



**HAL**  
open science

## Analyse génétique des adénovirus en situation clinique

Fatih Dinc

► **To cite this version:**

Fatih Dinc. Analyse génétique des adénovirus en situation clinique. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01896755

**HAL Id: dumas-01896755**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01896755>**

Submitted on 16 Oct 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 15 octobre 2018

Par M. DINC Fatih  
Né le 7 mars 1991 à Vienne

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76  
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**

**ANALYSE GENETIQUE DES ADENOVIRUS EN SITUATION  
CLINIQUE**

----oOo----

**JURY :**

Président : M. le Professeur Philippe COLSON  
Membres : M. le Professeur Pierre-Edouard FOURNIER  
M. le Docteur Antoine NOUGAIREDE (directeur de thèse)  
Mme la Docteure Laetitia NINOVE

# LISTE DES ENSEIGNANTS DE L'UFR

## ADMINISTRATION :

*Doyen :*

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE

*Vice-Doyens :*

M. Jean-Paul BORG

M. François DEVRED

M. Pascal RATHELOT

*Chargés de Mission :*

Mme Pascale BARBIER

M. David BERGE-LEFRANC

Mme Manon CARRE

Mme Caroline DUCROS

Mme Frédérique GRIMALDI

*Conseiller du Doyen :*

M. Patrice VANELLE

*Doyens honoraires :*

M. Jacques REYNAUD

M. Pierre TIMON-DAVID

M. Patrice VANELLE

*Professeurs émérites :*

M. José SAMPOL

M. Athanassios ILIADIS

M. Jean-Pierre REYNIER

M. Henri PORTUGAL

*Professeurs honoraires :*

M. Guy BALANSARD

M. Yves BARRA

Mme Claudette BRIAND

M. Jacques CATALIN

Mme Andrée CREMIEUX

M. Aimé CREVAT

M. Bernard CRISTAU

M. Gérard DUMENIL

M. Alain DURAND

Mme Danielle GARÇON

M. Maurice JALFRE

*Chef des Services Administratifs :*

*Chef de Cabinet :*

*Responsable de la Scolarité :*

M. Joseph JOACHIM

M. Maurice LANZA

M. José MALDONADO

M. Patrick REGLI

M. Jean-Claude SARI

Mme Florence GAUREL

Mme Aurélie BELENGUER

Mme Nathalie BESNARD

## **DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

### **PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT

M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE,

PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,

M. Philippe PICCERELLE

BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

### **MAITRES DE CONFERENCES**

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI

Mme Odile RIMET-GASPARINI

Mme Pascale BARBIER

M. François DEVRED

Mme Manon CARRE

M. Gilles BREUZARD

Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA

Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE,

M. Pascal PRINDERRE

PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,

M. Emmanuel CAUTURE

BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

Mme Véronique ANDRIEU

NUTRITION ET DIETETIQUE

**A.H.U.**

THERAPIE CELLULAIRE

**ENSEIGNANTS CONTRACTUELS**

ANGLAIS

Mme Marie-Pierre SAVELLI

M. Léopold TCHIAKPE

M. Jérémy MAGALON

Mme Angélique GOODWIN

## **DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

### **PROFESSEURS**

BIOCHIMIE FONDAMENTALE,

MOLECULAIRE ET CLINIQUE

BIOLOGIE CELLULAIRE

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

M. Philippe CHARPIOT

M. Jean-Paul BORG

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE

Mme Laurence CAMOIN-JAU

Mme Florence SABATIER-MALATERRE

Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN

M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

### **MAITRES DE CONFERENCES**

BIOCHIMIE FONDAMENTALE,

MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI

M. Thierry AUGIER

M. Edouard LAMY

Mme Alexandrine BERTAUD

Mme Claire CERINI

Mme Edwige TELLIER

M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER

**MICROBIOLOGIE**

M. Romaric LACROIX  
Mme Sylvie COINTE  
Mme Michèle LAGET  
M. Michel DE MEO  
Mme Anne DAVIN-REGLI  
Mme Véronique ROUX  
M. Fadi BITTAR  
Mme Isabelle PAGNIER  
Mme Sophie EDOUARD  
M. Seydina Mouhamadou DIENE  
Mme Carole DI GIORGIO  
M. Aurélien DUMETRE  
Mme Magali CASANOVA  
Mme Anita COHEN

**PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE  
MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE**

**BIOLOGIE CELLULAIRE**

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

**A.H.U.**

**HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE**

M. Maxime LOYENS

**DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

**PROFESSEURS**

**CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET  
NUTRITION**

Mme Catherine BADENS

**CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES  
RISQUES ET NUISANCES**

M. Philippe GALLICE

**TECHNOLOGIQUES**

**CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –  
CHIMIE THERAPEUTIQUE**

M. Pascal RATHELOT

M. Maxime CROZET

**CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE**

M. Patrice VANELLE

M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE,  
ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

### **MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE  
CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL

Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET  
NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT

M. Alain NICOLAY

Mme Estelle WOLFF

Mme Elise LOMBARD

Mme Camille DESGROUAS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES  
RISQUES ET NUISANCES

M. David BERGE-LEFRANC

M. Pierre REBOUILLON

TECHNOLOGIQUES

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT

Mme Caroline DUCROS

M. Marc MONTANA

Mme Manon ROCHE

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Armand GELLIS

HYDROLOGIE

M. Christophe CURTI

Mme Julie BROGGI

M. Nicolas PRIMAS

M. Cédric SPITZ

M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE,

M. Riad ELIAS

ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Valérie MAHIOU-LEDDET

Mme Sok Siya BUN

Mme Béatrice BAGHDIKIAN

### **MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES M. Cyril PUJOL

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE M. Marc LAMBERT  
GESTION PHARMACEUTIQUE, Mme Félicia FERRERA  
PHARMACOECONOMIE  
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE  
OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION  
PHARMACEUTIQUES A L’OFFICINE ET  
GESTION DE LA PHARMAFAC

#### **A.H.U.**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION M. Mathieu CERINO

#### **ATER**

CHIMIE ANALYTIQUE M. Charles DESMARCHELIER  
CHIMIE THERAPEUTIQUE Mme Fanny MATHIAS

#### **DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

#### **PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE Mme Diane BRAGUER  
M. Stéphane HONORÉ  
PHARMACODYNAMIE M. Benjamin GUILLET  
TOXICOLOGIE GENERALE M. Bruno LACARELLE  
TOXICOLOGIE DE L’ENVIRONNEMENT Mme Frédérique GRIMALDI

## **MAITRES DE CONFERENCES**

**PHARMACODYNAMIE**

M. Guillaume HACHE

Mme Ahlem BOUHLEL

M. Philippe GARRIGUE

**PHYSIOLOGIE**

Mme Sylviane LORTET

Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL

**TOXICOCINETIQUE ET**

M. Joseph CICCOLINI

**PHARMACOCINETIQUE**

Mme Raphaëlle FANCIULLINO

Mme Florence GATTACECCA

**TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE**

M. Pierre-Henri VILLARD

**CLINIQUE**

Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU

Mme Marie-Anne ESTEVE

Mise à jour le 22 février 2018

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le jury :

**Monsieur le Professeur Philippe COLSON** pour me faire l'honneur de présider ce jury, pour le semestre de Virologie à vos côtés et pour m'avoir fait entrer dans le cercle des auteurs scientifiques publiés.

**Monsieur le Professeur Pierre-Edouard FOURNIER** pour m'avoir accordé le privilège de vous avoir comme membre de ce jury et pour avoir dispensé les quelques cours enrichissants auxquels j'ai eu la chance d'assister pendant mon semestre en Bactériologie.

**Monsieur le Docteur Antoine NOUGAIREDE** pour avoir accepté la direction de ma thèse dans des conditions loin d'être confortables, pour m'avoir fourni une aide continue et précieuse sous forme de conseils avisés et d'encouragements. Sans vous mon travail n'aurait pu aboutir.

**Madame la Docteure Laetitia NINOVE** pour me faire l'honneur de siéger dans ce jury et pour le semestre de Virologie passé à valider la biologie moléculaire à vos côtés, dans l'aquarium suffocant, sans me douter que j'en ferai la pierre angulaire de ma thèse future.

Je remercie également :

**Mes amis, mes co-internes, mes collègues** et toutes les personnes qui ont pris la peine de me venir en aide ou me soutenir à un moment donné de ma vie.

**Mes parents** qui m'ont élevé de la meilleure des façons et sans qui je n'aurais pas pu aller bien loin, **mes frères** pour tous les moments vécus ensemble depuis aussi loin que je me souviens et ma **bien-aimée** pour sa patience et son soutien.

*« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »*

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ENSEIGNANTS DE L'UFR.....</b>	<b>2</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>9</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES.....</b>	<b>16</b>
<b>RAPPELS HISTORIQUES ET BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>18</b>
<b>1 GENERALITES.....</b>	<b>18</b>
1.1 CLASSIFICATION.....	18
1.2 STRUCTURE.....	19
<b>2 ASPECTS CLINIQUES .....</b>	<b>19</b>
2.1 MANIFESTATIONS GASTRO-INTESTINALES .....	19
2.2 ATTEINTES RESPIRATOIRES .....	20
2.3 ATTEINTES OCULAIRES.....	20
2.4 ATTEINTES URINAIRES.....	20
2.5 FORMES DISSEMINÉES .....	21
<b>3 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE .....</b>	<b>22</b>
3.1 DIAGNOSTIC DIRECT.....	22
3.1.1 Culture cellulaire .....	22
3.1.2 Tests de dépistage rapide (TDR).....	23
3.1.3 Biologie moléculaire .....	24
3.2 DIAGNOSTIC INDIRECT OU SEROLOGIE .....	25
<b>4 EPIDEMIOLOGIE.....</b>	<b>25</b>
<b>5 TRAITEMENT ANTIVIRAL SPECIFIQUE.....</b>	<b>27</b>

<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>28</b>
<b>1 ECHANTILLONS CLINIQUES.....</b>	<b>28</b>
<b>2 EXTRACTION DE L'ADN .....</b>	<b>28</b>
<b>3 PCR EN TEMPS REEL.....</b>	<b>29</b>
3.1 PREPARATION DES MILIEUX REACTIONNELS .....	29
3.2 REACTION ET LECTURE DES RESULTATS .....	29
<b>4 TYPAGE.....</b>	<b>30</b>
4.1 PREPARATION DES MILIEUX REACTIONNELS .....	30
4.2 REACTION ET LECTURE DES RESULTATS .....	30
<b>5 SEQUENÇAGE SANGER.....</b>	<b>31</b>
5.1 REACTION DE SEQUENÇAGE .....	31
5.2 PURIFICATION .....	31
5.3 LECTURE DES SEQUENCES .....	32
5.4 ANALYSE LOGICIELLE DES SEQUENCES.....	32
<b>RESULTATS.....</b>	<b>33</b>
<b>1 CHARGE VIRALE .....</b>	<b>33</b>
1.1 RESULTATS POSITIFS .....	33
1.2 DISTRIBUTION DE LA CHARGE VIRALE .....	33
1.3 REPARTITION PAR NATURE .....	34
1.4 RESULTATS NEGATIFS .....	34
<b>2 ESPECES.....</b>	<b>35</b>
2.1 DISTRIBUTION DES ESPECES .....	35
2.2 REPARTITION PAR NATURE .....	35
2.3 TEMPORALITE .....	36
2.4 DISTRIBUTION PAR TRANCHE D'AGE.....	37
2.5 RESULTATS NEGATIFS .....	38
<b>3 GENOTYPAGE.....</b>	<b>39</b>

3.1	DISTRIBUTION DES GENOTYPES .....	39
3.2	REPARTITION PAR NATURE .....	39
3.3	REPARTITION PAR ENTITE CLINIQUE .....	41
3.4	REPARTITION PAR SERVICE HOSPITALIER.....	42
3.5	TEMPORALITE .....	43
3.6	RESULTATS NEGATIFS .....	45
	<b>DISCUSSIONS .....</b>	<b>46</b>
<b>1</b>	<b>ASPECTS TECHNIQUES.....</b>	<b>46</b>
1.1	RENDEMENTS .....	46
1.1.1	<i>Génotypage</i> .....	46
1.1.2	<i>qPCR d'espèce</i> .....	47
1.2	REACTIONS CROISEES.....	47
1.3	INTERET DE LA PCR NESTED .....	48
<b>2</b>	<b>ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES .....</b>	<b>48</b>
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>51</b>
	<b>RESUME.....</b>	<b>59</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : *Acide desoxyribonucléique*  
ADV : *Adénovirus*  
APHM : *Assistance-Publique-Hôpitaux-de-Marseille*  
ARN : *Acide ribonucléique*  
AVR : *Affection des voies respiratoires*  
CF : *Conjonctivites folliculaires*  
CHU : *Centre Hospitalo-Universitaire*  
CSH : *Cellules souches hématopoïétiques*  
Ct : *Cycle seuil*  
ECIL : *European Conference on Infections in Leukaemia*  
ECP : *Effet cytopathique*  
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
FD : *Formes disséminées*  
FPC : *Fièvres pharyngoconjonctivales*  
GEA : *Gastro-entérites aiguës*  
GI : *Gastro-intestinal*  
HAdV : *Adénovirus humains*  
HVR : *Régions hypervariables*  
IC : *Immunocompétent*  
ID : *Immunodéprimé*  
IgG : *Immunoglobuline G*  
IGI : *Infections gastro-intestinales*  
IgM : *Immunoglobuline M*  
IHU : *Institut Hospitalo-Universitaire –Méditerranée Infection*  
KCE : *Kératoconjonctivites épidémiques*  
NATRS : *National Adenovirus Type Reporting System*  
NCBI : *National Center for Biotechnology Information*  
PCR : *Polymerase Chain Reaction*  
qPCR : *PCR quantitative*  
SAU : *Services d'accueil des urgences*

