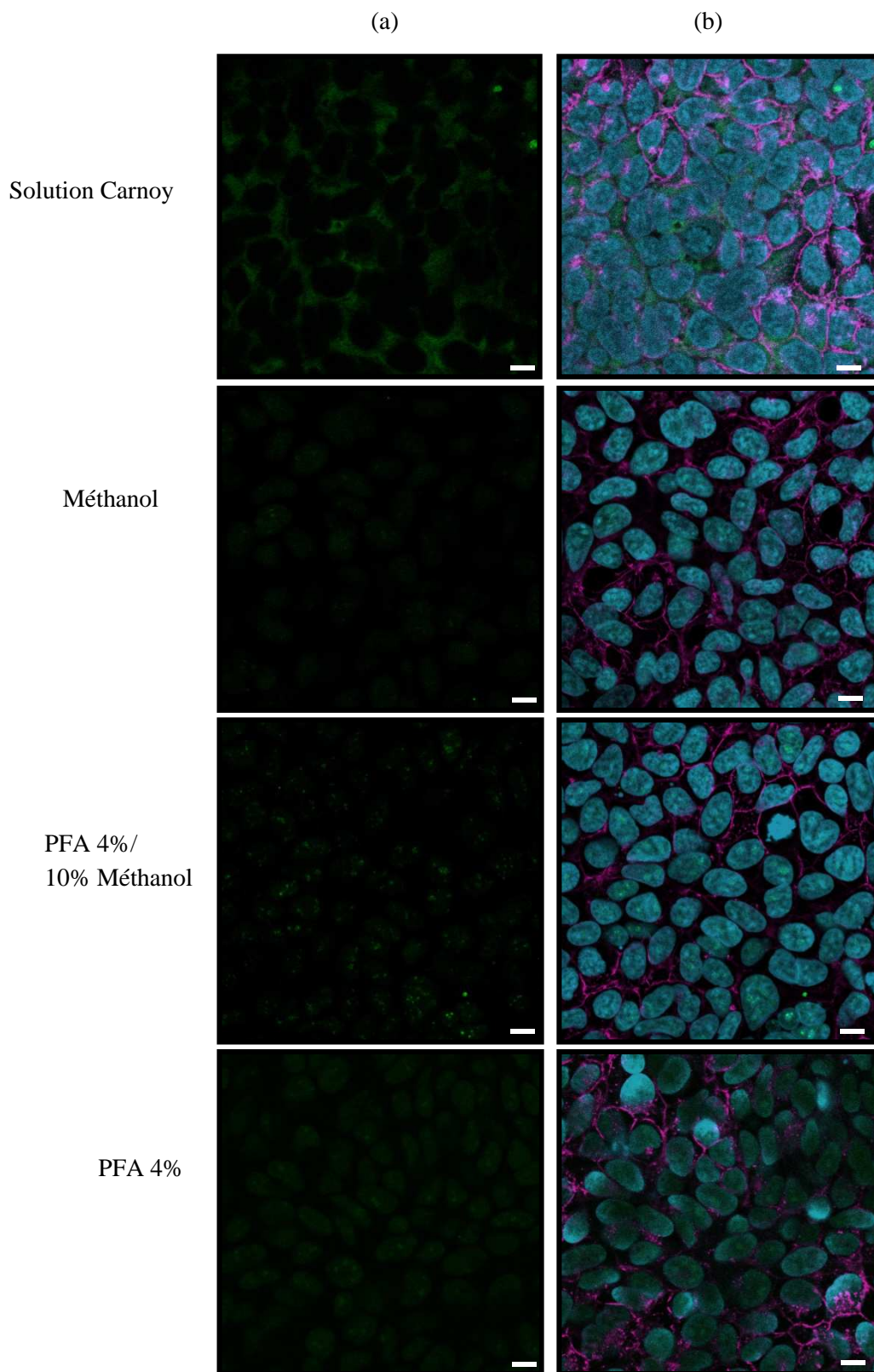


Figure 20: Effet des différents fixateurs testés (solution de Carnoy, méthanol, PFA 4% stabilisé avec 10% de méthanol et PFA 4%) sur les marquages cellulaires des cellules HEK 293A non infectées, perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min, 4°C). Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x. (a) hybride (MB HAdV-C 100 nM, ADN HAdV2 100 nM, 2 h 30 min, 37°C). (b) images fusionnées (hybride, membrane plasmique, noyau), barre = 20 µm.



## 2. Concentrations en molecular beacon

Cette étape permet de confirmer l'utilisation de la concentration en molecular beacon définie lors des expériences *ex situ*, soit 100 nM. Pour ce faire, différentes concentrations (100, 250 et 500 nM) préparées dans le tampon d'hybridation sont mises en contact des tapis cellulaires perméabilisés, sans infection préalable (Figure 21).

Pour une concentration en MB égale à 100 nM, aucune fluorescence n'a été décelée sur lignée cellulaire HEK 293A. Pour une concentration en MB de 250 nM, quelques signaux fluorescents ont été aperçus sur lignée cellulaire HEK 293A. Pour une concentration égale à 500 nM, de nombreux signaux fluorescents ont été détectés.

Au vu des résultats obtenus sur la lignée cellulaire HEK 293A, la concentration adéquate semble être celle de 100 nM. L'utilisation de concentrations supérieures induit l'apparition de faux-positifs, susceptibles d'interférer avec les signaux correspondant à l'hybridation MB HAdV-C/ARNm HAdV 2 et donc de fausser les résultats de quantification.

## C. Tests d'infectiosité

Trois types de test d'infectiosité ont été appliqués à la lignée cellulaire HEK 293A.

### 1. Test en conditions extrêmes

Lors du premier essai effectué pour la détection des signaux réels de l'HAdV2 sur la lignée cellulaire HEK 293A, des conditions « extrêmes » ont été appliquées. Le tapis cellulaire a été infecté avec une concentration élevée en HAdV2, soit  $10^6$  NPPUC/puits. Les tapis cellulaires ont montré un ECP en moins de 24 h p.i. (18-20 h p.i.).

Lorsque l'observation est réalisée sur un champ proche de l'ECP (Figure 22), on distingue un marquage de la membrane cellulaire quasi inexistant, mais également de nombreux signaux fluorescents au sein des noyaux cellulaires dus à l'hybridation entre la molecular beacon MB HAdV-C et l'ARN messager de l'HAdV2 au cours de son cycle de multiplication.

Egalement, lors de l'observation de tapis cellulaires infectés depuis plusieurs jours (96 h p.i.) et/ou présentant des ECP, un changement morphologique du noyau des cellules a pu être mis en évidence (Figure 23). Le marquage du noyau n'est plus uniforme comme il peut l'être dans les puits témoins. Les noyaux cellulaires paraissent donc altérés, le marquage montrant que l'ADN restant est condensé au pourtour du noyau. Cette information peut se révéler utile pour confirmer que les cellules ont bien été infectées.

De plus, ce test a permis de vérifier que la perméabilisation est, comme pour l'hybride formé avec l'ADN synthétique (témoin positif), nécessaire pour permettre à la molecular beacon de

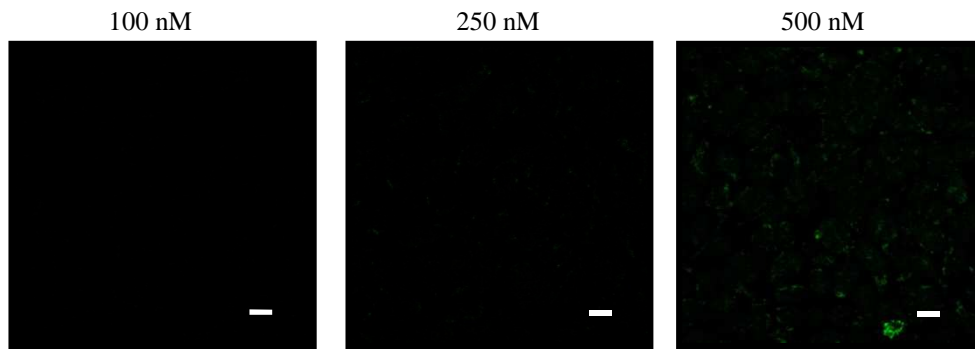


Figure 21 : Cellules HEK 293A non infectées, fixées au PFA 4%, perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min, 4°C) en présence de différentes concentrations en molecular beacon MB HAdV-C (2 h, 37°C). Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x, barre = 20 µm.

