

50376  
1989  
171

50376  
1989  
171

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

JOURNAL DE BIOLOGIE

Année 1989

N° d'ordre : 778

THESE DE DOCTORAT D'ETAT  
présentée pour l'obtention du titre de  
DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Christian NIEL



CONTRIBUTION AUX ETUDES D'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE  
DES ADENOVIRUS HUMAINS



030 024099 4

Soutenue le 2 Novembre 1989 devant la commission d'examen

MM. J.P. BOHIN,	Président
S. BALL,	Rapporteur
F. BRICOUT,	Rapporteur
J.C. D'HALLUIN,	Rapporteur
J.C. LEFEBVRE,	Examineur
G. MARTIN,	Examineur

Ce travail a été effectué à parts à peu près égales dans deux laboratoires :

- Le laboratoire de Virologie Moléculaire, Unité 233 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) à Lille, dirigé par Monsieur le Professeur P.A. Boulanger puis par le Dr. J.C. D'Halluin.

- Le laboratoire de Virologie Moléculaire, au sein du Département de Virologie de la Fondation Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brésil, dirigé par le Dr. H.G. Schatzmayr.

Il est la résultante de la coopération internationale qui s'est établie entre ces deux laboratoires depuis la venue du Dr. J.P.G. Leite à Lille en 1984. Il a bénéficié du soutien moral et financier de l'INSERM et du CNPq, l'organisme brésilien ayant pour vocation le développement de la recherche scientifique dans tous les domaines, ces deux organismes nous ayant fait bénéficier, tous les ans depuis 1985, de leur accord de coopération.

Je remercie vivement toutes les personnalités faisant partie du jury d'avoir accepté de juger ce mémoire.

Ce travail est en grande partie une oeuvre collective et il n'aurait pu voir le jour sans la collaboration des nombreux collègues qui m'ont entouré et aidé pendant ces années.

En tout premier lieu, je voudrais citer Selma A. Gomes qui, peu de temps après être devenue ma collègue, est devenue ma compagne de tous les instants et à qui je dois énormément, professionnellement et humainement.

Je voudrais ensuite remercier plus spécialement les Drs. Jean-Claude D'Halluin et Helio Gelly Pereira, qui comptent parmi les meilleurs spécialistes de l'adénovirus et qui ont donné, chacun en son domaine, un élan décisif à ce travail. J'aimerais y associer le Dr. Hermann G. Schatzmayr qui m'a accueilli avec sa grande gentillesse dans son laboratoire et qui m'a fourni les meilleures conditions de travail possibles.

Je voudrais exprimer ma gratitude à mes amis José P.G. Leite, Jussara P.N. Nascimento et Chantal Cousin qui m'ont souvent encouragé pendant ces années et dont le sourire a été le plus sûr stimulus.

Enfin j'adresse mes remerciements à tous mes collègues français et brésiliens pour leur aide bien souvent désintéressée et notamment à Z.P. Andrade, M. T. Belin, M.L. Boudin, J.A.N. Candeias, M. da Silva, L. de Castro, V. Delecroy, L. de Souza, Y.B. Gabbay, C.M. Harsi, M. Moncany, S.P. Monteiro, M.T.B. Moraes, C.K. Nakauchi, T.R. Pereira, D. Petite, E.G. Primo, M.L. Racz, O.M. Schatzmayr, R.A. Silveira et V. Tedeschi.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	11
I. PRESENTATION DU VIRUS	12
II. CLASSIFICATION	18
Le sérotype, base de la classification	18
Les adénovirus humains, classification en sous-groupes	20
Caractérisation des adénovirus humains à l'aide d'enzymes de restriction	23
III. LES MALADIES CAUSEES PAR LES ADENOVIRUS	28
Infections asymptomatiques	32
Infections respiratoires	32
Patients immunodéprimés	33
Gastroentérites, les sérotypes 40 et 41	34
Autres syndromes	35
Prévention, diagnostic, thérapie	36
IV. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DES ADENOVIRUS.	
LES TYPES GENOMIQUES	38

MATERIELS ET METHODES	43
I. CULTURE CELLULAIRE ET PREPARATION DE VIRUS	44
Les lignées cellulaires utilisées	44
Propagation des virus en culture cellulaire	45
Purification des virus	45
Extraction des virus directement à partir de fèces	46
II. MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DES VIRUS EN CULTURE	47
ELISA	47
Séroneutralisation	47
III. PREPARATION DE L'ADN VIRAL	47
A partir de virus purifiés	47
A partir de cellules infectées	48
Directement à partir de fèces	48
IV. PROFILS ET CARTES DE RESTRICTION	49
Enzymes de restriction	49
Electrophorèse en gel d'agarose	49
Electrophorèse en gel de polyacrylamide	50
Construction des cartes de restriction	50
V. CLONAGE ET HYBRIDATIONS MOLECULAIRES	51
Transformation	51
Sélection des clones par la taille	52
Préparation des plasmides	52
Marquage des sondes et hybridations	53

RESULTATS	55
I. CARTES DE RESTRICTION DES ADENOVIRUS HUMAINS SEROTYPES 2, 3, 5, 9 ET 19	56
Ad3	57
Ad2/Ad5	60
Ad9/Ad19	60
II. MISE EN EVIDENCE DE NOUVEAUX TYPES GENOMIQUES D'ADENOVIRUS HUMAINS	66
A. NOUVEAUX TYPES GENOMIQUES D'Ad1, Ad3 ET Ad5 (SAO PAULO)	66
Sous-groupe B	69
Sous-groupe C	71
Sous-groupe D	75
B. NOUVEAU TYPE GENOMIQUE D'ADENOVIRUS DU SOUS-GROUPE D (RIO DE JANEIRO)	75
C. INTERET DE L'ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DANS LA DIFFERENCIATION DES TYPES GENOMIQUES	79
III. LE TYPE GENOMIQUE Ad4a, RESPONSABLE DE CONJONCTIVITES ET DE MALADIES RESPIRATOIRES	84
IV. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION RAPIDE DES ADENOVIRUS FASTIDIEUX, SEROTYPES 40 ET 41, DANS LES FECES	91
Construction de la sonde	92
Marquage non radioactif et caractérisation de la sonde	93
Extraction de l'ADN viral à partir de fèces	96
Analyse des ADN viraux extraits de fèces	96

V. RECHERCHE D'UNE LIGNEE CELLULAIRE PERMISSIVE AUX ADENOVIRUS	101
FASTIDIEUX	

DISCUSSION	106
------------	-----

CONCLUSION	118
------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	121
---------------	-----

## INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

### INTRODUCTION

Figure I1.	Le virion et la localisation de ses protéines	14
Figure I2.	Les unités de transcription de l'adénovirus	16
Tableau I1.	Classification des adénovirus humains	22
Figure I3.	Profils de restriction <u>Bam</u> HI, <u>Bgl</u> II, <u>Bst</u> EII et <u>Hind</u> III des adénovirus humains, sous-groupes A, B, C, E et F.	24
Figure I4.	Profils de restriction <u>Bam</u> HI, <u>Bgl</u> II, <u>BST</u> EII et <u>Hind</u> III des adénovirus humains du sous-groupe D.	25
Figure I5.	Profils de restriction <u>Sma</u> I des adénovirus humains, sérotypes 1 à 41.	26
Tableau I2.	Présence d'adénovirus dans les selles sur une longue période	29
Tableau I3.	Syndromes cliniques causés par les adénovirus	31

### RESULTATS

Figure R1.	Cartes de restriction de l'Ad3	58
Figure R2.	Compilation des cartes de restriction de l'Ad3	59
Figure R3.	Cartes de restriction des Ad5 et Ad2	61
Figure R4.	Compilation des cartes de restriction des Ad5 et Ad2	62
Tableau R1.	Comparaison des sites de restriction Ad2 - Ad5	63
Figure R5.	Cartes de restriction des Ad9 et Ad19	64
Tableau R2.	Echantillons de fèces Ad-positifs en ELISA	68
Tableau R3.	Adenovirus de l'étude épidémiologique de Sao Paulo	70
Figure R6.	Profils de restriction Ad3p et souche 22-10	72

Figure R7.	Profils de restriction Ad5p et souches 23-12 et 60-09	74
Figure R8.	Profils de restriction Ad1p et souche 97-10	76
Figure R9.	Profils de restriction Ad9, Ad19 et souche 208	78
Tableau R4.	Profils de restriction Ad3p et Ad3e1 en gel d'agarose et en gel de polyacrylamide	82
Figure R10.	Profils de restriction Ad3p et Ad3e1 en gel de polyacrylamide	83
Tableau R5.	Virus isolés pendant l'épidémie de Belem	86
Tableau R6.	Typage génomique de souches d'Ad4 isolées	88
Figure R11.	Cartes de restriction des Ad4p et Ad4a	89
Figure R12.	A. Electrophorèse des ADN d'Ad2, Ad7, Ad40 et Ad41 B. Hybridation des mêmes avec la sonde 41-27	95
Figure R13.	A. Electrophorèse d'ADN viraux extraits de fèces B. Hybridation des mêmes avec de l'ADN d'Ad2 C. Hybridation des mêmes avec la sonde 41-27	97
Tableau R7.	Identification rapide des adénovirus de fèces	100
Tableau R8.	Détection des antigènes d'Ad40 et Ad41 en culture	104
Figure R14.	Profil de restriction de l'Ad40 en différentes lignées cellulaires	105

## DISCUSSION

Tableau D1.	Types génomiques d'adénovirus	111
-------------	-------------------------------	-----

ABREVIATIONS NON CONVENTIONNELLES

- Ad : adénovirus humain. Cette abréviation n'est utilisée que suivie d'un numéro de sérotype, exemple : Ad2, adénovirus humain sérotype 2. Lorsque l'on parle d'adénovirus en général, il n'est pas fait usage d'abréviation.
- ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- LB : Luria broth, composition p. 51
- MEM : Minimum Essential Medium
- PBS : Phosphate Buffer Saline, composition p. 48
- SET : Saline EDTA Tris, composition p. 54
- SSC : Saline Sodium Citrate, composition p. 54
- TBE : Tris-Borate-EDTA, composition p. 49
- TE : Tris-EDTA, composition p. 46
- TH : Tris Hypotonique, composition p. 45
- u.g. : unité génome
- 2XTY : Milieu Tryptone-Yeast extract deux fois concentré, composition p. 52

# INTRODUCTION

## I. PRESENTATION DU VIRUS

Les adénovirus ont été isolés pour la première fois par ROWE et al. (1953) à partir d'amygdales d'enfants opérés. Rapidement, ce virus fut identifié comme étant celui qui avait provoqué de grandes épidémies de maladies respiratoires aiguës chez de jeunes soldats des forces armées américaines pendant la seconde guerre mondiale (GINSBERG et al., 1954). Puis peu à peu on découvrit que ce virus était capable de provoquer toute une série de maladies, notamment respiratoires, oculaires, gastrointestinales, urinaires, mais aussi beaucoup d'autres (voir revue de STRAUS, 1984). Plus récemment, il s'est révélé que l'adénovirus était un agent opportuniste redoutable et quelquefois fatal chez les patients immunodéprimés, notamment atteints de sida (HIERHOLZER et al., 1988a, 1988b).

Mais l'aspect médical n'est pas toujours celui qui a attiré le plus fortement l'attention des chercheurs. En fait, le champ de la virologie moléculaire a énormément évolué depuis la découverte des adénovirus et ceux-ci ont joué un rôle majeur dans cette évolution. Des mécanismes très importants de l'expression des gènes eucaryotes tels que l'épissage et la polyadénylation des ARN ont été découverts chez l'adénovirus et c'est avec le génome de ce virus qu'a été mis au point le premier système de transcription "in vitro" fonctionnel. L'adénovirus humain de type 12 (Ad12) est le premier virus humain dont on a découvert les propriétés oncogènes, non pas pour l'homme mais pour le hamster nouveau-né (TRENTIN et al., 1962). L'adénovirus constitue donc un bon outil pour étudier les mécanismes de régulation de la cellule eucaryote, ceci en particulier parce que son génome est suffisamment simple pour pouvoir être étudié dans le détail mais suffisamment complexe pour coder

pour un assez grand nombre de produits responsables de la régulation de l'expression des gènes viraux et cellulaires.

D'autres caractéristiques rendent le système adénovirus très intéressant du point de vue du biologiste moléculaire, nous en citerons ici trois parmi les plus importantes :

- 1) les adénovirus peuvent être cultivés facilement et produits en grande quantité, avec cependant quelques exceptions, comme nous le verrons dans ce manuscrit.
- 2) les différents gènes viraux sont exprimés à des moments différents au cours du cycle de multiplication, ce qui facilite les études de régulation.
- 3) la séquence nucléotidique complète de l'un des sérotypes, Ad2, est connue.

Les adénovirus sont des virus non enveloppés, de forme icosaédrique, qui se répliquent et s'assemblent dans le noyau de la cellule infectée. Les virions contiennent une douzaine de protéines (Fig. 11). Leur capsid possède 252 capsomères ; 240 hexons (protéine II) forment les faces de l'icosaèdre et 12 pentons sont localisés aux sommets de la particule virale. Les pentons se composent de la base du penton (protéine III) et de la fibre (protéine IV) (VALENTINE et PEREIRA, 1965 ; PETERSSON, 1984), attachées de manière non covalente. La fibre sert à l'attachement du virion sur son récepteur situé à la surface de la cellule hôte. Le récepteur cellulaire est composé de glycoprotéines de masses moléculaires 78 kDa, 42 kDa et 34 kDa, il en existe environ 100 000 copies par cellule (HENNACHE et BOULANGER, 1977 ; SVENSSON et al., 1981). Après l'attachement du virion sur la cellule, les particules virales pénètrent dans le cytoplasme par endocytose (CHARDONNET et

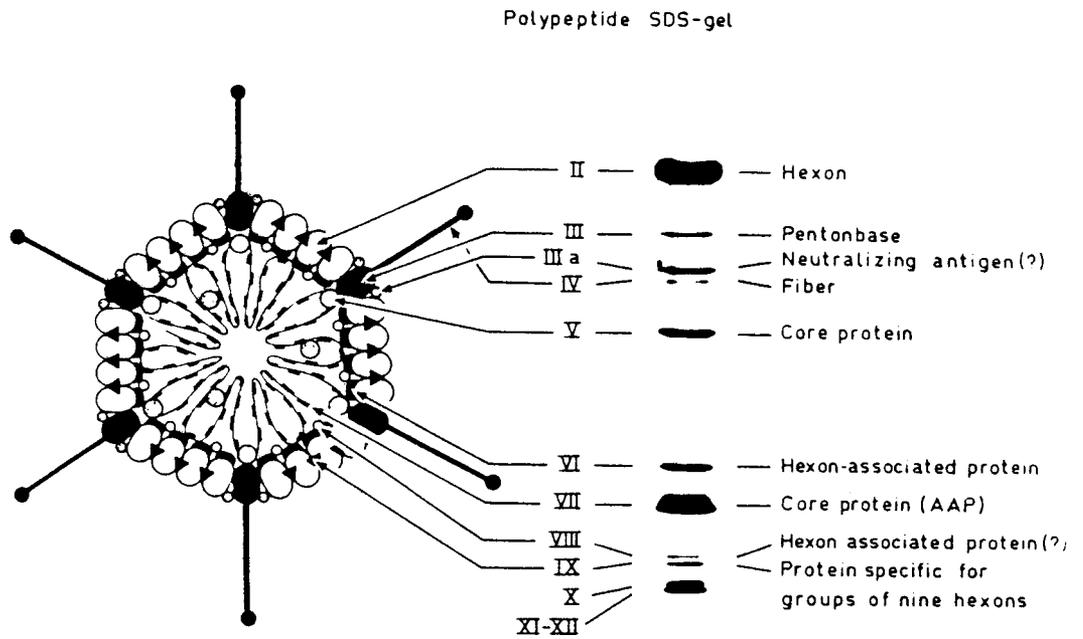


Fig. 11. Modèle structural de l'adénovirus (d'après EVERITT et al., 1975)

DALES, 1970 ; revue de MARSH et HELENIUS, 1989) et migrent vers le noyau où l'ADN est injecté. L'ADN viral entrant est associé à des protéines basiques, les protéines V et VII, ressemblant à des histones mais qui sont codées par le génome viral. Peu de temps après l'infection, la chromatine de l'adénovirus prend une structure nucléosomale, probablement par remplacement des protéines virales par des histones cellulaires (TATE et PHILIPSON, 1979 ; SERGEANT et al., 1979). Plus tard, lorsque la réplication de l'ADN viral fournit de l'ADN en excès pour l'assemblage du virus, l'ADN est encapsidé dans une tête préformée, grâce à une séquence spécifique localisée à l'extrémité gauche du génome (HAMMARSKJÖLD et WINBERG, 1980 ; HEARING et al., 1987 ; Revue générale sur l'assemblage : PHILIPSON, 1984).

Le génome de l'adénovirus est un ADN linéaire double brin, dont la masse moléculaire est comprise entre 20 et 25 MDa (GREEN et al., 1967 ; VAN DER EB et al., 1969). L'ADN de l'Ad2 contient  $35\ 937 \pm 9$  paires de bases (ROBERTS et al., 1986). Les deux extrémités du génome viral fonctionnent comme origines de réplication (TOLUN et PETERSSON, 1975 ; WEINGÄRTNER et al., 1976 ; LECHNER et KELLY, 1977) et une protéine, appelée protéine terminale, est liée de manière covalente à l'extrémité 5' de chaque brin de l'ADN (ROBINSON et al., 1973 ; REKOSH et al., 1977) par un résidu sérine (DESIDERIO et KELLY, 1981). Les extrémités de l'ADN viral contiennent une séquence répétée inversée (GARON et al., 1972 ; WOLFSON et DRESSLER, 1972) dont la longueur est comprise entre 63 et 165 paires de bases suivant les sérotypes (TAMANOI, 1986).

On distingue 5 unités de transcription précoces, appelées E1A, E1B, E2, E3 et E4 (E = early = précoce ; Fig I2). La région E1A est la première à être exprimée au cours du cycle, elle code pour une famille de protéines responsables pour toute une série d'activations et de

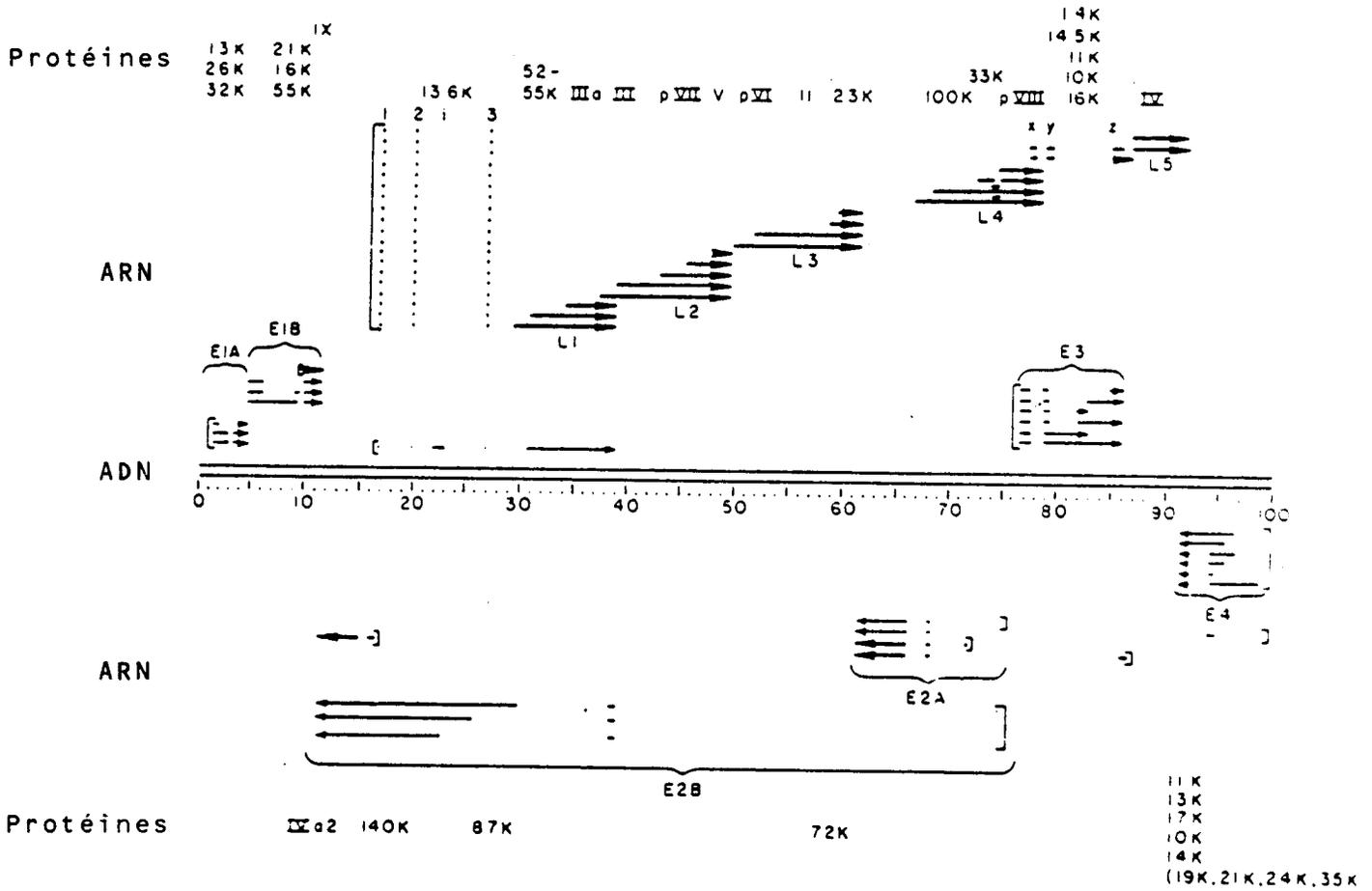


Fig. I2. Le génome de l'adénovirus de type 2, ses unités de transcription et les protéines synthétisées.

E = Early = Précoce  
 L = Late = Tardif  
 p = précurseur  
 K = Kilodalton

répressions de gènes viraux et cellulaires. Dans les cellules non permissives de rein de rat nouveau-né, la région E1A est responsable de l'immortalisation des cellules tandis que la région E1B, s'exprimant peu après, est impliquée dans le maintien de l'état transformé. L'ADN de ces deux régions, introduit dans une cellule primaire, est à lui seul capable de transformer cette cellule. On parle donc des oncogènes E1A et E1B de l'adénovirus (revue sur E1A : BERK, 1986 ; revue sur E1B : STILLMAN, 1986).

Le cycle de réplication virale dure de 32 à 36 heures pour la plupart des adénovirus humains mais plus longtemps pour ceux des sous-groupes A et F. Il est divisé en deux phases, précoce et tardive. Par définition, la phase tardive commence en même temps que la réplication de l'ADN, de 6 à 10 heures après l'infection.

Les protéines synthétisées en phase tardive sont pour la plupart des protéines d'assemblage et de structure du virus.

## II. CLASSIFICATION

Les adénovirus sont les membres de la famille des Adenoviridae (NORRBY et al., 1976), divisée en deux genres, Mastadénovirus pour les adénovirus des mammifères, et Aviadénovirus pour ceux qui infectent les oiseaux (WIGAND et ADRIAN, 1986). Les mastadénovirus ont été isolés chez l'homme, le singe, les bovins, le mouton, le porc, le cheval, le chien, la chèvre et la souris. Quant aux aviadénovirus, on les rencontre chez le coq, la dinde, l'oie, le faisan et le canard. Cette liste reflète bien entendu l'état de nos connaissances actuelles et il est probable que la présence d'adénovirus chez d'autres espèces soit détectée dans les années à venir. Notons encore que des adénovirus ont été isolés chez la grenouille et chez la truite mais qu'aucun genre n'a encore été créé pour les classer.

La spécificité d'hôte de ces virus est étroite : à l'exception d'un cas connu (LI et WADELL, 1988b), les adénovirus humains ne sont pas isolés chez l'animal et vice versa.

### Le sérotype, base de la classification

Historiquement, les différents types d'adénovirus, comme dans d'autres familles de virus, ont été différenciés immunologiquement par des tests de séroneutralisation. La séroneutralisation est une méthode simple d'identification des souches au laboratoire mais ce n'est pas seulement à cause de sa commodité qu'elle s'est imposée comme une méthode de choix. En effet, la réponse immunitaire de l'hôte est importante notamment lorsqu'elle est spécifique du type car elle révèle une infection passée et une immunité contre la réinfection et la maladie. L'existence d'anticorps neutralisants est un paramètre très

important dans les études séroépidémiologiques et donne des indications utiles sur la nécessité et le succès d'une immunisation active. Il est vrai cependant que seule une très petite partie du génome code pour les déterminants antigéniques actifs dans la séroneutralisation.

En 1981, le Comité International pour la Taxonomie des Virus avait provisoirement accepté la définition suivante pour l'espèce adénovirus (WIGAND et al., 1982 ; MATTHEWS, 1982) : une espèce est définie sur la base d'une distinction immunologique, par neutralisation quantitative, en utilisant des antisera animaux. Une espèce ne présente aucune réaction croisée avec les autres espèces ou, si elle en présente une, le rapport du titre homologue sur le titre hétérologue doit être supérieur à 16 dans les deux sens.

Mais en 1984, au Congrès de Virologie de Sendaï, Japon, cette proposition n'a pas été définitivement acceptée, principalement parce que ce concept ne tient pas suffisamment compte de l'homologie existant entre le génome de deux souches. La définition précédente doit donc s'appliquer au sérotype et non pas à l'espèce. Pour parler de nouveau type, on s'appuiera sur deux critères : la séroneutralisation et l'analyse du génome après digestion par des endonucléases de restriction (voir dans le même chapitre, caractérisation des adénovirus humains à l'aide d'enzymes de restriction).

La grande majorité des expériences de recherche sur les adénovirus ont été faites sur les sérotypes humains 2 et 5 qui sont extrêmement proches l'un de l'autre et dans une moindre mesure sur les sérotypes 7 et 12. Bien que le pourcentage d'homologie entre les ADN de deux souches soit parfois faible, voire très faible (< 10%), l'organisation de leurs génomes est tout à fait similaire et les différentes unités de

transcription localisées aux mêmes endroits. Par exemple, le gène de l'hexon est situé entre les unités génome 50 et 60 (le génome est divisé en 100 unités d'égale longueur) chez les adénovirus humains sérotypes 2, 5 et 12 (FLINT, 1980), 3 (TIBBETTS, 1977), les adénovirus simiens 8 et 16 et l'adénovirus bovin 3 (HU et al., 1984).

#### Les adénovirus humains, classification en sous-groupes

Les 47 sérotypes d'adénovirus humains actuellement connus ont été classés d'après des critères biologiques, immunologiques et biochimiques.

Tous les adénovirus humains sont capables d'immortaliser et de transformer morphologiquement des cellules en culture, notamment des cellules de rat nouveau-né. Cependant, tous ne sont pas capables, comme l'Ad12, d'induire des tumeurs chez l'animal. Suivant leur potentiel tumorigène estimé d'après l'efficacité et la rapidité avec lesquelles ils induisent l'apparition de tumeurs chez le hamster nouveau-né, les adénovirus ont été classés en 3 catégories, fortement oncogènes, faiblement oncogènes et non oncogènes (HUEBNER, 1967 ; TRENTIN et al., 1968 ; GREEN, 1970).

D'autre part, une classification basée sur les propriétés d'hémagglutination avait également été proposée par ROSEN (1960). Dans cette classification, les adénovirus du groupe I agglutinent les érythrocytes de singe, ceux du groupe II agglutinent complètement les érythrocytes de rat tandis que ceux du groupe III ne le font que partiellement. Quant aux adénovirus classés dans le groupe IV, ils n'agglutinent ni les érythrocytes de rat, ni ceux de singe.

Par la suite, d'autres critères ont été utilisés pour classer les adénovirus humains tels que la longueur de la fibre, la masse

moléculaire de certains polypeptides viraux, le pourcentage GC de l'ADN (PINA et GREEN, 1965) et le pourcentage d'homologie de séquence entre les ADN viraux (GREEN et al., 1979a). En général, les différentes manières de classer les adénovirus humains se recoupent tout-à-fait bien entre elles, c'est-à-dire que quelque soit le mode de classification utilisé, on retrouve toujours à peu près les mêmes subdivisions.

De l'utilisation de cet ensemble de critères résulte une classification en 6 sous-genres (ou sous-groupes, terme fréquemment employé et que nous utiliserons), de A à F. Cette classification, unanimement adoptée actuellement, est représentée dans le tableau II.

A la lecture de ce tableau, on remarquera que le pourcentage d'homologie de séquence entre deux virus appartenant à un même sous-groupe est généralement élevé, entre 89% et 100% pour les sous-groupes B, C et D. Toutefois, on ne retrouve pas un fort pourcentage d'homologie à l'intérieur du sous-groupe A. Ce sous-groupe contient 3 sérotypes réunis par le fait qu'ils possèdent tous trois un fort pouvoir tumorigène chez le hamster nouveau-né. Quant aux adénovirus du sous-groupe F, sérotypes 40 et 41, le pourcentage d'homologie de leurs ADN n'est que de 65% et ces deux sérotypes avaient préalablement été classés dans deux sous-groupes différents, F et G, mais depuis 1985, ils ont été regroupés parce qu'ils induisent tous deux le même type de pathologie et qu'ils présentent des caractéristiques communes de croissance tout-à-fait particulières (voir Introduction, chapitre III, gastroentérites, les sérotypes 40 et 41).

Si l'on considère deux virus appartenant à deux sous-groupes distincts, on constate que le pourcentage d'homologie de séquence entre leurs deux génomes est souvent très faible, toujours inférieur à 25%

TABLEAU 11. CLASSIFICATION DES ADENOVIRUS HUMAINS AVEC LEURS PRINCIPALES CARACTERISTIQUES

Sous-groupe	Serotype	Degré d'homologie du DNA		Teneur en base G+C	Nombre de fragments de restriction obtenus avec <u>Sma</u> I	Masse moléculaire apparente des polypeptides majeurs internes			Longueur de la fibre (en nm)	Oncogénicité chez le hamster nouveau-né	Groupe d'hémagglutination
		intra sous-groupe	inter sous-groupe			V	VI	VII			
A	12, 18, 31	48 - 69%	8 - 20%	Basse : 47 - 49%	4-5	51-51,5 K <sup>*</sup>	25,5-26 K	17,5-18 K	28-31	Forte	IV
B	3, 7, 11, 14 16, 21, 34, 35	89 - 94%	9 - 20%	Moyenne : 49 - 52%	8-10	53,5-54,5 K	24 K	17,8-18 K	9-11	Faible	I
C	1, 2, 5, 6	99 - 100%	10 - 16%	Haute : 57 - 59%	10-12	48,5 K	24 K	18,5 K	23-31	Aucune	III
D	8, 9,10,13,15 17,19,20,22,23 24,25,26,27,28 29,30,32,33,36 37,38,39,42,43 44,45,46,47	94 - 99%	4 - 17%	Haute : 57 - 59%	14-18	50-50,5 K	23,2 K	18,2 K	12-13	Aucune	II
E	4		4 - 23%	Haute : 57%	19	48 K	24,5 K	18 K	17	Aucune	III
F	40, 41	65%	15 %	Moyenne : 49 - 52%	9-12	46-43,5 K	25,5 K	17,2-17,7 K	28-33	Aucune	IV

D'après PETTERSSON et WADELL (1985), modifié.

\* K = kilodalton

## Caractérisation des adénovirus humains à l'aide d'enzymes de restriction

L'analyse des génomes viraux grâce à l'utilisation des endonucléases de restriction s'est révélée une méthode de choix pour établir le degré de parenté entre deux virus. Dans le cas de l'adénovirus, ceci est grandement facilité par le fait que l'ADN viral peut être extrait directement des cellules infectées (voir Matériels et Méthodes, chapitre III), dans la mesure toutefois où le virus se réplique convenablement.