SDRA : *Syndrome de détresse respiratoire aiguë*

TDR : *Tests de diagnostic rapide*

## LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Classification des HAdV .....	18
Figure 2 : Schéma de la structure de l'adénovirus .....	19
Figure 3 : Formes cliniques prédominantes selon les types d'HAdV .....	21
Figure 4 : Effets cytopathiques d'un HAdV 5 sur cellules HEp2 et MRC5.....	22
Figure 5 : Principe de fonctionnement d'un TDR immunochromatographique.....	24
Figure 6 : Proportions des différents types d'HAdV aux Etats-Unis entre 2003 et 2016 .....	26
Figure 7 : Récapitulatif du contenu du milieu réactionnel – qPCR tous HAdV et d'espèce ...	29
Figure 8 : Récapitulatif du contenu du milieu réactionnel – PCR de génotypage.....	31
Figure 9 : Distribution des positifs selon le cycle seuil – qPCR tous HAdV.....	33
Figure 10 : Répartition des positifs par nature – qPCR tous HAdV .....	34
Figure 11 : Répartition des négatifs par nature – qPCR tous HAdV.....	34
Figure 12 : Répartition des HAdV B par nature de prélèvement – qPCR d'espèce.....	35
Figure 13 : Répartition des HAdV C par nature de prélèvement – qPCR d'espèce.....	36
Figure 14 : Distribution des HAdV A, D, E et F selon la nature de prélèvement – qPCR d'espèce.....	36
Figure 15 : Distribution temporelle des HAdV B, C et toutes espèces confondues – qPCR d'espèce.....	37
Figure 16 : Distribution temporelle des HAdV A, D, E et F – qPCR d'espèce .....	37
Figure 17 : Répartition par tranche d'âge des espèces d'HAdV – qPCR d'espèce.....	38
Figure 18 : Répartition des négatifs par nature – qPCR d'espèce.....	38
Figure 19 : Nombre de positifs par type d'HAdV – Génotypage.....	39
Figure 20 : Distribution des positifs par type d'HAdV et par nature de prélèvement – Génotypage.....	40
Figure 21 : Répartition des positifs pour l'HAdV 3 par nature – Génotypage.....	40

Figure 22 : Répartition des positifs pour l’HAdV 2 par nature – Génométypage.....	41
Figure 23 : Distribution des positifs par type d’HAdV et par entité clinique – Génométypage ...	41
Figure 24 : Proportion des différentes entités cliniques par type d’HAdV – Génométypage .....	42
Figure 25 : Distribution des positifs par type et par service hospitalier – Génométypage.....	43
Figure 26 : Répartition des HAdV 1, 2, 3 et 5 par service hospitalier – Génométypage .....	43
Figure 27 : Distribution temporelle des différents types d’HAdV – Génométypage .....	44
Figure 28 : Distribution temporelle par quinzaine des positifs pour les HAdV 2 et 3 prélevés dans les différents SAU de l’APHM – Génométypage .....	45
Figure 29 : Distribution des positifs en qPCR tous HAdV en fonction de la valeur du Ct et du résultat du génométypage associé .....	46
Figure 30 : Distribution des positifs en qPCR tous HAdV en fonction de la valeur du Ct et du résultat de qPCR d’espèce associé .....	47

# RAPPELS HISTORIQUES ET BIBLIOGRAPHIQUES

## 1 GENERALITES

### 1.1 CLASSIFICATION

Les Adénovirus humains (HAdV) sont des virus appartenant au genre *Mastadenovirus* de la famille des *Adenoviridae*. Ils ont pour la 1<sup>ère</sup> fois été involontairement isolés dans des cellules adénoïdes humaines il y a maintenant plus de 60 ans (1).

Historiquement, les méthodes immunologiques de séroneutralisation et d'hémagglutination ont permis de classer les HAdV en 6 espèces (A à F) regroupant un total de 51 sérotypes (2).

Cependant la méthode de classification est différente de nos jours, basée sur le séquençage et l'analyse phylogénétique de régions hypervariables (HVR) de certains gènes du virus. Le premier HAdV identifié de la sorte a également été classé dans une nouvelle espèce (G) et obtenu le génotype (non plus sérotype) numéro 52 (3). Par la suite, de nombreux génotypes supplémentaires ont été identifiés, portant le nombre total de types (sérotypes et génotypes) à 70 (4).

TABLE 1 Current spectrum of published human adenoviruses<sup>a</sup>

Species	Types (serotypes/genotypes)
A	12, 18, 31, 61
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66
C	1, 2, 5, 6, 57
D	8–10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51, 53, 54, 56, 58–60, 63–67
E	4
F	40, 41
G	52

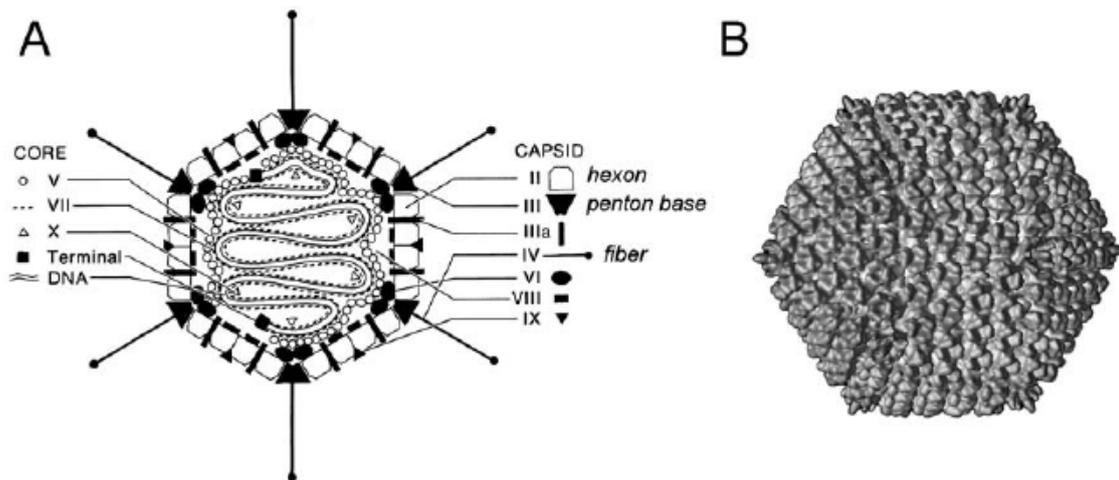
<sup>a</sup> The HAdV species (A to G) and types (1 to 67) belonging to individual species are indicated. While types 1 to 51 were identified by serotyping, all subsequently identified types, indicated in italics (types 52 to 67), were identified by genomic sequencing and computational analysis.

**Figure 1** : Classification des HAdV

*D'après Lion T, 2014.*

## 1.2 STRUCTURE

Il s'agit d'un virus à ADN double-brin unique, non-enveloppé, résistant en milieu extérieur et à capsid icosaédrique (20 faces triangulaires, 30 arêtes et 12 sommets) entourant un complexe ADN-protéine (5). Cette capsid est formée par un assemblage de trois protéines majeures nommées hexon, penton base et fibre (6). Chaque face triangulaire est formée d'un assemblage d'hexons et chaque sommet par le penton base sur lequel est fixée la fibre.



**FIG. 1.** (A) A stylized section of the adenovirus virion, indicating the relative orientations of the protein components and the viral DNA. The core and capsid proteins are listed separately. No actual planar slice through the virion would contain all these components. (Adapted from Stewart and Burnett, 1993). (B) A 15-Å resolution three-dimensional cryo-EM image reconstruction of Ad5 viewed along the 3-fold axis of the icosahedral capsid (C. San Martín, S.D. Fuller, and R.M. Burnett, unpublished results). The trimeric towers of hexon, the major coat protein, create the features visible on the facets. The fiber protrudes from the penton base at each 5-fold vertex. Note that actual fibers are not straight and so their extremities are not related by the symmetry depicted in (A). Only a short portion of the long fiber is visible; the rest is washed out when averaged by the reconstruction process.

**Figure 2 :** Schéma de la structure de l'adénovirus

*D'après Rux et al., 2004.*

## 2 ASPECTS CLINIQUES

### 2.1 MANIFESTATIONS GASTRO-INTESTINALES

Parmi les types d'infections pouvant être causées par les HAdV il y a les infections gastro-intestinales (IGI). Les HAdV sont la 2<sup>ème</sup> cause la plus fréquente de gastro-entérites aiguës (GEA) chez l'enfant de moins de 2 ans derrière les rotavirus (7). Une symptomatologie respiratoire peut être également observée de façon concomitante dans 24,8 à 26,7% des cas (8). Une étude taiwanaise sur une cohorte de 317 enfants hospitalisés atteints d'affection des

voies respiratoires (AVR) à HAdV cite des symptômes gastro-intestinaux (GI) classiques comme la diarrhée (25%), le vomissement (22%) et la douleur abdominale (19%).

De rares cas publiés décrivent des complications de type hépatite (9), pancréatite (10), cholécystite (11) et colite hémorragique (12).

Les HAdV de types 40, 41 (espèce F) et 52 (espèce G) seraient exclusivement à tropisme GI (2).

## 2.2 ATTEINTES RESPIRATOIRES

Les signes cliniques généralement présents dans ces atteintes respiratoires sont la fièvre, la pharyngite, l'amygdalite ainsi que la toux (13). 20% des cas d'AVR à HAdV chez le jeune enfant (en particulier chez le nouveau-né et le nourrisson) se compliquent d'une pneumonie. Toutefois des cas de décès faisant suite à une pneumonie ont été décrits chez l'immunocompétent (IC) de tout âge (14), avec une mortalité associée dépassant parfois les 50% (15) contre 73% pour la pneumonie de l'immunodéprimé (ID) (14).

Aux types 1, 3, 4, 7, 11, 14, 21 et 55 sont associés des cas de pneumonies et de syndromes de détresse respiratoire aiguë (SDRA), le **type 7** apparaissant comme le plus virulent de tous (16).

## 2.3 ATTEINTES OCULAIRES

Les atteintes oculaires causées par les HAdV peuvent donner des tableaux cliniques variés dont : les kératoconjunctivites épidémiques (KCE) (les plus fréquentes), les conjunctivites folliculaires (CF) et les fièvres pharyngoconjonctivales (FPC). L'atteinte unilatérale, l'œil rouge, le larmoiement, l'irritation et la photophobie sont des signes communs aux trois entités (17). A ces symptômes peuvent se rajouter folliculite et atteinte palpébrale pour la CF, atteinte cornéenne pour la KCE et enfin fièvre et pharyngite pour les FPC (18).

Les HAdV 8, 19, 37, 5, 3, 4, 7, 11 et 14 peuvent causer des atteintes oculaires, les 4 premiers types étant plus souvent associés aux KCE (14).

## 2.4 ATTEINTES URINAIRES

Depuis 1974, 43 publications ont fait état de cas d'infections adénovirales du tractus urinaire chez des patients transplantés rénaux chez lesquels les atteintes les plus fréquentes

sont les lésions rénales aiguës (94%), l'hématurie (86%), la fièvre (77%) et la dysurie (53%) (19). Ont également été rapportés des cas de cystites hémorragiques et de rejets de greffe (20) (21) (22).

Les types d'HAdV les plus fréquemment associés aux cystites hémorragiques sont les 3, 7, 11, 21, 34 et 35 (14).

## 2.5 FORMES DISSEMINÉES

Bien que les formes disséminées (FD) soient rares chez l'IC, elles surviennent dans 10 à 30% des cas chez les patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) infectés par l'HAdV (14). Elles sont définies par la seule virémie à HAdV par certains auteurs et par d'autres par l'association de signes cliniques avec la détection du virus chez le patient sur de multiples sites de prélèvements (23).

Dans les populations à risque, notamment en cas de déficit immunitaire congénital ou acquis, greffe allogénique ou autologue de CSH, de transplantation d'organe solide ou d'aplasies post-chimiothérapie, les infections peuvent menacer la survie du patient. La mortalité associée est espèce-dépendante, les HAdV A et C étant les plus létales (tuent respectivement dans 36% et 30% des cas) (24). Pour certains auteurs la mortalité globale dans les FD et dans certaines populations d'ID dépasse parfois même les 60% (25).

Les types 31 de l'espèce A, 11, 34 et 35 de l'espèce B, 1, 2 et 5 de l'espèce C ainsi que 40 et 41 de l'espèce F sont connus pour provoquer des infections disséminées chez l'ID (16) (25).

Forme clinique	Types associés
Formes disséminées chez l'ID	1, 2, 5, 11, 31, 34, 35, 40, 41
Atteintes respiratoires (SDRA et pneumonies compris)	1, 3, 4, 7, 11, 14, 21, 55
Cystites hémorragiques	3, 7, 11, 21, 34, 35
Atteintes GI	40, 41, 52
Atteintes oculaires ( <b>KCE</b> )	3, 4, <b>5</b> , 7, <b>8</b> , 11, 14, <b>19</b> , <b>37</b>

**Figure 3** : Formes cliniques prédominantes selon les types d'HAdV

### 3 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

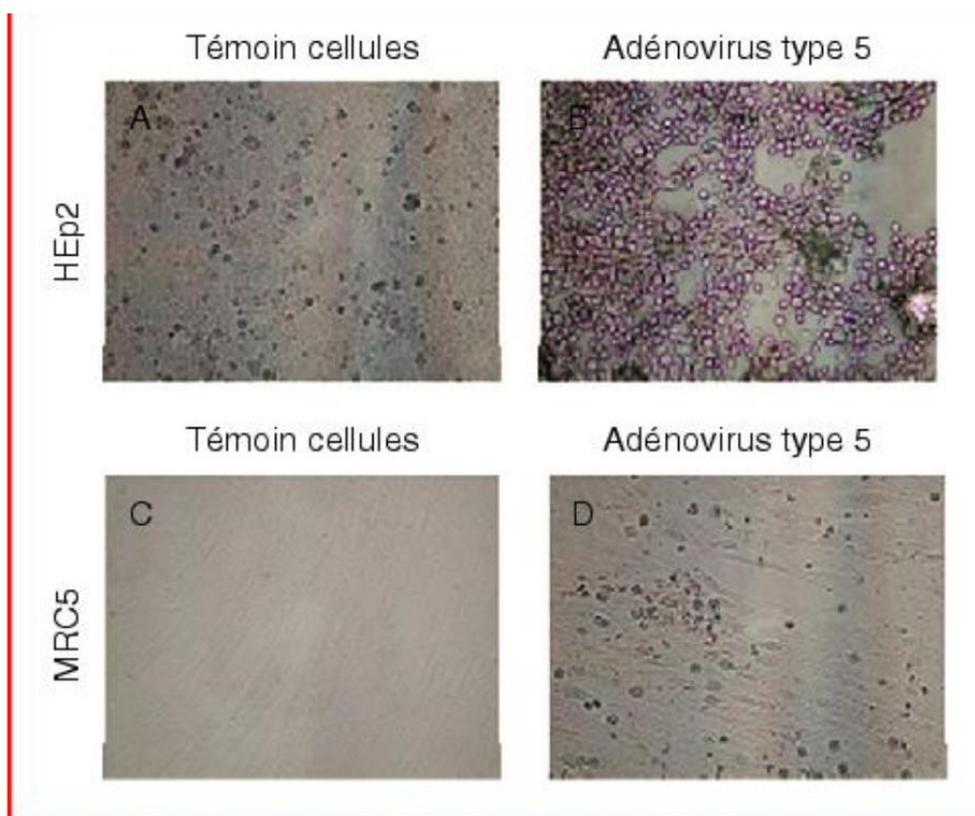
#### 3.1 DIAGNOSTIC DIRECT

##### 3.1.1 Culture cellulaire

L'isolement viral en culture cellulaire est fondé sur l'inoculation de cellules en culture par un échantillon biologique potentiellement infecté par un virus. Il s'agit pour les HAdV de la méthode de référence (26).