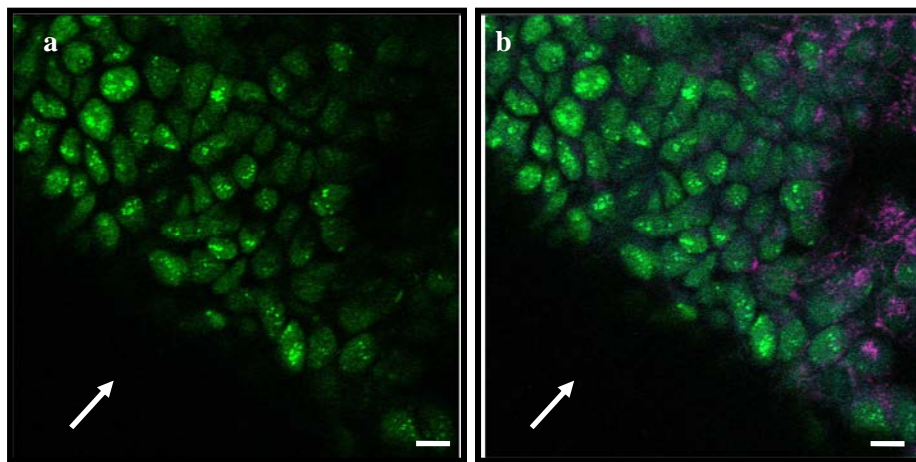


Figure 22 : Cellules HEK 293A infectées par l'adénovirus de type 2 ( $10^6$  NPPUC/puits, 18-20 h p.i.), fixées au PFA 4%, perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min, 4°C). (a) Détection de l'ARNm de l'hexon de l'adénovirus de type 2 par la molecular beacon HAdV-C (2 h 30 min, 37°C), (b) image fusionnée (marquage noyau et membrane). Flèche symbolise l'emplacement de l'ECP. Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x, barre = 20 µm.

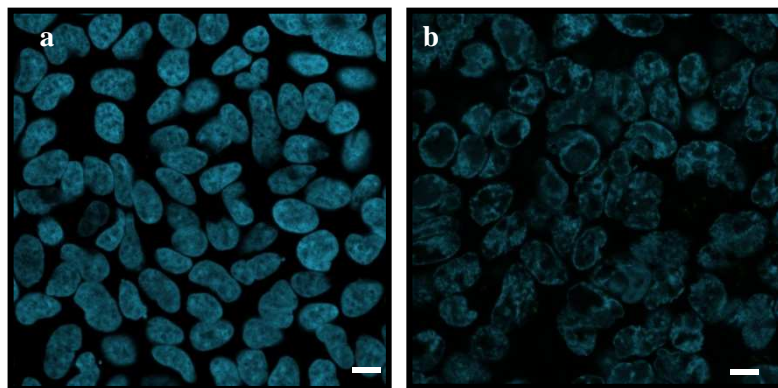


Figure 23: Noyaux des cellules HEK 293A, non infectées (a) et infectées (b) par l'adénovirus de type 2 ( $10^6$  NPPUC/puits, 96 h p.i.), fixées au PFA 4%, perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min, 4°C) et marquées au Hoechst 33342. Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x, barre = 20 µm.



pénétrer au sein des cellules afin de s'hybrider ultérieurement à l'ARNm viral. Lorsque les cellules sont non perméabilisées aucun spot fluorescent n'est présent dans les cellules contrairement aux cellules perméabilisées (Figure 24).

## 2. Tests aux concentrations environnementales

A terme, cette méthode de détection étant destinée à être appliquée à des échantillons environnementaux, des concentrations qui peuvent être représentatives des concentrations de l'environnement ont été utilisées pour infecter des tapis cellulaire HEK 293A, soient des concentrations en HAdV2 de  $10^5$  à  $10^0$  NPPUC/puits (Figure 25). Les marquages ont été effectués à moins de 24 h p.i. Les résultats des concentrations  $10^2$  à  $10^0$  NPPUC/puits ne sont pas présentés. Seulement une cellule présentait un spot fluorescent pour une concentration en HAdV2 de  $10^2$  NPPUC/mL. Pour les autres concentrations ( $10^1$  et  $10^0$  NPPUC/mL) aucun signal n'a été retrouvé. L'apparition de spots fluorescents au sein de certains noyaux cellulaires montre que toutes les cellules ne sont pas infectées. En revanche, plusieurs spots fluorescents ont été mis en évidence au sein d'un même noyau cellulaire. Le tableau 11 indique le pourcentage de cellules infectées/champs, bien qu'un seul champ ait été pris en considération. Ces valeurs sont donc présentées à titre indicatif, car elles ne sont pas représentatives de l'ensemble du puits. Toutefois, un lien entre la concentration en adénovirus et le nombre de cellules infectées est visible. Plus la concentration en adénovirus est élevée, plus le nombre de cellules infectées est élevé, avec 44% de cellules infectées à  $10^4$  NPPUC/puits pour 2% de cellules infectées à  $10^2$  NPPUC/puits.

## 3. Durée post-infection

Afin de visualiser le moment à partir duquel le gène de l'hexon est transcrit en ARNm, nous avons effectués des marquages cellulaires à différentes heures post-infection. En se basant sur les données recueillies, nous avons choisi d'étendre la durée d'infection de 8 h p.i. à 42 h p.i. Ainsi, à 8, 12, 18, 24, 30, 36 et 42 h, des marquages ont été effectués. Ces conditions ont été réalisées avec une concentration fixe en HAdV2 de  $10^6$  NPPUC/puits. Pour chaque heure p.i. analysée, aucune fluorescence n'a été visible dans le témoin de la molecular beacon. Le témoin positif (Figure 26f) a permis de révéler la présence de l'hybride (ADN HAdV2/MB HAdV-C). Les expériences peuvent donc être interprétées. Les résultats des puits infectés sont les suivants (Figure 26):

- ✓ à 8 h et 12 h p.i.: aucun signal d'hybridation n'a été détecté dans les puits infectés.