Dans un premier temps, l'enzyme de restriction SmaI a été utilisé préférentiellement (WADELL et VARSANYI, 1978 ; WADELL et al., 1980) car il reconnaît la séquence nucléotidique CCCGGG et il existe une certaine corrélation entre le nombre de sites de coupure par cette enzyme et le pourcentage GC du génome (Tableau I1).

On a ensuite cherché à quantifier le degré de parenté entre deux génomes. Pour cela, on fait migrer en électrophorèse en gel d'agarose les fragments de restriction provenant des deux génomes et on calcule le pourcentage de fragments migrant à la même distance, appelé pourcentage de comigration. Pour réaliser cette analyse, il est évidemment préférable d'utiliser plusieurs enzymes de restriction et de faire le calcul sur le plus grand nombre possible de fragments, 25 étant considéré comme un minimum. Plus le pourcentage de comigration entre deux virus est élevé, plus ces deux virus sont proches.

Cette analyse a été réalisée pour les 41 premiers sérotypes d'adénovirus humains par ADRIAN et al. (1986). Les profils de restriction avec 5 endonucléases que ces auteurs ont publiés nous serviront souvent au cours de notre travail pour la caractérisation de nouveaux types génomiques. C'est pourquoi nous les reproduisons ici intégralement (Figures I3 à I5). Il s'agit des ADN de 41 souches

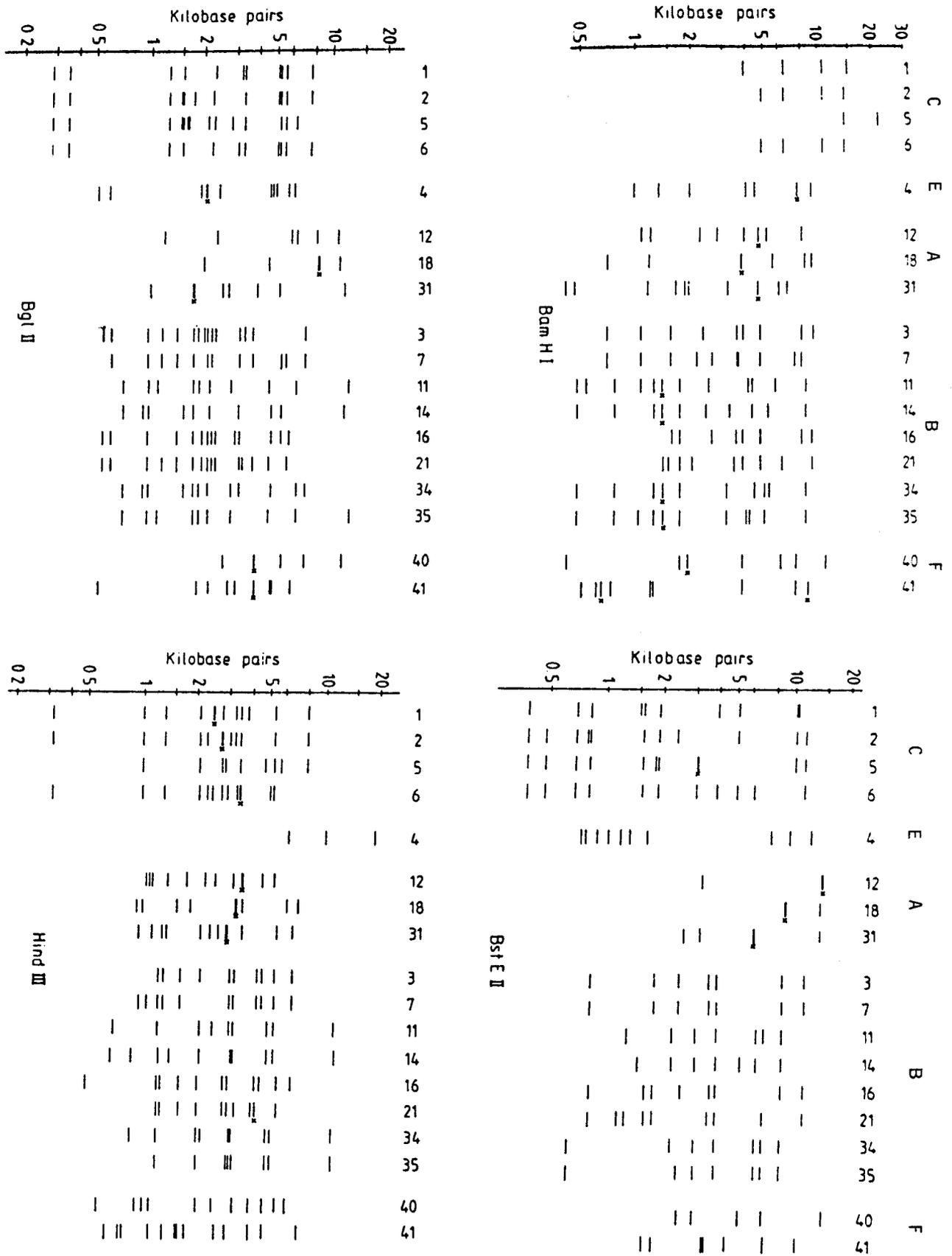


Figure I<sup>3</sup>. Profils de restriction des adénovirus humains des sous-groupes A, B, C, E et F avec les endonucléases BamHI, BglII, BstEII et HindIII (d'après ADRIAN et coll., 1986). Une croix indique la présence d'un doublet (deux bandes comigrant).

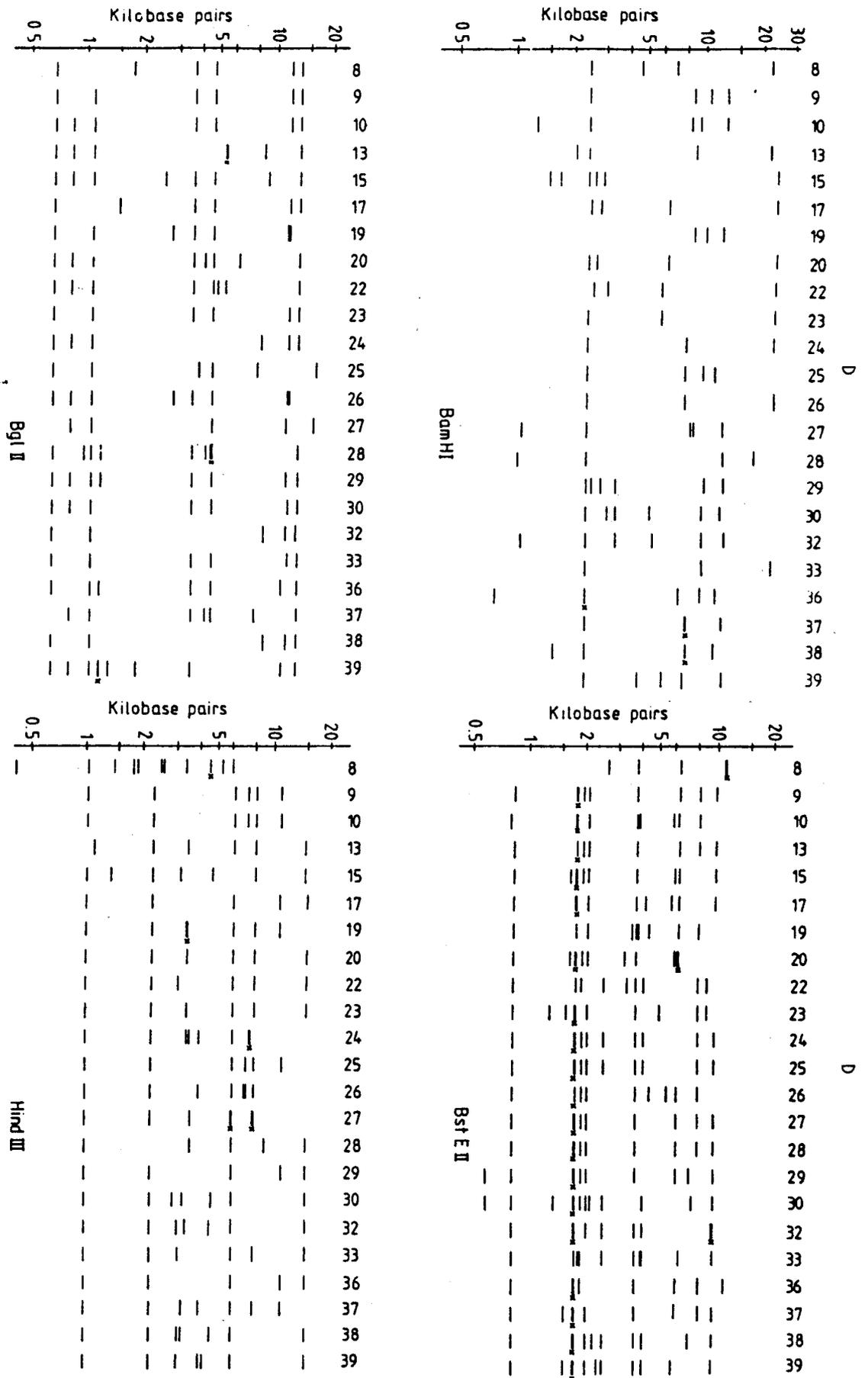


Figure 14. Profils de restriction de la plupart des adénovirus humains du sous-groupe D avec les endonucléases BamHI, BglIII, BstEII et HindIII (d'après ADRIAN et coll., 1986).

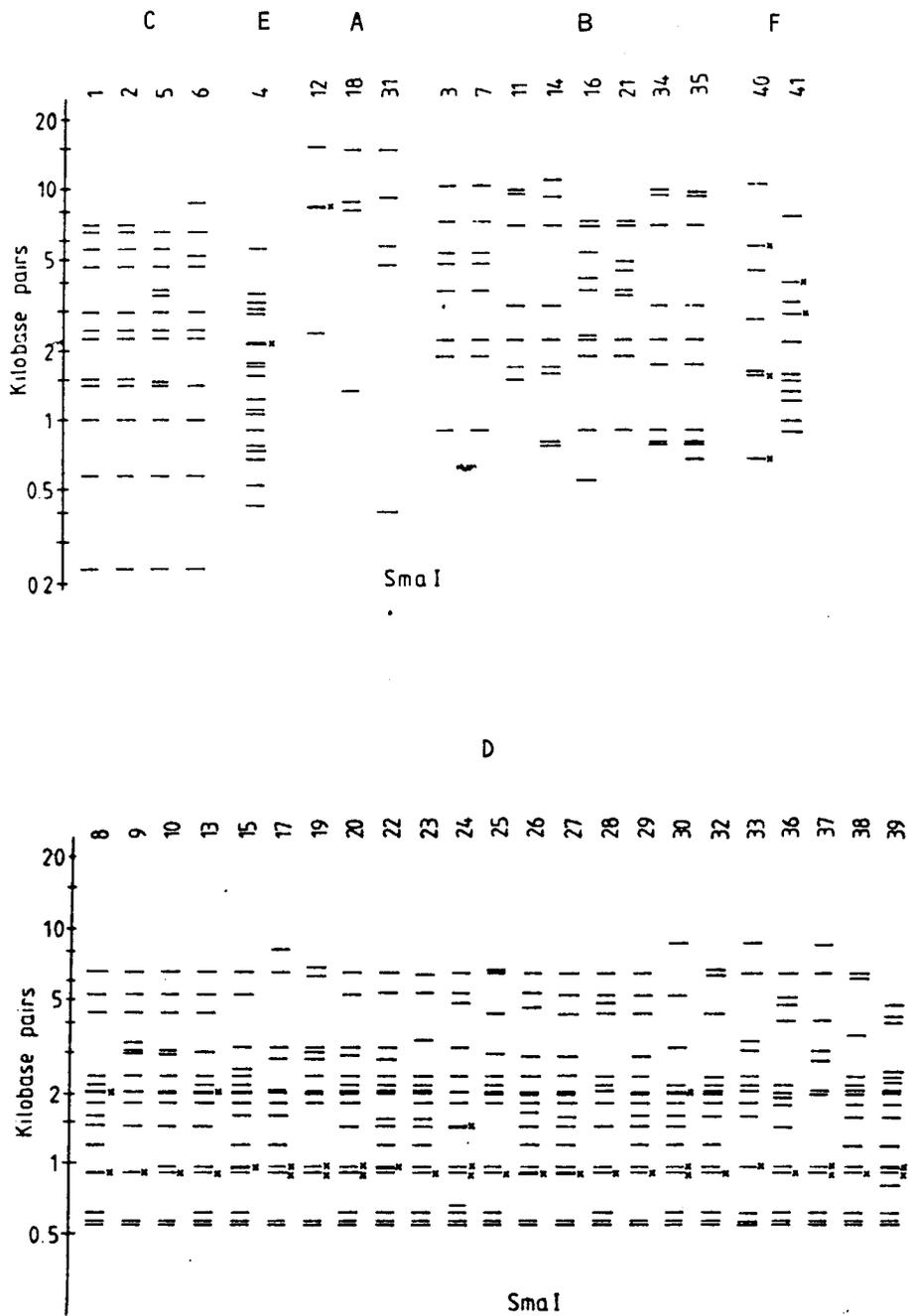


Figure I5. Profils de restriction des adénovirus humains, sérotypes 1 à 41, avec l'endonuclease SmaI (d'après ADRIAN et coll., 1986).

prototypes digérés par les endonucléases BamHI, BglII, BstEII, HindIII et SmaI. A la vue de ces profils, on s'aperçoit immédiatement que les sous-groupes B, C et D présentent des bandes caractéristiques du sous-groupe qui sont des fragments de restriction communs à tous ou à presque tous les virus du même sous-groupe.

Par analyse de restriction, le sous-groupe B a été subdivisé en deux ensembles, Ad3, Ad7, Ad16 et Ad21 d'une part, Ad11, Ad14, Ad34 et Ad35 d'autre part. A l'intérieur de chaque ensemble, les pourcentages de comigration sont toujours supérieurs à 55% mais d'un ensemble à l'autre, ils ne dépassent jamais 32%

Dans le sous-groupe C, le plus homogène, les pourcentages de comigration varient de 60% à 80% et de 37% à 80% dans le sous-groupe D. Dans le sous-groupe A, ce pourcentage n'est que de 20%, ce qui indique que ses membres sont assez éloignés les uns des autres.

Les pourcentages de comigration entre deux virus appartenant à deux sous-groupes différents ne sont que de 5% à 15%.

### III. LES MALADIES CAUSEES PAR LES ADENOVIRUS

Les adénovirus humains sont des virus universels, c'est-à-dire qu'ils peuvent infecter les êtres humains, hommes et femmes, appartenant à toutes les tranches d'âge et à toutes les races.

Certains sérotypes, surtout ceux du sous-groupe C, sont endémiques dans de nombreuses parties du monde. En Europe et aux Etats-Unis, entre un tiers et la moitié des enfants possèdent des anticorps dirigés contre ces sérotypes dès l'âge de 1 an. Des études épidémiologiques ont montré que le pourcentage d'enfants de 3 ans possédant des anticorps anti-adénovirus était de 37% en Suède, de 80% aux Etats-Unis et de près de 100% à Taiwan (STERNER, 1962 ; HALL et al., 1971 ; COONEY et al., 1972 ; FOY et GRAYSTONE, 1976). La vie dans les grandes agglomérations et le manque d'hygiène sont deux facteurs favorisant les infections par ces virus. En réalité, peu d'individus parviennent à l'âge adulte sans posséder d'anticorps contre ces adénovirus endémiques.

D'autres sérotypes sont plutôt isolés lors d'épidémies. Les Ad3, Ad4 et Ad7 ont été associés à des épidémies de fièvre pharyngoconjonctivale (BELL et al., 1956 ; D'ANGELO et al., 1979), les Ad4, Ad7, Ad11, Ad14 et Ad21 à des épidémies de maladies respiratoires (HILLEMANN et WERNER, 1954 ; TAI et al., 1960 ; VAN DER VEEN et al., 1969), les Ad8 et Ad19 à des épidémies de kératoconjonctivite (O'DAY et al., 1976 ; D'ANGELO et al., 1981) et les Ad40 et Ad41 à des épidémies de gastroentérite (GARY et al., 1979 ; RETTER et al., 1979 ; YOLKEN et al., 1982).

La transmission d'individu à individu se ferait principalement par la voie fécale-orale, tout au moins chez les enfants, et serait favorisée par le fait qu'un individu ayant été infecté par l'adénovirus peut continuer à en excréter pendant une très longue période (Tableau I2).

TABLEAU I2. POURCENTAGE DE PERSONNES EXCRETANT DES ADENOVIRUS PENDANT UNE CERTAINE PERIODE APRES UNE INFECTION INITIALE

---

Nombre de jours après l'infection	Pourcentage
1	100
2	52
16	44
31	36
61	32
91	26
181	20
361	9
721	2

---

D'après FOX et coll. (1969)

Les chiffres sont calculés à partir de 133 patients dont les fèces étaient adénovirus-positives

Pour les maladies respiratoires, la transmission a lieu aussi par instillation orale des aérosols provenant des sécrétions nasales contenant le virus.

La période d'incubation des infections à adénovirus varie de 4 à 10 jours pour les maladies respiratoires, les fièvres pharyngoconjonctivales et les kératoconjonctivites.

Même si ces virus sont actuellement parmi les plus étudiés au point de vue biologie moléculaire et quant à leurs interactions avec les cellules-hôtes, on ne dispose en définitive que de peu d'informations sur les mécanismes grâce auxquels ils infectent l'homme et provoquent des maladies et sur les réponses du système immunitaire qu'ils induisent. Ceci est notamment dû à l'absence d'un modèle animal satisfaisant.

Parmi l'ensemble des sérotypes d'adénovirus humains, seule une quinzaine ont été reconnus sans ambiguïté responsables de symptômes cliniques bien définis, ce qui ne veut pas dire que les autres soient nécessairement dépourvus de tout potentiel pathogène. Ce sont les Ad1, Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad6, Ad7, Ad8, Ad11, Ad14, Ad19, Ad21, Ad37, Ad40 et Ad41.

Dans le tableau I3, nous avons indiqué les principales maladies causées par l'adénovirus et les sérotypes responsables.

En fait, il n'est pas toujours facile d'établir une relation de cause à effet entre la présence d'un adénovirus chez un individu et un syndrome particulier présenté par cet individu et ceci pour deux raisons :

- Beaucoup d'infections associées à l'adénovirus sont bénignes
- Après une première infection, il n'est pas exceptionnel qu'un

TABLEAU 13. PRINCIPAUX SYNDROMES CLINIQUES CAUSEES PAR LES ADENOVIRUS

Syndrome	Sérotypes les plus fréquemment associés	Commentaire
Pharyngite	1, 2, 3, 5, 7	Epidémique
Infection respiratoire aiguë	3, 4, 7, 21	Epidémique dans les forces armées ; sporadique dans les populations civiles
Pneumonie	3, 4, 7	Peut être grave chez l'enfant
Pharyngoconjonctivite	3, 7	Epidémique
Conjonctivite folliculaire	3, 4, 7	
Kératoconjonctivite	3, 4, 7, 8, 19, 37	
Cystite hémorragique	11	
Gastroentérite	40, 41	Enfants

D'après WIGAND et ADRIAN (1986)

patient excrète un adénovirus pendant plusieurs mois, voire plusieurs années (Tableau I2).

Pour établir une relation de cause à effet, il doit être démontré statistiquement que les individus atteints d'une certaine maladie excrètent plus souvent le virus que les individus faisant partie d'un groupe contrôle. Ceci n'a pu être démontré que dans des études portant sur de très vastes populations, et dans des épidémies portant sur certains syndromes infectieux.

### Infections asymptomatiques

En réalité, beaucoup d'infections par l'adénovirus restent asymptomatiques. Par exemple, HILLEMANN (1957) a montré que 80% des recrues des forces armées américaines étaient infectées par l'adénovirus, en particulier Ad4 et Ad7, pendant les premières semaines de présence au corps, mais que la moitié de ces infections environ restaient asymptomatiques. D'une manière générale, et suivant le critère choisi pour définir la maladie, on estime que 55% à 85% des infections par l'adénovirus demeurent à un stade asymptomatique (STRAUS, 1984). Cette proportion est dépendante du sérotype (BRANDT et al., 1969).

### Infections respiratoires

Les adénovirus peuvent provoquer des rhumes, des pharyngites, des gripes, des trachéites, des bronchites, des pneumonies et d'autres infections respiratoires. On estime que pour l'ensemble de la population, ils sont responsables de 4% à 5% des infections respiratoires (MONTANO & ULLMAN, 1974) et ce pourcentage serait de 10% à 12% chez les enfants (BRANDT et al., 1969), un pourcentage supérieur

étant attribué à deux virus seulement, le virus syncytial respiratoire et le virus parainfluenza (KIM et al., 1979).

La fièvre pharyngoconjonctivale est un autre syndrome provoqué par l'adénovirus. Il se caractérise par la présence de fièvre, douleur de la gorge, conjonctivite et aussi par des migraines, des malaises et de l'anorexie. Des épidémies de fièvre pharyngoconjonctivale causées par l'adénovirus ont été décrites (FADEN et al., 1978). Dans un cas au moins, l'agent de transmission a été identifié : il s'agissait de l'eau d'une piscine mal désinfectée dans laquelle avaient séjourné les personnes atteintes (D'ANGELO et al., 1979).

#### Patients immunodéprimés

Un bon nombre d'infections par l'adénovirus, fatales pour l'individu atteint, ont été décrites, notamment chez de jeunes enfants au système immunitaire déficient ou souffrant de malnutrition (ATERMAN et al., 1973 ; ANDIMAN et al., 1977 ; ZAHRADNIK et al., 1980). Chez l'adulte, de telles infections fatales peuvent survenir chez des individus immunodéprimés parce que souffrant de cancer ou ayant reçu une transplantation de moelle osseuse ou de rein, ou traités avec des stéroïdes ou des drogues cytotoxiques (CARMICHAEL et al., 1979 ; ZAHRADNIK et al., 1980). Récemment, des adénovirus appartenant à de très nombreux sérotypes ont été isolés chez des patients souffrant de sida et les 5 derniers sérotypes découverts l'ont été chez cette catégorie de malades (HIERHOLZER et al., 1988b).

Les organes les plus fréquemment touchés par ces infections opportunistes sont le poumon et le foie. Comme ces infections surviennent souvent accompagnées de coinfections par des champignons ou des bactéries, il est difficile d'établir dans quelle mesure les

adénovirus contribuent au décès des individus.

#### Gastroentérites : les sérotypes 40 et 41

Les adénovirus sont communément isolés à partir des fèces de patients souffrant de maladie respiratoire, même sans symptômes de gastroentérite, ce qui indique que la détection de virus fécaux n'implique pas nécessairement une maladie intestinale (BRANDT et al., 1969 ; FOX et al., 1969). Le rôle pathologique d'un adénovirus isolé de fèces d'un patient souffrant de gastroentérite est souvent difficile à établir (JONCAS et PAVILANIS, 1960 ; DUNKIN et HUTCHINSON, 1961). Dans une étude réalisée sur deux groupes d'enfants, les uns souffrant de gastroentérite, les autres de maladie respiratoire, un même pourcentage d'individus excrétaient des adénovirus cultivables en culture cellulaire (BRANDT et al., 1980). Ainsi une relation de cause à effet, entre présence d'adénovirus et gastroentérite a été beaucoup plus longue à établir que dans le cas des rotavirus par exemple (FLEWETT et al., 1974 ; KAPIKIAN et al., 1974). Mais la situation a quelque peu évolué lorsqu'il a été montré que deux sérotypes, 40 et 41, détectés pour la première fois par FLEWETT et al. (1975) en microscopie électronique, étaient responsables de la grande majorité des cas de gastroentérite à adénovirus (BRANDT et al., 1985).

Le nombre de cas de gastroentérites virales est actuellement estimé à 200.000.000 par an dans le monde dont environ 30.000.000 seraient dus aux adénovirus qui constituent la seconde famille de virus en importance pour ce type de pathologie, après les rotavirus. Parmi ces 30.000.000 de cas, 150.000 à 200.000 sont mortels. Ce sont les enfants du tiers-monde qui sont les principales victimes de ce fléau.

Les Ad40 et Ad41, d'abord appelés adénovirus entériques, ont ensuite

été nommés fastidieux car ils ne peuvent être cultivés dans les systèmes de cultures cellulaires utilisées pour les autres adénovirus, HeLa, KB, HEp-2, HEK, etc. (KIDD et MADELEY, 1981 ; DE JONG et al., 1983), ce qui a considérablement retardé leur découverte. En revanche, ils peuvent être produits, bien qu'en quantité restreinte, dans les cellules 293, lignée cellulaire exprimant les unités de transcription précoce E1A et E1B de l'Ad5 (GRAHAM et al., 1977), ce qui a amené certains auteurs à émettre l'hypothèse selon laquelle le cycle lytique de ces virus serait bloqué à un stade précoce dans les lignées cellulaires conventionnelles (TAKIFF et STRAUS, 1982). Toutefois la détermination de la séquence nucléotidique des régions E1A et E1B des Ad40 et Ad41 (VAN LOON et al., 1987 ; ALLARD et WADELL, 1988 ; ISHINO et al., 1988) et la comparaison avec la séquence correspondante de l'Ad2 n'ont pas fait apparaître de manière évidente la cause de ce défaut de croissance.

#### Autres syndromes

Dès 1955, peu après sa découverte, il a été démontré que l'adénovirus était un agent infectieux pouvant provoquer des épidémies de kératoconjonctivite (JAWETZ et al., 1955). Ce sont principalement les Ad8, Ad19 et Ad37 qui sont responsables de ces épidémies (DAWSON et al., 1970 ; SPRAGUE et al., 1973 ; O'DAY et al., 1976 ; KEMP et al., 1983) dont les cas ne doivent pas être confondus avec ceux de kératite accompagnant parfois les maladies respiratoires provoquées par l'adénovirus. La maladie dure en général deux semaines mais peut, dans les cas les plus graves, entraîner une infirmité visuelle permanente.

Des cas isolés de méningites, méningoencéphalites et encéphalites dues à des adénovirus ont été également décrits dans la littérature, provoqués notamment par l'Ad3 et l'Ad7 (LELONG et al., 1956 ; FAULKNER et VAN ROOYEN, 1962 ; SIMILA et al., 1970).

Quant au cancer, la question de savoir si l'adénovirus pouvait

provoquer des cancers chez l'homme s'est posée depuis la découverte du caractère tumorigène de ce virus vis-à-vis du hamster nouveau-né par TRENTIN et al. (1962). Les recherches d'ADN d'adénovirus dans les tumeurs humaines par les techniques d'hybridation moléculaire ont toujours donné des résultats négatifs (MACKEY et al., 1979 ; GREEN et al., 1979b ; WOLD et al., 1979) mais le débat n'est pas définitivement clos car tous les types de cancers humains et tous les sous-groupes d'adénovirus n'ont pas été testés

#### Prévention, diagnostic, thérapie

Concernant la prévention, un certain nombre de vaccins, constitués de virus vivants ou inactivés, ont été mis au point (SMITH et al., 1970 ; TOP et al., 1971a, 1971b ; TAKAFUJI et al., 1979) mais deux facteurs ont considérablement freiné les recherches et le développement de ces vaccins. Ce sont :

- la grande variété de ces virus du point de vue immunologique (47 sérotypes),
- le risque potentiel d'oncogénicité pour l'homme des souches vaccinales.

Diagnostic : Jusqu'à ce jour, le diagnostic s'appuie encore largement sur la méthode traditionnelle d'isolement du virus après croissance en culture cellulaire. Toutefois, le grand inconvénient de cette méthode est sa lenteur, elle nécessite en effet plusieurs jours à plusieurs semaines. Des méthodes plus rapides ont été mises au point ces dernières années, utilisant la technique d'hybridation moléculaire de l'ADN viral (RANKI et al., 1983 ; VIRTANEN et al., 1983 ; GOMES et al., 1985 ; HYPPIA, 1985 ; KIDD et al., 1985 ; STALHANDSKE et al., 1985 ; TAKIFF et al., 1985 ; HAMMOND et al., 1987), des techniques immunoenzymatiques (JOHANSSON et al., 1985 ; PEREIRA et al., 1985 ; MORTENSSON-EGMUND et

KJELDSBERG, 1986 ; SINGH-NAZ et NAZ, 1986 ; GOUVEA et al., 1987 ; HERRMANN et al., 1987 ; SINGH-NAZ et al., 1988), des techniques d'agglutination (GRANDIEN et al., 1987) et d'immunomicroscopie électronique (WOOD et BAILEY, 1987). Un chapitre de cette thèse sera consacré à la mise au point d'une technique de diagnostic rapide des adénovirus impliqués dans les gastroentérites.

Thérapie : Aucune thérapie antivirale spécifique des infections à adénovirus n'existe pour le moment, contrairement aux infections dues aux virus de l'herpès et de l'influenza.

#### IV. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DES ADENOVIRUS. LES TYPES GENOMIQUES.

En culture cellulaire au laboratoire, les adénovirus ne présentent pas une variabilité génétique exceptionnellement élevée. Cultivées dans trois laboratoires différents et après de nombreux passages, 39 souches d'adénovirus présentaient toujours les mêmes profils de restriction avec trois enzymes (WIGAND et ADRIAN, 1986).

Toutefois, ces virus se présentent dans la nature sous une très grande diversité. Comme nous l'avons vu, 47 sérotypes ont été mis en évidence chez l'homme, sans parler des nombreux sérotypes d'adénovirus animaux. Il n'est donc pas étonnant que l'on puisse isoler des souches variantes dont les ADN sont différents mais dont les propriétés sérologiques sont les mêmes. Pour rendre compte de ces variations, WADELL et al. (1980) ont introduit le concept de type génomique qui se définit comme étant une souche d'un sérotype donné présentant un ou plusieurs profils de restriction différents de la souche prototype du sérotype considéré.

Suivant le nombre d'endonucléases de restriction utilisées et le nombre de fragments analysés, on révélera une variation plus ou moins grande du génome. Puisque chaque site de restriction est constitué d'un petit nombre de paires de bases (souvent 6), on ne pourra pas affirmer que deux souches présentant les mêmes profils de restriction sont identiques même si des centaines de fragments ont été comparés.

Deux systèmes de nomenclature des types génomiques ont été proposés. Le premier est un code numérique (ADRIAN et al., 1985b). Les profils de restriction de la souche prototype portent le numéro 1. Par exemple, si six endonucléases de restriction ont été utilisées avec l'Ad6 prototype, celui-ci est codé Ad6/P : 111111. Les profils de restriction

différents de celui du prototype prennent les numéros 2, 3, etc., les enzymes étant classées par ordre alphabétique. Par exemple, si les enzymes utilisées sont : BamHI, BglIII, BstEII, EcoRI, HindIII et SmaI, le type génomique Ad6/3 : 123112 présente des profils de restriction différents de ceux du prototype avec 3 enzymes, BglIII, BstEII et SmaI.

Ce système, très précis, est toutefois un peu compliqué. Un autre plus simple, proposé par LI et WADELL (1986), lui a été préféré. Dans ce système, la souche prototype est notée p et les souches du même sérotype présentant des profils de restriction différents avec l'endonucléase BamHI sont désignées a, b, c, etc. dans l'ordre dans lequel ces types génomiques sont découverts. Les chiffres arabes placés après p, a, b, c, etc. désignent les types génomiques différenciés par l'utilisation d'autres enzymes de restriction. Par exemple, Ad7p1 est un type génomique présentant le même profil BamHI que l'Ad7 prototype mais un profil différent avec une autre enzyme.

Les différents types génomiques d'un même sérotype peuvent parfois aussi être distingués par l'utilisation d'anticorps monoclonaux (VAN DER AVOORT et al., 1989) ou par la technique d'immunomicroscopie électronique en phase solide (SVENSSON et VON BONSDORFF, 1982).

La détermination des types génomiques permet de suivre la distribution épidémiologique des souches d'adénovirus dans le temps et dans l'espace et permet de comparer leurs caractères biologiques et pathologiques.

Le terme épidémiologie moléculaire a été employé dès que l'on a pu caractériser par analyse de restriction les différentes souches virales isolées. Le but en est une analyse détaillée de la dissémination des souches virales, soit sur une petite échelle pour déterminer comment se propage une épidémie, soit sur une grande échelle pour des études

épidémiologiques plus générales. Cette approche s'est révélée particulièrement fructueuse dans le cas des Ad3 et Ad7. Ainsi WADELL et al. (1985) et LI et WADELL (1986) ont publié une carte de la répartition des types génomiques d'Ad7 dans le monde.