Différentes lignées cellulaires sont disponibles pour cette analyse comme les cellules diploïdes MRC5 ou de lignées humaines continues Hep-2, HeLa ou encore KB.

La multiplication virale, ne s'observant que très peu pour les HAdV 40 et 41 voire pas du tout, se traduit par l'apparition d'un effet cytopathique (ECP). Le long délai de rendu du résultat (ECP en 3 à 28 jours) constitue l'une des principales limites de cette méthode (27).



**Figure 4** Effets cytopathiques, observés à l'état frais, produits par un adénovirus de type 5 sur cellules HEp2 et MRC5. Les adénovirus provoquent la formation de grosses cellules rondes, avec généralement, sur lignées continues (HEp2), un aspect en dentelle de la nappe cellulaire, du fait de trous liés à la rétraction du cytoplasme. Sur MRC5, l'ECP se traduit par l'apparition de grandes cellules précédant l'aspect rétracté de la nappe cellulaire.

**Figure 4** : Effets cytopathiques d'un HAdV 5 sur cellules HEp2 et MRC5

*D'après Thouvenot et al., 2004.*

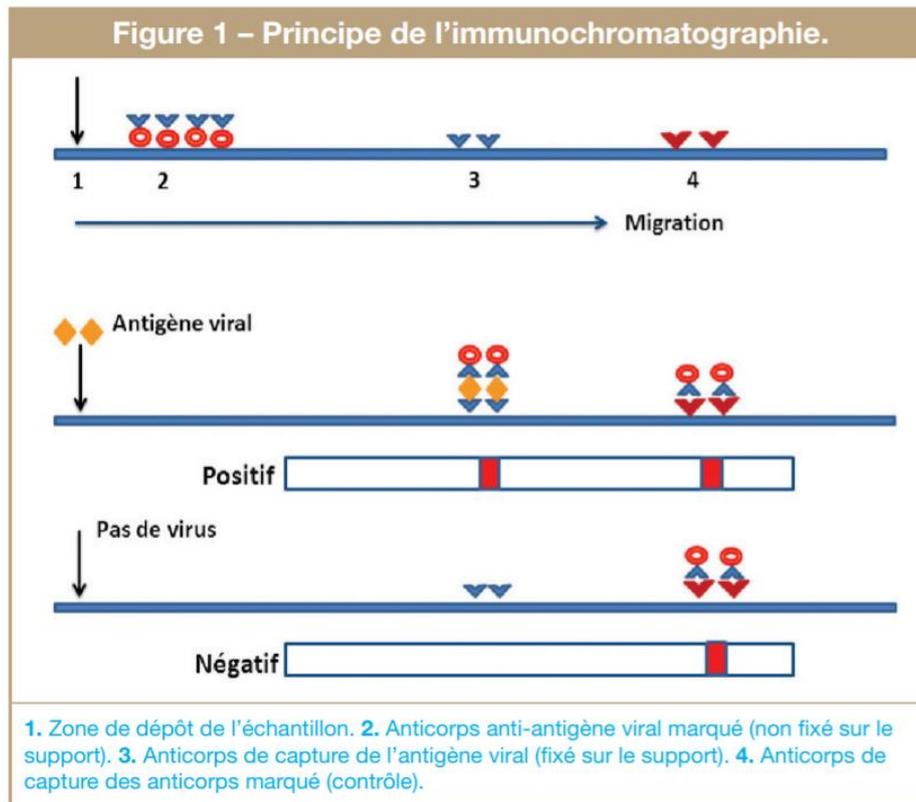
### 3.1.2 Tests de diagnostic rapide (TDR)

Ces tests ont pour avantage, comme leur nom l'indique, de donner un résultat rapidement, dans un délai de l'ordre de quelques minutes. Autre avantage majeur : leur simplicité d'utilisation sous forme de tests unitaires qui permet leur emploi en dehors des laboratoires par du personnel de santé autres que les biologistes et les techniciens de laboratoires.

Il existe des tests pour la détection des infections respiratoires (Adeno Respi Color, Servibio®) qui restent peu utilisés en pratique car peu sensibles mais aussi parce que la prévalence de ces atteintes est faible par rapport à d'autres étiologies virales.

Cependant, les HAdV étant plus fréquemment impliqués dans les tableaux GI, l'utilisation des TDR est beaucoup plus intéressante dans ce type d'atteinte. La sensibilité y est alors meilleure du fait de la présence en grande quantité de virus dans les selles, quelques faux-positifs peuvent néanmoins survenir (28). En revanche les performances des TDR sont meilleures lorsqu'ils sont utilisés pour le diagnostic des GEA du jeune enfant (29). Les trousse commercialisées sont pour la totalité combinées à la recherche d'autres virus responsables de GEA comme les norovirus ou les rotavirus. Ces sont des techniques de choix pour la fastidieuse détection des HAdV 40 et 41 dans les selles (30).

La technique est basée sur la migration de l'antigène, spécifique de l'HAdV (commun à tous les types) présent dans l'échantillon, par capillarité sur un support solide. Cet antigène est arrêté par un anticorps spécifique fixé sur le support sous la forme d'une bande. Le complexe antigène anticorps est ensuite révélé par un deuxième anticorps couplé à une enzyme, ce qui conduit à l'apparition d'une bande colorée. L'apparition d'une deuxième bande dite de contrôle permet de valider la réaction (cf. figure 5).



**Figure 5** : Principe de fonctionnement d’un TDR immunochromatographique

*D’après Segondy, 2015.*

### 3.1.3 Biologie moléculaire

La PCR est une technique hautement sensible utilisée pour la détection de l’ADN viral dans une grande variété d’échantillons biologiques (LCR, sang, biopsies, ...). Cette méthode se situe à mi-chemin entre la lenteur de la culture cellulaire et le manque de sensibilité des TDR. En effet, il s’agit d’une technique à la fois très sensible, spécifique et qui est relativement rapide (environ quelques heures) (31).

Les kits commerciaux de PCR qualitative et quantitative (qPCR) actuellement disponibles utilisent un système d’amorces et de sondes permettant soit la détection des HAdV sans distinction d’espèce ou de génotype, soit la détermination de l’espèce (de A à G) et/ou le génotype (pour la plupart) (32).

L’usage de la qPCR est très intéressant pour la surveillance des patients ID. En effet, il a été démontré que l’élévation de la charge virale ou des taux importants de virémie augmentait à la fois le risque d’infection à HAdV disséminée et la mortalité (33) (34).

Utilisée conjointement avec le séquençage, la PCR permet également le génotypage relativement rapide des HAdV (35).

### 3.2 DIAGNOSTIC INDIRECT OU SEROLOGIE

Il consiste en la détection d'anticorps (IgG ou IgM) dirigés contre un antigène spécifique de l'HAdV par méthode ELISA (peu utilisée) ou par réaction de fixation du complément effectuée avec l'antigène soluble spécifique (peu sensible chez le jeune enfant) (36). Objectiver une infection évolutive par HAdV nécessite d'effectuer deux sérologies suffisamment éloignées dans le temps pour observer une augmentation d'au moins un facteur 4 du titre de l'anticorps (37).

La sérologie est logiquement non informative chez l'ID (31).

En raison de la variété de techniques disponibles aujourd'hui plus performantes que la sérologie, cette dernière est principalement utilisée à des fins épidémiologiques.

## **4 EPIDEMIOLOGIE**

La majorité de la population générale est séropositive pour au moins un type d'HAdV après l'âge de 10 ans (38). Considérant seulement l'HAdV 5, des études ont montré une séroprévalence entre 60 et 70% en Europe et aux Etats-Unis et jusqu'à 98% dans certaines régions tropicales d'Afrique et d'Asie (39). Les HAdV sont responsables de 5 à 10% des infections respiratoires de l'enfant et de 1 à 7% de celles de l'adulte (40).

Aux Etats-Unis, le *National Adenovirus Type Reporting System* (NATRS) montrait que les HAdV 3, 7, 14, 1, 2 et 4 représentaient 85,5% de l'ensemble des cas d'infection à HAdV entre 2003 et 2016 (41).

**TABLE 1. Number and percentage of human adenovirus (HAdV) detections, by species and type — National Adenovirus Type Reporting System, 32 states and the U.S. Virgin Islands, 2003–2016**

HAdV species	HAdV type	No. (%) of detections
A	12	t3 (0.2)
	31	3 (0.2)
B	3*	341 (22.8)
	7*	127 (8.5)
	11	6 (0.4)
	14*	89 (5.9)
	21	34 (2.3)
	34	2 (0.1)
C	35	14 (0.9)
	1*	248 (16.6)
	2*	293(19.6)
	5	56 (3.7)
	6	20(1.3)
D	8	54 (3.6)
	15	1 (0.1)
	19	1 (0.1)
	22	1 (0.1)
	29	1 (0.1)
	37	12 (0.8)
	56	1 (0.1)
	4*	185 (12.4)
E	41	5 (0.3)
F	22	1,497 (100)

\* One of the six most common types detected, accounting for 1,283 (85.5%) of reports.

**Figure 6 :** Proportions des différents types d’HAdV aux Etats-Unis entre 2003 et 2016

*D’après Binder et al., 2017.*

La transmission de l’HAdV peut se faire via exposition à des sujets contaminés et plus précisément, en fonction des types d’atteintes précédemment évoqués, par voie oro-fécale, par voie respiratoire/salivaire ou inoculation conjonctivale. D’autre part, les adénovirus étant résistants en milieu extérieur, l’homme peut aussi être contaminé par contact avec des sources environnementales (eau et surfaces) (16). Des cas de réactivation chez des patients greffés ont également été rapportés (16) (42).

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu’une part non négligeable des sujets ID ayant une virémie à HAdV peut être asymptomatique (entre 22 à 57,8%) (43) (44).

Du fait de leur grande contagiosité, les HAdV sont souvent responsables d’épidémies communautaires mais également d’épidémies en espaces confinés notamment les campements militaires, les services d’hôpitaux ou encore les piscines publiques (14) (16) (41). Ces épidémies ont plutôt tendance à survenir en hiver et en début de printemps (16). C’est d’ailleurs la raison qui a mené au développement en 1971 d’un vaccin *per os*, conférant une immunité efficace contre les HAdV 4 et 7, destiné à l’armée américaine (45).

Les infections par HAdV hors épidémies surviendraient de façon sporadique tout au long de l'année sans variation saisonnière significative (41).

## 5 TRAITEMENT ANTIVIRAL SPECIFIQUE

Dans la grande majorité des cas chez le sujet IC, les infections par HAdV sont spontanément résolutive. Néanmoins chez l'ID (notamment en cas de déficit immunitaire congénital ou acquis, greffe allogénique ou autologue de CSH, de transplantation d'organe solide ou d'aplasies post-chimiothérapie) ces infections peuvent devenir très graves voire quelquefois mortelles (46). Dans ce cas précis l'emploi d'un traitement antiviral spécifique est fortement recommandé.

A l'heure actuelle, une efficacité *in vitro* anti-adénovirale a été démontrée pour le ganciclovir, la ribavirine et le cidofovir.

La ribavirine est un analogue de guanosine actif à la fois sur des virus à ADN et ARN. Cependant des études menées sur des cohortes d'enfants greffés en CSH présentant une virémie à HAdV ont montré une activité *in vivo* insuffisante de cette molécule (31).

Il en va de même pour le ganciclovir, à en croire la rareté des publications scientifiques montrant son efficacité dans les essais cliniques.

Le cidofovir est donc le seul antiviral réputé suffisamment efficace contre la virémie à HAdV de l'immunodéprimé. En effet, l'*European Conference on Infections in Leukaemia* (ECIL), recommande en 2012 aux cliniciens de traiter tous les patients greffés en CSH virémiques de façon préemptive, c'est-à-dire à partir du moment où l'on détecte l'ADN viral dans le sang périphérique, qu'il y ait ou non des signes d'infection.

Malgré cela, l'efficacité du cidofovir est à mettre en balance avec le fait que les études qui la démontre ont été menées sur des populations trop hétérogènes et de petites tailles. De plus, la mortalité associée à l'HAdV chez les patients ID varie de 23 à 50 % malgré l'instauration d'un traitement préemptif. Enfin, de nombreux cas de négativations spontanées (en dehors de tout traitement antiviral spécifique) de la charge virale sanguine ont été publiés.

# MATERIEL ET METHODES

## 1 ECHANTILLONS CLINIQUES

210 échantillons positifs pour l'HAdV ont été recueillis au sein du laboratoire de Virologie de l'Institut Hospitalo-Universitaire –Méditerranée Infection (IHU).

Ces échantillons proviennent de 197 patients âgés de 1 mois à 88 ans (âge médian : 2 ans). 109 patients étaient de sexe masculin et 88 de sexe féminin, hospitalisés ou consultants au cours de la période du 25 janvier 2017 au 18 janvier 2018.

Parmi ces échantillons, il y avait une majorité de prélèvements de l'arbre respiratoire (aspiration bronchique, lavages broncho-alvéolaires, aspirations naso-pharyngées, crachats, prélèvements nasaux, écouvillonnages des voies aériennes supérieures) mais aussi un liquide de drainage thoracique, des échantillons de sang total et de selles, des écouvillonnages rectaux, cornéens ainsi que des urines. Les échantillons de selles de l'étude proviennent uniquement des services d'hospitalisation de l'Assistance-Publique-Hôpitaux-de-Marseille (APHM), les selles originaires des services d'urgences ayant été analysées seulement par TDR au laboratoire.

La positivité des échantillons ainsi collectés a été établie par qPCR dans les 24 heures suivant la date de prélèvement, au sein de ce même laboratoire. Ces prélèvements ont par la suite été conservés à -80°C dans des cryotubes de 1.8 mL.

## 2 EXTRACTION DE L'ADN

Après décongélation à température ambiante, les extractions ont été réalisées à partir d'une prise d'essai de 200 µL, soit directement pour les échantillons liquides peu visqueux, soit obtenus après dilution dans la solution tampon AVE (QIAGEN®) pour les échantillons solides et liquides visqueux. Le système automatisé utilisé était le QIAcube HT (QIAGEN®) associé au kit d'extraction/purification référencé QIAamp 96 DNA QIAcube HT.

Suite à l'extraction, les plaques d'extraits ont été conservés à -20°C.