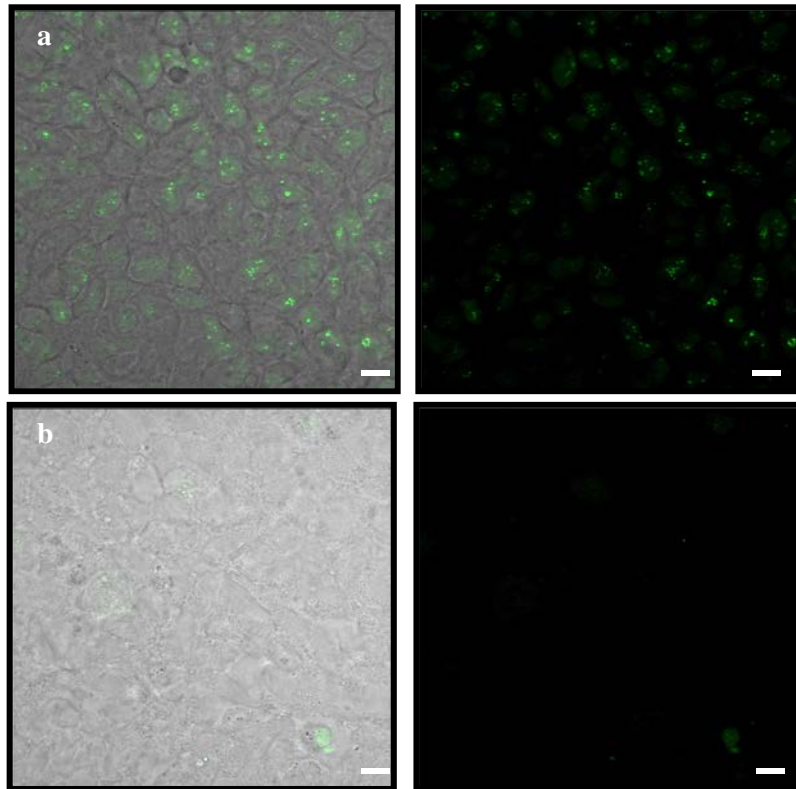


Figure 24 : Cellules HEK 293A infectées par l'adénovirus de type 2 ( $10^6$  NPPUC/puits, 18-20 h p.i.), fixées au PFA 4%. Concentration en molecular beacon  $2 \mu\text{M}$  (2 h 30 min,  $37^\circ\text{C}$ ), (a) perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ), contraste de phase/fluorescence (Cy5), (b) non perméabilisées, contraste de phase/fluorescence (Cy5). Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x, barre =  $20 \mu\text{m}$ .

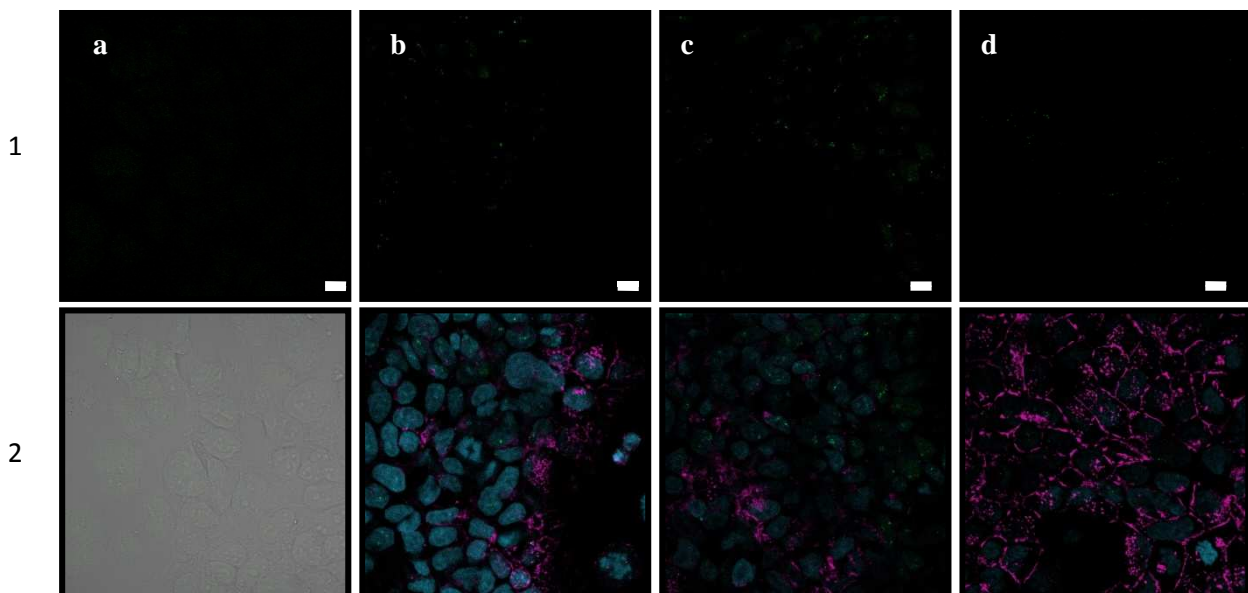


Figure 25: Cellules HEK 293A non infectées (a) et infectées (18-20 h.p.i) par une concentration en HAdV2 de (b)  $10^5$  NPPUC/mL, (c)  $10^4$  NPPUC/mL et (d)  $10^3$  NPPUC/mL. Cellules fixées au PFA 4% et perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) et molecular beacon en concentration 100 nM, 2 h 30 min,  $37^\circ\text{C}$  (1) Fluorescence Cy5, (2) image fusionnée rhodamine, Hoechst 33342, Cy5. Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x, barre =  $20 \mu\text{m}$ .

Tableau 11 : Pourcentage de cellules infectées pour différentes concentrations (NPPUC/puits) d'adénovirus type 2 inoculées. Observation à 18-20 h p.i.

<b>HAdV2 (NPPUC/puits)</b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>2</sup></b>	<b>10<sup>1</sup></b>	<b>10<sup>0</sup></b>
<b>Nombre de cellules par champs</b>	72	86	50	41	41	29
<b>Nombre de cellules infectées par champs</b>	29	38	12	1	0	0
<b>% de cellules infectées par champs</b>	40	44	24	2	0	0

- ✓ à 18 h p.i., 24 h p.i. et 30 h p.i.: aucune fluorescence n'a été mise en évidence au niveau des tapis cellulaires infectés, même à 18 h p.i. montrant que les résultats sont difficilement reproductibles
- ✓ à 36 h p.i.: aucun signal correspondant à l'adénovirus n'a été repéré sur les différents champs analysés du puits. Néanmoins, à partir de 36 h, il est possible d'observer le changement morphologique de certains noyaux, mis en évidence lors de l'apparition d'un ECP (Figure 23). Sur les 10 champs analysés du puits infecté à  $10^6$  NPPUC/puits, une moyenne de 2,5% de cellules/champ présente un noyau identique à ceux observés lors de l'ECP.
- ✓ à 42 h p.i.: sur la majorité des champs observés, aucun signal n'a été récupéré. Cependant, un champ du puits a révélé la présence d'une fluorescence verte soit environ 17% de cellules infectées, localisée dans quelques noyaux, indiquant la présence de l'adénovirus (Figure 26e). Egalement, comme observé à 36 h p.i. la des noyaux morphologiquement différents sont retrouvés sur les 10 champs analysés. Environ 2,6% des noyaux se présentent sous cette forme. Ainsi, le pourcentage de cellules présentant un noyau différent est le même que celui retrouvé à 36 h.

En résumé, seulement 4 tests d'infectiosité sur les 30 effectués ont permis de montrer le caractère infectieux de HAdV2. L'hybride étant toujours détectable lors des différentes expériences effectuées post infection, rien ne peut justifier l'absence récurrente du signal mis à part que la recherche du signal ne se fait pas au bon moment du cycle où la transcription de l'ARN messager du gène de l'hexon se produit.