Un exemple de déduction pouvant être tirée de ce genre de données épidémiologiques concerne le Japon : Dans ce pays, de nombreuses maladies respiratoires dues à l'Ad3 mais peu dues à l'Ad7 ont été décrites. En Europe, la situation est inverse. Mais il se trouve qu'au Japon, les souches isolées étaient Ad7p et Ad3a alors qu'en Europe, il s'agissait des Ad7b, Ad7c et Ad3p. Ces résultats suggèrent que les Ad7p et Ad3p sont moins virulents que les autres types génomiques.

La cause de l'apparition d'un nouveau syndrome peut aussi parfois être mieux comprise comme dans le cas de la conjonctivite à adénovirus pour laquelle il a été montré que le type génomique Ad19a était en cause (WADELL et DE JONG, 1980).

Dans cette thèse, nous présentons nos travaux de recherches menés sur la caractérisation de types génomiques d'adénovirus humains des sous-groupes B, C, D et E. Pour une meilleure caractérisation de ces variants, nous avons parfois eu besoin de dresser des cartes de restriction, elles sont également présentées. Les deux derniers chapitres sont consacrés aux adénovirus fastidieux, sérotypes 40 et 41, qui sont certainement les plus importants sur le plan médical par les gastroentérites qu'ils provoquent, mais qui n'ont pour l'instant été que très peu étudiés.

Les travaux décrits dans cette thèse ont fait l'objet des publications suivantes :

NIEL, C. & D'HALLUIN, J.C. (1984). Restriction maps of human adenovirus 2, 5 and 3 for BstEII, MluI, NdeI, NruI and SfiI endonucleases. *Gene*, 31, 305-308.

NIEL, C., GOMES, S.A., LEITE, J.P.G. & PEREIRA, H.G. (1986). Direct detection and differentiation of fastidious and nonfastidious adenoviruses in stools by using a specific non-radioactive probe. *Journal of Clinical Microbiology*, 24, 785-789.

GOMES, S.A. & NIEL, C. (1987). Human adenovirus from subgenus D : Restriction mapping of types 9 and 19 and characterization of a new genome type. *Journal of General Virology*, 68, 3171-3175.

GOMES, S.A., GABBAY, Y.B., NASCIMENTO, J.P. & NIEL, C. (1988). Genome analysis of adenovirus 4a, a causative agent of pharyngoconjunctival fever and respiratory diseases in Brazil. *Journal of Medical Virology*, 26, 453-459.

GOMES, S.A., CANDEIAS, J.A.N., MONTEIRO, S.P., PEREIRA, H.G. & NIEL, C. (1989). New genome types of adenovirus types 1, 3 and 5 isolated from stools of children in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 1022-1026.

En marge de ce travail, nous avons également participé aux publications suivantes :

D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C., NIEL, C. & BOULANGER, P. (1984). Characterization of an early temperature-sensitive and cytotoxic double mutant of adenovirus type 2. *Journal of General Virology*, 65, 1305-1317.

LEITE, J.P.G., NIEL, C. & D'HALLUIN, J.C. (1986). Expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in human cells under the control of early adenovirus subgroup C promoters : effect of E1A gene products from other subgroups on gene expression. *Gene*, 41, 207-215.

**MATERIELS  
ET  
METHODES**

## I. CULTURE CELLULAIRE ET PREPARATION DE VIRUS

### Les lignées cellulaires utilisées

Dans ce travail, nous avons utilisé les lignées cellulaires suivantes : HeLa, HEp-2, KB8, KB16, KB18, HRT18 et 293.

Les lignées KB8, KB16 et KB18 ont été obtenues à partir de la lignée humaine KB par introduction d'un plasmide contenant l'extrémité gauche du génome de l'Ad2. KB8 exprime la région E1A de l'Ad2, KB16 exprime les régions E1A et E1B et KB18 exprime la région E1B (BABISS et al., 1983). Nous remercions le Dr. YOUNG (Columbia University College of Physicians and Surgeons, New-York, N.Y., U.S.A.) qui nous a aimablement fourni ces trois lignées.

La lignée HRT18 est une lignée humaine provenant d'un adénocarcinome du rectum (TOMPKINS et al., 1974). Nous tenons à remercier le Dr. LAPORTE (INRA, Thiverval-Grignon) qui nous a gentiment envoyé cette lignée.

La lignée 293 a été isolée par transformation de cellules embryonnaires de rein humain par des fragments d'ADN d'Ad5, elle exprime les oncogènes E1A et E1B de ce virus (GRAHAM et al., 1977).

En monocouche, les cellules sont cultivées dans des flacons de marque Falcon à une température de 37°C en milieu de Dulbecco (marque Flow) contenant 5% de sérum de veau foetal et 5% de sérum de veau nouveau-né, irradié aux rayons  $\gamma$ , sauf pour les lignées HRT18 et 293 pour lesquelles on utilise du sérum de veau foetal à 10%.

En suspension, les cellules KB sont cultivées à 37°C en agitation dans du milieu MEM modifié par Joklik (F13 de Flow) et contenant 5% de sérum de cheval. Pour les cellules 293, on procède de la même manière mais on ajoute au sérum de cheval 2% de sérum de veau nouveau-né.

### Propagation des virus en culture cellulaire

La suspension virale est mise au contact de cellules en monocouche subconfluentes, dans un volume minimum de milieu de culture sans sérum, à peine suffisant pour éviter le dessèchement des cellules. Après une heure à 37°C, on ajoute du milieu de DULBECCO additionné de 2% de sérum de veau. Lorsque l'effet cytopathique est total, les cellules sont centrifugées à 2 000 g pendant 10 min et reprises dans 1/5 du volume initial de tampon TH (Tris 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM). Les cellules sont alors congelées et décongelées trois fois, elles éclatent et libèrent les virions. Au passage ultérieur, pour infecter un même nombre de cellules, on utilise 1/5 de cette suspension virale.

### Purification des virus

Elle se fait après multiplication virale dans des cellules KB ou 293 en suspension. Les cellules, à la concentration de  $4,5 \times 10^5$  cellules/ml, sont centrifugées à 2 000 g pendant 10 min. Le culot cellulaire est repris dans 1/20 du volume initial de milieu F13, sans sérum. Les cellules sont infectées à raison de 20 particules virales par cellule. Après 1 h d'adsorption virale à 37°C en agitation, le mélange cellules + virus est dilué au 1/20 dans du milieu F13 contenant 2% de sérum de veau nouveau-né.

Le cycle viral se déroule à 37°C pendant 40 h durant lesquelles les cellules restent en agitation. Les cellules infectées sont alors centrifugées à 2 000 g pendant 10 min. Le culot cellulaire est repris dans le tampon TH. Après trois cycles de congélation-décongélation et addition d'un volume égal de fréon F113 (E.I. du Pont de Nemours & Co, Inc., Wilmington, Del., U.S.A.), la suspension est homogénéisée à l'ultra-Turrax 2 min à 4°C. Les débris cellulaires sont éliminés par

centrifugation à 6 500 g pendant 20 min, à 4°C. La phase aqueuse supérieure est reprise, déposée sur un coussin de CsCl de densité 1,43 et centrifugée 1 h à 65 000 g, à 4°C. Les particules virales, concentrées en une bande opalescente, sont récupérées à l'aide d'une seringue et repurifiées sur gradient isopycnique de CsCl de densité 1,34 par centrifugation à 110 000 g pendant 16 h, à 4°C. Les particules sont récoltées, mélangées à un même volume de glycérol et stockées à -20°C.

#### Extraction des virus directement à partir de fèces

La technique employée dont on lira le protocole ci-dessous a été mis au point par nous-mêmes. Signalons qu'une technique similaire a été publiée par BUITENWERF et al. (1985).

S'ils sont solides, les échantillons de fèces sont soumis avant traitement à trois cycles de congélation-décongélation. On mélange 1 à 2 grammes de fèces à 3,5 ml de tampon TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). On ajoute un volume égal de fréon F113 et le mélange est agité vigoureusement pendant 2 min. Après centrifugation à 2 000 g pendant 10 min le surnageant contenant les particules virales est déposé au sommet d'un double coussin de chlorure de césium et de saccharose. Le coussin inférieur est composé de 0,7 ml de CsCl de densité 1,43 et le coussin supérieur de 0,7 ml de saccharose à 40%. On centrifuge à 110 000 g pendant 1 h à 4°C dans un rotor Beckman SW50.1. Un volume de 1 ml est collecté à l'interface CsCl-saccharose, là où viennent se concentrer les virus, et dialysé 4 fois 30 min contre un litre de TE.

## II. MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DES VIRUS EN CULTURE

### ELISA

Les cellules infectées sont congelées et décongelées 3 fois dans leur milieu de culture et la présence d'antigènes viraux est détectée par ELISA d'après la méthode de PEREIRA et al. (1985). L'anticorps de capture utilisé pour la sensibilisation des plaques est un sérum de chèvre post-immun anti-adénovirus. Comme antigène, on utilise la culture de cellules infectées sans traitement particulier, simplement congelée et décongelée 3 fois et diluée. L'anticorps détecteur est un sérum de cobaye anti-adénovirus. Le conjugué de révélation est un sérum de lapin anti-IgG de cobaye conjugué à la peroxydase et mélangé à du sérum de chèvre non immun destiné à bloquer la réaction résiduelle non spécifique pouvant survenir entre le conjugué et le sérum de capture.

### Séroneutralisation

Les souches virales ont été testées de la manière décrite par LEITE et al. (1985) avec des antisera fournis par le "Central Public Health Laboratory", Colindale, Londres, Grande-Bretagne.

## III. PREPARATION DE L'ADN VIRAL

### A partir de virus purifiés

Les virus sont dialysés contre du tampon TE puis digérés pendant 3 h à 37°C par 1 mg/ml de protéinase K en présence de 0,5% de sarcosinate de sodium. Après addition de CsCl jusqu'à une densité 1,7, l'ADN est

centrifugé à 110 000 g pendant 72 h à 18°C. La fraction contenant l'ADN est repérée sous lumière ultra-violette après addition de bromure d'éthidium puis dialysée contre le tampon TE et stockée à 4°C.

#### A partir de cellules infectées

La préparation d'ADN viral se fait par la méthode de HIRT (1967) modifiée par WADELL et DE JONG (1980). Cette préparation se fait à partir d'une petite quantité de cellules, comprise entre  $2 \times 10^6$  et  $5 \times 10^6$ . Après apparition d'un effet cytopathique total, les cellules sont centrifugées 10 min à 2 000 g, lavées dans le tampon PBS (NaCl 80 g ; KCl 2 g ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12 H<sub>2</sub>O 29 g ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g ; H<sub>2</sub>O qsp 2 500 ml), recentrifugées et reprises dans 0,5 ml de tampon Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 10 mM. On additionne 0,6% de SDS et on laisse agir 10 min à 20°C et 5 min à 60°C. Après digestion par 50 µg/ml de protéinase K durant 1 h à 37°C, une solution de NaCl 5 M est ajoutée goutte à goutte jusqu'à obtenir une concentration finale de 1 M, le lysat est alors agité doucement pendant 10 min puis laissé à 4°C pendant une nuit. Dans ces conditions, l'ADN cellulaire précipite alors que l'ADN viral, beaucoup plus petit, reste en suspension. On centrifuge ensuite durant 1 h à 12 000 g puis le surnageant est digéré pendant 2 h à 37°C par 30 µg/ml de RNase A puis 2 h 30 à la même température par 50 µg/ml de protéinase K. L'ADN est ensuite extrait au phénol, précipité à l'éthanol, séché et repris dans un petit volume de tampon TE.

#### Directement à partir de fèces

Après dialyse de la fraction contenant les virus (voir Matériels et Méthodes, chapitre I, extraction des virus directement à partir de fèces), le dialysat est digéré pendant 3 h à 37°C par addition de 50

µg/ml de protéinase K et de 0,5 % de sarcosinate de sodium. L'ADN est ensuite extrait au phénol, précipité par l'éthanol 20 min à -70°C et centrifugé 15 min à 38 000 g à 4°C. Le culot est séché sous vide et repris dans un petit volume d'eau distillée. L'ADN est alors suffisamment pur pour être digéré par les endonucléases de restriction.

#### IV. PROFILS ET CARTES DE RESTRICTION

##### Enzymes de restriction

Les enzymes suivantes ont été utilisées dans ce travail : BamHI, BclII, BglIII, BstEII, BstXI, ClaI, DraI, EcoRI, HindIII, HpaI, KpnI, MluI, NdeI, NruI, PstI, SalI, SmaI, SfiI, SphI, XbaI et XhoI.

Toutes sont de la marque Boehringer sauf BstXI et SfiI (Biolabs). Elles sont utilisées selon les prescriptions des fournisseurs. La firme Boehringer notamment fournit un ensemble de 5 tampons de digestion qui donne de bons résultats.

##### Electrophorèse en gel d'agarose

Le gel, contenant 0,8% d'agarose, est placé en position horizontale et immergé dans un tampon TBE (Tris 89 mM pH 8, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM). Après 4 h de migration à 80 V, le gel est placé 30 min dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5 mg/ml. Les bandes d'ADN sont alors visualisées sous lumière ultra-violette et photographiées avec un appareil Polaroid. Les films utilisés sont des films Polaroid références 667 (positif seul) ou 665 (positif + négatif).

Les gels contenant des fragments de restriction que l'on veut

hybrider sont dénaturés pendant 30 min dans une solution NaOH 0,5 M, NaCl 2,5 M puis neutralisés pendant 30 min dans une solution d'acétate de sodium 3 M, pH 5,5. L'ADN est ensuite transféré une nuit sur filtre de nitrocellulose (SOUTHERN, 1975) et fixé par chauffage sur le filtre dans une étuve sous vide à 80°C pendant 2 h.

#### Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Le gel de résolution est un gel à 7,5% polymérisé dans un tampon Tris pH 8,8, le rapport acrylamide / bis-acrylamide est 50/1,3. Le gel d'espacement est un gel à 3,5% polymérisé dans un tampon Tris pH 6,8 avec le même rapport acrylamide / bisacrylamide. Le tampon de cuve est un tampon Tris 0,025 M, Glycocolle 0,192 M pH 8,4.

#### Construction des cartes de restriction

Pour les sérotypes dont on connaissait déjà des cartes de restriction (sérotypes 2, 3, 4 et 5), l'emplacement des sites de restriction a été déterminé comme suit. 1 µg d'ADN d'adénovirus était digéré par

- 1) une enzyme de restriction X dont la carte de restriction était connue
- 2) une enzyme Y dont on voulait déterminer l'emplacement des sites de restriction
- 3) les enzymes X et Y simultanément.

Les enzymes X ont été choisies parmi les suivantes : BamHI, BclII, BglII, EcoRI, HindIII, HpaI, KpnI, SalI et XhoI. Après électrophorèse en gel d'agarose, les fragments de restriction étaient comparés avec des fragments de référence et leur masse moléculaire calculée.

Pour les sérotypes 9 et 19 pour lesquels aucune carte de restriction n'avait été préalablement déterminée, l'orientation des cartes de restriction par rapport à l'orientation conventionnelle des cartes

physiques d'adénovirus a été établie par hybridation de fragments de restriction transférés par la méthode de SOUTHERN (1975) avec des plasmides recombinants contenant des fragments d'ADN d'Ad2 et marqués de manière radioactive . Les plasmides utilisés ont été choisis parmi les plasmides que nous avons isolés lors de travaux antérieurs : le pVM214 contient la région s'étendant de 0 à 7,8 unités génome (LEITE et al., 1986), le pVM562 possède la région 0-29 unités génome et le pVM521 la région 29-59 unités génome (D'HALLUIN et al., 1984).

## V. CLONAGE ET HYBRIDATIONS MOLECULAIRES

### Transformation

La souche bactérienne utilisée est la souche HB101 qui est un hybride Escherichia coli K-12 - Escherichia coli B. Son génotype est : Pro, Leu, Thi, LacY, hsd20, endA, recA, rpsL20, ara-14, galK2, xyl-5, mtl-1, supE44. Elle est employée pour l'obtention et l'amplification de plasmides en vue de leur purification.

Les bactéries sont cultivées sous agitation à 37°C, dans 20 ml de milieu LB (extrait de levure 5 g/l, peptone 10 g/l, NaCl 5 g/l). Quand la culture atteint une densité optique de 0,6 à 580 nm, elle est centrifugée à 6 000 g pendant 10 min, à 4°C. Les bactéries sont lavées dans 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, recentrifugées, reprises dans 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, laissées 20 min à 4°C, centrifugées une dernière fois, reprises dans 0,5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M et réparties en aliquotes de 0,1 ml. A chaque aliquote sont ajoutés 25 µl d'une solution d'ADN transformant. Après 20 min dans la glace, cinq cycles de chocs thermiques 37°C - 4°C de 1 min

chacun sont effectués. La suspension est ensuite conservée 15 min à 4°C puis 1,5 ml de milieu 2XTY (extrait de levure 10 g/l, tryptone 16 g/l, NaCl 5 g/l) sont ajoutés et la suspension est mise en agitation 45 min à 37°C, ce qui permet aux cellules ayant reçu le plasmide d'exprimer les gènes de résistance à l'antibiotique. On étale alors 0,2 ml et 0,8 ml de culture sur deux boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélosé à 15 g/l et l'antibiotique servant de marqueur de résistance. Les boîtes sont incubées 18 h à 37°C et les clones résistants à l'antibiotique sont isolés.

#### Sélection des clones par la taille

Elle se fait selon la méthode d'ECKHARDT (1979). Chaque clone est étalé sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB gélosé + antibiotique. Une anse de bactéries est mise en suspension dans 500 µl de tampon TE. Après centrifugation 10 min à 5 000 g, le culot est repris dans 60 µl d'une solution TBE-25 % saccharose contenant 1 mg/ml de lysozyme et 50 µg/ml de RNase A. Les bactéries sont ensuite déposées sur un gel d'agarose à 0,8 %. A chaque échantillon, sont additionnés 20 µl d'une solution de SDS à 1%, bleu de bromophénoïl 0,05%, saccharose 50%, puis l'électrophorèse est effectuée à 90 V pendant 4 h. Les plasmides migrant moins vite, et donc ayant une taille plus importante que le témoin plasmide vecteur, sont sélectionnés comme plasmides recombinants.

#### Préparation des plasmides

Les clones sélectionnés sont mis en culture dans 30 ml de milieu LB contenant un antibiotique (ampicilline 50 µg/ml) pendant 3 h à 37°C, sous agitation. 10 ml de culture sont ajoutés à 200 ml de milieu LB et incubés à 37°C, sous agitation, jusqu'à atteindre une densité optique de

1 à 580 nm. On ajoute alors 1 ml de chloramphénicol à 34 mg/ml et la culture est laissée 18 h en agitation puis centrifugée 10 min à 6 000 g et le culot repris dans 3 ml de Tris 50 mM pH 8, saccharose 25%. Les bactéries sont placées à 4°C et 1 ml d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml est ajoutée. Après 5 min, 1 ml d'EDTA 0,2 M est additionné et après 10 min, 5 ml d'une solution Tris 50 mM pH 8, EDTA 20 mM, Triton 0,1% sont ajoutés et les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation à 150 000 g pendant 45 min à 4°C. On mélange alors 8,6 ml de surnageant, 8,6 g de CsCl et 86 µl d'une solution à 5 mg/ml de bromure d'éthidium. Après centrifugation à 300 000 g pendant 20 h à 16°C, la bande d'ADN plasmidique est récupérée, le bromure d'éthidium éliminé par extraction à l'isopropanol et les plasmides dialysés contre du tampon TE (SINSHEINER, 1977).

#### Marquage des sondes et hybridations

Le marquage des sondes de manière non radioactive, l'hybridation et la visualisation enzymatique des séquences complémentaires de la sonde ont été réalisés suivant la méthode colorimétrique à la peroxydase de RENZ et KURZ (1984). L'ADN d'Ad2 et un plasmide recombinant contenant un fragment de restriction d'Ad41, numéro 41-27, ont été utilisés comme sondes. Ce plasmide est linéarisé par digestion avec l'endonucléase de restriction BamHI. Les ADN sont dénaturés par chauffage à 100°C pendant 5 min suivi d'un brusque refroidissement dans la glace. La peroxydase préalablement attachée à la polyéthylèneimine est alors liée de manière covalente à l'ADN dénaturé comme décrit par RENZ et KURZ (1984).

La préhybridation est effectuée pendant 1 h à 37°C dans la solution de Denhardt 10 fois concentrée (solution de Denhardt : Ficoll 0,2 % ; Polyvinylpyrrolidone 0,2 % ; Sérumalbumine bovine fraction V 0,2 %) dans

un tampon 4 x SET (SET : Tris 120 mM pH 8 ; NaCl 0,6 M ; EDTA 4 mM) additionné de 0,1% de SDS.

Le filtre est ensuite placé dans la solution d'hybridation (formamide 50% ; polyéthylène glycol 8 000 6% ; solution de Denhardt 2 fois concentrée ; 4 x SET ; SDS 0,1% ; tRNA de levure 30 µg/ml) et incubé en agitation pendant 1 h à 37°C. La sonde est ensuite ajoutée à la concentration de 0,1 µg/ml et l'hybridation a lieu durant une nuit à 37°C. Le filtre de nitrocellulose est alors lavé 2 fois 30 min à 37°C dans une solution de formamide 50%, SDS 0,4%, 2 x SSC (SSC : citrate de sodium 0,015 M pH 7,2 ; NaCl 0,15M) et 2 fois 30 min à température ambiante dans du 2 x SSC.

La visualisation des séquences complémentaires de la sonde se fait par réaction enzymatique entre la peroxydase et l'orthodianisidine. Le substrat préparé extemporanément, soit 6 mg d'orthodianisidine dissout dans 2 ml d'éthanol, est additionné à 10 ml de tampon Tris 100 mM pH 7,4, imidazole 10 mM. Après addition de 10 µl d'eau oxygénée à 30 %, on laisse la réaction se dérouler 5 à 15 minutes dans l'obscurité à température ambiante, puis le filtre est lavé dans l'eau et fixé 30 min en méthanol 50%, acide acétique 10%, glycérol 10%. Il est ensuite séché entre deux feuilles de papier Whatman 3MM à 37°C.

# RESULTATS

I. CARTES DE RESTRICTION DES ADENOVIRUS HUMAINS SEROTYPES 2, 3, 5, 9 ET 19

Au cours de notre travail nous nous sommes intéressés d'une part à l'épidémiologie moléculaire et à la variabilité génomique des adénovirus humains et d'autre part à la régulation des gènes de ces virus. C'est essentiellement le premier aspect qui sera développé dans ce manuscrit. Les deux types d'études nécessitent cependant une bonne connaissance de la structure de l'ADN viral. On peut distinguer 5 critères apportant des informations quant à la structure du génome. Par ordre croissant d'intérêt : le pourcentage GC, le pourcentage d'homologie entre l'ADN de deux souches virales, les profils de restriction, les cartes de restriction et bien entendu la séquence nucléotidique de l'ADN à étudier dont la détermination nous donne l'information la plus complète. Comme il n'est pas possible, dans les conditions actuelles, de déterminer rapidement la séquence nucléotidique complète d'une souche d'adénovirus que l'on a isolée, la taille du génome étant approximativement de 36 000 paires de bases, la construction de cartes de restriction reste une méthode de choix d'analyse structurale du génome.

Pour les sérotypes 3, 5 et 19 pour lesquels nous avons mis en évidence de nouveaux types génomiques comme nous le verrons plus bas, ainsi que pour le sérotype 9, nous avons construit un certain nombre de cartes de restriction que nous présentons ci-dessous. Le sérotype 2 est le seul dont la séquence nucléotidique complète ait été déterminée (GINGERAS et al., 1982 ; AKUSJARVI et al., 1984 ; ALESTROM et al., 1984 ; ROBERTS et al., 1984, 1986). Avant publication de cette séquence, nous avons établi un certain nombre de cartes de restriction de ce sérotype. Nous présentons ici ces cartes, essentiellement dans un

but de comparaison avec le sérotype 5, extrêmement proche du point de vue structural. Le sérotype 4 fera l'objet du chapitre III de ces résultats où l'on trouvera les cartes correspondantes.

Les cartes présentées sont les cartes des souches prototypes à partir desquelles il est relativement aisé de construire les cartes des autres types génomiques (variants) du même sérotype car ils possèdent toujours un certain nombre de sites de coupure communs. Les endonucléases de restriction choisies ont une spécificité étroite : elles reconnaissent une séquence de 6 ou 8 paires de bases et de ce fait, le nombre de sites de coupure est relativement faible, en général inférieur à 10 pour un génome contenant environ 36 000 paires de bases. La taille de certains fragments de restriction est donc importante, de l'ordre de 40% à 60% du génome et de grands fragments de ce type sont particulièrement utiles lorsque l'on veut construire "in vitro" un ADN viral muté (par délétions, insertions, substitutions) dans le but d'obtenir un virus mutant.

### Ad3

La figure R1 montre les cartes de restriction que nous avons dressées pour l'Ad3. Les enzymes utilisées sont BglII, BstEII, MluI, NdeI, NruI et SfiI. On peut remarquer que deux endonucléases de restriction, MluI et SfiI, ne possèdent aucun site de reconnaissance sur le génome. Ceci constituait la première observation de l'absence de clivage d'un ADN d'adénovirus par une enzyme de restriction.

La figure R2 est une compilation des 19 cartes de restriction actuellement connues pour l'Ad3. Les cartes de restriction n'ayant pas été déterminées lors de ce travail avaient été publiées par D'HALLUIN et al. (1983) et par TIBBETTS (1977).

# Ad3

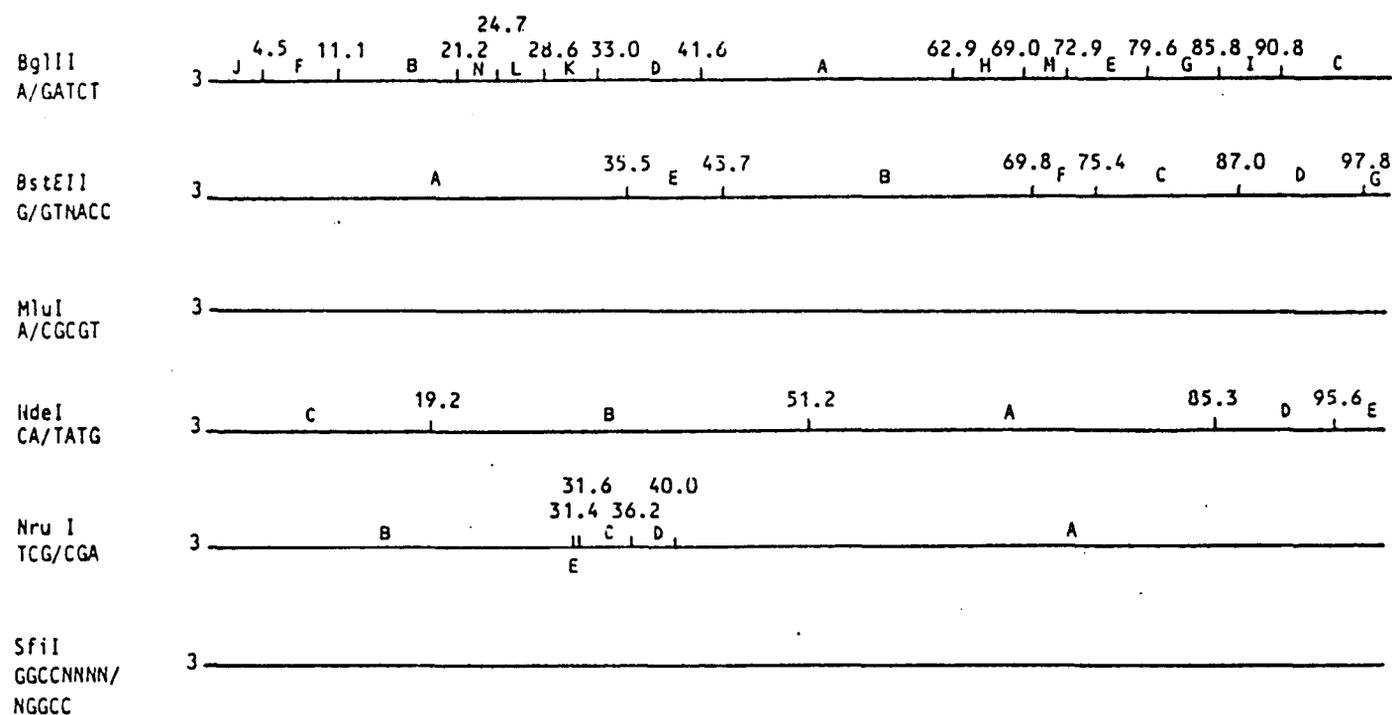


Figure R1. Cartes de restriction de l'Ad3 avec les enzymes BglII, BstEII, MluI, NdeI, NruI et SfiI. Sous le nom de l'enzyme figure la séquence nucléotidique reconnue. La barre indique l'emplacement exact du site de coupure. Les nombres indiquent les coordonnées des sites de coupure exprimés en unités génome. Le génome entier contient 100 unités génome. Les fragments de restriction ont été classés par ordre de taille décroissante : A, B, C, etc.  
N : Nucléotide dont la nature n'influence pas la reconnaissance par l'enzyme.

Ad3

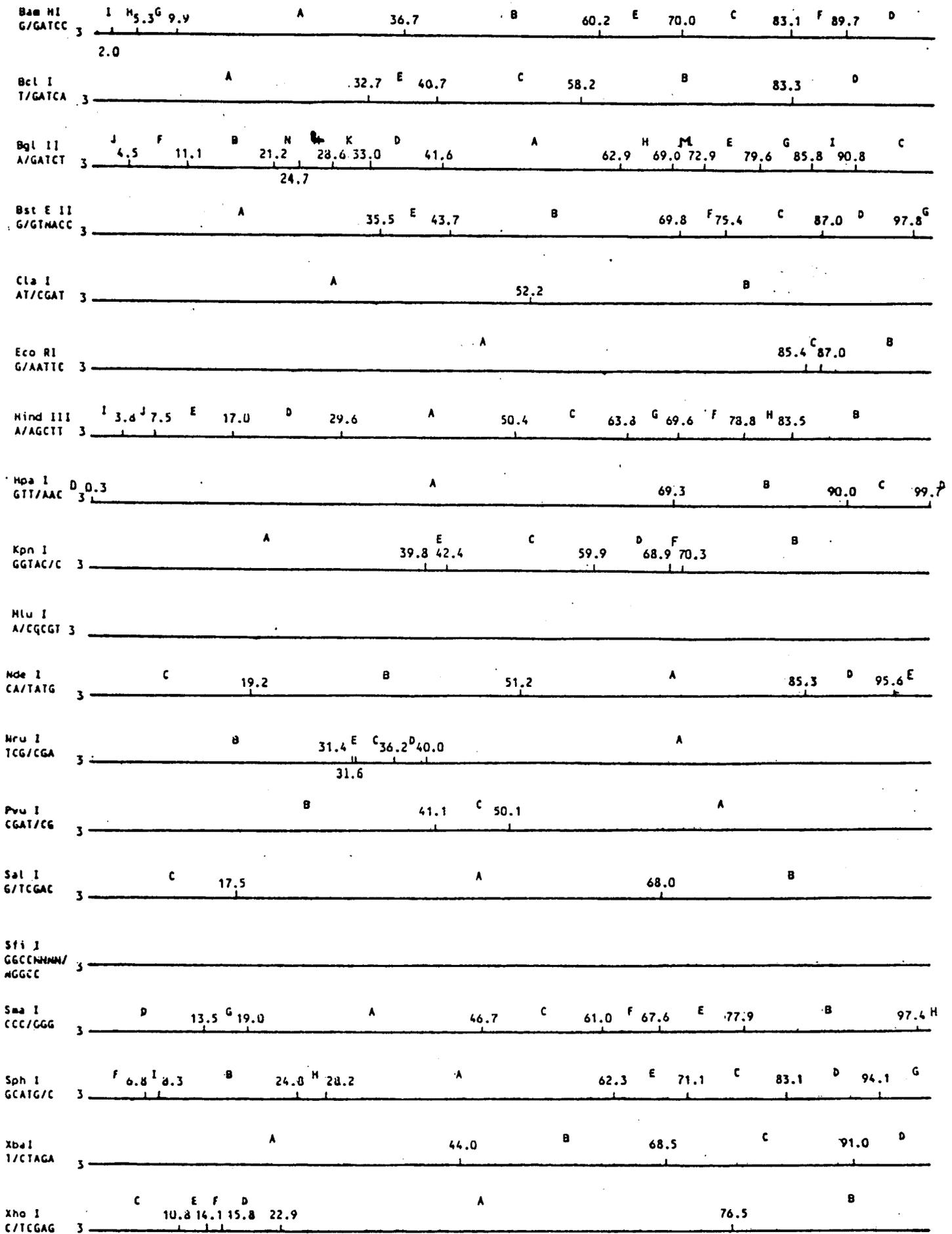


Fig. R2. Compilation des cartes de restriction actuellement connues pour l'Ad3.