### 3 PCR EN TEMPS REEL

#### 3.1 PREPARATION DES MILIEUX REACTIONNELS

Le kit EXPRESS One-Step SuperScript® qRT-PCR universal (référence ThermoFischer n°11781-200, Invitrogen®) a été utilisé lors de ces PCR. Il comprend les 3 modules suivants :

- EXPRESS SuperScript® Mix (1 mL)
- EXPRESS qPCR SuperMix Universal (5 mL)
- ROX Reference Dye (500 µL)

Avant toute chose, 10 µL de ROX ont été incorporés aux 5 mL de qPCR SuperMix.

Pour une réaction, 10 µL de qPCR SuperMix ont été ajoutés à 0,6 µL d'eau distillée stérile RNase-Free (référence BIO-RAD 54154) et à 2 µL de SuperScript® Mix. Ainsi que les éléments suivants spécifiques de chaque système (en solution fille de 10 µM), 1 µL d'amorce sens, 1 µL d'amorce anti-sens, 0,4 µL de sonde fluorescente et enfin 5 µL d'extrait ADN. Tout ceci formait un volume réactionnel total de 20 µL.

	<b>Volume (µL) pour 1 réaction</b>
qPCR SuperMix	10
SuperScript® Mix	2
Eau distillée stérile	0,6
Amorce sens (10µM)	1
Amorce anti-sens (10µM)	1
Sonde (10µM)	0,4
Extrait ADN	5

**Figure 7** : Récapitulatif du contenu du milieu réactionnel – qPCR tous HAdV et d'espèce

Dans un premier temps, le système tous HAdV a été testé pour vérifier la positivité des échantillons (47). Ensuite, chaque système d'espèce (A, B, C, D, E, F) a été réalisé sur l'ensemble des échantillons (48).

#### 3.2 REACTION ET LECTURE DES RESULTATS

La réaction d'amplification et l'analyse des résultats de ces préparations ont été réalisées pour une partie des échantillons par CFX96 Touch® Real-Time PCR Detection

System (BIO-RAD) et par QuantStudio® 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) pour l'autre.

## 4 TYPAGE

### 4.1 PREPARATION DES MILIEUX REACTIONNELS

Comme décrites par Lu et al. en 2006 (49), les amorces utilisées pour l'amplification de la HVR1-6 du gène de l'hexon sont celles correspondant aux références Ad2 GenBank (numéro d'accès BK000407) : AdhexF1 (nt 19135–19160 ; 5'-TICTTTGACATTCGIGGIGTICTIGA-3') et AdhexR1 (nt 20009–20030 ; 5'-CTGTCIACIGCCTGRTTCCACA-3').

Conformément aux recommandations du fournisseur, pour un volume réactionnel total de 25 µL, un volume de 12,5 µL du kit AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems®) a été ajouté à 8,5 µL d'eau distillée stérile (BIO-RAD), 0,5 µL d'amorce sens, 0,5 µL d'amorce anti-sens et enfin à 3 µL d'extrait ADN.

### 4.2 REACTION ET LECTURE DES RESULTATS

L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®) selon les paramètres suivants :

- Etape de dénaturation à 95°C pendant 5 min
- 40 cycles de 95°C pendant 15 s, 45°C pendant 30 s, 72°C pendant 1 min
- Etape d'élongation à 72 °C pendant 7 min.

Ces produits de PCR primaires ont été déposés après dilution volume à volume par témoin de charge sur gel d'agarose à 2% UltraPure® (Invitrogen®) pour migration électrophorétique pendant 45 min. Le contrôle de la réussite de l'amplification a été objectivé sur le système manuel de documentation de gels InGenius (Syngene®).

Tous les produits de PCR ont ensuite été purifiés en plaque sur le système Nucleofast® 96 PCR – vacuum processing (Macherey – Nagel).

	<b>Volume (µL) pour 1 réaction</b>
AmpliTaq Gold® 360 Master Mix	12,5
Eau distillée stérile	8,5
Amorce sens	0,5
Amorce anti-sens	0,5
Extrait ADN	3

**Figure 8** : Récapitulatif du contenu du milieu réactionnel – PCR de génotypage

## **5 SEQUENÇAGE SANGER**

### **5.1 REACTION DE SEQUENÇAGE**

Pour une réaction, à 4 µL de produit PCR de génotypage purifiés ont été ajoutés :

- 1,5 µL de BigDye® Terminator v1.1, v3.1 Sequencing Buffer (Applied Biosystems®)
- 1 µL de BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems®)
- 0,5 µL d'amorce Forward (AdhexF1) ou d'amorce Reverse (AdhexR1) et vice-versa (2 puits réactionnels par échantillon)
- 3 µL d'eau distillée stérile

L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®) selon les paramètres suivants :

- Etape de dénaturation à 94°C pendant 4 min
- 45 cycles de 94°C pendant 2 min, 45°C pendant 45 s, 72°C pendant 1 min
- Etape d'élongation à 72°C pendant 5 min.

### **5.2 PURIFICATION**

Après dilution au demi par ajout de 10µL d'eau distillée stérile des produits de séquençage ainsi obtenus, ceux-ci ont été purifiés en plaque par filtration en gel à l'aide de la résine GE Healthcare Sephadex™ G-50 Medium.

### 5.3 LECTURE DES SEQUENCES

La lecture des fragments résultant de la réaction de séquençage a été réalisée par électrophorèse capillaire sur le 3500xL Genetic Analyzer (référence ThermoFisher® n°4406016).

### 5.4 ANALYSE LOGICIELLE DES SEQUENCES

Les paires de séquences par échantillon ainsi obtenues ont été corrigées, analysées puis transformées en séquences consensus grâce au logiciel Sequencher®. Ces séquences consensus ont été ensuite blastées sur la base de données publique américaine du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

# RESULTATS

## 1 CHARGE VIRALE

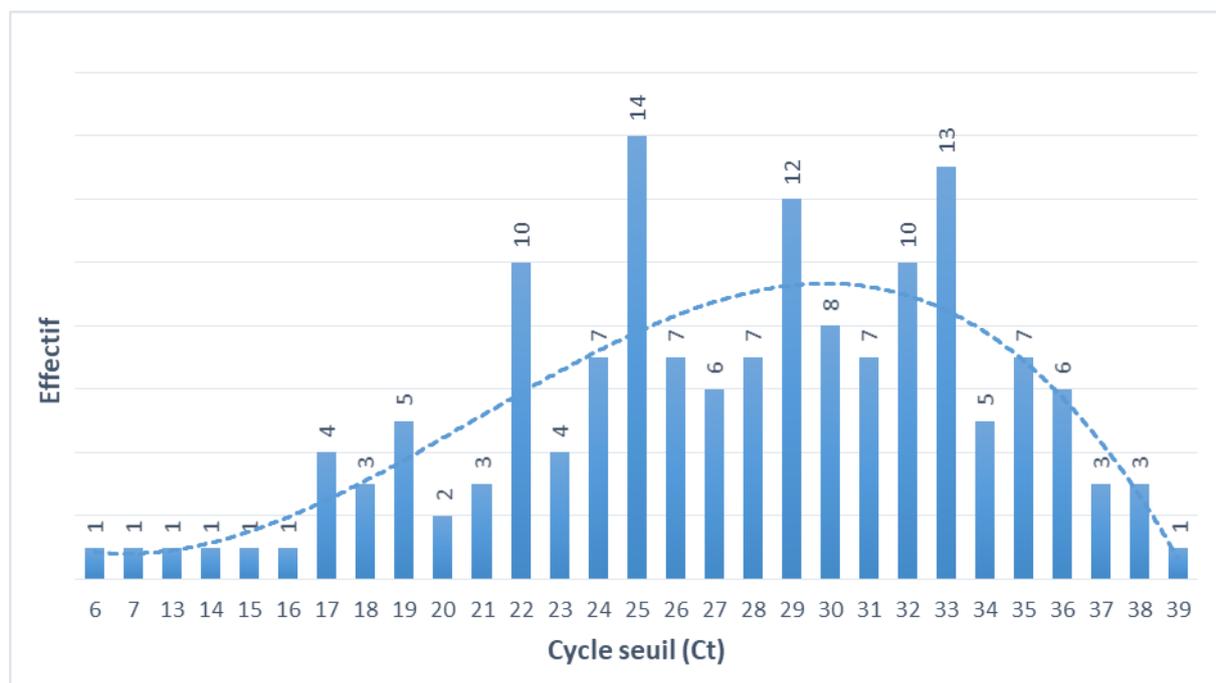
### 1.1 RESULTATS POSITIFS

Sur les 210 échantillons collectés dans la biobanque du laboratoire de Virologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Timone, 14 ont été éliminés pour des raisons pré-analytiques diverses (tubes vides, doublons par patient). Pour plusieurs prélèvements originaires d'un même patient pendant le même séjour hospitalier, le plus ancien est celui qui a été retenu.

La qPCR tous HAdV faite sur les 196 prélèvements restants a confirmé la positivité de 153 échantillons, ce qui représente **78% du total analysé**.

### 1.2 DISTRIBUTION DE LA CHARGE VIRALE

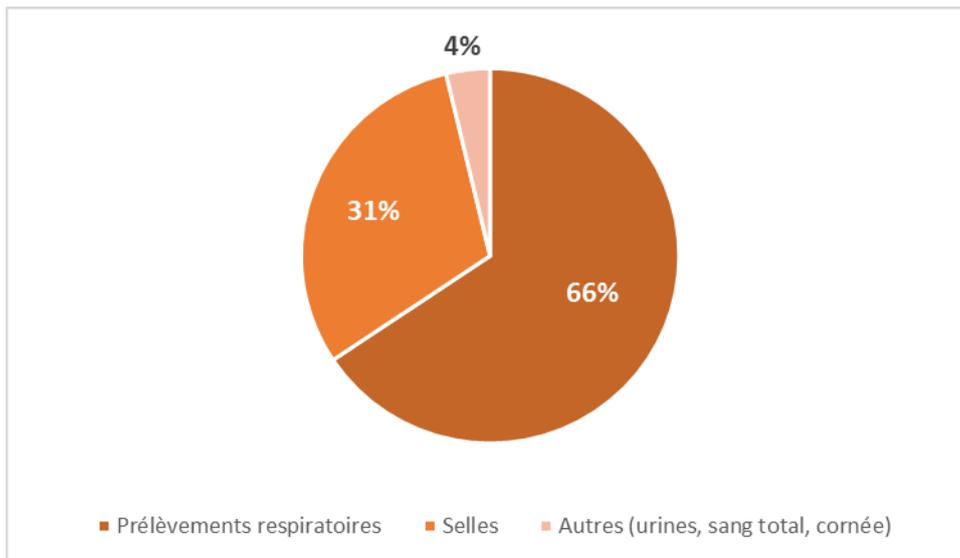
Les cycles seuils (Ct) mesurés pour ces échantillons positifs tous HAdV varient entre 6 et 39, 88% des échantillons étant compris entre 18 et 36 Ct.



**Figure 9** : Distribution des positifs selon le cycle seuil – qPCR tous HAdV

### 1.3 REPARTITION PAR NATURE

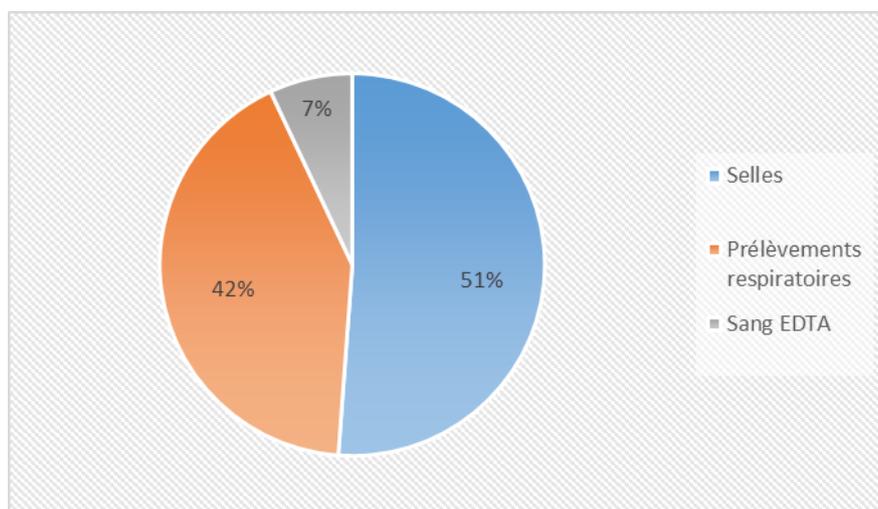
Les 153 échantillons positifs ont été prélevés pour la majorité à partir (66%) des voies respiratoires (écouvillonnages naso-pharyngés, lavages broncho-alvéolaires, crachats) et des selles (31%). Les autres prélèvements toutes natures confondues représentent 4% de la totalité de ces échantillons.



**Figure 10** : Répartition des positifs par nature – qPCR tous HAdV

### 1.4 RESULTATS NEGATIFS

Sur les 196 échantillons analysés, 43 étaient négatifs en qPCR tous HAdV, **soit 22%**. Ces négatifs étaient pour la majorité des échantillons de selles (51%) et de fluides respiratoires (42%).