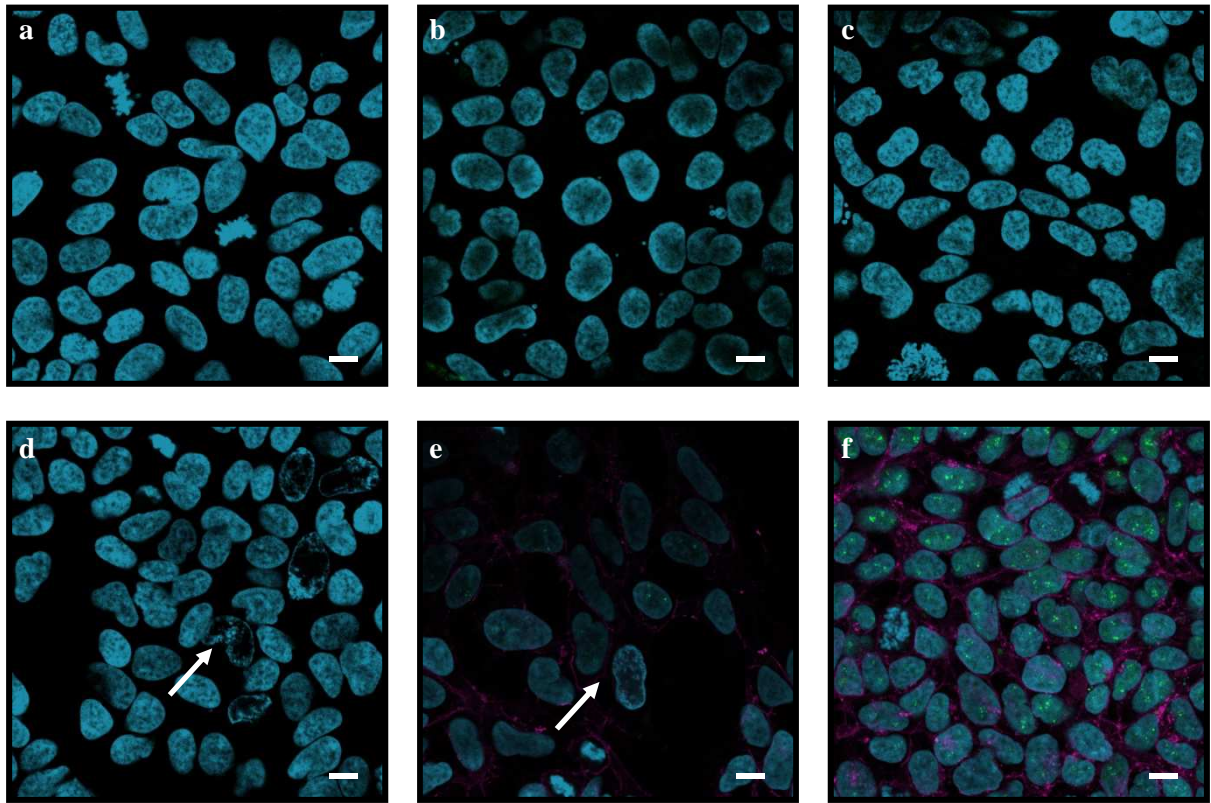


Figure 26 : Cellules HEK 293A infectées avec HAdV2 ( $10^6$  NPPUC/puits), fixées au PFA 4%, perméabilisées (0,1% Triton X-100, 5 min, 4°C) et colorées (rhodamine et Hoechst 33342). Suivi du signal de la molecular beacon en concentration 100 nM, (2 h, 37°C) à 18 h (a), 24 h (b), 30 h (c), 36 h (d) et 42 h (e) post-infection. (f) Contrôle positif avec l'hybride. Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x. Les flèches indiquent les noyaux lésés, barre = 20  $\mu$ m.

---

*Discussion -  
Conclusion -  
Perspectives*

---

Le développement de méthodes permettant de différencier les virus infectieux des non infectieux est un enjeu actuel majeur pour améliorer l'évaluation des risques sanitaires potentiellement présents dans l'environnement. En effet, la contamination virale des eaux est devenue une préoccupation grandissante au vue du nombre de maladies pouvant être véhiculées par cette ressource. La méthode en cours de développement, dont l'objectif est de détecter l'ARNm de l'hexon des adénovirus humains au sein des cellules HEK 293A, devrait permettre une détection rapide des virus infectieux présent dans un échantillon donné. Les expériences réalisées ont permis de montrer l'intérêt de la méthodologie sélectionnée.

La lignée cellulaire HEK 293A a été choisie préférentiellement car elle permet (i) une multiplication plus rapide des adénovirus (Jiang et al. 2009), (ii) la multiplication des adénovirus entériques types 40 et 41 (Siqueira-Silva et al. 2009) et (iii) une meilleure expression des signaux fluorescents que d'autres lignées cellulaires, notamment la lignée A549 (Li et al. 2010b). Toutefois, malgré l'utilisation d'un subclone (293A) ayant une capacité d'adhérence au support supérieure à celle des cellules originelles (293), des problèmes de décollement des tapis cellulaires ont été rencontrés.

Lors de cette étude, différents traitements de fixation permettant de maintenir les structures cellulaires ont été appliqués à la lignée cellulaire HEK 293A (Srinivasan et al. 2002). Selon les fixateurs testés, les résultats obtenus diffèrent et ne permettent pas tous de visualiser le signal recherché. Dans des études comparables avec le coxsackievirus et le virus de l'hépatite A (Wang et al. 2005; Yeh et al. 2008), le PFA est utilisé comme agent de fixation des structures cellulaires. Dans les puits fixés au PFA 4%, les signaux de l'hybride retrouvés sont uniformes et homogènes sur l'ensemble du tapis cellulaire, contrairement aux signaux qui ont pu être observés avec les autres fixateurs. Une étude de Basyuk et al. (2000) rapporte que l'utilisation du PFA à pH alcalin (pH compris entre 9 et 10), lors de l'hybridation *in situ*, augmenterait le signal de détection de la sonde oligonucléotidique avec l'ARNm, par dénaturation de l'ARN cible. L'accessibilité de la séquence cible et donc l'hybridation serait facilitée. L'étude de Urieli-Shoval (1992) confirme l'étude précédente en démontrant que la fixation au PFA conserverait mieux l'ARN lors de l'hybridation *in situ* (à hauteur de 45%) que la solution de Carnoy (seulement 10% d'ARN conservé), et présenterait un signal d'hybridation plus fort. De plus, les marquages cellulaires du noyau et de la membrane sont très nets, principalement car le PFA ne solubilise pas les lipides des membranes, d'où la nécessité de perméabiliser les cellules par la suite. Contrairement au PFA 4%, le méthanol et la solution de Carnoy (contient en majorité de l'éthanol) ne semblent pas être les fixateurs les mieux adaptés. Même si les 2 solutions sont composées d'alcool et

agissent par déshydratation, les résultats obtenus sont différents. L'association de l'acide acétique avec l'éthanol et le chloroforme dans la solution de Carnoy contrairement à l'emploi seul de méthanol aurait peut-être une incidence sur la précipitation des acides nucléiques, qui peut justifier la différence de résultats du signal de l'hybride entre ces deux modes de fixation. Bien que les fixateurs aient une incidence sur le maintien des structures cellulaires et non sur l'adhésion des tapis cellulaires au support, il est probable que l'agent fixateur diffusant dans les tapis cellulaires réagissent également avec les protéines de la solution de coatage ce qui pourrait justifier le maintien des tapis cellulaires au fond des puits. Lors de l'utilisation du méthanol glacé ou de la solution de Carnoy, aucun décollement des tapis cellulaires n'a été observé. Ces solutions qui agissent par déshydratation, provoquent une agglutination des protéines cellulaires entre elles qui vont s'agréger aux protéines de la solution de coatage. Quant au PFA, qui réagit avec le groupement amine (NH<sub>2</sub>) des protéines pour former des ponts méthyléniques, des décollements partiels ou totaux des cellules ont souvent été visualisés. L'hypothèse qui pourrait être émise au vue des résultats est que les ponts méthyléniques formés par le PFA avec les groupements NH<sub>2</sub> se dissoudraient progressivement en solution aqueuse. Une alternative envisageable à ce problème de décollement pourrait être l'utilisation d'une autre lignée cellulaire plus adhérente au support, comme la lignée A549. Une partie seulement de l'optimisation de la méthode peut être effectuée avec cette lignée, qui permet la multiplication de l'HAdV2 mais pas des adénovirus types 40 et 41. Des premiers tests ont été effectués. Comme suspecté, la tenue des tapis cellulaires était irréprochable et la détection des signaux de l'hybride a été observée (Annexe 1). Toutefois, l'ARNm des HAdV2 au sein des cellules n'a pas été mis en évidence après infection des tapis cellulaires avec 10<sup>6</sup> NPPUC/puits, de 18 à 42 h.p.i. Egalement, l'étude de Li et al. (2010b) souligne l'importance de la sensibilité de la lignée cellulaire sélectionnée, pour les études de FACS. En effet, à concentration équivalente en HAdV2, le pourcentage de cellules infectées détectées est moins élevé avec la lignée A549 qu'avec la lignée HEK 293A. L'utilisation de la lignée A549 n'est donc pas un choix optimal puisque la rapidité de la réponse est un élément primordial dans l'analyse du risque microbiologique.