### Ad2/Ad5

La figure R3 rassemble les cartes de restriction que nous avons construites pour l'Ad5 et l'Ad2. Ces deux sérotypes ont été groupés car ils appartiennent au même sous-groupe C et parce que leurs génomes présentent un pourcentage d'homologie extrêmement élevé, de l'ordre de 99 %. Pour ces deux sérotypes, les deux mieux connus parmi les adénovirus humains, nous avons réalisé une compilation portant sur 20 enzymes de restriction et 250 sites de coupure. C'est le schéma de la figure R4. Il était intéressant de savoir si certaines zones du génome étaient particulièrement variables d'un sérotype à l'autre. Le tableau R1 nous apporte quelques éléments de réponse. Le génome a été divisé en 4 zones suivant les unités de transcription. Nous pouvons voir que plus l'on se dirige vers la droite du génome, plus le pourcentage de sites communs aux deux sérotypes diminue et donc plus la variabilité du génome augmente. On notera que tous les sites de restriction situés dans les deux oncogènes E1A et E1B, à l'extrémité gauche du génome, sont conservés. D'une manière générale, 81% des sites sont communs aux deux sérotypes.

En revanche, si l'on compare les cartes de restriction de l'Ad3 appartenant au sous-groupe B et celles de l'Ad2 et de l'Ad5, du sous-groupe C, on constate que très peu de sites de restriction sont communs aux trois génomes.

### Ad9/Ad19

La figure R5 représente les cartes de restriction de l'Ad9 et de l'Ad19, deux virus du sous-groupe D, avec 7 endonucléases. Pour le sous-groupe D, seules avaient été publiées des cartes de restriction de l'Ad8 (TAKACS et al., 1983). Toutefois ce sérotype occupe une position

# Ad5/Ad2

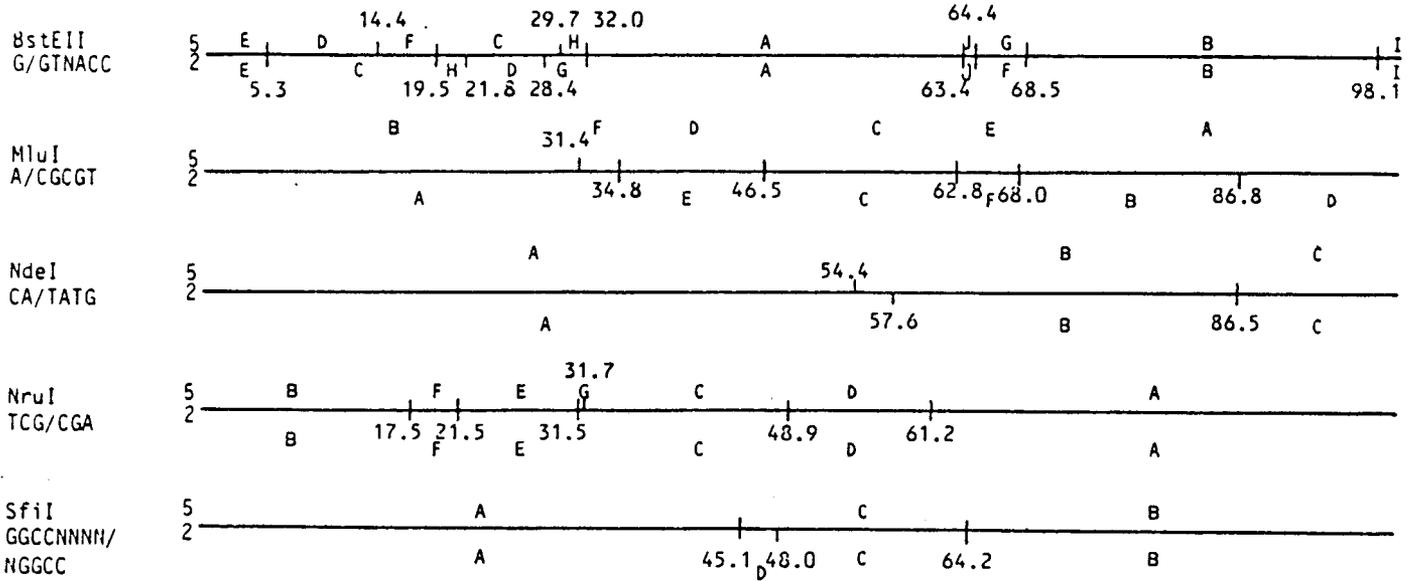


Fig. R3. Cartes de restriction des Ad5 et Ad2 avec les enzymes BstEII, MluI, NdeI, NruI et SfiI.

### Ad5 / Ad2

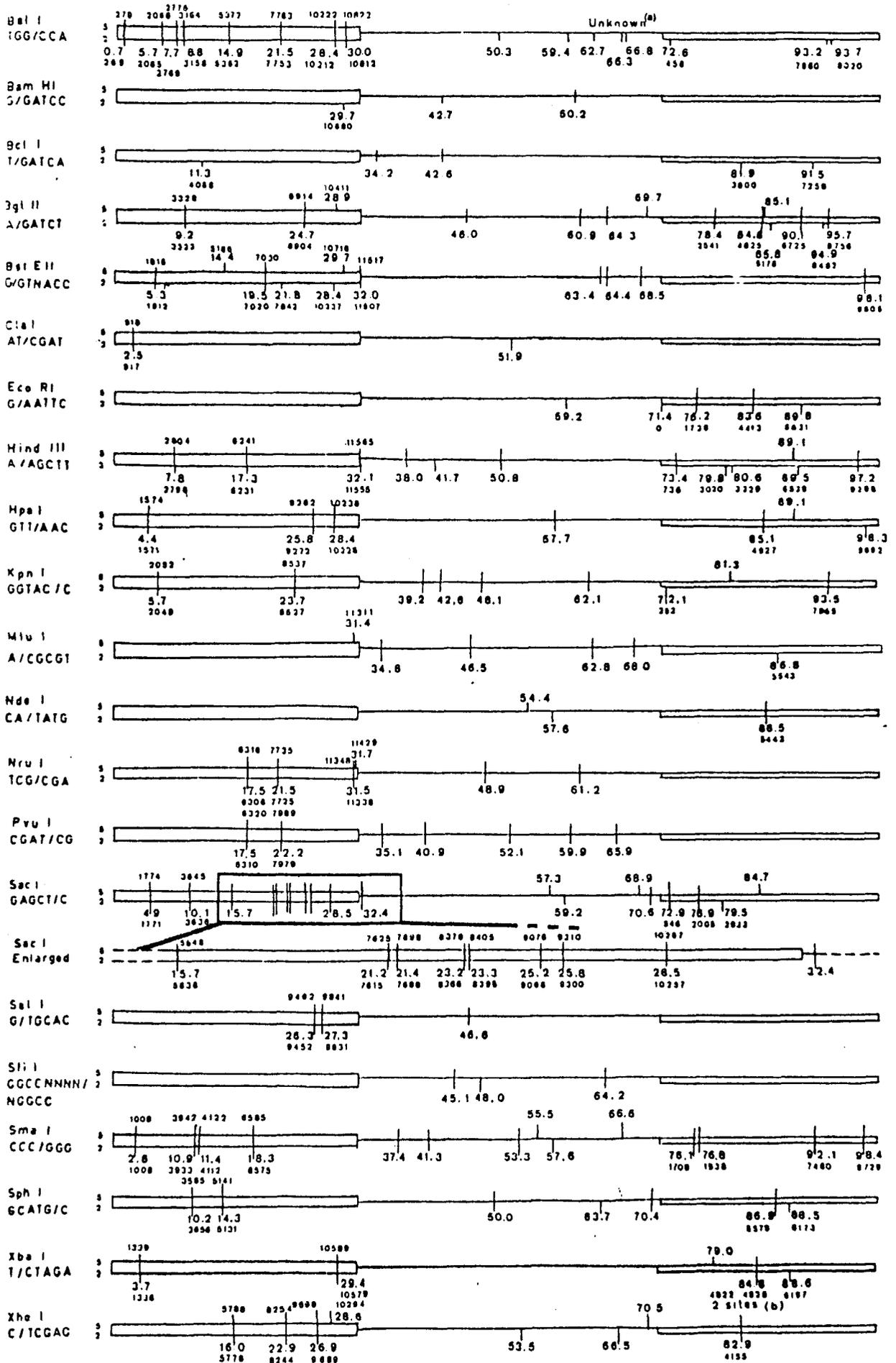


Fig. R4. Compilation des cartes de restriction de l'Ad5 actuellement connues et comparaison avec l'Ad2.

TABLEAU R1. COMPARAISON DES SITES DE RESTRICTION SUR LES GENOMES D'ADENOVIRUS TYPES 2 ET 5

Zone sur l'ADN en u.g. (a)	Unités de transcription (b)	Sites uniques		Sites en commun (c)	Pourcentage de sites en commun
		Ad2	Ad5		
0-11,2	E1A, E1B	0	0	24	100
11,2-62,3	E2B, L1, L2, L3	13	9	114	84
62,3-80,0	E2A, L4	5	5	36	78
80,0-100	E3, L5, E4	11	5	28	64
0-100	Génome complet	29	19	202	81

(a) Le génome de l'adénovirus est communément divisé en 100 parties égales appelées unités génome (u.g.). L'unité de transcription E1A, la première à être exprimée durant le cycle lytique, est située près d'une extrémité du génome. Par convention, cette extrémité est appelée extrémité gauche et représente l'u.g. 0.

(b) E = Early = Précoce.  
L = Late = Tardif.

(c) Les nombres indiquent le nombre de sites en commun sur les deux génomes. Par exemple, le nombre 24 (sites en commun) signifie 12 sites sur le génome d'Ad2 et 12 sites sur le génome d'Ad5.

### Ad9 / Ad19

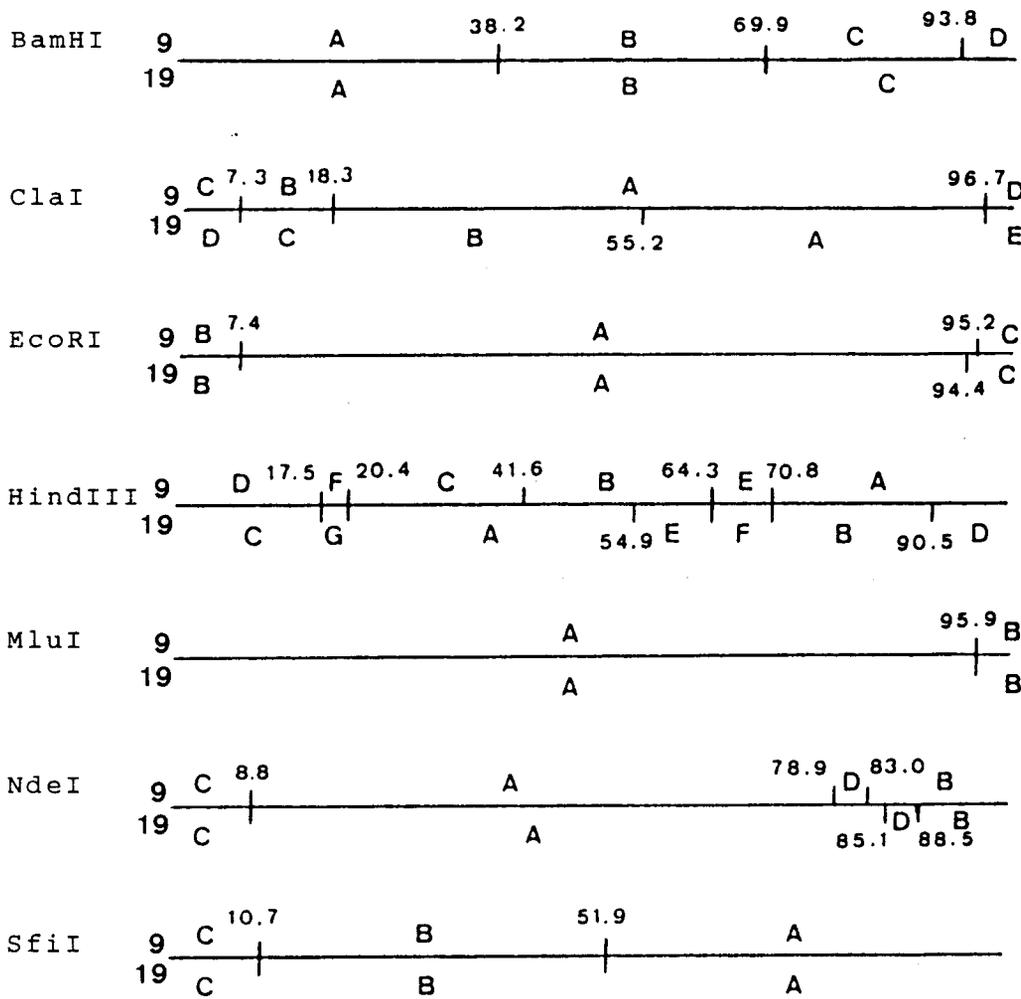


Fig. R5. Cartes de restriction des Ad9 et Ad19 avec les enzymes BamHI, ClaI, EcoRI, HindIII, MluI, NdeI et SfiI.

tout-à-fait particulière dans ce sous-groupe car le nombre de fragments de restriction d'ADN d'Ad8 comigrant avec les fragments de restriction d'un autre sérotype est beaucoup plus petit que pour n'importe quel autre sérotype du même sous-groupe (ADRIAN et al., 1986). Ainsi, en l'absence de cartes préalablement établies, il a été nécessaire, pour ces sérotypes 9 et 19, de recourir à la technique d'hybridation moléculaire en utilisant comme sondes des plasmides recombinants contenant un fragment d'ADN d'adénovirus afin de savoir où se trouvaient la gauche et la droite du génome et de l'orienter suivant la convention en vigueur décrite dans la légende du tableau R1. En comparant les cartes de restriction des deux sérotypes comme nous l'avons fait pour le couple Ad2/Ad5, on peut observer que dans les 40% situés à gauche du génome, tous les sites sont communs aux deux sérotypes, et qu'en revanche la majorité des sites localisés dans le quart droit du génome ne le sont pas, ce qui semble indiquer, là encore, une variabilité génétique plus grande dans cette région.

## II. MISE EN EVIDENCE DE NOUVEAUX TYPES GENOMIQUES D'ADENOVIRUS HUMAINS

### A. NOUVEAUX TYPES GENOMIQUES D'Ad1, Ad3 ET Ad5 (SAO PAULO)

Les adénovirus sont couramment isolés dans les fèces de patients, souvent très jeunes, atteints de gastroentérite. Ils ont également été isolés, à des fins de recherche, chez des sujets en bonne santé. Des adénovirus provoquant des maladies respiratoires peuvent également être excrétés durant la maladie. Certains auteurs ont trouvé que chez les patients ayant une diarrhée, la fréquence d'isolement des adénovirus était plus grande que dans le groupe contrôle (GARDNER et al., 1960 ; MOFFET et al., 1968). Pour d'autres auteurs en revanche, cette fréquence était similaire (YOW et al., 1970). Une étude assez ancienne mais portant sur un très grand nombre de cas, a montré que 0,5% des enfants en bonne santé de moins de 4 ans excrétaient des adénovirus, ce pourcentage étant d'autant plus élevé que les enfants étaient plus jeunes (GALBRAITH, 1965). Les types retrouvés, identifiés par séroneutralisation, étaient, par ordre décroissant, Ad2, Ad1, Ad5, Ad21, Ad3 et Ad15. Mais jusqu'à maintenant rien n'était connu sur les types génomiques présents dans les fèces de sujets non malades car l'analyse de restriction n'en avait jamais été faite. La caractérisation des types génomiques présente pourtant un grand intérêt du point de vue épidémiologique et aussi pour déterminer si à un type donné correspond ou non une plus grande virulence. Nous avons procédé à l'identification de ces types génomiques à partir des fèces de jeunes enfants vivant à Sao Paulo, Brésil. De nombreux types génomiques (variants) avaient déjà été isolés chez l'adénovirus, sérotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 19, 21, 31, 37, 40 et 41 ( voir revue de WIGAND et ADRIAN, 1986) mais

très peu l'avaient été en Amérique Latine, et aucun dans l'Etat de Sao Paulo, ce qui accroissait, a priori, la probabilité de rencontrer de nouveaux types génomiques.

Des échantillons fécaux donc ont été collectés à partir de 100 enfants, 59 filles et 41 garçons, vivant tous dans le même quartier pauvre (bidonville) de la ville de Sao Paulo. Chaque enfant a été suivi de la naissance à l'âge de 18 mois. Les fèces étaient collectées systématiquement tous les mois et une collecte supplémentaire était faite chaque fois qu'un enfant était malade, qu'il s'agisse d'une gastroentérite ou non. La présence d'antigènes d'adénovirus dans les fèces a été détectée par ELISA. Sur un total de 1345 échantillons, 53 (3,9%) contenaient des antigènes d'adénovirus. Sur ces 53, 29 provenaient d'enfants en bonne santé, 16 d'enfants malades, et 8 d'enfants dont l'état de santé n'avait pas été enregistré lors de la collecte. Les données concernant ces échantillons positifs figurent dans le tableau R2. Sur l'ensemble des prélèvements, des antigènes d'adénovirus ont été détectés dans les fèces de 35 enfants, 19 filles et 16 garçons, soit 35% de l'échantillonnage, ce qui est un pourcentage considérable.

Nous avons infecté des cellules HEp-2 avec des suspensions fécales provenant de 37 échantillons Ad-positifs et les virus contenus dans ces suspensions ont été cultivés jusqu'à apparition d'un effet cytopathique. Nous ne sommes parvenus qu'à cultiver 16 souches (43% des échantillons Ad-positifs). Tous les échantillons pour lesquels nous n'avons pas obtenu de croissance virale sur cellules HEp-2 ont été inoculés sur cellules 293, ceci afin de détecter d'éventuels adénovirus fastidieux, sérotypes 40 et 41, dont la croissance sur ce dernier type de cellules est satisfaisante alors qu'elle ne l'est pas sur HEp-2. Cependant, après

TABLEAU R2. ECHANTILLONS DE FECES CARACTERISES COMME Ad-POSITIFS EN ELISA

Echantillon (a)	Date de collecte	Sexe	Age	Diagnostic
01-02	09/84	F	2 mois	sain
02-10	11/85	F	16 mois	MR (b)
11-07	12/84	F	3 mois	fièvre
14-12	12/84	F	4 mois	sain
20-13	11/84	F	4 mois	sain
21-05	11/84	M	3 mois	sain
22-07	01/85	M	4 mois	sain
22-09	03/85	M	6 mois	sain
22-10	07/85	M	10 mois	diarrhée
23-12	07/85	M	11 mois	?
24-06	11/84	M	4 mois	MR
25-02	09/84	F	1 mois	sain
25-10	04/85	F	8 mois	fièvre - MR
26-21	10/85	M	14 mois	sain
26-22	10/85	M	14 mois	sain
30-03	11/84	F	3 mois	?
30-05	01/85	F	5 mois	MR
32-03	09/84	F	1 mois	sain
32-10	01/85	F	5 mois	?
33-04	11/84	M	3 mois	sain
33-05	11/84	M	3 mois	?
33-07	12/84	M	4 mois	MR
35-02	10/84	M	2 mois	sain
36-03	11/84	F	3 mois	?
37-02	11/84	F	2 mois	?
38-09	02/85	F	5 mois	sain
39-04	10/85	M	13 mois	varicelle
42-05	01/85	F	4 mois	sain
53-02	10/84	F	1 mois	sain
58-08	12/84	M	3 mois	sain
60-09	08/85	M	11 mois	sain
62-08	11/84	M	2 mois	sain
62-15	03/85	M	6 mois	?
62-22	10/85	M	13 mois	?
63-03	10/85	F	13 mois	diarrhée
63-04	11/84	F	2 mois	sain
63-05	11/84	F	2 mois	sain
65-17	10/85	F	13 mois	sain - anémie
66-04	10/84	M	1 mois	sain
68-15	06/85	M	10 mois	MR - fièvre
74-04	10/84	F	2 mois	sain
75-06	12/85	F	3 mois	sain
91-06	01/85	F	3 mois	diarrhée
92-07	01/85	M	3 mois	sain
95-06	01/85	M	3 mois	sain
96-05	01/85	F	2 mois	diarrhée
96-06	01/85	F	3 mois	MR
96-07	03/85	F	5 mois	sain - anémie
97-05	01/85	F	3 mois	diarrhée
97-08	03/85	F	5 mois	sain - anémie
97-09	04/85	F	6 mois	fièvre
97-10	05/85	F	7 mois	sain
97-11	05/85	F	7 mois	MR

a) N° de l'enfant - n° du prélèvement ; b) MR : maladie respiratoire

3 passages sur cellules 293, nous n'avons observé aucun effet cytopathique et aucun Ad40 ni Ad41 n'a été isolé durant cette étude.

Le typage des souches a été réalisé par analyse de restriction et par séroneutralisation. Dans un premier temps, l'ADN viral était extrait à partir des cellules infectées, digéré par l'enzyme de restriction BamHI et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. De manière surprenante, les profils BamHI d'une large majorité des souches différaient de ceux des 42 prototypes d'adénovirus humains actuellement connus (ADRIAN et al., 1986 ; WIGAND et al., 1987). Cependant, certains fragments de restriction étaient communs à une souche isolée et à un ou plusieurs prototypes. Ceci nous a permis pour chaque souche de déterminer à quel sous-groupe elle appartenait. Les résultats sont consignés dans le tableau R3.

Ainsi, sur les 16 souches virales isolées, 5 appartenaient au sous-groupe A, toutes les 5 montraient des profils de restriction différents de tous les types génomiques du groupe A actuellement caractérisés, Ad12p, Ad18p, Ad31p et Ad31a (HAMMOND et al., 1985). 5 souches appartenaient au sous-groupe B, 4 au sous-groupe C et 2 au sous-groupe D. Après cette première classification, nous avons typé les souches par séroneutralisation en utilisant pour chaque souche les antiséras dirigés contre les adénovirus du sous-groupe auquel appartenait la souche.

#### Sous-groupe B

Cinq souches appartenant au sous-groupe B ont été isolées, provenant de 4 enfants. Quatre de ces souches, 14-12, 22-09, 22-10, 25-10 (voir tableau R3), provenant de 3 enfants malades ou sains, ont été neutralisées par un antisérum anti-Ad3, ces 4 souches présentaient

TABLEAU R3. CARACTERISTIQUES DES ADENOVIRUS ISOLES PENDANT L'ETUDE  
EPIDEMIOLOGIQUE DE SAO PAULO

Echantillon (a)	Date de collecte	Enfant			Scus-groupe	Sérotype	Type Génomique
		Sexe	Age	Diagnostic			
22-07	01/1985	M	4	Sain	A	ND (b)	ND
25-02	09/1984	F	1	Sain	A	ND	ND
26-22	10/1985	M	14	Sain	A	ND	ND
30-05	01/1985	F	5	MR (c)	A	ND	ND
91-06	01/1985	F	3	Diarrhée	A	ND	ND
14-12	12/1984	F	4	Sain	B	Ad3	Ad3e1
22-09	03/1985	M	6	Sain	B	Ad3	Ad3e1
22-10	07/1985	M	10	Diarrhée	B	Ad3	Ad3e1
25-10	04/1985	F	8	MR, Fièvre	B	Ad3	Ad3e1
38-09	02/1985	F	5	Sain	B	Ad7	Ad7b
02-10	11/1985	F	16	MR	C	Ad1	Ad1p
23-12	07/1985	M	11	?	C	Ad5	Ad5a1
60-09	08/1985	M	11	Sain	C	Ad5	Ad5a2
97-10	05/1985	F	7	Sain	C	Ad1	Ad1d
39-04	10/1985	M	13	Varicelle	D	Ad10	ND
42-05	01/1985	F	4	Sain	D	ND	ND

- a) Numéro de l'enfant - Numéro du prélèvement
- b) ND : non déterminé
- c) MR : maladie respiratoire

toutes les mêmes profils de restriction avec les endonucléases BamHI et BstEII. La figure R6 montre les profils de restriction de l'Ad3 prototype (Ad3p) et de la souche 22-10, représentant ce groupe de 4, avec les enzymes de restriction BglII, HindIII, EcoRI et BamHI. On voit que les profils de restriction de la souche 22-10 sont différents de ceux de l'Ad3p. Les profils BglII et HindIII de la souche 22-10 étaient également différents de ceux des 17 types génomiques d'Ad3 connus jusqu'alors (LI et WADELL, 1988a). Les profils BamHI et EcoRI de cette souche étaient toutefois identiques à ceux du type génomique Ad3e. Le fait que l'Ad3e et la souche 22-10 présentent les mêmes profils de restriction avec l'enzyme BamHI nous a amené à proposer le nom d'Ad3e1 pour ce nouveau type génomique suivant la terminologie proposée par LI et WADELL (1986). Dans ce système, deux souches du même sérotype présentant des profils de restriction avec BamHI différents sont désignées a, b, c, etc. dans l'ordre dans lequel ces types génomiques sont découverts. Les chiffres arabes placés après a, b, c, etc. désignent les types génomiques différenciés par l'utilisation d'autres enzymes de restriction.

La souche 38-09, également du sous-groupe B, était neutralisée par le sérum anti-Ad7. Ses profils BglII, HindIII et BamHI étaient identiques à ceux de l'Ad7b (LI et WADELL, 1986) qui est un type génomique très proche de l'Ad7e déjà isolé au Brésil (WADELL et al., 1985).

### Sous-groupe C

Quatre échantillons de ce sous-groupe ont été isolés. Les souches 23-12 et 60-09 étaient neutralisées spécifiquement par le sérum anti-Ad5. La figure R7 montre les profils de restriction avec BglII, HindIII, EcoRI et BamHI de l'Ad5p et des souches 23-12 et 60-09 ainsi

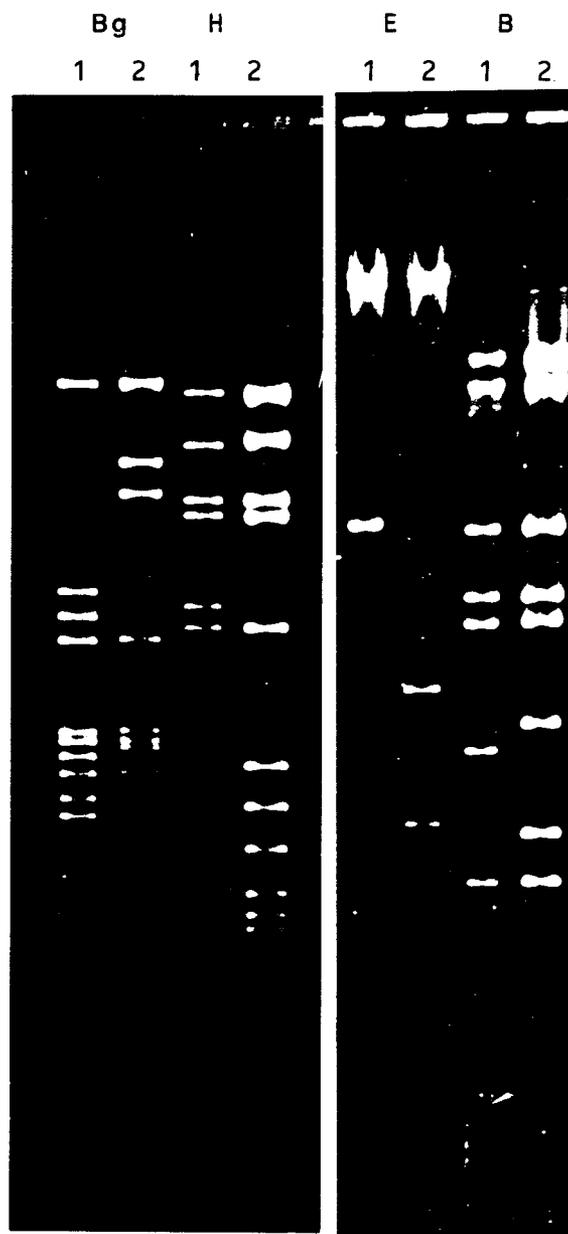


Fig. R6. Profils de restriction en électrophorèse en gel d'agarose de l'Ad3p (pistes 1) et de la souche 22-10 (pistes 2) après digestion par les endonucléases de restriction suivantes. Bg : BglII. H : HindIII. E : EcoRI. B : BamHI. La souche 22-10 a été désignée Ad3e1.

que le profil BamHI de l'Ad2p. Les profils de restriction de l'Ad5p et de la souche 60-09 avec HindIII sont identiques, sauf pour le fragment I de la souche 60-09 qui est plus petit d'environ 50 paires de bases que son homologue de l'Ad5p. Sachant que cette bande HindIII-I de l'Ad5p a été localisée à l'extrémité droite du génome (BROKER, 1980), on en déduit que cette différence de taille est révélatrice d'une petite délétion dans cette partie du génome de la souche 60-09, entre les coordonnées 97,2 et 100. Le profil de digestion par HindIII de la souche 23-12 ne possède pas la bande D de l'Ad5p, en revanche 2 plus petites bandes apparaissent en supplément. Ce profil est identique à ceux déjà publiés des Ad5b, Ad5c et Ad5d (WEBB et al., 1987).

La masse moléculaire de la bande BglII-A des deux souches isolées est supérieure à celle de la bande correspondante de l'Ad5p et le fragment K, long d'environ 1500 paires de bases, n'apparaît pas. Pour ces deux souches, la bande BglII-A est donc le résultat de l'addition des bandes A et K de l'Ad5p. On peut donc en déduire que le site de restriction BglII localisé au nucléotide 10411 chez l'Ad5p (DEKKER et VAN ORMONDT, 1984) n'existe pas chez ces deux souches. La petite délétion à l'extrémité droite du génome de la souche 60-09 a pu également être visualisée avec l'endonucléase BglII. En effet, le fragment BglII-J localisé entre 95,7 et 100 unités génome (BROKER, 1980) est inférieur d'environ 50 paires de bases chez la souche 60-09.