**Figure 11** : Répartition des négatifs par nature – qPCR tous HAdV

## 2 ESPECES

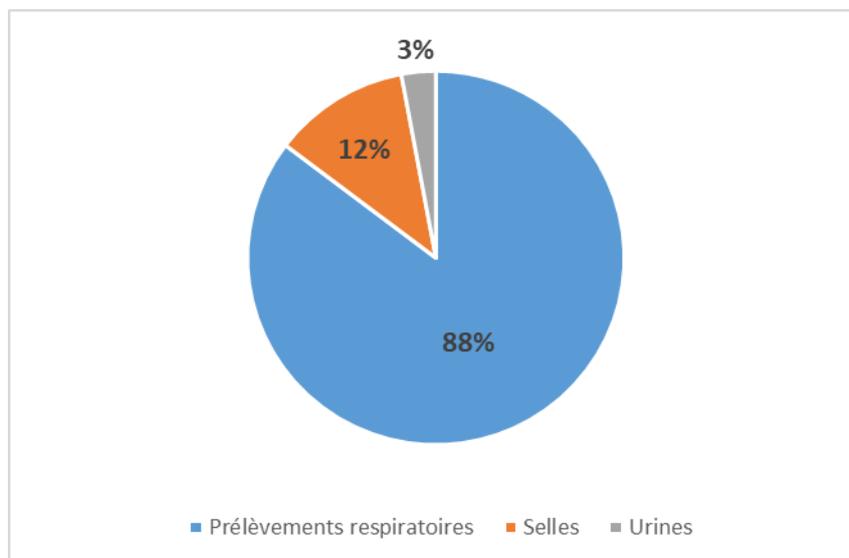
### 2.1 DISTRIBUTION DES ESPECES

L'espèce a pu être déterminée sans difficulté sur 109 des 196 prélèvements initialement étudiés. On retrouve une réactivité croisée pour 16 échantillons. En effet, les résultats croisaient entre 2 voire 3 espèces d'HAdV. Le génotypage réalisé par la suite sur ces échantillons avait permis de résoudre l'incertitude sur 12 d'entre eux, 4 n'ayant pas pu être amplifiés (cf. annexe page 57). Les résultats combinés de la qPCR d'espèce et la PCR de génotypage ont permis d'observer la répartition globale suivante des espèces, sur un total de **125 positifs (soit 64% du total analysé)** :

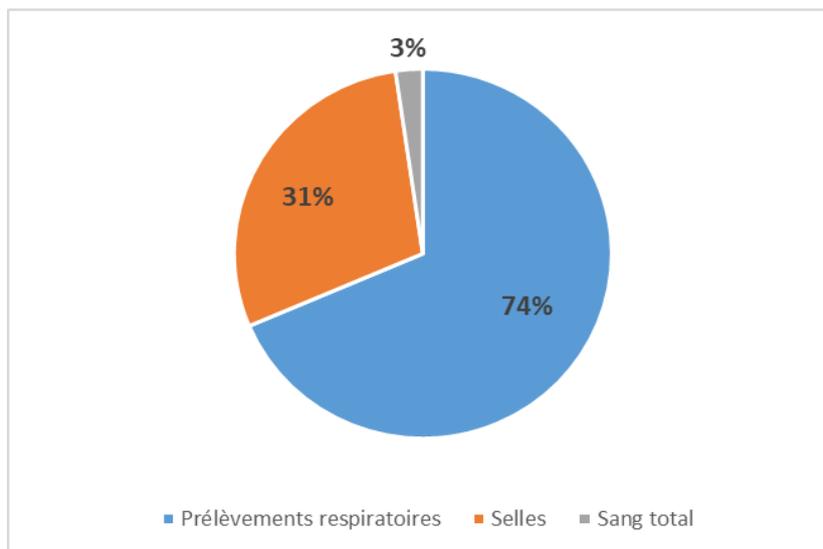
- **80 HAdV C**
- **33 HAdV B**
- **3 HAdV A**
- **2 HAdV D**
- **2 HAdV E**
- **5 HAdV F.**

### 2.2 REPARTITION PAR NATURE

En ce qui concerne les HAdV C, parmi les 80 échantillons positifs, il y avait une majorité (74%) de prélèvements respiratoires et de selles (31%). La proportion de prélèvements respiratoires était plus importante pour les HAdV B (88%).



**Figure 12** : Répartition des HAdV B par nature de prélèvement – qPCR d'espèce



**Figure 13** : Répartition des HAdV C par nature de prélèvement – qPCR d'espèce

La totalité (n = 8) des HAdV A et F provenaient de selles.

Sur les deux HAdV D, l'un a été isolé dans un prélèvement oculaire tandis que l'autre à partir d'un lavage broncho-alvéolaire. Sur les 2 HAdV E, l'un provenait d'une selle et l'autre d'un prélèvement respiratoire (cf. tableau ci-après).

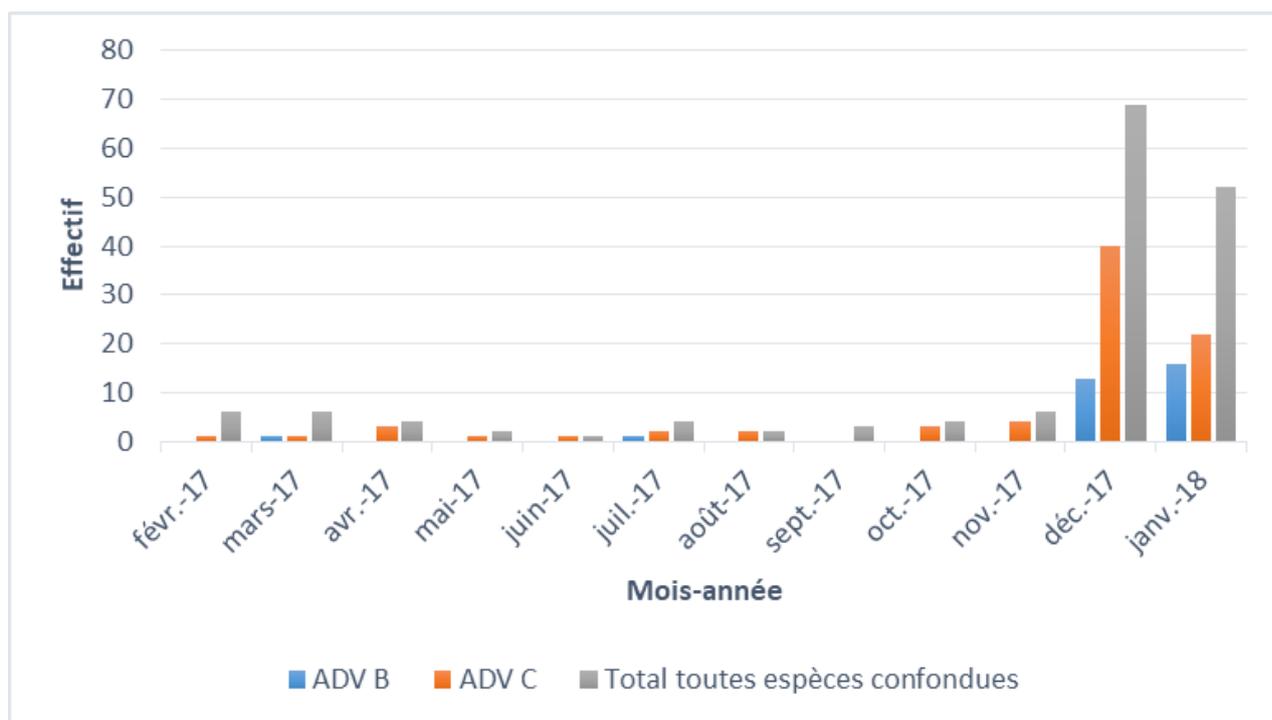
Nature de prélèvement	Effectif			
	ADV A	ADV D	ADV E	ADV F
Selle	3	0	1	5
Prélèvement oculaire	0	1	0	0
LBA	0	1	0	0
Prélèvement respiratoire	0	0	1	0
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>

**Figure 14** : Distribution des HAdV A, D, E et F selon la nature de prélèvement – qPCR d'espèce

### 2.3 TEMPORALITE

Pendant les mois de décembre 2017 et janvier 2018, on observe une nette augmentation des HAdV B et C, représentant à eux deux (n = 91) la très grande majorité des positifs toutes espèces confondues sur ces deux mois successifs, soit 95%.

Du fait de la faible taille des échantillons, l'analyse temporelle indépendante pour les autres espèces (A, D, E et F) n'a pas été réalisée (cf. figure 16).



**Figure 15** : Distribution temporelle des HAdV B, C et toutes espèces confondues – qPCR d’espèce

Mois-année	Effectif												Total
	Févr 17	Mars 17	Avr 17	Mai 17	Juin 17	Juil 17	Août 17	Sept 17	Oct 17	Nov 17	Déc 17	Janv 18	
AdV A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
AdV D	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2
AdV E	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
AdV F	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	1	5

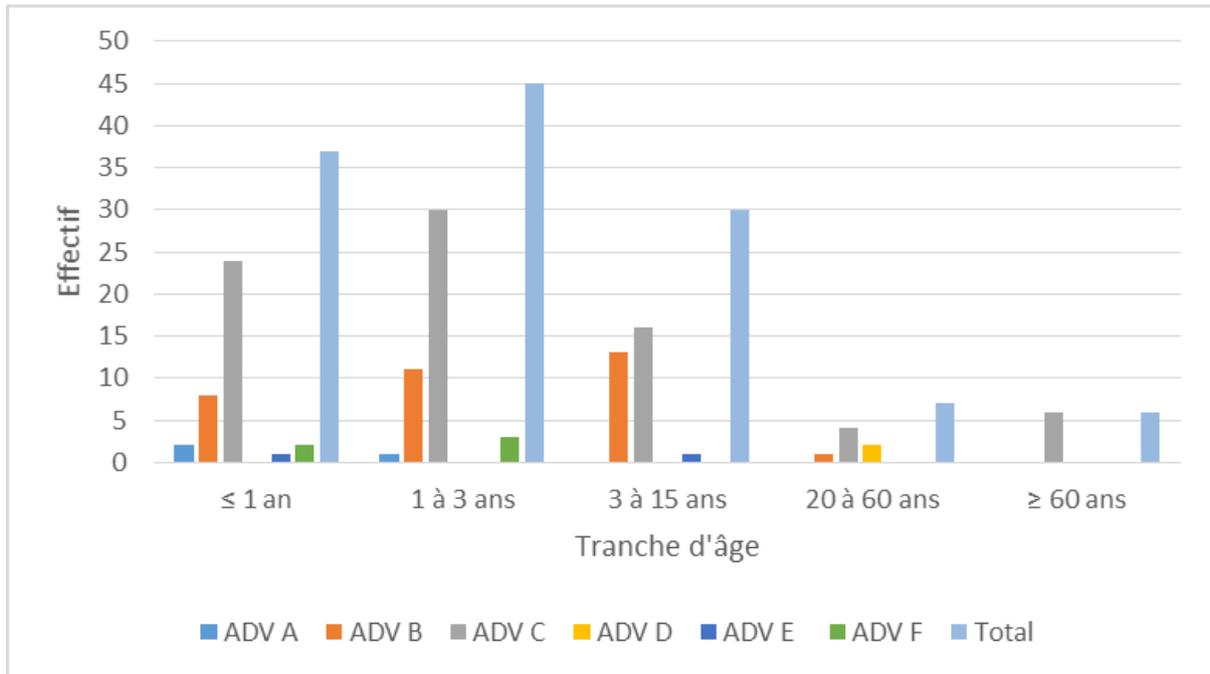
**Figure 16** : Distribution temporelle des HAdV A, D, E et F – qPCR d’espèce

#### 2.4 DISTRIBUTION PAR TRANCHE D’AGE

Nous observons que 89,6% des prélèvements positifs en qPCR d’espèce proviennent de patients de moins de 15 ans.

Le nombre le plus élevé d’échantillons HAdV C positif (n = 30) est issu de patients âgés de 1 à 3 ans quand la majorité des HAdV B émane de patients âgés de 3 à 15 ans.

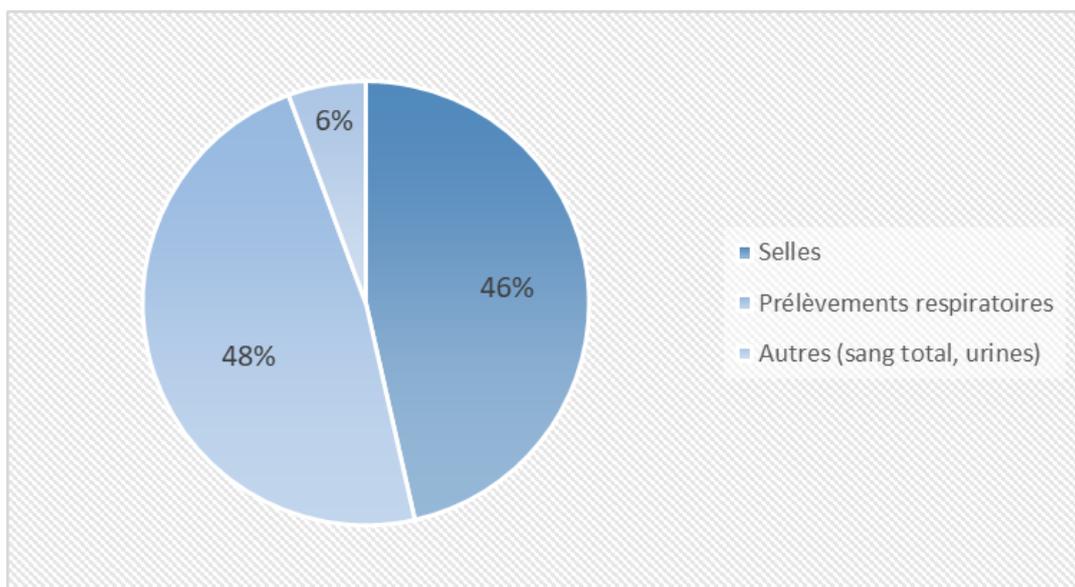
On observe également que les prélèvements HAdV C positifs isolés chez les patients de plus de 60 ans sont plus nombreux que ceux provenant des patients de la tranche d’âge précédente (20 à 60 ans).



**Figure 17** : Répartition par tranche d'âge des espèces d'HAdV – qPCR d'espèce

## 2.5 RESULTATS NEGATIFS

Tous les négatifs en qPCR tous HAdV étaient également négatifs en qPCR d'espèce (n = 43). Cependant, 28 échantillons positifs en qPCR tous HAdV étaient négatifs en qPCR d'espèce, portant le total d'échantillons négatifs dans cette dernière technique à 71, soit **36% du total analysé**. La figure 18 ci-dessous présente la répartition parmi ces 71 échantillons, des différentes natures de prélèvements.



**Figure 18** : Répartition des négatifs par nature – qPCR d'espèce

### 3 GENOTYPAGE

#### 3.1 DISTRIBUTION DES GENOTYPES

Pour la totalité des **153** échantillons contrôlés positifs par qPCR tous HAdV, l'amplification du gène de l'hexon par PCR a été réalisée. Cette amplification a été réussie pour **82 (soit 54% du total amplifié)** d'entre eux. Parmi les 82 produits de PCR ainsi obtenus, **72 (soit 88% du total séquencé)** ont été séquencés avec succès.

L'analyse bio-informatique de ces séquences a montré les résultats suivants :

Espèce	Type	Effectif	Total
A	31	1	1
	3	24	29
B	7	4	
	11	1	
C	1	8	36
	2	21	
	5	7	
D	-	-	-
E	4	2	2
F	40	1	4
	41	3	

**Figure 19** : Nombre de positifs par type d'HAdV – Génotypage

On observe une majorité de HAdV 3 (33%) et de HAdV 2 (29%).

Les différents types d'HAdV retrouvés sont les 3, 7 et 11 pour l'espèce B ; les 1, 2 et 5 pour l'espèce C ; le 31 pour l'espèce A ; le 4 pour l'espèce E ainsi que les 40 et 41 pour l'espèce F.

Aucun type de l'espèce D n'a été retrouvé.