La détection du signal de l'HAdV2 n'a pu être observée que lors de 4 expériences sur les 30 réalisées au cours de cette étude. Bien que peu reproductible, nous avons pu constater la présence de signaux fluorescents uniquement dans les puits infectés (et non dans les témoins), traduisant l'hybridation de la molecular beacon sur l'ARNm du gène de l'hexon de l'HAdV2, à moins de 24 h p.i. et à 42 h p.i. Ces deux temps p.i. pourraient correspondre à deux cycles de multiplication successifs du virus, à savoir le premier cycle initié suite à



l'infection initiale des cellules et le second cycle initié après la propagation des virions formés aux cellules voisines. Ceci met clairement en évidence l'importance d'identifier la durée d'un cycle de multiplication. En effet, pour réaliser une quantification des virus infectieux présents dans un échantillon donné, uniquement les cellules initialement infectées doivent être comptabilisées afin de ne pas surestimer la concentration virale. Egalement, à partir de 36 h post infection, la présence de noyaux morphologiquement différents est bien visible. Des modifications structurales du noyau, avec une agrégation ou une lyse de la chromatine, chez des cellules infectées par des HAdVs ont déjà été rapportées (Harrach et al., 2012). Ces modifications apparaîtraient assez tardivement dans le cycle de multiplication, au moment de la formation de l'ECP avec l'arrondissement des cellules infectées. Ceci est cohérent avec les résultats à 42 h p.i.(Figure 25e) où les signaux retrouvés de l'HAdV2 sont juxtaposés à un noyau ayant une morphologie différente.

Différents éléments ont été investigués pour comprendre la non reproductibilité des résultats positifs :

- (i) La sensibilité et la permissivité des cellules HEK 293A a été régulièrement vérifiée en observant l'apparition d'un ECP en quelques jours, confirmant la multiplication des HAdV2 sur cette lignée cellulaire.
- (ii) Egalement, les tests de perméabilisation ont permis de montrer qu'il s'agissait d'une étape cruciale pour permettre à la sonde oligonucléotidique molecular beacon de pénétrer au sein des cellules. L'agent perméabilisant utilisé, le Triton X-100, possède des propriétés tensio-actives agissant avec les liaisons hydrogènes présentes dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Cela entraîne une désorganisation de sa structure, d'ailleurs confirmé par le marquage membranaire non uniforme, et permet ainsi l'entrée de la molecular beacon et/ou de l'hybride au sein la cellule. L'hybride, servant de témoin positif, ayant été détecté à chacune de nos expériences, la perméabilisation n'était pas l'étape limitante.
- (iii) La durée du cycle de multiplication, qui peut être dépendante du type viral et de la lignée cellulaire. Le gène ciblé dans l'étude est le gène de l'hexon (L3), il s'agit du 3<sup>ème</sup> gène transcrit lors de la phase tardive du cycle de multiplication des adénovirus. Généralement, les gènes codant les protéines de structure sont exprimés à la fin du cycle de multiplication, mais l'écart entre les données retrouvées dans la littérature étant très importante, il est difficile de cibler le moment exact ou le gène va être transcrit en ARNm. Comme développé dans l'analyse bibliographique, le cycle peut s'étendre de 10

h à 14 h (Russell, 2000), à 24 h (Molinier-Frenkel and Boulanger 2003) et plus. L'étude de Zhao (2007) montre que la réplication de l'ADN de l'adénovirus débute seulement à partir de 24 h p.i., indiquant le début de la phase tardive et l'étude de Ko et al. (2003) ont révélé la transcription des ARNm du gène de l'hexon par RT-PCR à 24 h et 36 h p.i. sur les lignées cellulaires 293 (HAdV41) et A549 (HAdV2). Lors d'une étude portant sur la détection de l'ARNm du gène de la fibre (gène tardif) sur d'autres lignées cellulaires, HBEC ou PHK, il n'aura fallu que 8 à 12 h p.i. (Dorer et al. 2011) pour mettre en évidence la synthèse du transcrit. Dans notre étude, puisque les signaux de la molecular beacon ont été retrouvés majoritairement aux environs de 18-20 h p.i., il est possible que la durée du cycle cellulaire en lignée HEK 293A soit d'environ 20-24 h. Ainsi, les résultats obtenus coïncident avec les résultats retrouvés dans la littérature, à savoir que la détection de l'ARNm de l'adénovirus serait facilitée à partir de 18 h p.i.

- (iv) Un autre paramètre à prendre en considération est la durée de vie des ARNm, qui peut être très variable d'un gène à l'autre. Ceux-ci peuvent persister de quelques jours à quelques secondes. Il est décrit dans la littérature que l'ARNm du gène de l'hexon aurait une demi-vie de 30 à 40 minutes (Sharp, 1984). Cette durée de demi-vie est considérée comme étant courte, d'où la difficulté de cibler le moment du cycle de multiplication de l'adénovirus où le gène de l'hexon va être exprimé dans les cellules. Toutefois ce problème de durée vie de notre ARNm cible aurait pu être contrebalancé par une forte abondance de celui-ci. En effet, les transcrits tardifs atteindraient le nombre de 2000 à 5000 copies par cellule à 18 h p.i. (Sharp, 1984), et même 10 000 copies par cellule à 36 h p.i. (Flint and Sharp 1976) ; contrairement aux transcrits précoces avec 500 à 1000 copies par cellules (Ko, 2003).
- (v) L'accessibilité à la cible (l'ARNm) peut également être mise en cause. Au cours du cycle de multiplication des adénovirus, l'ARNm est transcrit dans le noyau, puis est transféré dans le cytoplasme pour y être traduit. Une fois pris en charge par le ribosome, l'ARNm devient certainement inaccessible à la molecular beacon. Cette hypothèse est corroborée par nos résultats expérimentaux, puisque les signaux ARNm/MB HAdV-C ont toujours été observés au niveau du noyau des cellules et jamais dans le cytoplasme.
- (vi) Afin de maximiser les chances de rencontre avec la molecular beacon, une alternative pourrait être le choix d'une séquence non codante du même gène cible. En effet l'avantage de travailler avec une séquence non codante est qu'elle ne serait pas traduite ce qui laisserait peut être plus de temps à la molecular beacon d'aller s'hybrider à sa cible. Différentes études visent une séquence non codante terminale (Dunams et al.

2012; Wang et al. 2005; Yeh et al. 2008). Toutefois, il est décrit que presque tous les ARN transcrits subissent un épissage dans le cytoplasme pour donner naissance aux différents ARNm (Ketner, 1999), éliminant ainsi les parties non codantes.