Le profil EcoRI de la souche 60-09 est identique à celui de l'Ad5p, alors que celui de la souche 23-12 présente une bande supplémentaire comme décrit pour l'Ad5b et l'Ad5d (WEBB et al., 1987). Les profils de digestion par BamHI des deux souches sont identiques à ceux de l'Ad2p et de l'Ad5a (BRUCKOVA et al., 1980) mais non des Ad5b, Ad5c et Ad5d (WEBB et al., 1987). Nous avons donc proposé la désignation suivante

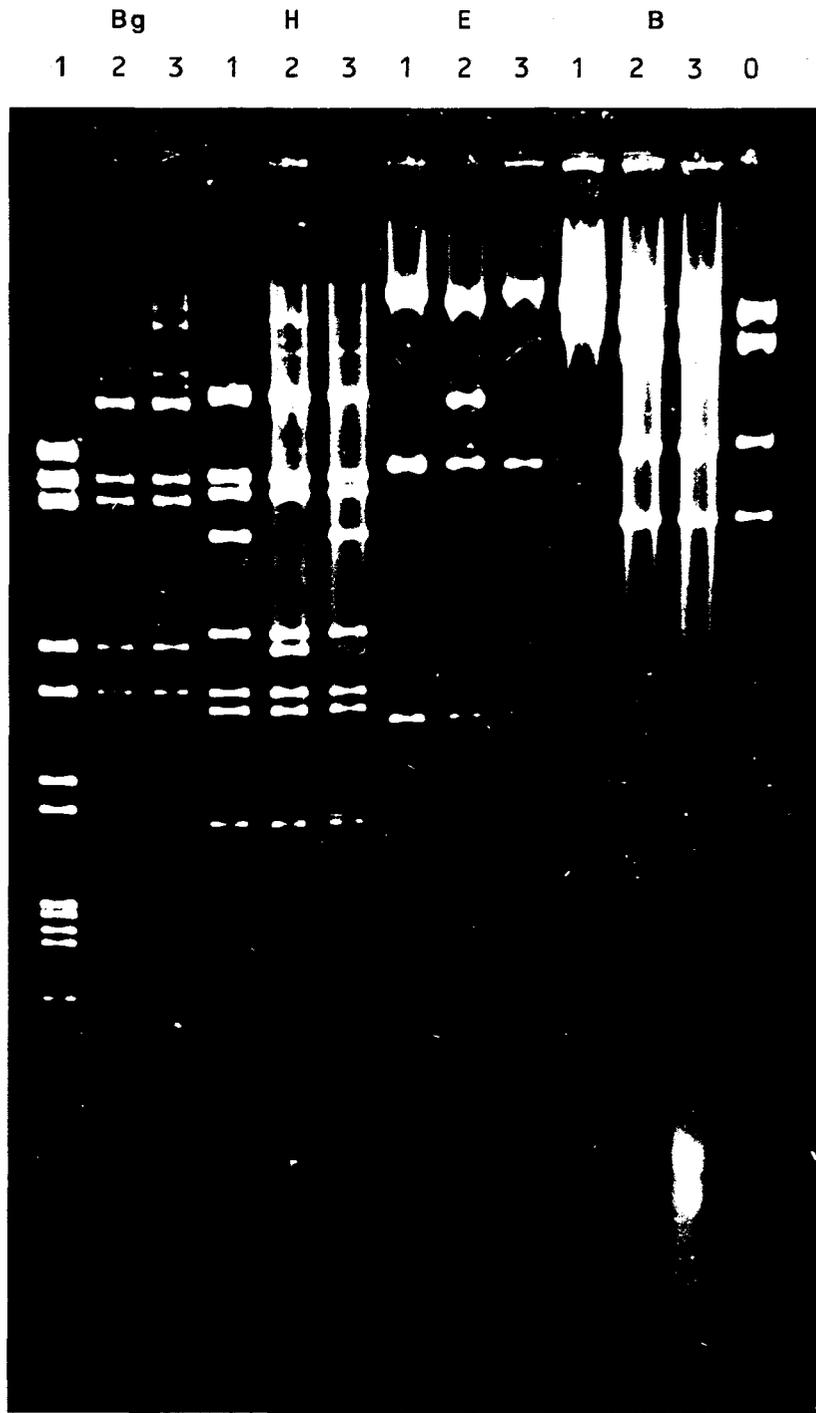


Fig. R7. Profils de restriction en électrophorèse en gel d'agarose de l'Ad5p (pistes 1), de la souche 23-12 (pistes 2) et de la souche 60-09 (pistes 3) après digestion par les endonucléases de restriction suivantes. Bg : BglIII. H : HindIII. E : EcoRI. B : BamHI. Piste 0 : Ad2p. Les souches 23-12 et 60-09 ont été désignées respectivement Ad5a1 et Ad5a2.

pour ces nouveaux types génomiques : Ad5a1 pour la souche 23-12 et Ad5a2 pour la souche 60-09.

Deux autres isolats du sous-groupe C ont été identifiés par séroneutralisation comme étant de l'Ad1. Le virus 2-10 présente des profils de restriction avec BamHI, BglIII et HindIII identiques à ceux de l'Ad1p. L'autre virus, numéro 97-10, montre un profil BamHI différent de celui de l'Ad1p (Fig. R8). Les profils EcoRI de l'Ad1p et de la souche 97-10 sont identiques. Puisque trois types génomiques Ad1a, Ad1b et Ad1c avaient déjà été décrits (FIFE et al., 1985a), nous avons proposé le nom d'Ad1d pour ce nouveau type génomique.

#### Sous-groupe D

Deux souches de ce sous-groupe ont été isolées. La souche 39-04 provenant d'un enfant atteint de varicelle était neutralisée par le sérum anti-Ad10. Cependant, ses profils de restriction avec BglII, HindIII et BamHI étaient différents de ceux de l'Ad10 prototype.

### B. NOUVEAU TYPE GENOMIQUE D'ADENOVIRUS DU SOUS-GROUPE D

#### (RIO DE JANEIRO)

Au cours d'un autre travail, nous avons également mis en évidence un nouveau type génomique du sous-groupe D. Afin de mettre au point une technique de détection rapide des adénovirus dans les fèces de sujets atteints de gastroentérite, nous avons procédé à l'analyse de ces virus directement après leur extraction de fèces, sans culture. La majorité

E        B  
1   2   1   2

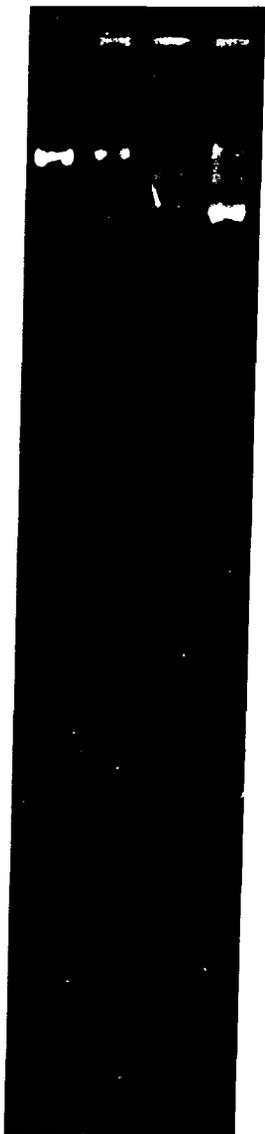


Fig. R8. Profils de restriction en électrophorèse en gel d'agarose de l'Adlp (pistes 1) et de la souche 97-10 (pistes 2) après digestion par les endonucléases de restriction suivantes. E : EcoRI. B : BamHI. La souche 97-10 a été désignée Adld.

des virus extraits a pu être typé par l'analyse de restriction de leur ADN après électrophorèse en gel d'agarose (voir Résultats, chapitre IV). A partir d'un de ces virus, souche numéro 208, extrait de fèces provenant d'un enfant de 2 ans qui se trouvait sous traitement pour gastroentérite aigüe à Rio de Janeiro, Brésil, nous avons obtenu une quantité d'ADN assez considérable, de l'ordre de 50 ng/g de fèces. De plus, l'ADN de cette souche présentait des profils de restriction non décrits jusqu'alors. Pris ensemble, les profils de restriction avec les enzymes BamHI, HindIII et SmaI de la souche 208 étaient différents de ceux de tous les types d'adénovirus humains connus. Nous avons donc décidé de caractériser cette souche plus complètement.

Nous avons purifié ce virus après l'avoir cultivé en grande quantité sur cellules 293. Ce virus a été soumis à des tests d'hémagglutination et de séroneutralisation. Il agglutinait entièrement les érythrocytes de rat et de singe rhésus, ce qui est une propriété du sous-groupe D. La croissance de ce virus était considérablement ralentie par un sérum anti-Ad19.

Les ADN des Ad9 et Ad19 et de la souche 208 ont été préparés à partir de virions purifiés et digérés par 18 enzymes de restriction. La figure R9 montre les profils de restriction obtenus. Tous les fragments de restriction supérieurs à 800 paires de bases sont visibles. Le nombre total de fragments visibles est de 117 pour l'Ad9, 123 pour l'Ad19 et 112 pour la souche 208. Les profils de restriction de ces trois virus montrent une certaine similitude. Afin d'estimer le degré de similitude entre les génomes nous avons calculé le pourcentage de fragments de restriction comigrant, ceci par comparaison 2 à 2. L'Ad9 et l'Ad19 présentaient 74 (62%) fragments comigrant. Entre l'Ad9 et la souche 208 le pourcentage était de 60% et entre l'Ad19 et la souche 208, il était de 57%.

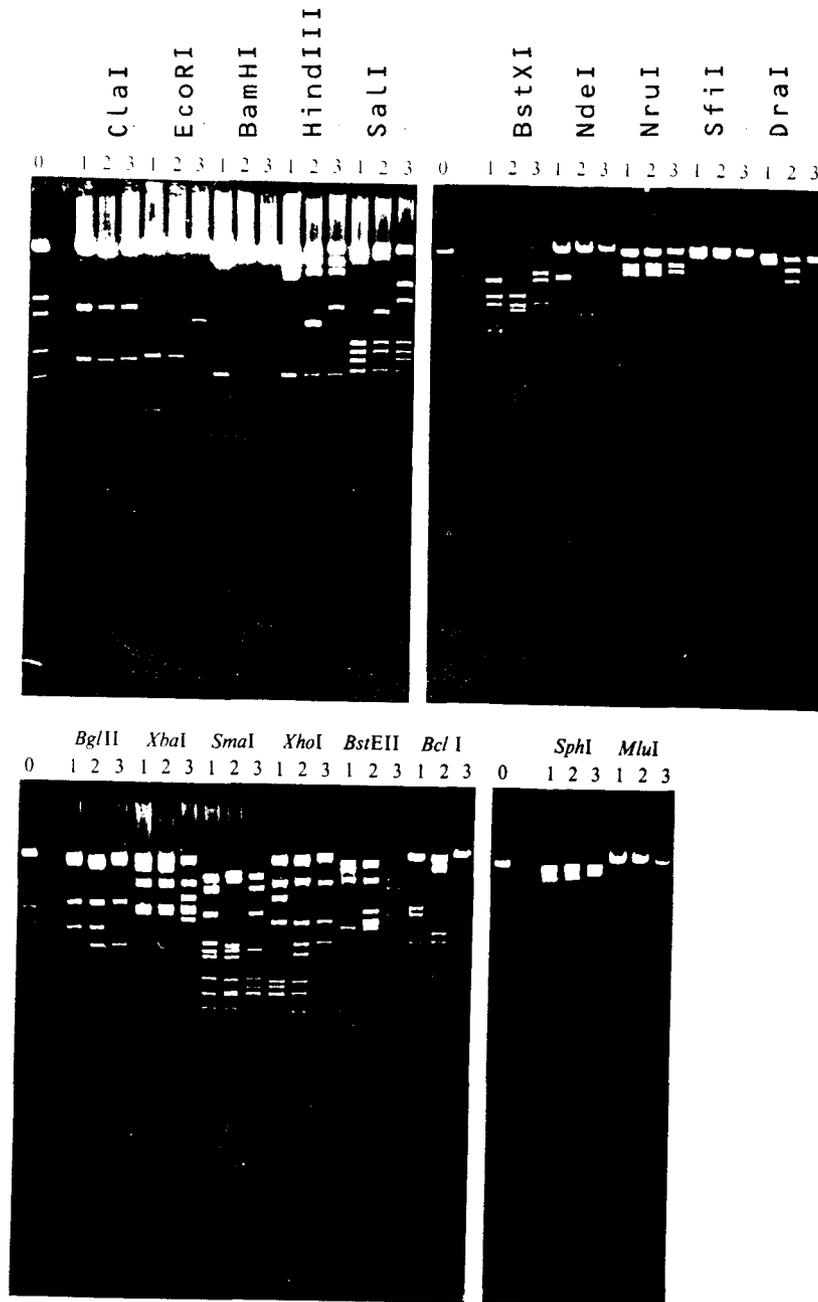


Fig. R9. Profils de restriction en électrophorèse en gel d'agarose des Ad9 (pistes 1), Ad19 (pistes 2) et de la souche 208 (pistes 3) après digestion par les endonucléases de restriction indiquées. Pistes 0 : Marqueur de taille, ADN d'Ad2 digéré par *EcoRI*; la taille des fragments est de 21338, 4295, 3673, 2674, 2218 et 1739 paires de bases.

De la même manière que nous avons construit les cartes de restriction de l'Ad9 et de l'Ad19 (Fig. R5), nous avons également construit les cartes de restriction de la souche 208 avec les mêmes enzymes. Avec l'enzyme BamHI, la carte de la souche 208 était la même que celle de l'Ad19, avec l'enzyme ClaI la carte du virus isolé était identique à celle de l'Ad9 et avec l'enzyme SfiI les cartes des 3 virus étaient identiques. Toutefois, avec les enzymes EcoRI, HindIII et MluI, la souche 208 présentait des profils de restriction différents de ceux de l'Ad9 et de l'Ad19.

Par la suite, nous avons constaté par des tests de séroneutralisation que la souche 208 appartenait au sérotype 26. Ceci ne pouvait absolument pas être détecté par l'analyse de restriction car les profils de restriction de la souche 208 et de l'Ad26p sont également très différents.

### C. INTERET DE L'ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DANS LA DIFFERENCIATION DES TYPES GENOMIQUES

Comme nous l'avons vu précédemment, la notion de type génomique est basée sur l'existence sur le génome viral de séquences nucléotidiques qui sont reconnues spécifiquement par les endonucléases de restriction. Après digestion, les fragments d'ADN générés sont séparés par électrophorèse. Le support d'électrophorèse généralement utilisé est l'agarose, qui permet une séparation selon la taille des fragments. L'autre support utilisé en électrophorèse est le gel de polyacrylamide.

Ce dernier a été utilisé pour distinguer les rotavirus des adénovirus dans des infections où ces deux types de virus sont susceptibles d'être présents. En utilisant un gel de polyacrylamide de concentration et de réticulation adéquates, on peut facilement distinguer les génomes, non digérés, de ces deux virus : l'ADN d'adénovirus non digéré pénètre à peine dans le gel tandis que le RNA double brin segmenté du rotavirus donne naissance à une douzaine de bandes caractéristiques de ce virus. Toutefois, le support polyacrylamide n'avait pas été utilisé chez l'adénovirus dans la mise en évidence de nouveaux types génomiques.

En gel d'agarose, la migration des molécules d'ADN linéaire double brin est très peu affectée par la structure (séquence nucléotidique) de la macromolécule, mais presque exclusivement par sa taille. La situation est différente en gel de polyacrylamide dans lequel deux ADN linéaires double brin de même taille peuvent migrer de manière sensiblement différente.

Nous avons mis à profit cette propriété du gel de polyacrylamide pour tenter de différencier des souches qui présentaient des profils de restriction identiques en gel d'agarose et donc avaient été classées dans le même type génomique. Le modèle que nous avons choisi est l'ensemble des 4 souches appartenant au type génomique Ad3e1 (tableau R3). Ces 4 souches, numéros 14-12, 22-09, 22-10 et 25-10, isolées au cours de l'étude épidémiologique menée à Sao Paulo, proviennent de 3 enfants ; deux de ces souches, 22-09 et 22-10, ayant été isolées à partir de deux échantillons de fèces du même enfant, collectés à quatre mois d'intervalle. Au moment de la première collecte, cet enfant n'était pas malade, mais à la deuxième collecte, il avait une diarrhée. Les ADN de l'Ad3p et des 4 souches d'Ad3e1 ont été digérés par 4 enzymes de restriction, BamHI, BglII, BstEII et HindIII, et soumis à électrophorèse

en gel d'agarose et en gel de polyacrylamide. Les résultats sont indiqués dans le tableau R4. Le gel de polyacrylamide permet avec chacune des enzymes utilisées, de diviser les quatre souches d'Ad3e1 en deux groupes, le couple 14-12/25-10 et le couple 22-09/22-10, les deux souches d'un même couple présentant pour chaque enzyme le même profil de restriction et ayant des profils différents de ceux des membres de l'autre couple. En revanche, seules deux enzymes, BglIII et HindIII, nous permettent de faire cette différenciation lorsqu'on utilise l'agarose comme support et dans le cas d'HindIII, le comportement électrophorétique des fragments d'ADN des souches 14-12 et 25-10 est le même que celui des fragments d'ADN d'Ad3p. Quant aux enzymes BamHI et BstEII, elles ne permettent pas, en utilisant l'électrophorèse en gel d'agarose, de faire une distinction entre les quatre souches. La figure R10 montre les profils de restriction de l'Ad3p et des 4 souches avec les enzymes BglIII et HindIII. Sur la droite de la figure, apparaissent les fragments d'ADN de l'Ad2 et de l'Ad6 digérés par BamHI. Ces deux virus appartiennent au même sous-groupe C et leurs profils de restriction avec BamHI en gel d'agarose sont rigoureusement identiques. On voit ici qu'en gel de polyacrylamide, ces deux profils sont légèrement différents.

Dans nos conditions expérimentales, avec visualisation des fragments d'ADN sous lumière ultra-violette, après coloration avec le bromure d'éthidium, le gel de polyacrylamide présente aussi l'avantage de permettre la détection de quantités 10 fois plus petites d'ADN, la consistance du polyacrylamide permettant de travailler avec des gels beaucoup plus minces et la diffusion de l'ADN dans ce support étant moindre.

TABLEAU R4. PROFILS DE RESTRICTION D'Ad3p ET DES SOUCHES D'Ad3e1 EN ELECTROPHORESE EN GELS D'AGAROSE ET DE POLYACRYLAMIDE

Enzyme de Restriction	Agarose			Polyacrylamide		
	Profil A1	Profil A2	Profil A3	Profil P1	Profil P2	Profil P3
<u>Bam</u> HI	Ad3p	14-12 22-09 22-10 25-10	-	Ad3p	14-12 25-10	22-09 22-10
<u>Bgl</u> II	Ad3p	14-12 25-10	22-09 22-10	Ad3p	14-12 15-10	22-09 22-10
<u>Bst</u> EII	Ad3p 14-12 22-09 22-10 25-10	-	-	Ad3p	14-12 25-10	22-09 22-10
<u>Hind</u> III	Ad3p 14-12 25-10	22-09 22-10	-	Ad3p	14-12 25-10	22-09 22-10

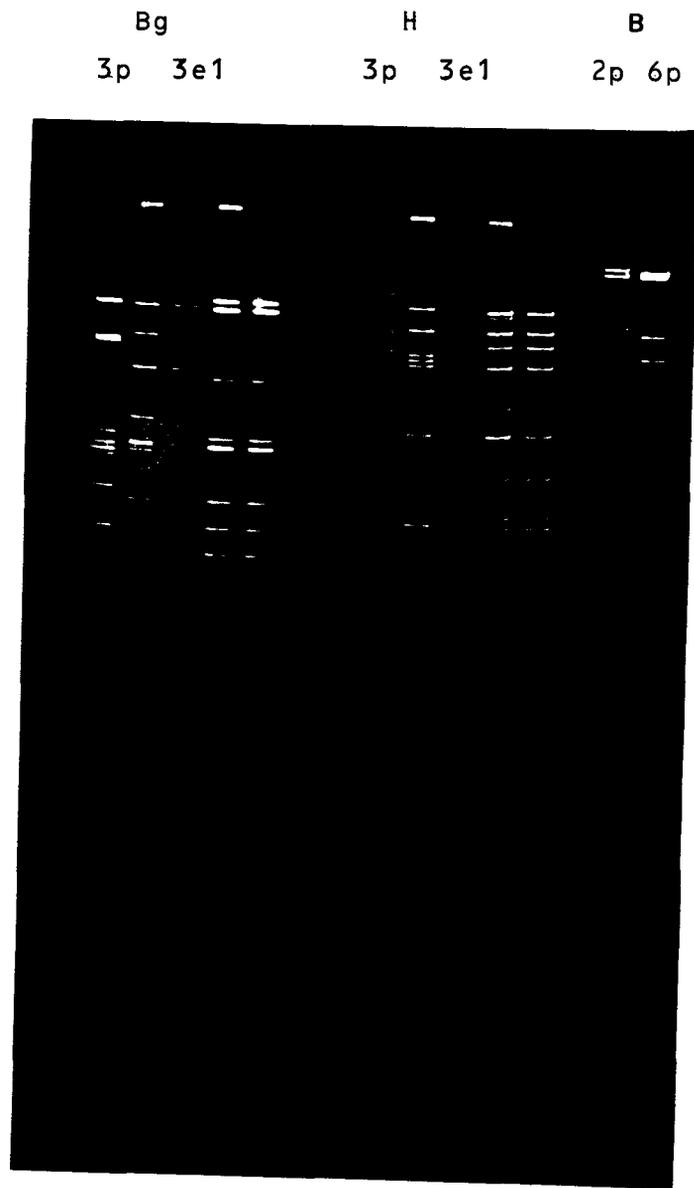


Fig. R10. Profils de restriction en électrophorèse en gel de polyacrylamide de l'Ad3p et des souches d'Ad3e1 après digestion par les endonucléases de restriction suivantes. Bg : BglII. H : HindIII. Profils BamHI (B) de l'Ad2p et de l'Ad6p.

### III. LE TYPE GENOMIQUE Ad4a, RESPONSABLE DE CONJONCTIVITES ET DE MALADIES RESPIRATOIRES

Dans le chapitre précédent, où l'étude était effectuée sur un groupe d'individus pris au hasard et suivis dans le temps et non pas choisis en raison d'une pathologie particulière, nous avons vu qu'il n'était pas facile d'établir une relation de cause à effet entre la présence d'un certain type d'adénovirus dans les fèces d'un individu et les symptômes cliniques observés chez cet individu. Nous commenterons plus amplement ce point dans la discussion.

Dans le cas que nous allons voir maintenant, qui concerne le sérotype 4, cette relation de cause à effet peut être établie avec certitude. L'Ad4, bien que ne représentant, d'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé, que 2 à 3% des adénovirus isolés dans le monde, revêt une certaine importance sur le plan médical. En effet, ce sérotype a été associé à des épidémies de maladies respiratoires survenues dans des régiments de jeunes soldats, notamment dans les forces armées américaines. Ceci a d'ailleurs conduit à la mise au point et à l'administration, au moins à titre expérimental, d'un vaccin chez ce groupe de sujets à risque (TAKAFUJI et al., 1979). L'Ad4 a par ailleurs été décrit comme responsable d'épidémies de conjonctivite en Europe (MUZZI et al., 1975), aux Etats-Unis (LEWANDOWSKI et RUBENIS, 1981) et au Japon (AOKI et al., 1982). Quant à l'Amérique du Sud, rien n'avait été publié ayant trait spécifiquement à l'Ad4. Nous avons réalisé avec ce sérotype une étude d'épidémiologie moléculaire divisée en deux parties, l'une concernant une épidémie de fièvre pharyngoconjonctivale survenue à Bélem, dans le Nord du Brésil (Etat du Para) et l'autre, plus générale, de caractérisation de souches isolées

sur une période de plusieurs années dans les agglomérations de Rio de Janeiro et Bélem, distantes d'environ 3000 kilomètres. Dans les deux cas, nous avons déterminé quel était le type génomique d'Ad4 en cause.

De Juin à Novembre 1976, eut lieu dans la ville de Bélem une épidémie de fièvre pharyngoconjonctivale. Les symptômes cliniques le plus souvent observés étaient : conjonctivite papillaire et folliculaire, congestion de la conjonctive et hémorragie subconjonctivale. Des échantillons ont été prélevés au niveau de l'oropharynx et de la conjonctive sur 89 patients (51 hommes, 38 femmes) s'étant présentés dans une des cliniques de la ville ou faisant partie du personnel de l'Institut Evandro Chagas où ont été réalisés les prélèvements. Dans ce groupe de patients, toutes les classes d'âge étaient représentées. Le tableau R5 indique le nombre et l'origine de chaque type de virus isolé durant cette épidémie. Nous avons identifié l'Ad4 comme agent causal de l'épidémie et celui-ci a été isolé dans 82 % des cas. La présence d'autres types d'adénovirus et même d'un virus de l'herpès était détectée mais dans un très petit nombre de cas.

Dix souches d'Ad4 provenant de l'épidémie ont été cultivées et leur ADN extrait à partir de cellules infectées et digéré par les endonucléases de restriction BamHI et EcoRI. Toutes ces souches présentaient des profils de restriction identiques à ceux de l'Ad4a identifié par WADELL (1984).

Puisque l'Ad4a était responsable de cette épidémie de conjonctivite, nous avons voulu savoir si ce type génomique pouvait être fréquemment isolé au Brésil et s'il était répandu géographiquement, d'où la deuxième partie de l'étude conduite dans les métropoles de Rio de Janeiro et Bélem.

A Bélem, 43 adénovirus ont été isolés durant la période 1977-1986.

TABLEAU R5. VIRUS ISOLES DES PRELEVEMENTS DE L'OROPHARYNX ET DE LA CONJONCTIVE DE 89 PATIENTS ATTEINTS DE FIEVRE PHARYNGOCONJONCTIVALE (EPIDEMIE DE BELEM)

Virus	Nombre de souches isolées de			Total
	Conjonctive et oropharynx	Conjonctive seulement	Oropharynx seulement	
Ad1	1	0	0	1
Ad2	1	0	0	1
Ad3	2	0	0	2
Ad4	58	8	7	73
Ad7	1	0	0	1
Ad non typé	1	0	0	1
HSV (a)	1	0	0	1
Aucun	-	-	-	9
Total	65	8	7	89

(a) HSV : Herpes Simplex Virus

Treize d'entre eux, soit 30 %, étaient neutralisés par un sérum anti-Ad4. Ces 13 souches ont été isolées à partir de 12 adultes présentant une maladie oculaire et d'un enfant atteint d'une maladie respiratoire aigüe. A Rio de Janeiro, la population étudiée était composée d'enfants de 0 à 5 ans vivant dans les quartiers pauvres. Entre 1979 et 1985, 134 adénovirus ont été isolés, 5 % d'entre eux appartenant au sérotype 4.

Les données concernant les 7 souches d'Ad4 pour lesquelles nous avons pu déterminer le type génomique figurent dans le tableau R6. Toutes les souches ont été caractérisées comme étant de l'Ad4a. Ce type génomique est donc capable de provoquer des fièvres pharyngoconjonctivales, des maladies oculaires et des maladies respiratoires, ce dernier type de mal pouvant être associé à une diarrhée.

Chez l'Ad4, trois types génomiques avaient été caractérisés et nommés Ad4p, Ad4a (WADELL et al., 1980) et Ad4b (BAILEY et RICHMOND, 1986). Au cours de cette étude, nous n'avons rencontré ni Ad4 prototype (Ad4p), ni Ad4b. En revanche, une opportunité nous était offerte d'approfondir la connaissance du génome de l'Ad4a. C'est ce que nous avons fait, notamment par comparaison avec le génome de l'Ad4p. Nous avons ainsi digéré les ADN d'Ad4p et d'Ad4a avec les enzymes de restriction suivantes : BamHI, BclI, BglII, BstEII, ClaI, EcoRI, HindIII, HpaI, MluI, PstI, SalI, SmaI, et XbaI. Les profils de restriction des deux types ont été comparés. Sur un total de 87 fragments de restriction pour l'Ad4p et de 80 pour l'Ad4a, 42 fragments comigraient, ce qui donne un pourcentage de comigration de  $2 \times 42 / 87 + 80 = 50 \%$ . Les cartes de restriction d'Ad4p avaient été publiées avec un certain nombre d'endonucléases (KITCHINGMAN, 1982 ; TOKUNAGA et al., 1982). Nous avons déterminé les positions des sites de clivage par les endonucléases de

TABLEAU R6. TYPAGE GENOMIQUE DE SOUCHES D'Ad4 ISOLEES A RIO DE JANEIRO ET A BELEM ENTRE 1977 ET 1986 (HORS EPIDEMIE).

Isolement		Age du patient	Symptomes	Type génomique
Lieu	Date			
Rio de Janeiro	1980	3 ans	FPC	Ad4a
Rio de Janeiro	1981	2 ans	MR + Diarrhée	Ad4a
Rio de Janeiro	1982	6 mois	MR	Ad4a
Rio de Janeiro	1983	10 mois	MR	Ad4a
Bélem	1985	3 ans	MR	Ad4a
Bélem	1985	49 ans	MO	Ad4a
Bélem	1986	25 ans	MO	Ad4a

FPC : Fièvre pharyngoconjonctivale

MR : Maladie respiratoire

MO : Maladie oculaire

### Ad4a / Ad4p

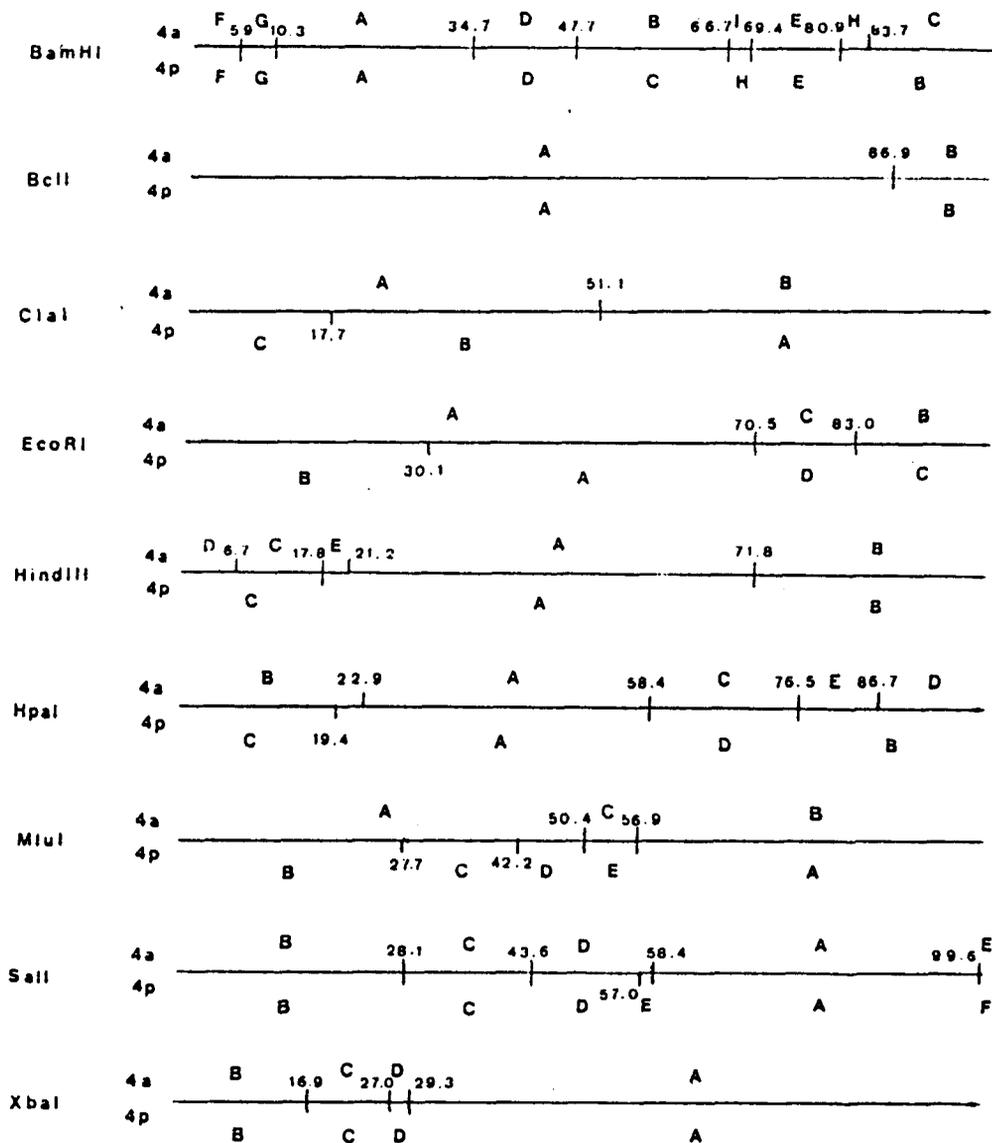


Fig. R11. Cartes de restriction de l' Ad4p et de l'Ad4a avec les endonucléases BamHI, BclI, ClaI, EcoRI, HindIII, HpaI, MluI, Sall et XbaI.  
 Les cartes de l'Ad4p sont reprises des travaux de TOKUNAGA et coll. (1982) pour les enzymes BamHI, BclI, EcoRI et XbaI et de ceux de KITCHINGMAN (1982) pour les enzymes HindIII, HpaI et Sall.

restriction ClaI et MluI sur l'ADN d'Ad4p et construit les cartes de restriction d'Ad4a avec 9 enzymes (Figure R11). Sept cartes de restriction sont différentes d'un type génomique à l'autre et onze sites de restriction ne sont pas communs. Contrairement aux autres sérotypes pour lesquels nous avons construit des cartes de restriction (voir Résultats, chapitre I), nous n'avons pas trouvé de région du génome à variabilité particulièrement grande (proportion de sites uniques plus élevée).