#### 3.2 REPARTITION PAR NATURE

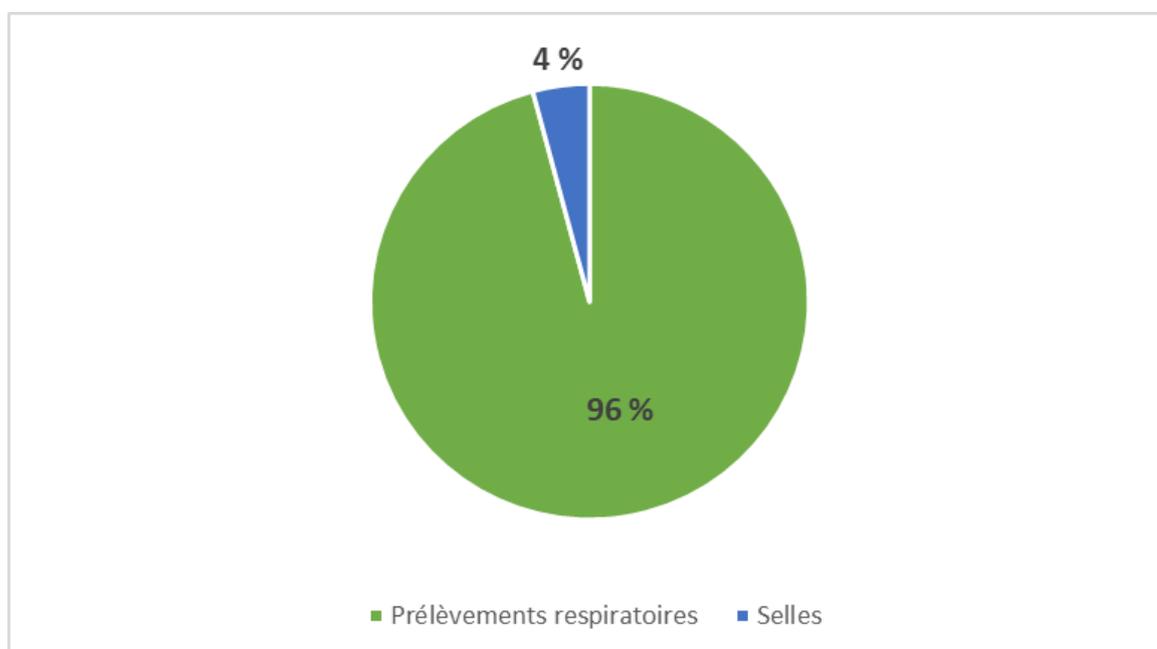
La totalité (n = 5) des HAdV 31, 40 et 41 ont été isolés à partir de selles. L' HAdV 11 est le seul à avoir été isolé à dans un prélèvement urinaire. Les HAdV 1, 2, 3, 4, 5 et 7 ont été

retrouvés à la fois dans des prélèvements des voies respiratoires et dans des selles, en proportions variables (cf. figure 20).

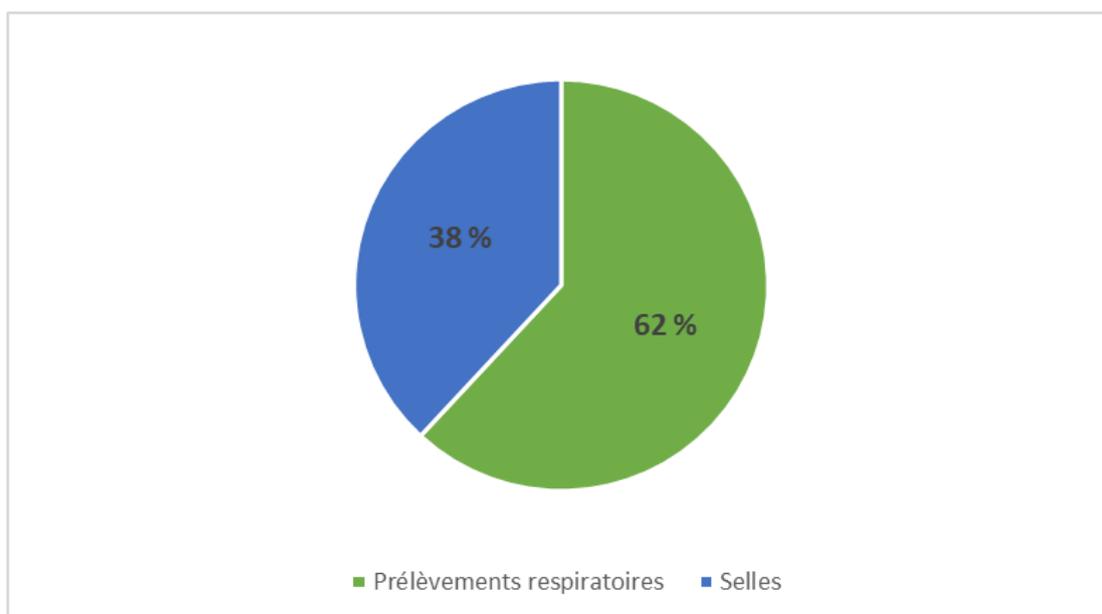
Nature de prélèvement	Effectif									
	ADV 1	ADV 2	ADV 3	ADV 4	ADV 5	ADV 7	ADV 11	ADV 31	ADV 40	ADV 41
Respiratoire	5	13	23	1	3	2	0	0	0	0
Selles	3	8	1	1	4	2	0	1	1	3
Urine	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>21</b>	<b>24</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>

**Figure 20** : Distribution des positifs par type d’HAdV et par nature de prélèvement – Génotypage

La grande majorité (96%) des HAdV 3 a été isolée à partir de prélèvements respiratoires. Pour le total des échantillons HAdV 2 positifs, la proportion de prélèvements respiratoires s’élève à 62%, ils sont retrouvés également dans les selles dans 38% des cas, contre 4% pour les HAdV 3.



**Figure 21** : Répartition des positifs pour l’HAdV 3 par nature – Génotypage



**Figure 22** : Répartition des positifs pour l'HAdV 2 par nature – Génotypage

### 3.3 REPARTITION PAR ENTITE CLINIQUE

La quasi-totalité des HAdV 31, 40 et 41 ont été retrouvés chez des patients présentant uniquement des signes GI. Seul un des trois HAdV 41 a été isolé chez un patient IC asymptomatique au décours d'un écouvillonnage rectal de contrôle.

Pour ce qui est de l'HAdV 7, l'ensemble des 4 échantillons positifs (2 selles et 2 écouvillons respiratoires) ont été prélevés sur des patients IC présentant une symptomatologie respiratoire. Parmi ces patients deux avaient une pneumonie, l'un d'eux est décédé par la suite.

Les échantillons provenant de patients asymptomatiques représentent 11% du total des positifs. La concomitance de signes respiratoires et GI a été retrouvée chez des patients HAdV 1, 2, 3 et 4 positifs (7%).

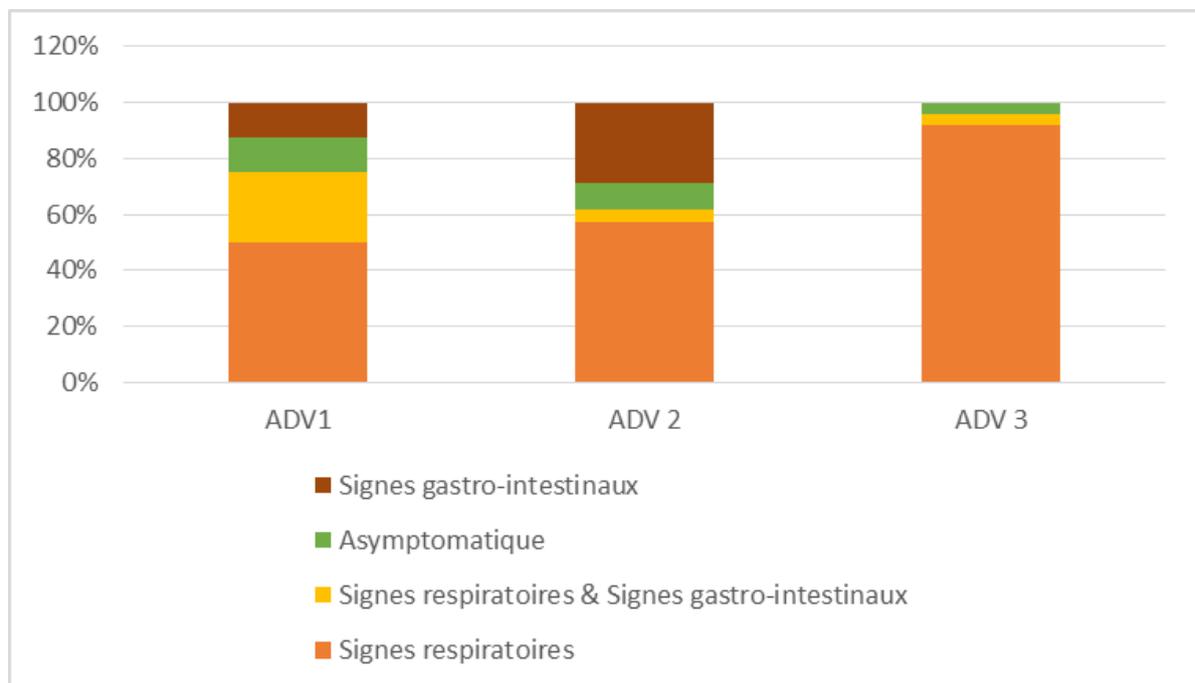
Entité clinique	Effectif									
	ADV 1	ADV 2	ADV 3	ADV 4	ADV 5	ADV 7	ADV 11	ADV 31	ADV 40	ADV 41
Signes respiratoires	4	12	22	1	3	4	0	0	0	0
Signes respiratoires & GI	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Asymptomatique	1	2	1	0	2	0	1	0	0	1
Signes GI	1	6	0	0	2	0	0	1	1	2
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>21</b>	<b>24</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>

**Figure 23** : Distribution des positifs par type d'HAdV et par entité clinique – Génotypage

Les patients présentant exclusivement des signes respiratoires ont fourni 63% du total des positifs présentés dans la figure 23. Les HAdV 2 et 3 en représentent à eux deux la grande majorité (74%).

Il est intéressant de noter que les HAdV 3 ont pour la plupart été isolés sur des patients à symptomatologie respiratoire (92%) alors que parmi les patients HAdV 2 positifs, 57% présentaient des signes respiratoires et 29% des signes GI.

Les prélèvements effectués sur des patients présentant uniquement des signes GI (n = 13) constituent quant à eux 18% du total, l'HAdV 2 étant le plus représenté (46%).



**Figure 24** : Proportion des différentes entités cliniques par type d'HAdV – Génotypage

### 3.4 REPARTITION PAR SERVICE HOSPITALIER

Les prélèvements originaires des services d'accueil des urgences (SAU) de l'APHM ont fourni 67% du total des échantillons séquencés avec succès (n = 72), contre 10% pour les services d'hospitalisation pour greffés et 24% pour les autres services d'hospitalisation.

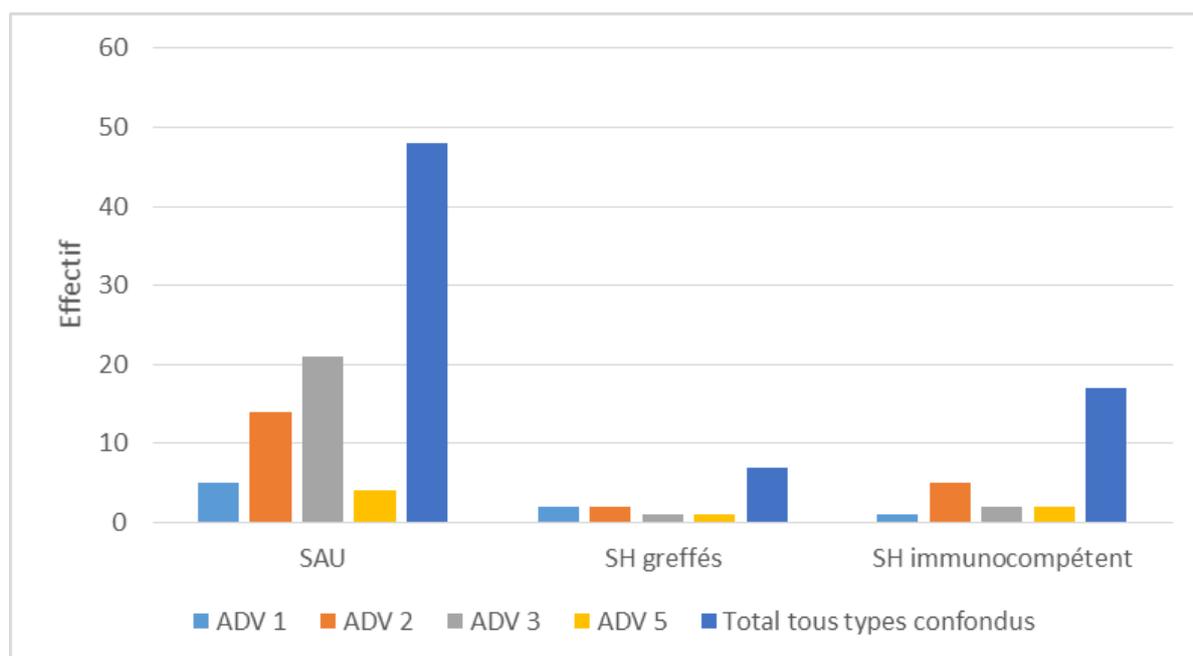
Les HAdV 1, 2 et 3 représentent à eux trois plus de 83% du total des échantillons collectés chez les patients admis dans ces services. Par ailleurs ils représentent 71% (n = 5) du total des échantillons prélevés chez les ID hospitalisés, contre 47% (n = 8) du total chez les hospitalisés IC.

Les 5 échantillons HAdV 2 positifs présentés dans la figure 25 ont tous été isolés chez des sujets IC et hospitalisés au sein de différents services de soin. 3 de ces prélèvements ont été réalisés au cours du même mois (décembre 2017).

Les 3 échantillons HAdV 41 positifs ont également été prélevés dans différents services.