Bien qu'elle soit actuellement difficilement reproductible, cette méthode présente des alternatives qui pourraient faciliter la détection des signaux. Le premier recours serait de travailler en cellules vivantes non fixées. Le cycle de multiplication des HAdVs ne serait pas stoppé contrairement à ce qui a été fait dans la présente étude. Les chances de retrouver le moment exact où l'ARNm du gène de l'hexon est transcrit serait peut être facilité, la molecular beacon étant en contact pendant au moins 2 heures dans les cellules ce qui permettrait de couvrir une phase du cycle un peu plus longue pendant que la multiplication du virus se poursuit. Néanmoins, la molecular beacon utilisée habituellement devrait subir quelques modifications pour ne pas être dégradée par les nucléases présentes dans les cellules. Le design serait le même, mais il faudrait ajouter aux deux extrémités de la MB, avant l'incorporation du reporter (fluorochrome) et du quencher, un groupement 2'Ométhyl et 2'Ométhyl-phosphotrothioate. Egalement, les cellules ne pouvant pas subir de traitement de perméabilisation, un dérivé du peptide TAT devrait être ajouté à la molecular beacon pour permettre sa pénétration dans les cellules (Sivaraman et al. 2011). D'autres méthodes sont disponibles comme l'existence de kit de transfection qui permettraient d'introduire la molecular beacon directement dans la cellule, les membranes étant lysées de manière réversible par la Streptolysine O (SLO), ou encore la microinjection et l'électroporation (Monroy-Contreras and Vaca 2011).

Dans le but de détecter un large spectre d'adénovirus humains, un gène conservé a été choisi comme cible. L'étude de Ko et al, (2003) sur l'HAdV2 montre que l'ARNm du gène E1A persiste durant tout le cycle de multiplication du virus (6, 18, 24 et 36 h p.i.), contrairement au gène de l'hexon détectable uniquement à 24 et 36 h p.i. Même si ce gène semble être une alternative intéressante pour faciliter la détection du signal, elle n'était toutefois pas envisageable dans notre étude, pour deux raisons. Tout d'abord, la lignée cellulaire HEK 293A possédant au sein de son génome les gènes E1A et E1B, des signaux faux-positifs auraient pu être observés. Enfin, ces gènes ne semblent pas assez conservés au sein de la famille pour permettre une détection à large spectre d'adénovirus. L'utilisation d'autres gènes précoces comme E2B, codant notamment pour l'ADN polymérase (Harrach et al. 2012), pourrait toutefois être envisagée, mais un design de sonde et de cible, ainsi que des tests de spécificité seraient nécessaires avant une application en molecular beacon.

Il a été possible, au cours des diverses expériences effectuées de déceler la présence des HAdV2 au sein de la lignée cellulaire HEK 293A à moins de 24 h p.i. Les premiers résultats ont pu être quantifiés, même s'ils sont non représentatifs de l'ensemble du puits. Bien que la limite de détection ne soit pas encore définie, la méthode pourra par la suite être validée en comparant des résultats obtenus par la méthode des NPP avec le pourcentage de cellules infectées de la méthode en cours de développement. Egalement, la détection des adénovirus infectieux dans des échantillons environnementaux par culture cellulaire couplée à une hybridation *in situ* permettrait un gain de temps dans l'obtention des résultats, par comparaison aux techniques actuellement disponibles (cf. section étude bibliographie). Bien que le développement de la méthode ne soit pas terminé, de nombreuses étapes ont pu être validées permettant d'approcher de plus en plus le but fixé : la détection du caractère infectieux des adénovirus en un temps réduit. En conclusion, malgré une faible reproductibilité, la méthode en cours de développement pour la recherche des HAdVs infectieux est proche d'aboutir, puisqu'elle a tout de même permis de mettre en évidence la présence d'HAdV2 en moins de 24 h dans des conditions optimisées, et qu'elle offre encore de nombreuses alternatives pour améliorer la détection des signaux de l'adénovirus au sein des cellules infectées.

---

*Références  
bibliographiques*

---

Articles scientifiques :

- Ahmed, W., A. Goonetilleke and T. Gardner 2010. Human and bovine adenoviruses for the detection of source-specific fecal pollution in coastal waters in Australia. *Wat. Research* **44**(16): 4662-73.
- Albinana-Gimenez, N., P. Clemente-Casares, S. Bofill-Mas, A. Hundesa, F. Ribas and R. Girones 2006. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **40**(23): 7416-22.
- Amdiouni, H., A. Faouzi, N. Fariat, M. Hassar, A. Soukri and J. Nourlil 2012. Detection and molecular identification of human adenoviruses and enteroviruses in wastewater from Morocco. *Lett. Appl. Microbiol.* **54**(4): 359-66.
- Aslan, A., I. Xagorarakis, F.J. Simmons, J.B. Rose and S. Dorevitch 2011. Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *J. Appl. Microbiol.* **111**(5): 1250-61.
- Basyuk, E., E. Bertrand and L. Journot 2000. Alkaline fixation drastically improves the signal of in situ hybridization. *Nucleic Acids Res.* **28**(10): e46.
- Brown, M. 1990. Laboratory identification of adenoviruses associated with gastroenteritis in Canada from 1983 to 1986. *J. Clin. Microbiol.* **28**(7): 1525-9.
- Brown, M., M. Petric and P.J. Middleton 1984. Diagnosis of fastidious enteric adenoviruses 40 and 41 in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* **20**(3): 334-8.
- Choo, Y. J. and S.J. Kim 2006. Detection of human adenoviruses and enteroviruses in Korean oysters using cell culture, integrated cell culture-PCR, and direct PCR. *J. Microbiol.* **44**(2): 162-70.
- Cupelli, K. and T. Stehle 2011. Viral attachment strategies: the many faces of adenoviruses. *Curr. Opin. Virol.* **1**(2): 84-91.
- Dong, Y., J. Kim and G.D. Lewis 2010. Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. *J. Appl. Microbiol.* **108**(3): 800-9.
- Dorer, D. E., F. Holtrup, K. Fellenberg, J.K. Kaufmann, S. Engelhardt, J.D. Hoheisel and D.M. Nettelbeck 2011. Replication and virus-induced transcriptome of HAdV-5 in normal host cells versus cancer cells - differences of relevance for adenoviral oncolysis. *PLoS ONE* **6**(11).
- Doronin, K., K. Toth, M. Kuppaswamy, P. Krajcsi, A.E. Tollefson and W.S.M. Wold 2003. Overexpression of the ADP (E3-11.6K) Protein Increases Cell Lysis and Spread of Adenovirus. *Virology* **305**(2): 378-87.
- Dunams, D., P. Sarkar, W. Chen and M.V. Yates 2012. Simultaneous detection of infectious human echoviruses and adenoviruses by an in situ nuclease-resistant molecular beacon-based assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(5): 1584-8.
-