#### IV. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION RAPIDE DES ADENOVIRUS FASTIDIEUX, SEROTYPES 40 ET 41, DANS LES FECES

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les adénovirus peuvent provoquer des maladies respiratoires et oculaires. Cependant, c'est au niveau intestinal que l'action pathogène de l'adénovirus est la plus redoutable. En effet, ce virus continue aujourd'hui de provoquer un nombre énorme de gastroentérites infantiles. Dans le tiers-monde, son action se conjugue à une alimentation insuffisante et à de mauvaises conditions d'hygiène et c'est là que sont recensés les cas les plus graves pouvant aller, dans un trop grand nombre de cas, jusqu'au décès de l'enfant. Parmi les 47 sérotypes connus à ce jour, deux d'entre eux, Ad40 et Ad41, ont été décrits comme responsables de la grande majorité des cas de gastroentérites à adénovirus (BRANDT et al., 1985). Ces deux sérotypes, bien que retrouvés souvent en quantité très importante dans les fèces de jeunes enfants, présentent des difficultés de croissance sur cultures cellulaires conventionnelles et ont pour cela été appelés fastidieux.

La méthode de diagnostic actuellement utilisée pour l'adénovirus nécessite la croissance de ce virus sur culture cellulaire. C'est donc une méthode très lente qui ne donne des résultats qu'après plusieurs jours, voire plusieurs semaines. Nous nous sommes attachés à mettre au point une technique pouvant être utilisée dans le diagnostic des gastroentérites à adénovirus. Cette technique devait répondre aux 3 critères suivants :

- 1) Etre rapide
- 2) Etre utilisable dans des laboratoires d'analyses médicales ou de surveillance épidémiologique

- 3) Pouvoir différencier les adénovirus fastidieux, agents pathogènes importants, des adénovirus non fastidieux pouvant exister dans les fèces sans être l'agent pathogène (voir Résultats, chapitre II).

La technique que nous avons mise au point répond à ces trois critères. Elle est rapide car les adénovirus contenus dans les fèces sont extraits directement, sans culture, ce qui permet de gagner un temps considérable. Leur présence est ensuite détectée par mise en évidence de l'ADN viral par hybridation moléculaire. La sonde utilisée est une sonde que nous avons construite et qui reconnaît spécifiquement les adénovirus fastidieux. Cette sonde n'est pas marquée de manière radioactive, il n'est donc pas nécessaire d'utiliser des nucléotides marqués au  $^{32}\text{P}$  qui sont coûteux, dont il faut se protéger et dont la demi-vie, très courte, nécessite un constant renouvellement, leur emploi étant par là même exclu, au moins pour le moment, de la plupart des laboratoires d'analyses médicales.

#### Construction de la sonde

Notre but était l'obtention d'une sonde reconnaissant spécifiquement les adénovirus fastidieux. Nous avons digéré l'ADN d'Ad41 avec les endonucléases de restriction BamHI et EcoRI. Le mélange de fragments de restriction obtenus a été cloné dans le plasmide vecteur pBR322, préalablement coupé par les mêmes enzymes. Trois plasmides recombinants dont la taille était supérieure à celle du pBR322 ont été sélectionnés. Les tailles des inserts de ces plasmides, déterminées par comparaison avec des ADN standards de poids moléculaires connus étaient approximativement de 3500, 1000 et 800 paires de bases. Ces plasmides ont été digérés avec EcoRI et BamHI, soumis à électrophorèse, transférés

sur des filtres de nitrocellulose et hybridés contre de l'ADN d'Ad2 et d'Ad41. Avec la sonde Ad41, une bande d'hybridation était détectée pour chacun des trois clones. Cependant, le plus petit clone n'hybridait pas avec la sonde Ad2. Nous avons alors utilisé ce clone, numéro 41-27, comme sonde.

#### Marquage non radioactif et caractérisation de la sonde

En vue d'une éventuelle utilisation de la technique ici mise au point par des utilisateurs extérieurs à la recherche scientifique (laboratoires d'analyses médicales, notamment du tiers-monde où le problème des gastroentérites infantiles se pose avec le plus d'acuité), nous avons choisi d'utiliser notre sonde en la marquant de manière non radioactive, ce qui permet d'éviter les inconvénients de l'utilisation des radioisotopes : perte très rapide du marquage dans le temps, notamment pour les molécules marquées au  $^{32}\text{P}$ , d'où nécessité d'un constant réapprovisionnement et donc élévation considérable des coûts, danger potentiel dû aux rayonnements ionisants, notamment pour un personnel étant appelé à utiliser la technique d'une manière routinière, donc sur de très longues périodes.

Le marquage de la sonde, les hybridations moléculaires et la visualisation enzymatique des hybridations ont été réalisés suivant la méthode colorimétrique à la peroxydase de RENZ et KURZ (1984) décrite dans "Matériels et Méthodes". Il est à noter que cette méthode présente un avantage supplémentaire par rapport aux techniques utilisant de l'ADN marqué au  $^{32}\text{P}$  dans le cas décrit ci-après. Lorsque deux bandes proches l'une de l'autre hybrident avec la sonde, l'une donnant un signal très fort, et l'autre un signal faible, il est parfois impossible en utilisant l'autoradiographie de visualiser les deux bandes. Si on

laisse le filtre peu de temps en autoradiographie, les bandes mineures n'apparaissent pas et si on le laisse longtemps la bande à fort signal se transforme en tache et masque la présence de la bande mineure voisine. Avec la méthode à la peroxydase, les deux bandes apparaissent, bien visibles.

En vue de vérifier sa spécificité envers les adénovirus fastidieux, notre clone 41-27, marqué à la peroxydase, a été hybridé avec des ADN digérés par BamHI d'Ad12, Ad7, Ad2, Ad15 et Ad4 (représentants respectifs des groupes A à E, adénovirus non fastidieux) et Ad40 et Ad41, du sous-groupe F. Un signal d'hybridation avec ce clone était obtenu uniquement avec les ADN des sérotypes 40 et 41. La figure R12 représente un exemple d'hybridation du clone 41-27 avec les ADN d'Ad2, Ad7, Ad40 et Ad41 clivés par différentes endonucléases de restriction. On peut observer un signal d'hybridation dans toutes les pistes contenant de l'ADN d'Ad40 ou d'Ad41. En revanche, aucune hybridation n'était observée dans les pistes contenant de l'ADN d'adénovirus non fastidieux, ce qui montre la spécificité du clone 41-27 pour les adénovirus fastidieux. La sonde a également été hybridée contre elle-même comme contrôle (Fig. R12A, ligne 12). Une hybridation était d'autre part constatée avec les sérotypes et fragments de restriction suivants (voir pistes correspondantes de la figure R12B) : Ad40 BamHI-D (piste 4), Ad41 BamHI-B (piste 5), Ad41 EcoRI-E (piste 7), Ad41 SalI-B (piste 9), Ad41 HindIII-B (piste 10) et Ad41 ClaI-D (piste 11). D'après les cartes de restriction des Ad40 et Ad41 précédemment publiées (TAKIFF et al., 1984 ; ALLARD et al., 1985 ; VAN LOON et al., 1985), tous ces fragments de restriction sont situés dans l'extrémité gauche du génome. Or, cette extrémité ne contient qu'un seul site EcoRI situé à 7,6 unités génome. Le fragment de restriction cloné dans le plasmide

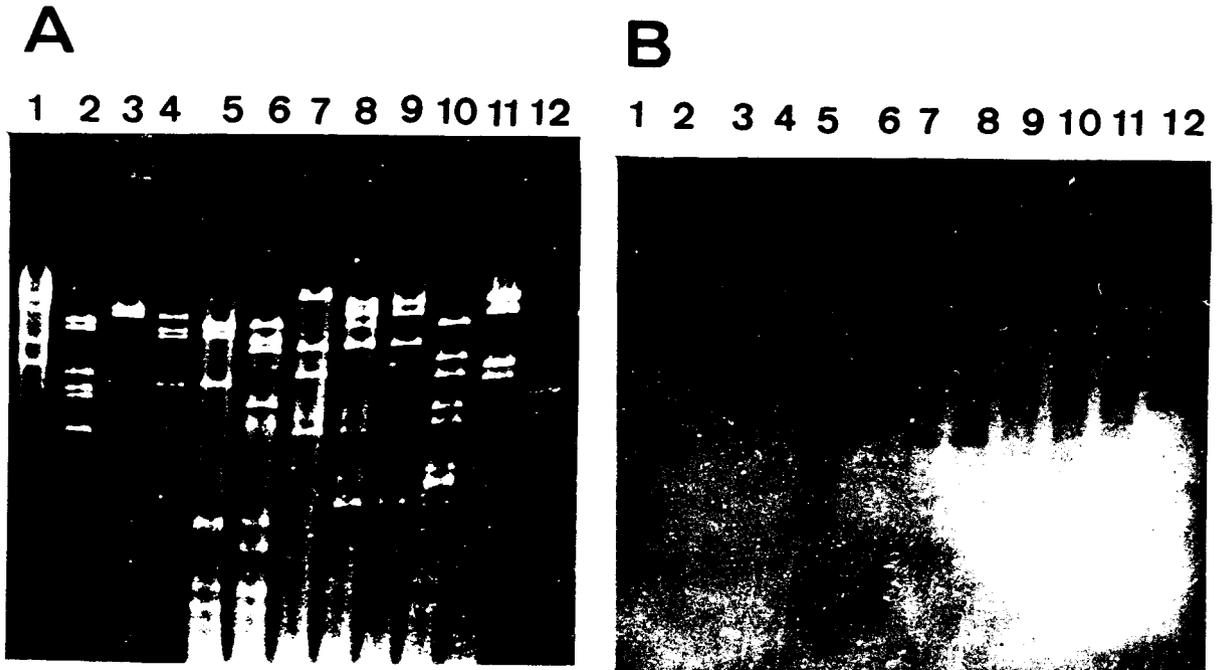


Fig. R12. A. Electrophorèse en gel d'agarose des ADN d'Ad2, Ad7, Ad40 et Ad41 digérés avec plusieurs endonucléases de restriction.

B. Hybridation des mêmes ADN avec la sonde 41-27 non radioactive.

Pistes : 1. Ad2, BamHI. 2. Ad7, BamHI. 3. Adénovirus de fèces non typé, BamHI. 4. Ad40, BamHI. 5. Ad41, BamHI. 6. Ad41, BamHI + EcoRI. 7. Ad41, EcoRI. 8. Ad41, EcoRI + SalI. 9. Ad41, SalI. 10. Ad41, HindIII. 11. Ad41, ClaI. 12. Clone 41-27 non digéré.

41-27 contient environ 800 paires de bases (2,2 unités génome) et par consultation des cartes de restriction de l'Ad41, on en déduit que le fragment EcoRI - BamHI cloné s'étend de 5,4 à 7,6 unités génome, région du génome entièrement incluse dans l'unité de transcription précoce E1B de l'Ad41 s'étendant de 4,5 à 11 unités génome. Une forte hybridation de la sonde avec le fragment de restriction EcoRI - BamHI de bas poids moléculaire de l'Ad41 correspondant à l'insert de la sonde plasmidique peut être observée sur la Fig. R12B, piste 6. Les deux bandes d'hybridation que l'on peut voir sur la piste 8 de la Fig. R12B sont le résultat d'une digestion incomplète de l'ADN d'Ad41 par EcoRI et SalI.

#### Extraction de l'ADN viral à partir de fèces

Les échantillons fécaux que nous avons utilisés avaient été collectés entre 1981 et 1985 et provenaient d'enfants de moins de 5 ans se trouvant alors sous traitement pour gastroentérite aiguë dans la ville de Rio de Janeiro. Ces échantillons avaient été caractérisés au préalable comme contenant des adénovirus, ceci par immunomicroscopie électronique et ELISA (LEITE et al., 1985). La technique que nous avons mise au point permettant l'extraction directe de l'ADN du virus à partir des matières fécales est décrite dans le détail dans la partie MATERIELS ET METHODES. Rappelons simplement que le virus est extrait des fèces au Fréon, purifié par ultracentrifugation, et que l'ADN viral est extrait de ces virus purifiés.

#### Analyse des ADN viraux extraits de fèces

L'ADN viral était digéré par l'enzyme de restriction BamHI et divisé en deux parties égales qui étaient toutes deux soumises à électrophorèse sur 2 gels différents. Après électrophorèse (la Figure R13A montre un

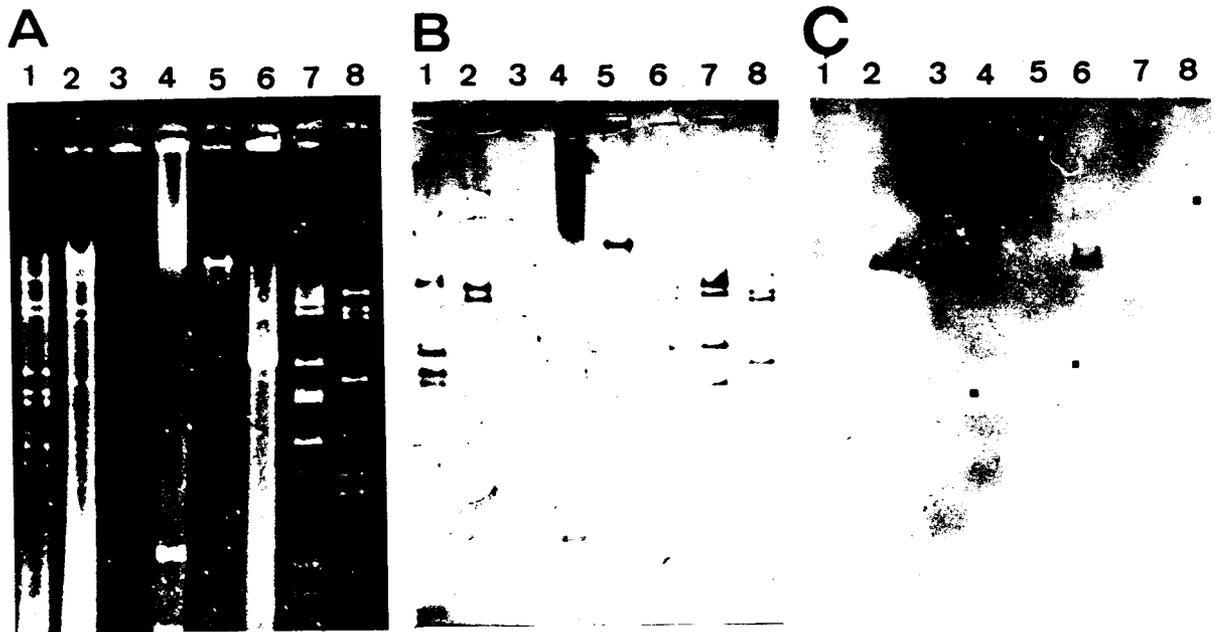


Fig. R13. Electrophorèse en gel d'agarose (A) et hybridation avec les sondes non radioactives, ADN viral d'Ad2 (B) et clone 41-27 (C), des ADN d'adénovirus extraits directement de fèces.  
Pistes : 1. Ad7 contrôle, BamHI. 2. Ad41 contrôle, BamHI. 3 à 8. ADN extraits de fèces, BamHI.

exemple), les ADN étaient transférés sur une membrane de nitrocellulose et hybridés contre l'ADN entier d'Ad2 (Fig. R13B) et contre le clone 41-27 (Fig. R13C), tous deux marqués de manière non radioactive. Nous avons pu typer un certain nombre d'échantillons par analyse de restriction, notamment des échantillons d'Ad7 et d'Ad40 (Fig. R13A, pistes 7 et 8). L'hybridation avec la sonde ADN génomique d'Ad2 nous permettait de savoir si l'ADN des échantillons était bien de l'ADN d'adénovirus. Sur la piste 6 de la Figure R13A, on peut voir que la bande principale n'hybride avec aucune des deux sondes, il s'agit donc d'un ADN d'une autre origine que l'adénovirus. Nous avons digéré cet ADN d'environ 5 000 paires de bases avec plusieurs enzymes de restriction. Cet ADN ne possède pas de site BamHI, HindIII et SmaI mais plusieurs sites TaqI. L'échantillon de fèces correspondant examiné au microscope électronique nous a révélé la présence d'adénovirus et de virus associé à l'adénovirus (AAV).

La technique d'hybridation à la peroxydase s'est révélée très sensible. Elle nous a permis de détecter des quantités d'ADN très faibles, de l'ordre de 10 pg. Sur la piste 3 de la figure R13 par exemple, on peut voir que bien qu'aucune bande n'apparaisse après coloration avec le bromure d'éthidium ni après hybridation avec la sonde 41-27, au moins trois bandes hybridaient avec l'ADN d'Ad2 total (Fig R13B). La quantité et la pureté des ADN extraits des fèces étaient très variables d'un échantillon à l'autre. L'hybridation avec le clone 41-27 nous a permis de faire la distinction entre adénovirus fastidieux et adénovirus non fastidieux notamment dans les échantillons dans lesquels l'ADN était dégradé ou présent en petites quantités. L'hybridation avec cette sonde nous a révélé la présence d'ADN provenant d'adénovirus fastidieux (Fig. R13C, pistes 4, 5, 6 et 8). Les autres ADN pour

lesquels aucune hybridation avec le clone 41-27 n'était notée (Fig. R13C, pistes 3 et 7), provenaient d'adénovirus non fastidieux.

Les résultats obtenus par combinaison de l'analyse de restriction et des techniques d'hybridation sont résumés dans le tableau R7. Dix échantillons contenaient des adénovirus non fastidieux, deux d'entre eux appartenant au sous-groupe B et deux au sous-groupe C. Pour ces deux derniers il s'agissait du type 2 ou du type 6 mais nous n'avons pas pu différencier entre ces deux types car leur profil de restriction avec l'enzyme BamHI est le même. Quatre échantillons appartenaient au sérotype 40, tous les quatre présentant un profil BamHI identique à celui de la souche HoviX (KIDD et al., 1984). De la même manière étaient mis en évidence deux échantillons d'Ad41 présentant le même profil de restriction que la souche 1105 (TAKIFF et al., 1985). L'Ad41 provenant de l'échantillon contenant le virus associé à l'adénovirus (AAV) présentait le même profil BamHI que la souche Tak. On peut constater que sur 19 souches, 9 appartiennent au sous-groupe F, soit 47%, pourcentage inférieur à celui de 80% calculé par BRANDT et al. (1985). Toutefois, le nombre de souches analysées dans notre cas est trop faible pour que notre chiffre puisse avoir une réelle valeur statistique.

TABLEAU R7. ADENOVIRUS PROVENANT DE FECES IDENTIFIES PAR LA METHODE DE DETECTION RAPIDE

Sous-groupe (sérotypage)	Nombre d'échantillons	Quantité d'ADN viral (ng/g de fèces) (a)
<b>Adénovirus non fastidieux</b>		
B (3 ou 7)	2	300
C (2 ou 6)	2	60, 150
Inconnu (inconnu) (b)	6	1-50
<b>Adénovirus fastidieux</b>		
F (40, souche HoviX)	4	150-800
F (41, souche 1105)	2	10, 1 000
F (41, souche Tak) + AAV	1	20 (Ad), 80 (AAV)
F (inconnu)	2	10, 50

AAV : Virus associé à l'adénovirus

(a) : Quantité d'ADN viral estimée, après électrophorèse en gel d'agarose et illumination sous ultra-violet, par comparaison avec des contrôles contenant une quantité connue d'ADN.

(b) : Adénovirus non typé

V. RECHERCHE D'UNE LIGNEE CELLULAIRE PERMISSIVE AUX ADENOVIRUS  
FASTIDIEUX

Les adénovirus fastidieux, outre leur importance en tant qu'agents pathogènes, constituent un phénomène intéressant du strict point de vue fondamental. En effet, bien qu'on les retrouve parfois en quantité très importante dans les fèces, ce qui a d'ailleurs permis leur découverte en microscopie électronique, ils présentent la caractéristique de ne pas pouvoir se multiplier de manière satisfaisante dans les lignées cellulaires conventionnelles permissives aux autres adénovirus, KB, HeLa, HEK, WI-38, etc. Ceci néanmoins ne peut être généralisé à toutes les souches d'adénovirus 40 et 41 car récemment PERRON-HENRY et al. (1988) ont isolé un certain nombre de souches pouvant se multiplier sur la lignée cellulaire HEp-2.

Une fonction, permettant normalement la croissance chez ces cellules conventionnelles, serait absente chez les Ad40 et Ad41 prototypes. On peut émettre l'hypothèse selon laquelle cette fonction serait présente dans les entérocytes du jeune enfant où les adénovirus fastidieux se multiplient remarquablement bien. Au cours de l'évolution, ces virus se seraient spécialisés dans l'infection de ce type de cellules et auraient perdu cette fonction indispensable à leur réplication dans d'autres types cellulaires.

D'autre part, un certain nombre d'auteurs ont observé que l'Ad41 pouvait être propagé de manière satisfaisante dans la lignée cellulaire 293 qui est une lignée provenant de cellules embryonnaires de rein humain transformées par des fragments d'ADN d'Ad5. Cette lignée exprime les oncogènes E1A et E1B d'Ad5 (GRAHAM et al., 1977). L'hypothèse a donc été émise selon laquelle les produits de ces gènes synthétisés dans

cette lignée pourraient compléter la fonction déficiente des adénovirus fastidieux. Toutefois, l'Ad40 ne présente qu'une croissance faible sur la lignée 293, ce qui ne permet pas l'obtention de stocks suffisants pour l'étude approfondie de ce virus. Récemment, la séquence nucléotidique des oncogènes E1A et E1B des Ad40 et Ad41 a été déterminée (ALLARD et WADELL, 1988 ; ISHINO et al., 1988 ; VAN LOON et al., 1987) mais ceci n'a pas permis d'identifier la cause de l'absence de multiplication virale sur lignées cellulaires conventionnelles.

Désireux de réaliser des études de biologie moléculaire sur ces virus et de déterminer avec précision quelle est la fonction qui leur manque, nous nous sommes fixés pour premier objectif la recherche d'une lignée cellulaire totalement permissive à ces virus, afin de pouvoir en obtenir de grandes quantités en laboratoire.

Pour cette étude, nous avons utilisé six lignées cellulaires humaines. La lignée HEp-2 a été employée comme contrôle négatif et la lignée 293 a servi de contrôle positif, mais seulement pour l'Ad41 car, comme nous l'avons vu ci-dessus, elle n'est pas très permissive à l'Ad40. Les lignées KB8, KB16 et KB18 ont été choisies par analogie avec les cellules 293 : ce sont des cellules de type KB qui ont intégré et expriment un ou les deux oncogènes de l'Ad2. KB8 exprime E1A, KB16 exprime E1A + E1B et KB18 exprime E1B. Enfin nous avons choisi la lignée HRT18, qui provient d'un carcinome du rectum, car elle avait été décrite comme étant permissive aux coronavirus bovins fastidieux (LAPORTE et al., 1980). Ces lignées cellulaires ont été infectées avec les prototypes Ad40 (souche Dugan) et Ad41 (souche Tak). La mesure de la croissance a été faite de la manière suivante. Les cellules ont été infectées avec un même volume d'inoculum viral et trois passages consécutifs ont été effectués. Chaque passage avait une durée maximale

de 7 jours mais était interrompu auparavant dès qu'un effet cytopathique total était observé. Après le troisième passage, nous avons mesuré par ELISA le taux d'antigènes d'adénovirus dans les cultures. Les résultats figurent dans le tableau R8.

Dans les lignées cellulaires HEp-2, KB8 et KB16, les taux d'antigènes étaient très faibles, ce qui indique que les deux virus ne s'y multipliaient pratiquement pas. Ces taux étaient plus forts pour la lignée KB18, celle qui exprime la région E1B d'Ad2. Dans les cellules 293, l'Ad41 se multipliait très bien, mais l'Ad40 ne présentait pas un taux très élevé d'antigènes. Quant à la lignée HRT18, l'Ad40 y produisait un taux relativement élevé d'antigènes mais pas l'Ad41.

Pour confirmer la sensibilité des cellules HRT18 à l'Ad40, nous avons continué à passer ce virus sur cette lignée. Nous avons alors observé une augmentation continue du taux d'antigènes. Au 7ème passage, le résultat en ELISA restait positif jusqu'à la dilution 1/640. Après le 10ème passage, nous avons purifié le virus à partir de 10 flacons de 175 cm<sup>2</sup> de surface et obtenu une bande visible après centrifugation en gradient de chlorure de césium à une densité apparente de 1,34.

Nous avons alors infecté des cellules HRT18, HeLa, KB8, KB16 et KB18 avec le virus purifié, extrait l'ADN viral et digéré celui-ci avec l'enzyme de restriction BamHI. Un profil d'Ad40 était alors observé sur toutes les pistes (Fig. R14). Ceci constituait bien sûr une vérification de l'identité du virus obtenu mais signifiait également que la synthèse d'ADN avait lieu, au moins au premier passage, dans toutes ces lignées cellulaires.

TABLEAU R8. DETECTION PAR ELISA DES ANTIGENES D'Ad40 ET Ad41 EN CULTURE APRES LE TROISIEME PASSAGE DANS DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES

Sérotype	Inverse de la plus haute dilution ELISA-positive (a)					
	HEp-2	KB8	KB16	KB18	HRT18	293
Ad40	20	10	20	160	160	80
Ad41	10	10	20	80	10	1280

(a) Exemple : Le nombre 10 signifie que la dilution 1/10 donne un résultat positif et que la dilution 1/20 donne un résultat négatif

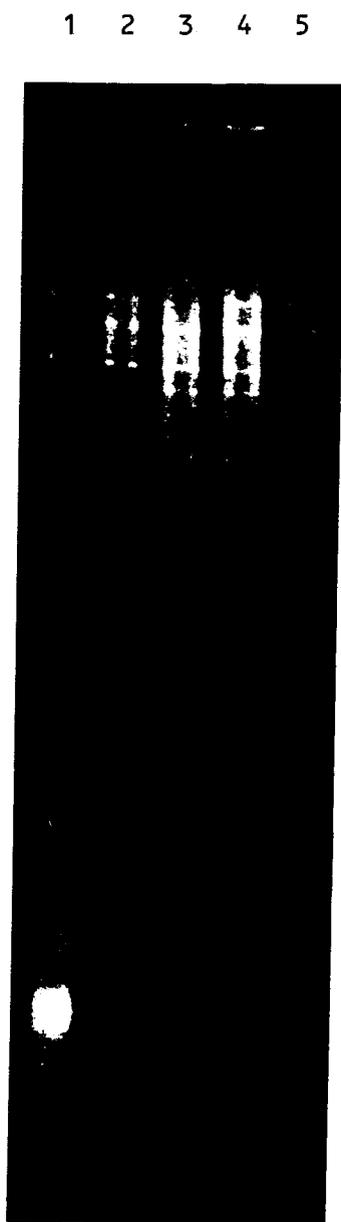


Fig. R14. Profils de restriction avec l'endonucléase BamHI de l'Ad40 cultivé dans différentes lignées cellulaires.

Pistes : 1. KB8. 2. KB18. 3. HRT18. 4. KB16. 5. HeLa.

La bande de plus haut poids moléculaire résulte de la digestion partielle de l'ADN.

# DISCUSSION

Lorsqu'on isole une souche d'adénovirus humain, les deux moyens les plus performants dont on dispose actuellement pour la caractériser sont la séroneutralisation et l'analyse de restriction.

La séroneutralisation est une méthode rapide et d'une technologie facile à mettre en oeuvre. Elle possède néanmoins deux inconvénients de taille :

- elle nécessite une très grande variété de sérums. En effet, le nombre de sérotypes d'adénovirus humains actuellement connus est de 47, ce nombre n'a fait qu'augmenter au cours des dernières années et l'on peut penser qu'il augmentera encore. Ce qui veut dire qu'il faudra bientôt, pour séroneutraliser une souche nouvellement isolée, la faire réagir contre plus de 50 sérums différents, ce qui est un nombre considérable. De nombreux laboratoires effectuent la séroneutralisation en n'utilisant que les sérums dirigés contre les sérotypes 1 à 7, les plus répandus dans la nature, mais ceci ne peut évidemment donner naissance qu'à de nombreuses erreurs dans l'identification des souches.

- le deuxième inconvénient de la séroneutralisation est que toutes les souches ne sont pas typables par ce procédé. Il a ainsi été isolé, notamment dans les sous-groupes B et D, des souches intermédiaires ne pouvant être classés dans aucun sérotype (ADRIAN et al., 1985a, 1987a, 1987c ; ADRIAN et WIGAND, 1986 ; HIERHOLZER et al., 1988a ; WIGAND et ADRIAN, 1989).

FIFE et al. (1985b), comparant les techniques de séroneutralisation et d'analyse de restriction pour le typage des souches, ont montré que l'analyse de restriction donnait généralement des résultats plus satisfaisants.

Au vu de nos résultats, nous pouvons dire que l'analyse de restriction possède un grand avantage, c'est qu'en digérant l'ADN d'une souche avec une seule endonucléase de restriction, BamHI dans notre cas, il est possible de déterminer le sous-groupe auquel appartient cette souche. Cependant, lorsque les profils de restriction de la souche considérée sont trop éloignés de ceux de la souche prototype, il n'est pas possible avec cette méthode de déterminer le type. Ainsi nous n'avons pas pu déterminer le type de la souche 208, même après examen d'un nombre élevé de profils de restriction (18), ceci n'ayant pu être obtenu que par séroneutralisation.

Mais plus grave encore que de ne pouvoir typer une souche serait lui attribuer un sérotype qui n'est pas le sien. C'est pourtant le risque auquel on s'expose en ne procédant à l'analyse que d'un seul profil de restriction. Ainsi les types génomiques Ad5a1 et Ad5a2 présentent un profil de restriction avec BamHI identique à celui de l'Ad2p et différent de celui de l'Ad5p, ce qui aurait pu conduire à une erreur d'identification.

Aucune des deux techniques, séroneutralisation et analyse de restriction, n'apparaît donc sans défaut et c'est pourquoi il nous paraît indispensable de les utiliser toutes deux pour toute caractérisation sûre d'adénovirus humain.

Cette dernière manière de procéder nous a permis d'isoler des types génomiques d'adénovirus jusqu'alors inconnus. Ceux-ci ont été détectés dans des fèces d'enfants pris au hasard dans une population à très bas niveau de vie de la ville de Sao Paulo, Brésil.

Des adénovirus avaient été détectés dans des fèces d'enfants n'ayant pas de diarrhée (BRANDT et al., 1979) et sont communément isolés chez

des individus bien portants (BRANDT et al., 1969, 1972 ; FOX et al., 1969). Dans une étude à grande échelle portant sur 25 600 enfants britanniques sains âgés de moins de 5 ans, GALBRAITH (1965) a trouvé que 0,5% des enfants excrétaient des adénovirus, parmi ceux-ci 78% appartenaient au sous-groupe C. Le pourcentage d'enfants infectés déclinait très vite avec l'âge, de 0,9% pour les enfants de moins de 1 an à 0,2% pour les enfants de 4 ans.