Services hospitaliers	Effectif									
	ADV 1	ADV 2	ADV 3	ADV 4	ADV 5	ADV 7	ADV 11	ADV 31	ADV 40	ADV 41
SAU	5	14	21	1	4	2	0	1	0	0
SH greffés	2	2	1	0	1	0	1	0	0	0
SH immunocompétent	1	5	2	1	2	2	0	0	1	3
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>21</b>	<b>24</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>

**Figure 25** : Distribution des positifs par type et par service hospitalier – Génométypage



**Figure 26** : Répartition des HAdV 1, 2, 3 et 5 par service hospitalier – Génométypage

### 3.5 TEMPORALITE

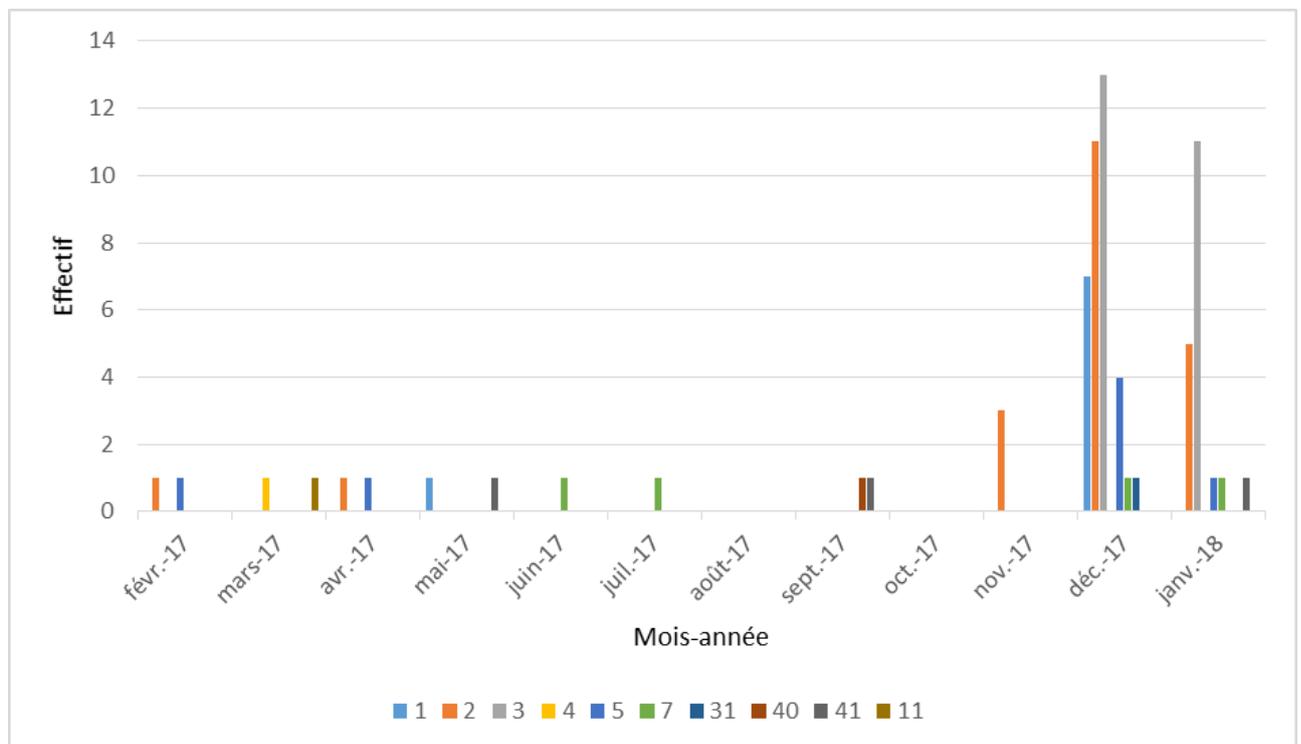
Les échantillons positifs prélevés entre novembre 2017 et janvier 2018 représentent 82% du total des échantillons typés avec succès.

Quasiment la totalité des 60 échantillons positifs pour les HAdV 1, 2, 3 et 5 (n = 55) sont répartis dans cette même période. L' HAdV 2 y est retrouvé en grand nombre (n = 19). L'ensemble des positifs à HAdV 3 (n = 24) sont observés les mois de décembre 2017 et janvier 2018. Plus précisément, on observe une augmentation des échantillons HAdV 2 et 3 positifs à partir de décembre 2017 jusqu'à mi-janvier 2018.

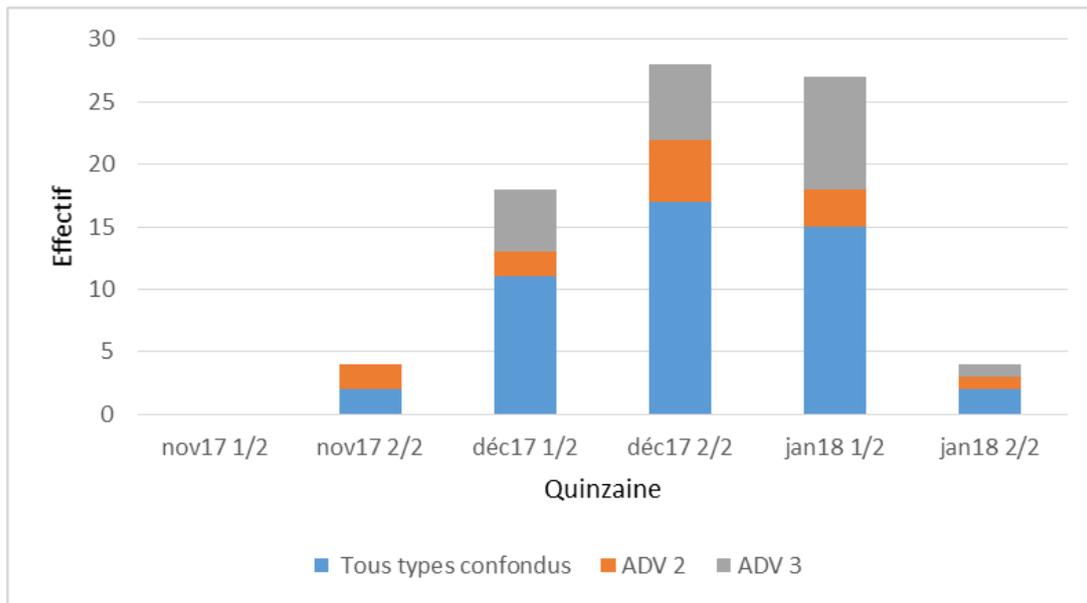
L' HAdV 1 quant à lui est retrouvé principalement (n = 7) en décembre 2017 et une fois en mai 2017.

Aucun des 6 échantillons prélevés en août et en octobre de l'année 2017 n'a donné de positifs en typage.

Le reste de l'année, les HAdV 1, 2, 4, 5, 7, 40, 41 et 11 sont retrouvés de façon sporadique (cf. figure 27).



**Figure 27** : Distribution temporelle des différents types d'HAdV – Génotypage



**Figure 28** : Distribution temporelle par quinzaine des positifs pour les HAdV 2 et 3 prélevés dans les différents SAU de l’APHM – Génomique

### 3.6 RESULTATS NEGATIFS

Sur le total de 196 échantillons retenus pour l’étude, 114 n’ont pas été amplifiés avec succès (58%) lors de la réaction de typage. Le séquençage a échoué pour 10 échantillons parmi les 82 amplifiés dans l’étape précédente, soit pour 12% d’entre eux.

# DISCUSSIONS

## 1 ASPECTS TECHNIQUES

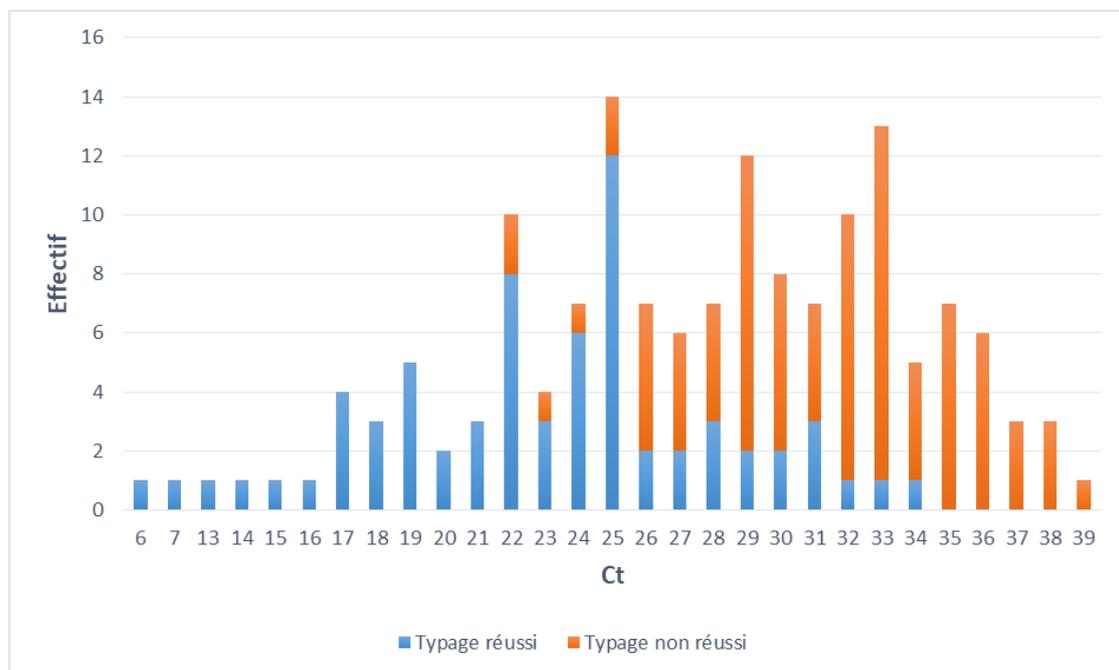
### 1.1 RENDEMENTS

#### 1.1.1 Génompage

Nous remarquons sur le graphique ci-dessous que pour l'ensemble des échantillons pour lesquels la qPCR tous HAdV a donné un Ct strictement inférieur à 22, les génotypages ont réussi. *A contrario* pour des valeurs de Ct strictement supérieures à 34, tous ont échoué. Sur les 110 échantillons situés entre 22 et 34 Ct, 46 (42%) ont pu aboutir à un génotypage.

Au total, 45% (n = 69) de l'ensemble des échantillons avaient une charge virale suffisante pour la réussite du génotypage. Sur les 55% (n = 84) restants, 93% avaient des Ct supérieurs ou égaux à 26.

Au vu de toutes ces données, nous pouvons donc penser que plus les charges virales sont élevées (plus les Ct sont bas), plus les chances de réussite du génotypage sont importantes.

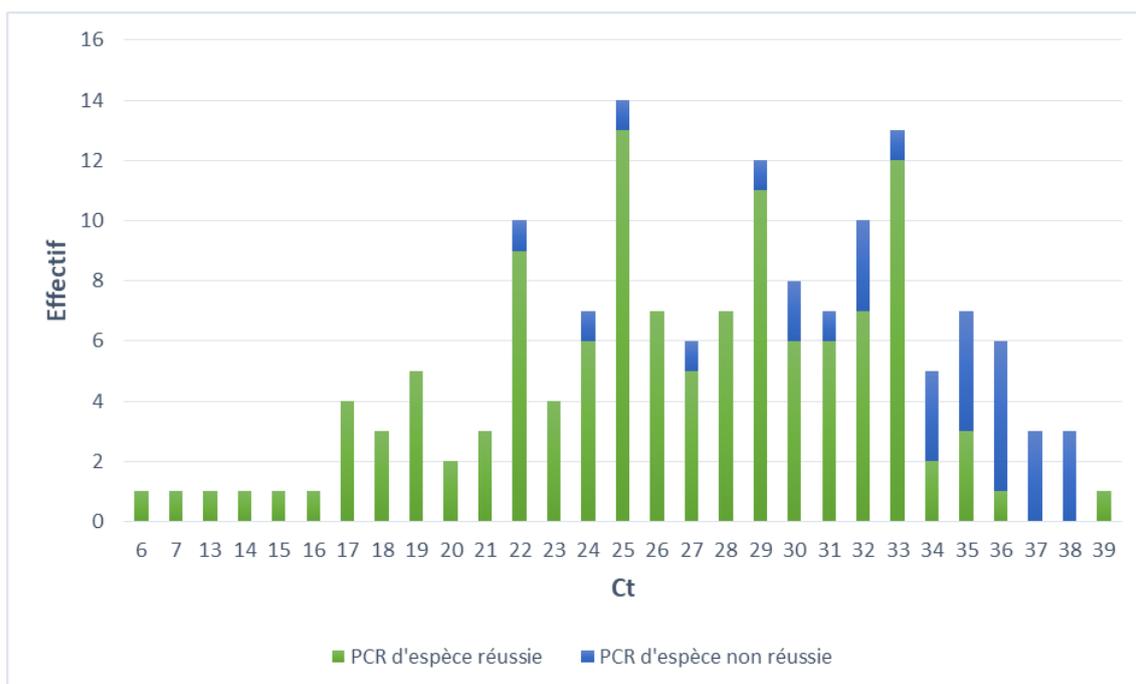


**Figure 29** : Distribution des positifs en qPCR tous HAdV en fonction de la valeur du Ct et du résultat du génotypage associé

### 1.1.2 qPCR d'espèce

La totalité des échantillons de Ct inférieur ou égal à 21 ont vu leur détermination d'espèce réussir. Cette réussite s'observe aussi pour la grande majorité (88%) des échantillons de Ct strictement inférieur à 34.

Nous constatons donc, dans une moindre mesure par rapport au génotypage, l'importance de la charge virale dans la réussite de la qPCR d'espèce.



**Figure 30** : Distribution des positifs en qPCR tous HAdV en fonction de la valeur du Ct et du résultat de qPCR d'espèce associé

### 1.2 REACTIONS CROISEES

La qPCR d'espèce employée lors de cette étude n'est pas parfaitement spécifique. En effet, nous avons vu précédemment que des réactions croisées en qPCR d'espèce étaient survenues sur 16 échantillons et que le génotypage avait été réussi sur 12 d'entre eux. 11 de ces génotypages étaient en accord avec l'espèce retrouvée avec le Ct le plus bas (cf. annexe page 57).

Ce constat permet à l'avenir de trancher lors d'une difficulté d'interprétation en faveur du résultat donné avec la valeur la plus faible de Ct, ce que nous sommes déjà tentés de faire intuitivement, avec un risque de faire erreur une fois sur 12.

### 1.3 INTERET DE LA PCR NESTED

Si elle avait été utilisée, la PCR nested aurait permis d'augmenter la taille de la population d'étude. En effet, la haute sensibilité de cette technique permet le rattrapage de résultats rendus faussement négatifs en qPCR et PCR primaire dus à leurs seuils de détection ou quantification insuffisamment bas.

C'est dans cette perspective que Ciçek *et al.* en 2012 (50) ou encore Barnadas *et al.* en 2018 (51) ont utilisé cette méthode pour suppléer les principales lorsqu'elles atteignaient leurs limites, sans pour autant détailler leurs résultats. Le peu de données publiées nous viennent de Qiu *et al.* en 2018, qui comparaient une technique de qPCR à une PCR nested : 138 échantillons respiratoires contrôlés HAdV-positifs par une tierce technique l'étaient également en PCR nested contre 133 pour la qPCR (52).