- El Bakkouri, M., C.M. Fabry, P. Fender and G. Schoehn 2008. Adenoviruses structure. *Virologie* **12**(4): 275-92.
- Enriquez, C. E. and C.P. Gerba 1995. Concentration of enteric adenovirus 40 from tap, sea and waste water. *Wat. Research* **29**(11): 2554-60.
- Flint, S. J. and P.A. Sharp 1976. Adenovirus transcription: V. Quantitation of viral RNA sequences in adenovirus 2-infected and transformed cells. *J. Mol. Biol.* **106**(3): 749-71.
- Gerba, C. P., D.M. Gramos and N. Nwachuku 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(10): 5167-9.
- Graham, F. L., J. Smiley, W.C. Russell and R. Nairn 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**(1): 59-72.
- Grimm, A. C., J.L. Cashdollar, F.P. Williams and G.S. Fout 2004. Development of an astrovirus RT-PCR detection assay for use with conventional, real-time, and integrated cell culture/RT-PCR. *Can. J. Microbiol.* **50**(4): 269-78.
- Halliday, M. L., L.Y. Kang, T.K. Zhou, M.D. Hu, Q.C. Pan, T.Y. Fu, Y.S. Huang and S.L. Hu 1991. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J. Infect. Dis.* **164**(5): 852-9.
- Hamza, I. A., L. Jurzik, K. Überla and M. Wilhelm 2011. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* **214**(6): 424-36.
- Haramoto, E., H. Katayama, K. Oguma and S. Ohgaki 2007. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J. Appl. Microbiol.* **103**(6): 2153-9.
- Harley, D., B. Harrower, M. Lyon and A. Dick 2001. A primary school outbreak of pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 3. *Communicable diseases intelligence* **25**(1): 9-12.
- Harrach, B., M. Benkö, G. Both, M. Brown, A. Davison, M. Echavarría, M. Hess, M. Jones, A. Kajon, H. Lehmkuhl, V. Mautner, S. Mittal and G. Wadell (2012) Family - Adenoviridae. In *Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses* ed. King, A., Adams, M., Carstens, E. and Lefkowitz, E. pp. 125-141. San Diego: Elsevier.
- Jiang, S. C., J. Han, J.W. He and W. Chu 2009. Evaluation of four cell lines for assay of infectious adenoviruses in water samples. *J. Water Health* **7**(4): 650-6.
- Jiang, Y. J., G.Y. Liao, W. Zhao, M.B. Sun, Y. Qian, C.X. Bian and S.D. Jiang 2004. Detection of infectious hepatitis A virus by integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* **97**(5): 1105-12.
- Jothikumar, N., T.L. Cromeans, V.R. Hill, X. Lu, M.D. Sobsey and D.D. Erdman 2005. Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(6): 3131-6.
- Kaneko, H., T. Iida, H. Ishiko, T. Ohguchi, T. Ariga, Y. Tagawa, K. Aoki, S. Ohno and T. Suzutani 2009. Analysis of the complete genome sequence of epidemic
-

- keratoconjunctivitis-related human adenovirus type 8, 19, 37 and a novel serotype. *J. Gen. Virol.* **90**(6): 1471-6.
- Ketner, G. (1999) Les adénovirus. In *Microbiologie et pathologie infectieuse* ed. Schaechter, M., Medoff, G. and Eisenstein, B.I. pp. 484-494.
- Ko, G., T.L. Cromeans and M.D. Sobsey 2003. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(12): 7377-84.
- Kukkula, M., P. Arstila, M.L. Klossner, L. Maunula, C.H.V. Bonsdorff and P. Jaatinen 1997. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scan. J. Infect. Dis.* **29**(4): 415-8.
- Lee, H. K. and Y.S. Jeong 2004. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(6): 3632-6.
- Lee, J. I., G.C. Lee, J.Y. Chung, T.H. Han, Y.K. Lee, M.S. Kim and C.H. Lee 2012. Detection and molecular characterization of adenoviruses in Korean children hospitalized with acute gastroenteritis. *Microbiol. Immunol.* **56**(8): 523-8.
- Lee, S. H. and S.J. Kim 2002. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Wat. Research* **36**(1): 248-56.
- Li, D., A.Z. Gu, W. Yang, M. He, X.h. Hu and H.C. Shi 2010a. An integrated cell culture and reverse transcription quantitative PCR assay for detection of infectious rotaviruses in environmental waters. *J. Microbiol. Methods* **82**(1): 59-63.
- Li, D., M. He and S.C. Jiang 2010b. Detection of infectious adenoviruses in environmental waters by fluorescence-activated cell sorting assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**(5): 1442-8.
- Mac Kenzie, W. R., N.J. Hoxie, M.E. Proctor, M.S. Gradus, K.A. Blair, D.E. Peterson, J.J. Kazmierczak, D.G. Addiss, K.R. Fox, J.B. Rose and J.P. Davis 1994. A Massive Outbreak in Milwaukee of Cryptosporidium Infection Transmitted through the Public Water Supply. *N Engl. J Med* **331**(3): 161-7.
- McNeill, K. M., F.R. Benton, S.C. Monteith, M.A. Tuchscherer and J.C. Gaydos 2000. Epidemic spread of adenovirus type 4-associated acute respiratory disease between U.S. Army installations. *Emerg. Infect. Dis.* **6**(4): 415-9.
- Meier, O. and U.F. Greber 2003. Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* **5**(6): 451-62.
- Mena, K. D. and C.P. Gerba 2009. Waterborne adenovirus. *Rev. Environ. Contam. T.* **198**: 133-67.
- Molinier-Frenkel, V. and P. Boulanger 2003. Adenovirus: From structure to genes vectorisation and vaccinology - I. Adenovirus and recombinant adenovirus virology. *Virologie* **7**(4): 267-79.
- Monroy-Contreras, R. and L. Vaca 2011. Molecular beacons: Powerful tools for imaging RNA in living cells. *J. Nucleic Acids* **2011**: Article number 741723.
-



- Ogorzaly, L., I. Bertrand, M. Paris, A. Maul and C. Gantzer 2010. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**(24): 8019-25.
- Ogorzaly, L., H.M. Cauchie, C. Penny, A. Perrin, C. Gantzer and I. Bertrand 2013. Two-day detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by improved ICC-qPCR. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(9): 4159-66.
- Pina, S., M. Puig, F. Lucena, J. Jofre and R. Girones 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(9): 3376-82.
- Poddar, S. K. 1999. Detection of adenovirus using PCR and molecular beacon. *J. Virol. Methods* **82**(1): 19-26.
- Rigotto, C., K. Hanley, P.A. Rochelle, R. De Leon, C.R.M. Barardi and M.V. Yates 2011. Survival of adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. *Environ. Sci. Technol.* **45**(9): 4145-50.
- Rodriguez, R. A., P.M. Polston, M.J. Wu, J. Wu and M.D. Sobsey 2013. An improved infectivity assay combining cell culture with real-time PCR for rapid quantification of human adenoviruses 41 and semi-quantification of human adenovirus in sewage. *Wat. Research* **47**(9): 3183-91.
- Russell, W. C. 2000. Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* **81**(11): 2573-604.
- Russell, W. C. 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *J. Gen. Virol.* **90**(1): 1-20.
- Scheid, P. and R. Schwarzenberger 2012. *Acanthamoeba* spp. as vehicle and reservoir of adenoviruses. *Parasitol. Res.* **111**(1): 479-85.
- Sharp, P. A. (1984) Adenovirus transcription. In *The Adenoviruses* ed. Ginsberg, H.S. pp. 173-204. Springer US.
- Silva, H. D., M.T.A. Garcia-Zapata and C.E. Anunciaçao 2011. Why the use of adenoviruses as water quality virologic marker? *Food. Environ. Virol.* **3**(3): 138-40.
- Sinclair, R. G., E.L. Jones and C.P. Gerba 2009. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J. Appl. Microbiol.* **107**(6): 1769-80.
- Siqueira-Silva, J., F.P. Yeda, A.L. Favier, P. Mezin, M.L. Silva, K.M. Barrella, D.U. Mehnert, P. Fender and C.M. Harsi 2009. Infection kinetics of human adenovirus serotype 41 in HEK 293 cells. *Mem. I. Oswaldo. Cruz* **104**(5): 736-44.
- Sivaraman, D., P. Biswas, L.N. Cella, M.V. Yates and W. Chen 2011. Detecting RNA viruses in living mammalian cells by fluorescence microscopy. *Trends Biotechnol.* **29**(7): 307-13.
- Smith, J. G., C. M. Wiethoff, P. L. Stewart and G. R. Nemerow (2010) Adenovirus. In *Cell Entry by Non-Enveloped Viruses* ed. Johnson, J.E. pp. 195-224. Springer Berlin Heidelberg.
- Srinivasan, M., D. Sedmak and S. Jewell 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.* **161**(6): 1961-71.
-