La population sur laquelle nous avons travaillé ne comprenait que des enfants n'ayant pas atteint l'âge de 18 mois. Un total de 100 enfants ont été suivis de la naissance jusqu'à 18 mois et 1345 échantillons de fèces ont été collectés à partir d'enfants bien portants et malades. Nous avons retrouvé des antigènes d'adénovirus dans 53 échantillons, soit 3,9% et 35 enfants (35%) ont, au moins une fois pendant ces 18 mois, excrété des antigènes d'adénovirus.

La détection de ces antigènes ayant été faite par la méthode ELISA qui n'est pas une méthode d'une grande sensibilité, on peut penser que les taux d'adénovirus présents dans les échantillons de fèces positifs sont assez importants. Cependant, nous n'avons réussi à cultiver que 43% de ces adénovirus. Il est possible que ceci soit dû à une perte de l'infectivité survenue durant le stockage des souches plusieurs années à -20°C.

Aucun Ad40 ou Ad41 n'a été isolé après culture cellulaire. Il est donc possible qu'aucun enfant n'ait été contaminé par un de ces sérotypes pendant la période considérée. A ce sujet, remarquons qu'aucune épidémie de gastroentérite n'a frappé la communauté étudiée pendant les 18 mois où ont été effectués les prélèvements. Notons aussi le petit nombre d'enfants souffrant de diarrhée (5) parmi ceux qui ont excrété des adénovirus.

Nous avons détecté chez ces enfants la présence d'adénovirus des sous-groupes A, B, C et D. Parmi les 16 souches caractérisées, 14 appartenaient à un type génomique inconnu jusqu'alors. Cette proportion surprenante car très élevée peut s'expliquer en partie par le fait que la recherche de types génomiques a été essentiellement menée jusqu'à présent en Amérique du Nord, en Europe ou au Japon et que presque rien n'a encore été fait en ce domaine en Amérique Latine. Ceci confirme en tout cas la grande variabilité génétique de ces virus.

Au cours des dernières années, des types génomiques ont été mis en évidence pour un certain nombre de sérotypes (Tableau D1).

Au cours de notre travail effectué sur les échantillons de Sao Paulo, quatre nouveaux types génomiques ont été caractérisés que nous avons nommés Ad1d, Ad3e1, Ad5a1 et Ad5a2 suivant la nomenclature de LI et WADELL (1986). Nous avons attribué le type génomique Ad3e1 aux quatre souches d'Ad3 isolées car elles présentaient un profil de restriction avec BamHI identique à celui de l'Ad3e préalablement identifié. Toutefois, une analyse plus fine, employant notamment l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, nous a permis de séparer ces quatre souches en deux sous-ensembles de deux souches chacun. Dans l'un des deux sous-ensembles, on trouve deux souches isolées chez le même enfant, à 4 mois d'intervalle. Lors du premier prélèvement, cet enfant n'était pas malade et lors du second, il souffrait de diarrhée. Dans ce cas, et comme pour les autres isolats, nous n'avons donc pas pu établir de relation entre type génomique et pathogénicité.

Plusieurs études épidémiologiques ont montré une hétérogénéité considérable à l'intérieur d'un même sérotype (ADRIAN et al., 1985b ; BAILEY et RICHMOND, 1986 ; O'DONNELL et al., 1986). D'autre part, d'autres études ont révélé une homogénéité génétique (ADRIAN et al.,

TABLEAU D1. SEROTYPES D'ADENOVIRUS HUMAINS POUR LESQUELS DIFFERENTS TYPES GENOMIQUES ONT ETE MIS EN EVIDENCE CES DERNIERES ANNEES

Sous-groupe	Sérotype	Auteurs	Année		
A	Ad31	ADRIAN <u>et al.</u> , ADRIAN <u>et WIGAND</u> , HAMMOND <u>et al.</u> ,	1987b 1989a 1985		
B	Ad3	ADRIAN <u>et al.</u> , BRUMMITT <u>et CHERRINGTON</u> , GUO <u>et al.</u> , LI <u>et WADELL</u> , O'DONNELL <u>et al.</u> ,	1989 1988 1988a ; 1988b 1988a 1986		
		Ad7	WADELL, LI <u>et WADELL</u> , KANNEMEYER <u>et al.</u> ,	1984 1986 1988	
			Ad11	WADELL, WADELL <u>et al.</u> ,	1984 1985
				Ad21	ADRIAN <u>et al.</u> , VAN DER AVOORT <u>et al.</u> ,
		C	Ad1	FIFE <u>et al.</u> ,	1985a
	Ad2		AIRD <u>et al.</u> , HAMMOND <u>et al.</u> ,	1983 1985	
			Ad5	Mc FARLANE <u>et al.</u> , BRUCKOVA <u>et al.</u> ,	1986 1980
	Ad6		WADELL, ADRIAN <u>et al.</u> ,	1984 1985b	
			D	Ad8	FUJII <u>et al.</u> , KEMP <u>et HIERHOLZER</u> ,
	Ad19			MENG <u>et al.</u> , NODA <u>et al.</u> ,	1986 1988
Ad37		WADELL <u>et DE JONG</u> , MENG <u>et al.</u> , NODA <u>et al.</u> ,		1980 1986 1988	
	E	Ad4		LI <u>et WADELL</u> , REN <u>et al.</u> , WADELL,	1988b 1985 1984
				F	Ad40
Ad41			SHINOZAKI <u>et al.</u> , VAN DER AVOORT <u>et al.</u> ,		
	Ad41	HAMMOND <u>et al.</u> , KIDD SHINOZAKI <u>et al.</u> , VAN DER AVOORT <u>et al.</u> ,	1985 1984 1988 1989		

1988 ; ARENS et DILWORTH, 1988). Dans notre étude, le nombre d'échantillons caractérisés est insuffisant pour évaluer avec précision le degré d'homogénéité d'un sérotype donné dans un environnement local.

En ce qui concerne notre travail réalisé sur des souches d'Ad4 isolées à Bélem et à Rio de Janeiro, la situation est un peu différente car il ne s'agissait plus d'isoler un nouveau type génomique mais de déterminer quels types génomiques d'Ad4 circulaient dans ces agglomérations et les maladies qu'ils provoquaient.

Les données de l'Organisation Mondiale de la Santé indiquent que l'Ad4 représente de 2% à 3% des adénovirus isolés dans le monde (SCHMITZ et al., 1983). Cependant, la plupart des isolements recensés ont été effectués en Amérique du Nord et en Europe, il y en a eu très peu en Amérique du Sud. Nos résultats montrent que l'Ad4 ne représente effectivement qu'un faible pourcentage des adénovirus isolés entre 1979 et 1985 dans l'agglomération de Rio de Janeiro, soit 4% des adénovirus chez les enfants atteints de maladies respiratoires. Il n'en est pas de même à Bélem, situé dans le nord du Brésil, à environ 3 000 km au nord de Rio de Janeiro et où l'incidence de l'Ad4 atteint 30% durant la période 1977-1986, ceci en ne considérant que des cas sporadiques, non liés aux épidémies. La majorité des souches d'Ad4 isolées dans la région de Bélem l'ont été à partir de patients souffrant de maladies oculaires. Quoique calculé sur un nombre relativement faible d'adénovirus isolés (43), ce chiffre de 30% semble indiquer que l'Ad4 est endémique dans la région de Bélem. Il se pourrait qu'une telle différence entre Rio de Janeiro et Bélem soit due à des facteurs climatiques, l'humidité et les températures moyennes annuelles étant supérieures à Bélem.

Trois types génomiques d'Ad4 avaient été décrits lorsque nous avons conclu nos travaux sur ce sérotype en 1988, Ad4p, Ad4a (WADELL et al., 1980) et Ad4b (BAILEY et RICHMOND, 1986). L'Ad4p a été associé à des maladies respiratoires aiguës, l'Ad4b a été récemment isolé de deux patients souffrant de conjonctivite folliculaire et d'un autre ayant une maladie respiratoire (BAILEY et RICHMOND, 1986). D'après WADELL (1984), l'Ad4a est le responsable d'épidémies de maladies oculaires survenues en Europe en 1974 (MUZZI et al., 1975) et aux Etats-Unis (FADEN et al., 1978).

Notre étude révèle que l'Ad4a était le responsable de l'épidémie de fièvre pharyngoconjonctivale survenue à Bélem en 1976 et qu'il est également cause de maladies respiratoires chez les enfants. Nos résultats sont en accord avec ceux de REN et al. (1985) qui ont montré qu'un certain type génomique d'Ad4 pouvait causer des maladies oculaires et respiratoires. Bien que ces auteurs ne mentionnent pas l'Ad4a dans leur publication, il est très probable que le type génomique en question est bien celui-là puisqu'il présente des profils de restriction avec les endonucléases EcoRI, HindIII et BamHI identiques à ceux de l'Ad4a. On peut déduire de ces observations que l'Ad4a ne se limite pas à provoquer des maladies oculaires même si jusqu'à présent toutes les souches d'Ad4 isolées dans des épidémies de maladies oculaires et étudiées par analyse de restriction se sont révélées être de l'Ad4a. Dans notre étude, nous n'avons isolé ni Ad4p, ni Ad4b. Une autre étude portant sur un nombre plus élevé d'échantillons serait nécessaire pour déterminer si ces types génomiques circulent également en Amérique du Sud.

Le pourcentage de fragments comigrant entre l'Ad4p et l'Ad4a, calculé sur 13 profils de restriction et 167 bandes, était de 50% Ceci confirme

les données de WADELL (1984) qui trouvait également 50% en utilisant 4 enzymes de restriction. Ce pourcentage est supérieur aux pourcentages existant entre l'Ad4p et les autres sérotypes d'adénovirus humains qui sont compris entre 4% et 15% (ADRIAN et al., 1986), mais il est comparable, en revanche, aux pourcentages existant entre 2 sérotypes du sous-groupe B (13% à 80%) ou du sous-groupe D (38% à 79%) et même inférieur aux pourcentages existant entre 2 sérotypes du sous-groupe C (59% à 77%). On peut donc affirmer que les types génomiques Ad4p et Ad4a sont séparés par une distance génétique relativement grande.

Les cartes de restriction de l'Ad4p avaient été établies pour 11 endonucléases de restriction (KITCHINGMAN, 1982 ; TOKUNAGA et al., 1982). Nous avons déterminé les positions des sites de coupure de 9 enzymes de restriction sur le génome de l'Ad4a. La comparaison des cartes de restriction de l'Ad4p et de l'Ad4a montre que seules 2 cartes sont identiques et que 11 sites de restriction ne sont pas communs aux 2 génomes.

Un autre aspect de notre travail consistait à mettre au point une méthode de détection rapide des adénovirus dans les fèces, et ceci dans un but diagnostique. Comme nous l'avons vu, la diarrhée infantile est un très vaste problème de santé publique, notamment dans les pays du Tiers-Monde, provoquant la mort de millions d'enfants chaque année. Lorsque l'agent causal est l'adénovirus, ce sont les sérotypes 40 et 41, dits fastidieux, qui sont principalement impliqués. Aussi nous sommes nous attachés à essayer de distinguer, dans les fèces des enfants atteints de diarrhée, ces adénovirus fastidieux des sérotypes non fastidieux, pouvant être excrétés sans pour autant avoir provoqué la gastroentérite.

Un plasmide recombinant contenant un fragment de restriction d'Ad41 a été sélectionné, marqué de manière non radioactive et hybridé contre l'ADN de souches appartenant à chacun des sous-groupes d'adénovirus humains, de A à F. Ce clone était capable d'hybrider avec les ADN des adénovirus fastidieux mais non avec ceux des adénovirus des autres sous-groupes. Nous avons localisé l'insert de ce plasmide entre 5,4 et 7,6 unités sur le génome de l'Ad41, dans une région correspondant à la région de transcription précoce E1B, plus précisément entre le site de coupure par l'enzyme EcoRI situé au nucléotide 2635 (d'après la séquence publiée postérieurement par VAN LOON et al., 1987) et un site BamHI localisé à une distance d'environ 800 paires de bases, qui serait probablement celui existant au nucléotide 1917, ou encore celui du nucléotide 1857 en cas de digestion partielle de l'enzyme BamHI avant clonage. L'absence d'hybridation dans cette région du génome entre l'Ad41 et les adénovirus non fastidieux confirme d'autres résultats montrant une absence d'hybridation entre l'Ad41 et l'Ad2 entre 2,8 et 10,9 unités génome (fragment SmaI E de l'Ad2, TAKIFF et al., 1985) et entre l'Ad41 et l'Ad5 entre 0 et 7,8 unités génome (fragment HindIII G de l'Ad5, VAN LOON et al., 1985). Une autre sonde plasmidique a été construite, dont l'insert s'étend de 1,5 à 3,3 unités génome, dans la partie 5' de la région E1A de l'Ad41 (ALLARD et al., 1985). Cette sonde est spécifique des adénovirus fastidieux mais révèle mieux l'Ad41 que l'Ad40. Notre sonde, en revanche, détecte aussi bien les deux sérotypes.

Nous avons en réalité utilisé une combinaison de l'analyse de restriction et de l'hybridation moléculaire pour la caractérisation des adénovirus contenus dans les fèces d'enfants atteints de gastroentérite aiguë. Notre méthode d'analyse de l'ADN extrait directement de fèces est une méthode rapide, pouvant être menée à bien en 12 h environ. Dans le

cas où un échantillon de fèces contient deux adénovirus différents, elle présente l'avantage de ne pas modifier les proportions de chacun d'eux comme peut le faire la culture des virus en vue de la séroneutralisation (BROWN, 1985 ; DELSERT et D'HALLUIN, 1984). Certains auteurs ont trouvé des taux très faibles d'adénovirus non fastidieux dans les fèces (BRANDT et al., 1984 ; KIDD et al., 1982) et certaines tentatives d'extraction de l'ADN de ces virus avaient échoué (BUITENWERF et al., 1985). Cependant, nous avons obtenu des quantités importantes d'ADN viral (60 à 300 ng/g de fèces) dans quatre échantillons contenant des adénovirus des sous-groupes B et C.

D'autre part, les quatre échantillons d'Ad40 mis en évidence dans notre étude présentaient tous le profil de restriction BamHI de la souche HoviX. Ce profil avait déjà été trouvé pour des souches isolées en Europe, en Afrique et en Amérique du Nord (KIDD et al., 1984). Le fait que nous retrouvions ce même profil en Amérique du Sud renforce l'idée que ce type génomique est largement répandu de par le monde.

Des sondes radioactives, marquées au  $^{32}\text{P}$  ont été utilisées par hybridation moléculaire ponctuelle (dot ou spot) pour la détection des adénovirus fastidieux (KIDD et al., 1985 ; STALHANDSKE et al., 1985 ; TAKIFF et al., 1985). Mais ces expériences, quoique satisfaisantes dans l'ensemble, peuvent produire des faux positifs ou des résultats équivoques (TAKIFF et al., 1985). L'hybridation avec des sondes non radioactives a été utilisée avec succès pour la détection d'un certain nombre de virus à ADN ou à ARN dans des échantillons biologiques ou dans des cultures de tissus (revue de PEREIRA, 1986). Des infections respiratoires induites par l'adénovirus ont été diagnostiquées par hybridation in situ (GOMES et al., 1985) et par hybridation ponctuelle (dot) avec des sondes biotinylées. Nos propres

essais d'utilisation de sondes biotinyllées ou de sondes marquées à la peroxydase par hybridation ponctuelle (dot) sont restés sans succès par manque de sensibilité et de spécificité. La combinaison analyse de restriction + hybridation après transfert que nous avons employée dans ce travail nous a permis d'utiliser une sonde non radioactive pour la détection et la caractérisation des adénovirus dans des infections entériques par un procédé relativement simple, économique et sûr pouvant être éventuellement reproduit dans des laboratoires d'analyses médicales disposant de ressources limitées.

# CONCLUSION

Au cours de ce travail nous avons isolé et caractérisé de nouveaux types génomiques d'adénovirus humains. L'identification de ces types génomiques présente deux intérêts majeurs :

- un type génomique peut servir de marqueur dans des études épidémiologiques

- il est intéressant de déterminer si à un type génomique est associée une pathologie particulière

Si dans l'étude menée à partir des échantillons isolés à Sao Paulo, nous n'avons pu mettre en évidence une relation entre type génomique et pathologie, en revanche nous avons clairement montré que le type génomique Ad4a était responsable de l'épidémie de fièvre pharyngoconjonctivale survenue à Bélem en 1976.

Par ailleurs, l'obtention d'un clone ADN recombinant capable d'hybrider avec les ADN des adénovirus entériques Ad40 et Ad41 et la mise au point d'une technique d'extraction et d'analyse directe des ADN d'adénovirus à partir de fèces nous ont permis de franchir une étape essentielle dans l'identification rapide chez le malade des adénovirus responsables de gastroentérites.

On sait que les deux sérotypes, Ad40 et Ad41, sont responsables de la majorité des cas de gastroentérites à adénovirus. Beaucoup de questions restent encore sans réponse à propos de ces adénovirus appelés fastidieux et d'abord pourquoi ces adénovirus sont-ils fastidieux, c'est-à-dire pourquoi sont-ils difficilement cultivables "in vitro" ?

Très récemment, MAUTNER et al. (1989) ont montré que l'Ad40 pouvait se répliquer dans des lignées cellulaires humaines exprimant la région

de transcription E1B de l'Ad2, qui est un des deux oncogènes de l'adénovirus. Ceci confirme nos propres observations. Ces auteurs ont de plus émis l'hypothèse selon laquelle une protéine de masse moléculaire 55 kDa codée par cet oncogène jouerait un rôle essentiel de complémentation pour la croissance de l'Ad40 dans ce type de lignées. Nos observations concernant la croissance de l'Ad40 sur la lignée intestinale humaine HRT18, non transformée par l'adénovirus, amènent à se poser la question de savoir si un oncogène équivalent à E1B (appartenant à la même classe d'oncogène que ras) ne s'exprimerait pas chez cette lignée, complétant ainsi la fonction manquante de l'Ad40.

# BIBLIOGRAPHIE

ADRIAN, T., BASTIAN, B., BENOIST, W., HIERHOLZER, J.C. & WIGAND, R. (1985a). Characterization of adenovirus 15/H9 intermediate strains. *Intervirology*, 23, 15-22.

ADRIAN, T., BEST, B., HIERHOLZER, J.C. & WIGAND, R. (1989). Molecular epidemiology and restriction site mapping of adenovirus type 3 genome types. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 1329-1334.

ADRIAN, T., BEST, B. & WIGAND, R. (1985b). A proposal for naming adenovirus genome types, exemplified by adenovirus type 6. *Journal of General Virology*, 66, 2685-2692.

ADRIAN, T., BEST, B. & WIGAND, R. (1987a). Serologically atypical adenovirus strains of subgenus D are different in their genome from the respective prototypes. *Medical Microbiology and Immunology*, 176, 217-224.

ADRIAN, T., DE JONG, J.C., WERMENBOL, A.G., VAN DER AVOORT, H.G.A.M. & WIGAND, R. (1988). Genome type analysis of adenovirus 37 isolates. *Journal of Medical Virology*, 25, 77-84.

ADRIAN, T., WADELL, G., HIERHOLZER, J.C. & WIGAND, R. (1986). DNA restriction analysis of adenovirus prototypes 1 to 41. *Archives of Virology*, 91, 277-290.

ADRIAN, T. & WIGAND, R. (1986). Adenovirus 3-7, an intermediate strain of subgenus B. *Intervirology*, 26, 202-206.

ADRIAN, T. & WIGAND, R. (1989a). Genome type analysis of adenovirus 31, a potential causative agent of infants enteritis. *Archives of Virology*, 105, 81-88.

ADRIAN, T. & WIGAND, R. (1989b). Genome type analysis of certain adenovirus serotypes of subgenus D. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. A-Medizine*, 270, 527-533.

ADRIAN, T., WIGAND, R. & HIERHOLZER, J.C. (1985c). Immunological and biochemical characterization of human adenoviruses from subgenus B. II. DNA restriction analysis. *Archives of Virology*, 84, 79-90.

ADRIAN, T., WIGAND, R. & RICHTER, J. (1987b). Gastroenteritis in infants associated with a genome type of adenovirus 31 and with combined rotavirus and adenovirus infection. *European Journal of Pediatrics*, 146, 38-40.

ADRIAN, T., WIGAND, R. & WADELL, G. (1987c). Serological and biochemical characteristics of intermediate adenovirus strains of subgenus D. *Archives of Virology*, 97, 347-358.

AIRD, F., KING, J.J. & YOUNGHUSBAND, H.B. (1983). Identification of a new strain of adenovirus type 2 by restriction endonuclease analysis. *Gene*, 22, 133-134.

AKUSJÄRVI, G., ALESTRÖM, P., PETTERSSON, M., LAGER, M., JORNVALL, H. & PETTERSSON, U. (1984). The gene for the adenovirus 2 hexon polypeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 13976-13979.

ALESTRÖM, P., AKUSJÄRVI, G., LAGER, M., LIANG, Y.K. & PETTERSSON, U. (1984). Genes encoding the core proteins of adenovirus type 2. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 13980-13985.

ALLARD, A.K. & WADELL, G. (1988). Physical organization of the enteric adenovirus type 41 early region 1A. *Virology*, 164, 220-229.

ALLARD, A.K., WADELL, G., EVANSER, K.M. & LINDMAN, G.K.K. (1985). Specific properties of two enteric adenovirus 41 clones mapped within early region 1A. *Journal of Virology*, 54, 145-150.

ANDIMAN, W.A., JACOBSON, R.I. & TUCKER, G. (1977). Leukocyte-associated viremia with adenovirus type 2 in an infant with lower respiratory tract disease. *New England Journal of Medicine*, 297, 100-106.

AOKI, K., KATO, M., OHTSUKA, H., ISHII, K., NAKAZONO, N. & SAWADA, H. (1982). Clinical and aetiological study of adenoviral conjunctivitis with special reference to adenovirus types 4 and 19 infections. *British Journal of Ophthalmology*, 66, 776-780.

ARENS, M. & DILWORTH, V. (1988). Remarkably homogeneous population of adenovirus type 3 and 7 genome. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 1604-1608.

ATERMAN, K., EMBIL, J., EASTERBROOK, K.B., HALDANE, E.V. & CROSBY, J. (1973). Liver necrosis, adenovirus type 2 and thymic dysplasia. *Virchows Archives A*, 360, 155-161.

BABISS, L.E., YOUNG, C.S.H., FISHER, P.B. & GINSBERG, H.S. (1983). Expression of adenovirus E1a and E1b gene products and the *Escherichia coli* XGPRT gene in KB cells. *Journal of Virology*, 46, 454-465.

BAILEY, A.S. & RICHMOND, S.J. (1986). Genetic heterogeneity of recent isolates of adenovirus types 3, 4 and 7. *Journal of Clinical Microbiology*, 24, 30-35.

BELL, J.A., WARD, D.G., HUEBNER, R.J., ROWE, W.P., SUSKIND, R.G. & PAFFENBARGER, R.S. (1956). Studies of adenoviruses (APC) in volunteers. *American Journal of Public Health*, 46, 1130-1139.

BERK, A. (1986). Functions of adenovirus E1A. *Cancer Surveys*, 5, 367-387.

BRANDT, C.D., KIM, H.W., JEFFRIES, B.C., PYLES, G., CHRISTMAS, E.E., REID, J.L., CHANOCK, R.M. & PARROTT, R.H. (1972). Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. II. Variations in adenovirus infections by year and season. *American Journal of Epidemiology*, 95, 218-227.

BRANDT, C.D., KIM, H.W., RODRIGUEZ, W.J., ARROBIO, J.O., JEFFRIES, B.C., STALLINGS, E.M., LEWIS, C., MILES, A.J., GARDNER, M.K. & PARROTT, R.H. (1985). Adenoviruses and pediatric gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases*, 151, 437-443.

BRANDT, C.D., KIM, H.W., VARGOSKO, A.J., JEFFRIES, B.C., ARROBIO, J.O., RINDGE, B., PARROTT, R.H. & CHANOCK, R.M. (1969). Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *American Journal of Epidemiology*, 90, 484-500.

BRANDT, C.D., KIM, H.W., YOLKEN, R.H., KAPIKIAN, A.Z., ARROBIO, J.O., RODRIGUEZ, W.J., WYATT, R.G., CHANOCK, R.M. & PARROTT, R.H. (1979). Comparative epidemiology of two rotavirus serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis. *American Journal of Epidemiology*, 110, 243-254.

BRANDT, C.D., RODRIGUEZ, W.J., KIM, H.W., ARROBIO, J.O., JEFFRIES, B.C. & PARROTT, R.H. (1984). Rapid presumptive recognition of diarrhea-associated adenoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 20, 1008-1009.

BROKER, T. (1980). Nucleotide sequence and analysis of group C adenoviruses. *In* *Molecular biology of tumor viruses, part 2. DNA tumor viruses*. Edited par TOOZE, Cold Spring Harbor, New York, pp 923-935.

BROWN, M. (1985). Selection of nonfastidious adenovirus species in 293 cells inoculated with stool specimens containing adenovirus 40. *Journal of Clinical Microbiology*, 22, 205-209.

BROWN, M., PETRIC, M. & MIDDLETON, P.J. (1984). Silver staining of DNA restriction fragments for the rapid identification of adenovirus isolates : application during nosocomial outbreaks. *Journal of Virological Methods*, 9, 87-98.

BRUCKOVA, M., WADELL, G., SUNDELL, G., SYRUCZEK, L. & KUNZOVA, L. (1980). An outbreak of respiratory disease due to a type 5 adenovirus identified as genome type 5a. *Acta Virologica*, 24, 161-165.

BRUMMITT, C.F. & CHERRINGTON, J.M. (1988). Nosocomial adenovirus infections : Molecular epidemiology of an outbreak due to adenovirus type 3a. *Journal of Infectious Diseases*, 158, 423-432.

BUITENWERF, J., LOUWERENS, J.J. & DE JONG, J.C. (1985). A simple and rapid method for typing adenoviruses 40 and 41 without cultivation. *Journal of Virological Methods*, 10, 39-44.

CARMICHAEL, G.P., ZAHRADNIK, J.M. & MOYER, G.H. (1979). Adenovirus hepatitis in an immunosuppressed adult patient. *American Journal of Clinical Pathology*, 71, 352-355.

CHARDONNET, Y. & DALES, S. (1970). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. *Virology*, 40, 462-477.

COONEY, M.K., HALL, C.E., & FOX, J.P. (1972). Seattle virus watch. III. Evaluation of isolation methods and summary of infections detected by virus isolations. *American Journal of Epidemiology*, 96, 286-298.

D'ANGELO, L.J., HIERHOLZER, J.C., HOLMAN, R.C. & SMITH, J.D. (1981). Epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 8 : Epidemiologic and laboratory aspects of a large outbreak. *American Journal of Epidemiology*, 113, 44-55.

D'ANGELO, L.J., HIERHOLZER, J.C., KEENLYSIDE, R.A., ANDERSON, L. & MARTONE, W.J. (1979). Pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus 4 : Report of a swimming pool-related outbreak with recovery of virus from pool water. *Journal of Infectious Diseases*, 140, 42-50.

DAWSON, C.R., HANNA, L., WOOD, T.R. & DESPAIN, R. (1970). Adenovirus type 8 keratoconjunctivitis in the United States. III. Epidemiologic, clinical and microbiological features. *American Journal of Ophthalmology*, 69, 473-480.

DE JONG, J.C., WIGAND, R., KIDD, A.H., WADELL, G., KAPSENBERG, J.G., MUZERIE, C.J., WERMENBOL, A.G. & FIRTZLAFF, R.G. (1983). Candidate adenoviruses 40 and 41 : fastidious adenoviruses from human infant stool. *Journal of Medical Virology*, 11, 215-231.

DEKKER, B.M.M. & VAN ORMONDT, H. (1984). The nucleotide sequence of fragment HindIII-C of human adenovirus type 5 DNA (map positions 17.1-31.7). *Gene*, 27, 115-120.

DELSERT, C. & D'HALLUIN, J.C. (1984). Genetic expression of human adenoviruses in simian cells. Evidence for interserotypic inhibition of viral DNA synthesis. *Virus Research*, 1, 365-380.

DESIDERIO, S.V. & KELLY, T.J., Jr. (1981). Structure of the linkage between adenovirus DNA and the 55,000 molecular weight terminal protein. *Journal of Molecular Biology*, 145, 319-337.

D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C., NIEL, C. & BOULANGER, P. (1984). Characterization of an early temperature-sensitive and cytotydal double mutant of adenovirus type 2. *Journal of General Virology*, 65, 1305-1317.

D'HALLUIN, J.C., MILLEVILLE, M. & BOULANGER, P.A. (1983). Restriction maps of human adenovirus types 2, 5 and 3 for BclI, ClaI, PvuI and SphI endonucleases. *Gene*, 21, 165-169.

DUNKIN, I.B.R. & HUTCHINSON, J.G.P. (1961). Type 3 adenovirus with gastrointestinal symptoms. *Lancet*, 1, 530-531.

ECKHARDT, T. (1979). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1, 584-588.

EVERITT, E., LUTTER, L. & PHILIPSON, L. (1975). Structural proteins of adenovirus. XII. Location and neighbour relationship among proteins of adenovirion type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking. *Virology*, 67, 197-208.

FADEN, H., GALLAGHER, M., OGRA, P. & McLAUGHLIN, S. (1978). Nosocomial outbreak of pharyngoconjunctival fever due to adenovirus type 4. *New-York Morbidity and Mortality Weekly Report*, 27, 49-61.

FAULKNER, R. & VAN ROOYEN, C.E. (1962). Adenovirus types 3 and 5 isolated from the cerebrospinal fluid of children. *Journal of the Canadian Medical Association*, 87, 1123-1128.

FIFE, K.H., ASHLEY, R. & COREY, L. (1985a). Isolation and characterization of six new genome types of human adenovirus types 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 21, 20-23.

FIFE, K.H., ASHLEY, R., SHIELDS, A.F., SALTER, D., MEYERS, J.D. & COREY, L. (1985b). Comparison of seroneutralization and DNA restriction enzyme methods for typing clinical isolates of human adenovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 22, 95-110.

FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S., DAVIES, H. & MORRIS, C.A. (1975). Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet*, 1, 4-6.

FLEWETT, T.H., DAVIES, H., BRYDEN, A.S. & ROBERTSON, N.J. (1974). Diagnostic electron microscopy of feces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *Journal of Clinical Pathology*, 27, 608-612.

FLINT, S.J. (1980). Structure and genomic organization of adenoviruses. *In* DNA Tumor viruses. Edited par TOOZE, Cold Spring Harbor, New York, pp 383-441.

FOX, J.P., BRANDT, C.D., WASSERMANN, F.E., HALL, C.E., SPIGLAND, I., KOGON, A. & ELVEBACK, L.R. (1969). The virus watch program : a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New-York families. VI. Observations of adenovirus infections : virus excretion patterns, antibody response, efficiency of surveillance and relation to illness. *American Journal of Epidemiology*, 89, 25-50.

FOY, H.M., & GRAYSTONE, J.T. (1976). Adenovirus. *In* Viral infections of man. Edited par EVANS, Raven Press, New York. pp 53-81.

FUJII, S., MAKUZONO, M., SAWADA, H., ISHII, K., KATO, M., AOKI, K., OHTSUKA, H. & FUJINAGA, K. (1983). Restriction endonuclease cleavage analysis of adenovirus type 8 : two new subtypes from patients with epidemic keratoconjunctivitis in Sapporo, Japan. *Japanese Journal of Medical Sciences and Biology*, 36, 307-313.

GALBRAITH, N.S. (1965). A survey of enteroviruses and adenoviruses in faeces of normal children aged 0-4 years. *Journal of Hygiene*, 63, 441-454.

GARDNER, P.S., MCGREGOR, C.B. & DICK, K. (1960). Association between diarrhoea and adenovirus type 7. *British Medical Journal*, 1, 91-93.

GARON, C.F., BERRY, K.W. & ROSE, J.A. (1972). A unique form of terminal redundancy in adenovirus DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 69, 2391-2395.

GARY, G.W., HIERHOLZER, J.C. & BLACK, R.E. (1979). Characteristics of noncultivable adenoviruses associated with diarrhea in infants : A new subgroup of human adenoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 10, 96-103.

GINGERAS, T.R., SCIAKY, D., GELINAS, R.E., BING-DONG, J., YEN, C.E., KELLY, M.M., BULLOCK, P.A., PARSONS, B.L., O'NEILL, K.E. & ROBERTS, R.J. (1982). Nucleotide sequences from the adenovirus 2 genome. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 13475-13491.

GINSBERG, H.S., BADGER, G.F., DINGLE, J.H., JORDAN, W.S., Jr. & KATZ, S. (1954). Etiologic relationship of the RI-67 agent to acute respiratory disease (ARD). *Journal of Clinical Investigation*, 34, 1077-1086.

GOMES, S.A., CANDEIAS, J.A.N., MONTEIRO, S.P., PEREIRA, H.G. & NIEL, C. (1989). New genome types of adenovirus types 1, 3 and 5 isolated from stools of children in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 1022-1026.

GOMES, S.A., GABBAY, Y.B., NASCIMENTO, J.P. & NIEL, C. (1988). Genome analysis of adenovirus 4a, a causative agent of pharyngoconjunctival fever and respiratory diseases in Brazil. *Journal of Medical Virology*, 26, 453-459.

GOMES, S.A., NASCIMENTO, J.P., SIQUEIRA, M.M., KRAWCZUK, M.M., PEREIRA, H.G., & RUSSELL, W.C. (1985). In situ hybridization with biotinylated DNA probes : Rapid diagnostic test for adenovirus upper respiratory infections. *Journal of Virological Methods*, 12, 105-110.

GOMES, S.A. & NIEL, C. (1987). Human adenovirus from subgenus D : Restriction mapping of types 9 and 19 and characterization of a new genome type. *Journal of General Virology*, 68, 3171-3175.

GOUVEA, V.S., DE CASTRO, L., & PEREIRA, H.G. (1987). A combined dot nitrocellulose enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. *Journal of Virological Methods*, 18, 57-66.

- GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C. & NAIRN, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36, 59-72.
- GRANDIEN, M., PETTERSSON, C.A., SVENSSON, L. & UHNOO, I. (1987). Latex agglutination test for adenovirus diagnosis in diarrheal disease. *Journal of Medical Virology*, 23, 311-316.
- GREEN, M. (1970). Oncogenic viruses. *Annual Review of Biochemistry*, 39, 701-756.
- GREEN, M., MACKEY, J.K., WOLD, W.S.M. & RIGDEN, P. (1979a). Thirty-one human adenovirus (Ad1-31) form five groups (A-E) based upon DNA genome homologies. *Virology*, 93, 481-492.
- GREEN, M., PINA, M., KIMES, R., WENSINK, P.C., MACHATTIE, L.A. & THOMAS, C.A. (1967). Adenovirus DNA. I. Molecular weight and conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 57, 1302-1309.
- GREEN, M., WOLD, W.S.M., MACKEY, J.K. & RIGDEN, P.M. (1979b). Analysis of the human tonsil and cancer DNAs and RNAs for DNA sequences of group C (serotypes 1,2,5 and 6) human adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 76, 6606-6609.
- GUO, D.F., SHIBATA, R., SHINAGAWA, M., SATO, G., AOKI, K. & SAWADA, H. (1988a). Genomic comparison of adenovirus type 3 isolates from patients with acute conjunctivitis in Japan, Australia and the Philippines. *Microbiology and Immunology*, 32, 833-842.
- GUO, D.F., SHINAGAWA, M., AOKI, K., SAWADA, H., ITAKURA, S. & SATO, G. (1988b). Genome typing of adenovirus strains isolated from conjunctivitis in Japan, Australia and the Philippines. *Microbiology and Immunology*, 32, 1107-1118.
- HALL, C.E., BRANDT, C.D., FROTHINGHAM, T.E., SPIGLAND, I., COONEY, M.K. & FOX, J.P. (1971). The Virus Watch Program : A continuing surveillance of viral infections in metropolitan New-York families. IX. A comparison of infections with several respiratory pathogens in New York and New Orleans families. *American Journal of Epidemiology*, 94, 367-380.

HAMMARSKJÖLD, M.L. & WINBERG, G. (1980). Encapsidation of adenovirus 16 DNA is directed by a small DNA sequence at the left end of the genome. *Cell*, 20, 787-795.

HAMMOND, G.W., HANNAN, C., FISHER, K., MAUTHE, G. & STRAUS, S.E. (1987). DNA hybridization for diagnosis of enteric adenovirus infection from directly spotted human feral specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 1881-1885.

HAMMOND, G.W., MAUTHE, G., JOSHUA, J., & HANNAN, C.K. (1985). Examination of uncommon clinical isolates of human adenoviruses by restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 21, 611-616.

HEARING, P., SAMULSKI, R.J., WISHART, W.L. & SHENK, T. (1987). Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *Journal of Virology*, 61, 2555-2558.

HENNACHE, B. & BOULANGER, P. (1977). Biochemical study of KB-cell receptor for adenovirus. *The Biochemical Journal*, 166, 237-247.

HERRMANN, J.E., PERRON-HENRY, D.M., & BLACKLOW, N.R. (1987). Antigen detection with monoclonal antibodies for the diagnosis of adenovirus gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases*, 155, 1167-1171.

HIERHOLZER, J.C., ADRIAN, T., ANDERSON, L., WIGAND, R. & GOLD, J.W.M. (1988a). Analysis of antigenically intermediate strains of subgenus B and D adenoviruses from AIDS patients. *Archives of Virology*, 103, 99-116.

HIERHOLZER, J.C., WIGAND, R., ANDERSON, L., ADRIAN, T. & GOLD, J.W.M. (1988b). Adenoviruses from patients with AIDS : A plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *Journal of Infectious Diseases*, 158, 804-813.

HILLEMANN, M.R. (1957). Epidemiology of adenovirus respiratory infection in military recruit populations. *Annales of the New-York Academy of Sciences*, 62, 262-275.

HILLEMANN, M.R. & WERNER, J.H. (1954). Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine, 85, 183-190.

HIRT, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. Journal of Molecular Biology, 26, 365-369.

HU, S.L., HAYS, W.W. & POTTS, D.E. (1984). Sequence homology between bovine and human adenoviruses. Journal of Virology, 49, 604-608.

HUEBNER, R.J. (1967). Adenovirus-directed tumor and T-antigens. In Perspectives in Virology. Edited par POLLARD, Academic Press, New-York, pp 147-166.

HYPPIA, T. (1985). Detection of adenovirus in nasopharyngeal specimens by radioactive and nonradioactive probes. Journal of Clinical Microbiology, 21, 730-733.

ISHINO, M., OHASHI, Y., EMOTO, T., SAWADA, Y. & FUJINAGA, K. (1988). Characterization of adenovirus type 40 E1 region. Virology, 165, 95-102.

JAWETZ, E., KIMURA, S.J., NICHOLAS, A.N., THYGESON, P. & HANNA, L. (1955). New type of APC virus from epidemic keratoconjunctivitis. Science, 122, 1190-1192.

JOHANSSON, M.E., UHNOO, I., PETTERSSON, C.A., SVENSSON, L. & WADELL, G. (1985). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of enteric adenovirus 41. Journal of Medical Virology, 17, 19-28.

JONCAS, J. & PAVILANIS, V. (1960). Diarrhea and vomiting in infancy and childhood : Viral studies. Journal of the Canadian Medical Association, 83, 1108-1110.

KANNEMEYER, J.R., BROOKS, L.A., DUMBELL, K.R. & KEEN, G.A. (1988). Two new genome types of adenovirus 7c. Journal of Medical Virology, 24, 101-108.

KEMP, M.C. & HIERHOLZER, J.C. (1986). Three adenovirus type 8 genome types defined by restriction enzyme analysis : prototype stability in geographically separated populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 23, 469-474.

KEMP, M.C., HIERHOLZER, J.C., CABRADILLA, C.P. & OBIJESKI, J.F. (1983). The changing etiology of epidemic keratoconjunctivitis : antigenic and restriction enzyme analysis of adenovirus types 19 and 37 isolated over a ten-year period. *Journal of Infectious Diseases*, 148, 24-33.

KIDD, A.H. (1984). Genome variants of adenovirus 41 (subgroup G) from children with diarrhea in South Africa. *Journal of Medical Virology*, 14, 49-59.

KIDD, A.H., BERKOWITZ, F.E., BLASKOVIC, P.J. & SCHOUB, B.D. (1984). Genome variants of human adenovirus 40 (subgroup F). *Journal of Medical Virology*, 14, 235-246.

KIDD, A.H., COSGROVE, B.P., BROWN, R.A. & MADELEY, C.R. (1982). Faecal adenoviruses from Glasgow babies. Studies on culture and identity. *Journal of Hygiene*, 88, 463-474.

KIDD, A.H., HARLEY, E.H., & ERAMUS, M.J. (1985). Specific detection and typing of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens by dot-blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 22, 934-939.

KIDD, A.H. & MADELEY, C.R. (1981). In vitro growth of some fastidious adenoviruses from stool specimens. *Journal of Clinical Pathology*, 34, 213-216.

KIM, H.W., BRANDT, C.D., ARROBIO, J.O., MURPHY, B., CHANOCK, R.M. & PARROTT, R.H. (1979). Influenza A and B virus infection in infants and young children during the years 1957-1976. *American Journal of Epidemiology*, 109, 464-477.

KITCHINGMAN, G.R. (1982). Restriction mapping and molecular cloning of adenovirus type 4 (subgroup E) DNA. *Gene*, 20, 205-210.

LAPORTE, J., BOBULESCO, P. & ROSSI, F. (1980). Une lignée cellulaire particulièrement sensible à la réplication du coronavirus entéritique bovin : les HRT18. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, série D, 625-626.

LECHNER, R.L. & KELLY, T.J., Jr. (1977). The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. *Cell*, 12, 1007-1020.

LEITE, J.P.G., NIEL, C. & D'HALLUIN, J.C. (1986). Expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in human cells under the control of early adenovirus subgroup C promoters : effect of E1A gene products from other subgroups on gene expression. *Gene*, 41, 207-215.

LEITE, J.P.G., PEREIRA, H.G., AZEREDO, R.S. & SCHATZMAYR, H.G. (1985). Adenoviruses in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Virology*, 15, 203-209.

LELONG, M., LEPINE, P., ALISON, F., VINH, L.T., SATGE, P. & CHANY, C. (1956). La pneumonie à virus du groupe APC chez le nourrisson, isolement du virus. Les lésions anatomohistologiques. *Archives Françaises de Pédiatrie*, 13, 1092-1097.

LEWANDOWSKI, R.A. & RUBENIS, M. (1981). Nosocomial conjunctivitis caused by adenovirus type 4. *Journal of Infectious Diseases*, 143, 28-31.

LI, Q.G. & WADELL, G. (1986). Analysis of 15 different genome types of adenovirus type 7 isolated on five continents. *Journal of Virology*, 60, 331-335.

LI, Q.G. & WADELL, G. (1988a). Comparison of 17 genome types of adenovirus type 3 identified among strains recovered from six continents. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 1009-1015.

LI, Q.G. & WADELL, G. (1988b). The degree of genetic variability among adenovirus type 4 strains isolated from man and chimpanzee. *Archives of Virology*, 101, 65-78.

MACKEY, J.K., GREEN, M., WOLD, W.S.M. & RIGDEN, P.M. (1979). Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 8. *Journal of the National Cancer Institute*, 62, 23-29.

MARSH, M. & HELENIUS, A. (1989). Virus entry in animal cells. *Advances in Virus Research*, 36, 107-151.

MATTHEWS, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 17, 1-119.

MAUTNER, V., MACKAY, N. & STEINTHORSDOTTIR, V. (1989). Complementation of enteric adenovirus type 40 for lytic growth in tissue culture by E1B 55K function of adenovirus types 5 and 12. *Virology*, 171, 619-622.

McFARLANE, E.S., STEWART, J.H.B. & JAMES, H. (1986). Genome variation of 5 clinical adenovirus type 2 isolates determined by restriction enzyme digestion analysis. *Archives of Virology*, 87, 321-326.

MENG, Z.D., KENNETT, M.L., RODGER, S.M., DICKSON, K.E., ANDERSON, B.N. & GUST, I.D. (1986). Further characterization of 41 isolates of adenovirus type-19 type-37 by serum neutralization and DNA restriction enzyme analysis. *Journal of Hygiene*, 97, 377-383.

MOFFETT, H.L., SHULENBERGER, H.K. & BURKHOLDER, E.R. (1968). Epidemiology and etiology of severe infantile diarrhoea. *Journal of Pediatrics*, 72, 1-14.

MONTO, A.S. & ULLMAN, B.M. (1974). Acute respiratory illness in an American community : The Tecumseh study. *Journal of the American Medical Association*, 227, 164-173.

MORTENSSON-EGMUND, K. & KJELDSBERG, E. (1986). Improved ELISA for the detection of adenovirus antigen in faeces extracts by the biotin/streptavidin interaction. *Journal of Virology Methods*, 14, 57-64.

MUZZI, A., ROCCHI, G., LUMBROSO, B., TOSATO, G. & BARBIERI, F. (1975). Acute haemorrhagic conjunctivitis during an epidemic outbreak of adenovirus-type-4 infection. *Lancet*, 2, 822-823.

NIEL, C. & D'HALLUIN, J.C. (1984). Restriction maps of human adenovirus 2, 5 and 3 for BstEII, MluI, NdeI, NruI and SfiI endonucleases. *Gene*, 31, 305-308.

NIEL, C., GOMES, S.A., LEITE, J.P.G. & PEREIRA, H.G. (1986). Direct detection and differentiation of fastidious and nonfastidious adenoviruses in stools by using a specific non-radioactive probe. *Journal of Clinical Microbiology*, 24, 785-789.

NODA, M., OTAGAKI, Y., IKEDA, Y., MATSUSHI, T. & OGINO, T. (1988). Genome types of adenovirus types 19 and 37 isolated from patients with conjunctivitis in Hiroshima city. *Journal of Medical Virology*, 26, 15-22.

NORRBY, E., BARTHA, A., BOULANGER, P., DREIZIN, R.S., GINSBERG, H.S., KALTER, S.S., KAWAMURA, H., ROWE, W.P., RUSSELL, W.C., SCHLESINGER, R.W. & WIGAND, R. (1976). Adenoviridae. *Intervirology*, 7, 117-125.

O'DAY, D.M., GUYER, B., HIERHOLZER, J.C., ROSING, K.J. & SCHAFFNER, W. (1976). Clinical and laboratory evaluation of epidemic keratoconjunctivitis due to adenovirus types 8 and 19. *American Journal of Ophthalmology*, 81, 207-215.

O'DONNELL, B., BELL, E., PAYNE, S.B., MAUTNER, V. & DESSELBERGER, U. (1986). Genome analysis of species 3 adenoviruses isolated during summer outbreaks of conjunctivitis and pharyngoconjunctival fever in the Glasgow and London areas in 1981. *Journal of Medical Virology*, 18, 213-228.

PEREIRA, H.G. (1986). Non-radioactive nucleic acid probes for the diagnosis of virus infection. *Bioessays*, 4, 110-113.

PEREIRA, H.G., AZEREDO, R.S., LEITE, J.P.G., ANDRADE, Z.P. & DE CASTRO, L. (1985). A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *Journal of Virological Methods*, 10, 21-28.

PERRON-HENRY, D.M., HERRMANN, J.E. & BLACKLOW, N.R. (1988). Isolation and propagation of enteric adenoviruses in HEP-2 cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 1445-1447.

PETTERSSON, U. (1984). Structural and nonstructural adenovirus proteins. In The Adenoviruses. Edité par GINSBERG, Plenum Press, New-York. pp 205-270.

PETTERSSON, U. & WADELL, G. (1985). Antigenic structure of the adenoviruses. In Immunochemistry of viruses, the basis for serodiagnosis and vaccines. Edité par VAN REGENMORTEL et NEURATH, Elsevier Science Publishers, Bonn, pp 295-319.

PHILIPSON, L. (1984). Adenovirus assembly. In The Adenoviruses. Edité par GINSBERG, Plenum Press, New-York. pp 309-337.

PINA, M. & GREEN, M. (1965). Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 54, 547-551.

RANKI, M., VIRTANEN, M., PALVA, A., LAAKSONEN, M., PETTERSSON, U., KAARIAINEN, L., HALONEN, P. & SODERLUND, H. (1983). Nucleic acid sandwich hybridization in adenovirus diagnosis. Current topics in Microbiology and Immunology, 104, 307-318.

REKOSH, D.M.K., RUSSELL, W.C., BELLETT, A.J.D. & ROBINSON, A.J. (1977). Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. Cell, 11, 283-295.

REN, C.S., NAKAZONO, N., ISHIDA, S., FUJII, S.I., YOSHII, T., YAMAZAKI, S., ISHII, K. & FUJINAGA, K. (1985). Genome type analysis of adenovirus type 4 isolates, recently obtained from clinically different syndromes in some areas in Japan. Japanese Journal of Medical Sciences and Biology, 38, 195-199.

RENZ, M. & KURZ, C. (1984). A colorimetric method for DNA hybridization. Nucleic Acids Research, 12, 3435-3444.

RETTET, M., MIDDLETON, P.J., TAM, J.S. & PETRIC, M. (1979). Enteric adenoviruses : Detection, replication, and significance. Journal of Clinical Microbiology, 10, 574-578.

- ROBERTS, R.J., AKUSJARVI, G., ALESTROM, P., GELINAS, R.E., GINGERAS, T.R., SCIAKY, D. & PETERSSON, U. (1986). A consensus sequence for the adenovirus-2 genome. *In* Adenovirus DNA. Edited par DOERFLER, Martinus Nijhoff Publishing, Boston. pp 1-51.
- ROBERTS, R.J., O'NEILL, K. & YEN, C.T. (1984). DNA sequences from the adenovirus genome. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 13968-13975.
- ROBINSON, A.J., YOUNGHUSBAND, H.B. & BELLETT, A.J.D. (1973). A circular DNA-protein complex from adenoviruses. *Virology*, 56, 54-69.
- ROSEN, L. (1960). A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. *American Journal of Hygiene*, 71, 120-128.
- ROWE, W.P., HUEBNER, A.J., GILMORE, L.K., PARROTT, R.N. & WARD, T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 84, 570-573.
- SCHMITZ, H., WIGAND, R. & HEINRICH, W. (1983). Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *American Journal of Epidemiology*, 117, 455-466.
- SERGEANT, A., TIGGES, M.A. & RASKAS, H.J. (1979). Nucleosome-like structural subunits of intranuclear parental adenovirus type 2 DNA. *Journal of Virology*, 29, 888-898.
- SHINOZAKI, T., ARAKI, K., KOBAYASHI, M., FUJITA, Y., ABE, T. & USHIJIMA, H. (1988). Genome variants of human adenovirus types 40 and 41 (subgroup F) in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 2567-2571.
- SIMILA, S., JOUPPILA, R., SALMI, A. & POHJONEN, R. (1970). Encephal meningitis in children associated with an adenovirus type 7 epidemic. *Acta Paediatrica Scandinavia*, 59, 310-316.
- SINGH-NAZ, N., & NAZ, R.K. (1986). Development and application of monoclonal antibodies for specific detection of human enteric adenoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 23, 840-842.

SINGH-NAZ, N., RODRIGUEZ, W.J., KIDD, A.H., & BRANDT, C.D. (1988). Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and typing of subgroup F adenoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 297-300.

SINSHEINER, R.L. (1977). Recombinant DNA, *Annual Review of Biochemistry*, 46, 415-438.

SMITH, J.J., BUESCHER, E.L. & TOP, F.H., Jr. (1970). Experimental respiratory infection with type 4 adenovirus vaccine in volunteers : Clinical and Immunological responses. *Journal of Infectious Diseases*, 122, 239-251.

SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98, 503-517.

SPRAGUE, J.B., HIERHOLZER, J.C., CURRIER, R.W., II, HATTWICK, M.A.W. & SMITH, M.D. (1973). Epidemic keratoconjunctivitis : A severe industrial outbreak due to adenovirus type 8. *New England Journal of Medicine*, 289, 1341-1346.

STALHANDSKE, P., HYPPIA, T., ALLARD, A., HALONEN, P., & PETTERSSON, U. (1985). Detection of adenoviruses in stool specimens by nucleic acid spot hybridization. *Journal of Medical Virology*, 16, 213-218.

STERNER, G. (1962). Adenovirus infections in childhood : An epidemiological and clinical survey among Swedish children. *Acta Paediatrica Scandinavia*, Suppl. 142, 1-23.

STILLMAN, B. (1986). Functions of the adenovirus E1B tumour antigens. *Cancer Surveys*, 5, 369-404.

STRAUS, S.E. (1984). Adenovirus infections in humans. In *The adenoviruses*. Edited par GINSBERG, Plenum Press, New-York, pp 451-496.

SVENSSON, L. & VON BONSDORFF, C.H. (1982). Solid-phase immune electronmicroscopy (SPIEM) by use of protein A and its application for characterization of selected adenovirus serotypes. *Journal of Medical Virology*, 10, 243-253.

SVENSSON, U., PERSSON, R. & EVERITT, E. (1981). Virus-receptor interaction in the adenovirus system. I. Identification of virion attachment proteins of the HeLa cell plasma membrane. *Journal of Virology*, 38, 70-81.

TAI, F.H., GRAYSTONE, J.T., JOHNSON, P.B. & WOOLRIDGE, R.L. (1960). Adenovirus infections in Chinese army recruits on Taiwan. *Journal of Infectious Diseases*, 107, 160-165.

TAKACS, M., BERENCSI, G., LENGYEL, A. & NASZ, I. (1983). Restriction site maps of the human adenovirus type 8 DNA. *Acta Virologica* 27, 289-298.

TAKAFUJI, E.T., EAYDOS, J.C., ALLEN, R.G. & TOP, F.H. Jr. (1979). Simultaneous administration of live, enteric-coated adenovirus types 4, 7 and 21 vaccines : Safety and immunogenicity. *Journal of Infectious Diseases*, 140, 48-53.

TAKIFF, H.E., REINHOLD, W., GARON, C.F., & STRAUS, S.E. (1984). Cloning and physical mapping of enteric adenoviruses (candidate 40 and 41). *Journal of Virology*, 51, 131-136.

TAKIFF, H.E., SEIDLIN, M., KRAUSE, P., ROONEY, J., BRANDT, C.D., RODRIGUEZ, W., YOLKEN, R., & STRAUS, S.E. (1985). Detection of enteric adenoviruses by dot-blot hybridization using a molecularly cloned viral DNA probe. *Journal of Medical Virology*, 16, 107-118.

TAKIFF, H.E. & STRAUS, S.E. (1982). Early replicative block prevents the efficient growth of fastidious diarrhea-associated adenoviruses in cell culture. *Journal of Medical Virology*, 9, 93-100.

TAMANOI, F. (1986). On the mechanism of adenovirus DNA replication. *In* Adenovirus DNA. Edited par DOERFLER, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 97-128.

TATE, V.E. & PHILIPSON, L. (1979). Parental adenovirus DNA accumulates in nucleosome-like structures in infected cells. *Nucleic Acids Research*, 6, 2769-2785.

TIBBETTS, C. (1977). Physical organization of subgroup B human adenovirus genomes. *Journal of Virology*, 24, 564-579.

TOKUNAGA, O., SHINAGAWA, M. & PADMANABHAN, R. (1982). Physical mapping of the genome and sequence analysis at the inverted terminal repetition of adenovirus 4 DNA. *Gene*, 18, 329-334.

TOLUN, A. & PETERSSON, U. (1975). Termination sites for adenovirus type 2 DNA replication. *Journal of Virology*, 16, 759-766.

TOMPKINS, W.A.F., WATRACH, A.M., SCHMALE, J.D., SCHULTZ, R.M. & HARRIS, J.A. (1974). Culture and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. *Journal of the National Cancer Institute*, 52, 1101-1110.

TOP, F.H., Jr., BUESCHER, E.L., BANCROFT, W.H. & RUSSELL, P.K. (1971a). Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines. II. Antibody response and protective effect against acute respiratory disease due to adenovirus type 7. *Journal of Infectious Diseases*, 124, 155-162.

TOP, F.H., Jr., GROSSMAN, R.A., BARTELLONI, P.J., SEGAL, H.E., DUDDING, B.A., RUSSELL, P.K., & BUESCHER, E.L. (1971b). Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines. I. Safety, infectivity, antigenicity, and potency of adenovirus type 7 vaccine in humans. *Journal of Infectious Diseases*, 124, 148-152.

TRENTIN, J.J., VAN HOOSIER, G.L. & SAMPER, L. (1968). The oncogenicity of human adenoviruses in hamsters. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 127, 683-689.

TRENTIN, J.J., YABE, Y. & TAYLOR, G. (1962). The quest for human cancer viruses. *Science*, 137, 835-841.

VALENTINE, R.C. & PEREIRA, H.G. (1965). Antigens and structure of the adenovirus. *Journal of Molecular Biology*, 13, 13-23.

VAN DER AVOORT, H.G.A.M., ADRIAN, T., WIGAND, R., WERMENBOL, A.G., ZOMERDIJK, P.L. & DE JONG, J.C. (1986). Molecular epidemiology of adenovirus type 21 in the Netherlands and the Federal Republic of Germany from 1960 to 1985. *Journal of Clinical Microbiology*, 24, 1084-1088.

VAN DER AVOORT, H.G.A.M., WERMENBOL, A.G., ZOMERDIJK, T.P.L., KLEIJNE, J.A.F.W., VAN ASTEN, J.A.A.M., JENSMA, P., OSTERHAUS, A.D.M.E., KIDD, A.H. & DE JONG, J.C. (1989). Characterization of fastidious adenovirus types 40 and 41 by DNA restriction enzyme analysis and by neutralizing monoclonal antibodies. *Virus Research*, 12, 139-158.

VAN DER EB, A.J., VAN KESTEREN, L.W. & VAN BRUGGEN, E.F.J. (1969). Structural properties of adenovirus 5 DNA. *Biochimica et biophysica acta*, 182, 530-541.

VAN DER VEEN, J., OEI, K.G. & ABARBANEL, M.F.W. (1969). Patterns of infections with adenovirus types 4, 7 and 21 in military recruits during a 9-year survey. *Journal of Hygiene*, 67, 255-263.

VAN LOON, A.E., LIGTENBERG, M., REEMST, A.M.C.B., SUSSENBACH, J.S. & ROZIJN, T.H. (1987). Structure and organization of the left-terminal DNA regions of fastidious adenovirus types 40 and 41. *Gene*, 58, 109-126.

VAN LOON, A.E., ROZIJN, T.H., DE JONG, J.C. & SUSSENBACH, J.S. (1985). Physico-chemical properties of the DNAs of the fastidious adenovirus species 40 and 41. *Virology*, 140, 197-200.

VIRTANEN, M., PALVA, A., LAAKSONEN, M., HALONEN, P., SODERLUND, H. & RANKI, M. (1983). Novel test for rapid viral diagnosis : Detection of adenovirus in nasopharyngeal mucus aspirates by means of nucleic acid sandwich hybridization. *Lancet*, i, 381-383.

WADELL, G. (1984). Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 110, 191-220.

WADELL, G., COONEY, M.K., DA COSTA LINHARES, A., DE SILVA, L., KENNETT, M.L., KONO, R., GUI-FANG, R., LINDMAN, K., NASCIMENTO, J.P., SHOUB, B.D. & SMITH, C.D. (1985). Molecular epidemiology of adenoviruses : global distribution of adenovirus 7 genome types. *Journal of Clinical Microbiology*, 21, 403-408.

WADELL, G. & DE JONG, J.C. (1980). Restriction endonucleases in identification of a genome type of adenovirus 19 associated with keratoconjunctivitis. *Infection and Immunity*, 27, 292-296.

WADELL, G., HAMMARSKJOLD, M.L., WINBERG, G., VARSANYI, T. & SUNDELL, G. (1980). Genetic variability of adenoviruses. *Annals of the New-York Academy of Sciences*, 353, 16-42.

WADELL, G. & VARSANYI, T.M. (1978). Demonstration of three different subtypes of adenovirus type 7 by DNA restriction site mapping. *Infection and Immunity*, 21, 238-246.

WEBB, D.H., SHIELDS, A.F. & FIFE, K.H. (1987). Genomic variation of adenovirus type 5 isolates recovered from bone marrow transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 305-308.

WEINGARTNER, B., WINNACKER, E.L., TOLUN, A. & PETERSSON, U. (1976). Two complementary strand-specific termination sites for adenovirus DNA replication. *Cell*, 9, 259-268.

WIGAND, R. & ADRIAN, T. (1986). Classification and epidemiology of adenoviruses. *In* Adenovirus DNA. Edited par DOERFLER, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp 409-441.

WIGAND, R. & ADRIAN, T. (1989). Intermediate adenovirus strains of subgenus D occur in extensive variety. *Medical Microbiology and Immunology*, 178, 37-44.

WIGAND, R., ADRIAN, T. & BRICOUT, F. (1987). A new human adenovirus of subgenus D : Candidate adenovirus type 42. *Archives of Virology*, 94, 283-286.

WIGAND, R., BARTHA, A., DREIZIN, R.S., ESCHE, H., GINSBERG, H.S., GREEN, M., HIERHOLZER, J.C., KALTER, S.S., McFERRAN, J.B., PETTERSSON, U., RUSSELL, W.C. & WADELL, G. (1982). Adenoviridae : Second report. Intervirology, 18, 169-176.

WOLD, W.S.M., MACKEY, J.K., RIGDEN, P.M. & GREEN, M. (1979). Analysis of human cancer DNA's for DNA sequences of human serotypes 3, 7, 11, 14, 16 and 21 in group B. Cancer Research, 39, 3479-3483.

WOLFSON, J. & DRESSLER, D. (1972). Adenovirus DNA contains an inverted terminal redundancy. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 69, 3054-3057.

WOOD, D.J. & BAILEY, A.S. (1987). Detection of adenovirus 40 and 41 in specimens by immune electron microscopy. Journal of Medical Virology, 21, 191-199.

YOLKEN, R.H., LAWRENCE, F., LEISTER, F., TAKIFF, H.E. & STRAUS, S.E. (1982). Enteric type adenovirus : An important cause of gastrointestinal and respiratory disease in hospitalized infants. Journal of Pediatrics, 101, 21-26.

YOW, M.D., MELNICK, J.L., BLATTNER, R.J., STEPHENSON, W.B., ROBINSON, N.M. & BURKHARDT, M.A. (1970). The association of viruses and bacteria with infantile diarrhea. American Journal of Epidemiology, 92, 33-39.

ZAHRADNIK, J.M., SPENCER, G.J. & PORTER, D.D. (1980). Adenovirus infection in the immune-compromised patient. American Journal of Medicine, 68, 725-731.



## RESUME

Les adénovirus humains sont classés en 6 sous-groupes, de A à F, chaque sous-groupe contenant un ou plusieurs sérotypes. L'analyse de l'ADN de ces virus permet, pour un même sérotype, de distinguer plusieurs types génomiques (variants). Au cours d'études d'épidémiologie moléculaire menées à Sao Paulo et à Rio de Janeiro (Brésil), nous avons isolé plusieurs types génomiques nouveaux appartenant aux sous-groupes A, B, C et D. Nous avons d'autre part montré que le type génomique adénovirus 4a (sous-groupe E) était responsable d'une épidémie de fièvre pharyngoconjonctivale survenue à Bélem (nord du Brésil).

Les adénovirus provoquent chaque année dans le monde des millions de cas de gastroentérites infantiles, dont certaines mortelles, notamment chez les enfants du Tiers-monde. Parmi ces virus, les sérotypes 40 et 41 sont responsables de la majorité des cas. Par clonage moléculaire, nous avons construit une sonde ADN recombinant capable de reconnaître spécifiquement l'ADN des sérotypes 40 et 41 et nous avons mis au point une méthode de détection rapide et d'identification des adénovirus contenus dans les fèces. Cette méthode est une combinaison de l'analyse de restriction et de l'hybridation moléculaire avec cette sonde. Elle permet donc de distinguer ces deux sérotypes à fort potentiel pathogène des autres adénovirus.

Mots-clés : Adénovirus

: Endonucléases de restriction

: Gastroentérite

: Sérotype

: Type génomique