- Stevenson, F. and V. Mautner (2003) Aspects of the molecular biology of enteric adenoviruses. In *Perspectives in Medical Virology Viral Gastroenteritis* ed. Ulrich Desselberger, J.G. pp. 389-406. Elsevier.
- Tan, W., K. Wang and T.J. Drake 2004. Molecular beacons. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**(5): 547-53.
- Therre, E., de Valk, H., Vaillant, V., and Mouly, D. 2009. Bilan des épidémies d'origine hydrique investiguées en France depuis 1998 et principales recommandations – Synthèse du rapport. Saint-Maurice (France): Institut de veille sanitaire, 5 p. Disponible sur [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)
- Thurston-Enriquez, J. A., C.N. Haas, J. Jacangelo and C.P. Gerba 2003. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline Calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(7): 3979-85.
- Thurston-Enriquez, J. A., C.N. Haas, J. Jacangelo and C.P. Gerba 2005a. Inactivation of enteric adenovirus and feline Calicivirus by chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(6): 3100-5.
- Thurston-Enriquez, J. A., C.N. Haas, J. Jacangelo and C.P. Gerba 2005b. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Wat. Research* **39**(15): 3650-6.
- Tollefson, A. E., A. Scaria, T.W. Hermiston, J.S. Ryerse, L.J. Wold and W.S. Wold 1996. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J. Virol.* **70**(4): 2296-306.
- Tyagi, S. and F.R. Kramer 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **14**(3): 303-8.
- Urieli-Shoval, S., R.L. Meek, R.H. Hanson, M. Ferguson, D. Gordon and E.P. Benditt 1992. Preservation of RNA for in situ hybridization: Carnoy's versus formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* **40**(12): 1879-85.
- van Heerden, J., M.M. Ehlers, A. Heim and W.O.K. Grabow 2005. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *J. Appl. Microbiol.* **99**(2): 234-42.
- Wang, A., A.M. Salazar, M.V. Yates, A. Mulchandani and W. Chen 2005. Visualization and detection of infectious coxsackievirus replication using a combined cell culture-molecular beacon assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(12): 8397-401.
- Wolfrum, N. and U.F. Greber 2013. Adenovirus signalling in entry. *Cell. Microbiol.* **15**(1): 53-62.
- Wyn-Jones, A. P., A. Carducci, N. Cook, M. D'Agostino, M. Divizia, J. Fleischer, C. Gantzer, A. Gawler, R. Girones, C. Höller, A.M. de Roda Husman, D. Kay, I. Kozyra, J. López-Pila, M. Muscillo, M.S. José Nascimento, G. Papageorgiou, S. Rutjes, J. Sellwood, R. Szewzyk and M. Wyer 2011. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Wat. Research* **45**(3): 1025-38.
- Yeh, H. Y., Y.C. Hwang, M.V. Yates, A. Mulchandani and W. Chen 2008. Detection of Hepatitis A virus by using a combined cell culture-molecular beacon assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(7): 2239-43.
-

Zhao, H., F. Granberg and U. Pettersson 2007. How adenovirus strives to control cellular gene expression. *Virology* **363**(2): 357-75.

Autres références :

[1]From Fields Virology, 4th ed, Knipe & Howley, eds, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, Fig. 67-5

[2][viralzone.expasy.org/](http://viralzone.expasy.org/)

[3][http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/MHC/\\_FR/Presentation/MHC\\_adenovirus.html](http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/MHC/_FR/Presentation/MHC_adenovirus.html)

[4][http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/wastewater/virus.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/wastewater/virus.pdf)

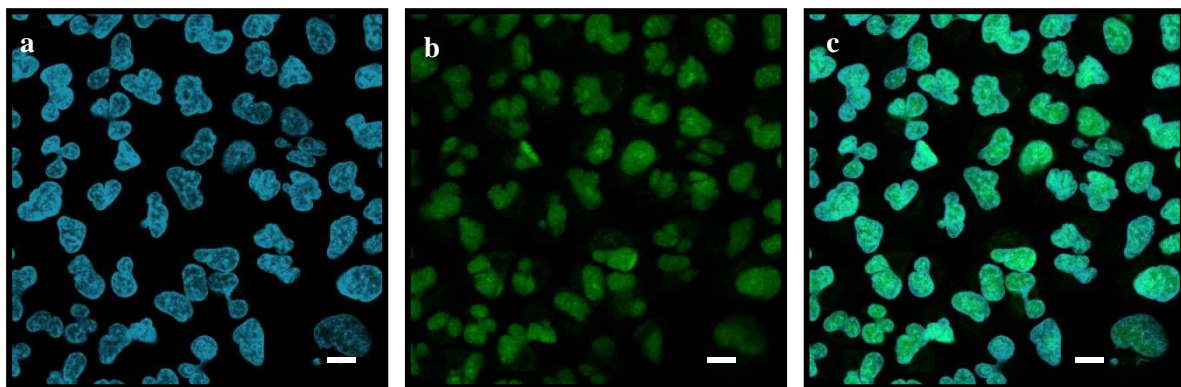
[5][http://www.molecular-beacons.org/MB\\_introduction.html](http://www.molecular-beacons.org/MB_introduction.html)

---

---

# *Annexes*

---



Annexe 1 : Visualisation de la lignée cellulaire A549 non infectée. Observation en microscopie confocale à balayage laser, grossissement 630x. (a) tapis cellulaire A549 ayant été en contact avec la molecular beacon en concentration de 100 nM pendant 2 h à 37°C, marqué au Hoechst 33342 (b) Visualisation de l'hybride formé pendant 2 h à 37°C avec une concentration en ADN HAdV2 de 100 nM et une concentration en MB de 100 nM, (c) image fusionnée.

## **Detection and visualisation of infectious human adenoviruses using a combined cell culture-molecular beacon assay**

Human adenoviruses, affiliated to the *Adenoviridae* family, are part of the most commonly detected viruses in contaminated surface waters and belong to the 12 priority microorganisms of the contaminant candidate list for drinking water (CCL3, USEPA). The aim of this study was to develop a rapid method for visualization of the infectious status of human adenoviruses by combining cell culture with fluorescent *in situ* hybridization using a molecular beacon oligonucleotide probe. Fluorescence is generated when the molecular beacon probes undergo a spontaneous conformational change upon formation of a hybrid with homologous mRNA during the viral replication cycle in the host cell. The fluorescent signal is then detectable by imaging methods such as confocal laser scanning microscopy. The experimental protocol (fixation and permeabilization of cells, staining of plasma membranes and nuclei, hybridization conditions) was developed with human adenovirus type 2 as viral model and the host cell line HEK 293A. Despite problems of reproducibility and the need for further optimization of the technique, promising results were obtained with detection of viral mRNA inside the cells in less than 24 hours after infection.

---

Les adénovirus humains, membres de la famille des *Adenoviridae*, font partie des virus les plus couramment identifiés dans les eaux de surface contaminées et ont été inclus dans la liste des 12 contaminants microbiens à surveiller dans les eaux de consommation (CCL 3, US EPA). L'objectif de ce travail était de développer une méthode rapide de visualisation du caractère infectieux par hybridation *in situ* de l'ARN messager viral avec une sonde oligonucléotidique fluorescente de type «molecular beacon». Suite à la réplication virale dans les cellules hôtes, les sondes forment des hybrides avec les ARN messager viraux. Cela induit un changement conformationnel spontané des sondes, qui dès lors fluorescent. Le signal peut ensuite être détecté en microscopie confocale à balayage laser. Le protocole expérimental (fixation et perméabilisation des cellules, marquages des composants cellulaires, condition d'hybridation...) a été élaboré à l'aide de l'adénovirus type 2 et de la lignée cellulaire HEK 293A. Malgré des problèmes de reproductibilité et la nécessité d'approfondir l'optimisation de cette technique, les résultats obtenus se sont révélés prometteurs car ils ont permis de détecter l'ARNm viral à l'intérieur des cellules en moins de 24 h après l'infection.

Mots-clés : adenovirus humains, test d'infectiosité , molecular beacon, hybridation *in situ*, HEK 293A.