## 2 ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES

Cette étude, tout comme d'autres déjà publiées (53), montre que les jeunes enfants sont les plus touchés par les infections à HAdV (majorité des échantillons obtenus chez des patients de 1 à 3 ans). En effet, Barnadas *et al.* ont observé, lors d'une étude qui a recensé quelques 664 échantillons HAdV-positifs entre 2011 et 2016 au Danemark, une médiane d'âge des patients prélevés de 1,5 à 3,5 ans (51).

D'autre part, de nombreux auteurs s'accordent à dire que, mis à part les épidémies nosocomiales et communautaires qui ont tendance à apparaître en hiver et début de printemps, les infections à HAdV surviennent de façon sporadique sans variation saisonnière significative (16) (53). Or cette étude montre une très nette augmentation de cas d'HAdV 2 et 3 les mois de décembre 2017 et janvier 2018 (en hiver donc) aux urgences pédiatriques, ce qui est probablement la conséquence d'une épidémie communautaire.

Un autre point intéressant à souligner est la forte proportion de symptômes GI associés à tous les types d'HAdV de l'espèce C par rapport à ce que l'on observe entre autres avec les HAdV B. Pour les HAdV C et surtout de type 2, le tableau clinique type GI est souvent prédominant. Ils représentent respectivement 69% et 46% de l'ensemble des prélèvements effectués chez des patients (surtout enfants) présentant une symptomatologie GI exclusive. Toutefois ces pourcentages sont à vérifier ultérieurement dans une étude qui analyserait

l'ensemble des échantillons de selles reçus au laboratoire afin d'estimer avec plus de précision la proportion des autres espèces d'HAdV (notamment l'espèce F).

En comparaison, au cours de la période allant de juin à novembre 2017, Qiu *et al.* ont mené une étude dans laquelle ont été typés 79 échantillons de selles prélevés chez des enfants présentant un tableau de GEA. Ils ont montré alors que l'HAdV 2 constituait la 4<sup>ème</sup> étiologie (8%) derrière les HAdV 40 et 41 (57%) et étonnamment l'HAdV 3 (30%) (4). Par ailleurs dans le travail mené par Barnadas *et al.* la proportion d'HAdV F était de 21% (51). Nous remarquons dans notre étude que la proportion d'HAdV F est faible (5%) par rapport à d'autres. Cette sous-estimation peut être expliquée par notre biais de sélection portant sur les selles non incorporées à notre étude : une grande partie des échantillons ont uniquement été analysés par TDR, quel qu'en soit le résultat.

# CONCLUSION

Notre étude visait principalement à déterminer les caractéristiques épidémiologiques des infections à HAdV diagnostiqués dans les différents services de l'APHM au cours de la période du 25 janvier 2017 au 18 janvier 2018.

Elle nous a permis de rapporter sur un relativement grand nombre d'échantillons, l'association entre les différentes espèces ou types avec la nature des prélèvements et la symptomatologie clinique, mais également d'estimer l'âge des individus de la population générale les plus touchés par le virus. Par ailleurs, ce travail a aussi confirmé l'existence d'épidémies communautaires survenant préférentiellement en hiver et qu'en dehors de ces situations, les infections à HAdV surgissent de façon sporadique.

Le point faible de cette étude est encore une fois le biais de sélection portant sur les échantillons de selles prélevés devant les tableaux cliniques de GEA, sous-estimant certainement la proportion d'HAdV de l'espèce F par rapport aux autres.

Bien que les échantillons étudiés soient en nombre conséquent, ils n'ont été collectés que sur une période d'un an. Il serait donc intéressant à l'avenir de réitérer cette analyse sur une durée de plusieurs années dans le but d'en confirmer les résultats et de les agrémenter, ou l'inverse. Les pics de positifs s'observeront-ils de nouveau ? Apparaîtront-ils la même saison ? De quels types seront-ils faits ? Autant de questions auxquelles il serait plaisant de pouvoir répondre.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* déc 1953;84(3):570-3.
2. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol.* mars 2014;4(1):26-33.
3. Jones MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, dela Cruz WP, Riedel B, et al. New Adenovirus Species Found in a Patient Presenting with Gastroenteritis. *J Virol.* juin 2007;81(11):5978-84.
4. Qiu F-Z, Shen X-X, Li G-X, Zhao L, Chen C, Duan S-X, et al. Adenovirus associated with acute diarrhea: a case-control study. *BMC Infect Dis.* 3 sept 2018;18(1):450.
5. Valentine RC, Pereira HG. Antigens and structure of the adenovirus. *J Mol Biol.* août 1965;13(1):13-20.
6. Ginsberg HS, Pereira HG, Valentine RC, Wilcox WC. A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits. *Virology.* avr 1966;28(4):782-3.
7. Fischer TK, Rungoe C, Jensen CS, Breindahl M, Jørgensen TR, Nielsen J-P, et al. The burden of rotavirus disease in Denmark 2009-2010. *Pediatr Infect Dis J.* juill 2011;30(7):e126-129.
8. Tabain I, Ljubin-Sternak S, Cepin-Bogović J, Markovinović L, Knezović I, Mlinarić-Galinović G. Adenovirus respiratory infections in hospitalized children: clinical findings in relation to species and serotypes. *Pediatr Infect Dis J.* juill 2012;31(7):680-4.
9. Schaberg KB, Kambham N, Sibley RK, Higgins JPT. Adenovirus Hepatitis: Clinicopathologic Analysis of 12 Consecutive Cases From a Single Institution. *Am J Surg Pathol.* juin 2017;41(6):810-9.
10. Bateman CM, Kesson AM, Shaw PJ. Pancreatitis and adenoviral infection in children after blood and marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* déc 2006;38(12):807-11.
11. Hedderwick SA, Greenson JK, McGaughy VR, Clark NM. Adenovirus cholecystitis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* avr 1998;26(4):997-9.

12. Symeonidis N, Jakubowski A, Pierre-Louis S, Jaffe D, Pamer E, Sepkowitz K, et al. Invasive adenoviral infections in T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: high mortality in the era of cidofovir. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* juin 2007;9(2):108-13.
13. Ryan MAK, Gray GC, Smith B, McKeenan JA, Hawksworth AW, Malasig MD. Large epidemic of respiratory illness due to adenovirus types 7 and 3 in healthy young adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 mars 2002;34(5):577-82.
14. Lynch JP, Fishbein M, Echavarría M. Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med.* août 2011;32(4):494-511.
15. Hakim FA, Tleyjeh IM. Severe adenovirus pneumonia in immunocompetent adults: a case report and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* févr 2008;27(2):153-8.
16. Lynch JP, Kajon AE. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med.* 2016;37(4):586-602.
17. Omari AA, Mian SI. Adenoviral keratitis: a review of the epidemiology, pathophysiology, clinical features, diagnosis, and management. *Curr Opin Ophthalmol.* juill 2018;29(4):365-72.
18. Bowling B, Kanski JJ. *Kanski's clinical ophthalmology: a systematic approach.* 8. ed. s.l.: Elsevier; 2016. 917 p. (Expert consult).
19. Veer M, Abdulmassih R, Como J, Min Z, Bhanot N. Adenoviral nephritis in a renal transplant recipient: Case report and literature review. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* août 2017;19(4).
20. Ferreira GF, Oliveira RA, Lucon M, de Paula FJ, Lucon AM, Ianhez LE, et al. Hemorrhagic cystitis secondary to adenovirus or herpes simplex virus infection following renal transplantation: four case reports. *Transplant Proc.* déc 2009;41(10):4416-9.
21. Koga S, Shindo K, Matsuya F, Hori T, Kanda S, Kanetake H. Acute hemorrhagic cystitis caused by adenovirus following renal transplantation: review of the literature. *J Urol.* avr 1993;149(4):838-9.

22. Yagisawa T, Nakada T, Takahashi K, Toma H, Ota K, Yaguchi H. Acute hemorrhagic cystitis caused by adenovirus after kidney transplantation. *Urol Int.* 1995;54(3):142-6.
23. Matthes-Martin S, Feuchtinger T, Shaw PJ, Engelhard D, Hirsch HH, Cordonnier C, et al. European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* déc 2012;14(6):555-63.
24. Engelmann I, Coiteux V, Heim A, Magro L, Dewilde A, Dulery R, et al. Severe Adenovirus Pneumonia Followed by Bacterial Septicaemia: Relevance of Co-Infections in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Infect Disord Drug Targets.* 2016;16(1):69-76.
25. Echavarría M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev.* oct 2008;21(4):704-15.
26. A. Goffard. Culture cellulaire et virologie. Intérêts et applications de la culture cellulaire en virologie. *Biol Médicale [Internet].* 2011; Disponible sur: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0000-0000\(11\)55409-9](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0000-0000(11)55409-9)
27. Thouvenot D, Billaud G, Morfin F. Actualité de la culture cellulaire et de son application au diagnostic des infections virales. *Virologie.* 1 juill 2004;8(4):297-309.
28. Levent F, Greer JM, Snider M, Demmler-Harrison GJ. Performance of a new immunochromatographic assay for detection of adenoviruses in children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* févr 2009;44(2):173-5.
29. De Grazia S, Bonura F, Pepe A, Li Muli S, Cappa V, Collura A, et al. Performance analysis of two immunochromatographic assays for the diagnosis of rotavirus infection. *J Virol Methods.* 2017;243:50-4.
30. Segondy M. Les tests de diagnostic rapide des viroses respiratoires et des gastroentérites virales: intérêts et limites. *Rev Francoph Lab.* 1 juill 2015;2015(474):45-50.
31. Matthes-Martin S, Boztug H, Lion T. Diagnosis and treatment of adenovirus infection in immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther.* oct 2013;11(10):1017-28.
32. Dooms M, Chango A, Abdel-Nour A. [Quantitative PCR (qPCR) and the guide to good practices MIQE: adapting and relevance in the clinical biology context]. *Ann Biol Clin (Paris).* juin 2014;72(3):265-9.

33. Echavarria M, Forman M, van Tol MJ, Vossen JM, Charache P, Kroes AC. Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR. *Lancet Lond Engl*. 4 août 2001;358(9279):384-5.
34. Lion T, Baumgartinger R, Watzinger F, Matthes-Martin S, Suda M, Preuner S, et al. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood*. 1 août 2003;102(3):1114-20.
35. Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, Schnurr DP, Russell KL, Kajon AE, et al. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 nov 2007;45(9):1120-31.
36. Société française de microbiologie, Groupe Révir. *Le Révir: référentiel en virologie médicale*. Montmorency, France: 2M2; 2000. 113-114 p.
37. Horwitz MS. Adenoviruses. Dans: *Fields Virology*. 3rd ed, Fields BN, Knipe DM, Howley PM, éditeurs. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. 2160 p.
38. Pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of adenovirus infection - UpToDate [Internet]. [cité 5 oct 2018]. Disponible sur: [https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-epidemiology-and-clinical-manifestations-of-adenovirus-infection?search=adenovirus&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-epidemiology-and-clinical-manifestations-of-adenovirus-infection?search=adenovirus&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
39. Yu B, Zhou Y, Wu H, Wang Z, Zhan Y, Feng X, et al. Seroprevalence of neutralizing antibodies to human adenovirus type 5 in healthy adults in China. *J Med Virol*. sept 2012;84(9):1408-14.
40. Lee YJ, Prockop SE, Papanicolaou GA. Approach to adenovirus infections in the setting of hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Infect Dis*. août 2017;30(4):377-87.
41. Binder AM, Biggs HM, Haynes AK, Chommanard C, Lu X, Erdman DD, et al. Human Adenovirus Surveillance - United States, 2003-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 6 oct 2017;66(39):1039-42.

42. Zheng X, Lu X, Erdman DD, Anderson EJ, Guzman-Cottrill JA, Kletzel M, et al. Identification of adenoviruses in specimens from high-risk pediatric stem cell transplant recipients and controls. *J Clin Microbiol.* janv 2008;46(1):317-20.
43. Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* juill 2014;27(3):441-62.
44. Grimley MS, Chemaly RF, Englund JA, Kurtzberg J, Chittick G, Brundage TM, et al. Brincidofovir for Asymptomatic Adenovirus Viremia in Pediatric and Adult Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* mars 2017;23(3):512-21.
45. Clemmons NS, McCormic ZD, Gaydos JC, Hawksworth AW, Jordan NN. Acute Respiratory Disease in US Army Trainees 3 Years after Reintroduction of Adenovirus Vaccine 1. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(1):95-8.
46. Serrano RM, Darragh RK, Parent JJ. Successful treatment of disseminated adenovirus infection with cidofovir and intravenous immunoglobulin in an infant following heart transplant. *Cardiol Young.* juin 2018;28(6):888-9.
47. Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol.* juin 2003;70(2):228-39.
48. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol.* nov 2004;42(11):5189-98.
49. Lu X, Erdman DD. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Arch Virol.* août 2006;151(8):1587-602.
50. Çiçek C, Sanlıdağ T, Akçalı S, Sayan M, Yalaz M, Metin DY. [Molecular typing of adenoviruses isolated from clinical specimens by PCR and DNA sequencing methods]. *Mikrobiyol Bul.* oct 2012;46(4):607-13.
51. Barnadas C, Schmidt DJ, Fischer TK, Fonager J. Molecular epidemiology of human adenovirus infections in Denmark, 2011-2016. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* juill 2018;104:16-22.

52. Qiu F-Z, Shen X-X, Zhao M-C, Zhao L, Duan S-X, Chen C, et al. A triplex quantitative real-time PCR assay for differential detection of human adenovirus serotypes 2, 3 and 7. *Virology*. 2018;15(1):81.
53. Ison MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 août 2006;43(3):331-9.

Echantillon	Résultat PCR d'espèce 1 (Ct)	Résultat PCR d'espèce 2 (Ct)	Résultat PCR d'espèce 3 (Ct)	Résultat Génotypage (Type / espèce)
1	A (12)	C (22)		31 / A
2	B (16)	C (33)		3 / B
3	B (17)	F (21)		3 / B
4	B (21)	C (30)		3 / B
5	B (22)	E (23)		4 / E
6	B (25)	C (28)		3 / B
7	B (22)	C (26)		3 / B
8	B (28)	C (31)		3 / B
9	B (12)	E (16)	D (33)	11 / B
10	C (25)	B (32)		Négatif
11	C (29)	B (40)		Négatif
12	C (30)	B (33)		Négatif
13	D (27)	C (34)		Négatif
14	E (20)	F (24)		4 / E
15	F (11)	E (20)		41 / F
16	F (25)	E (26)		40 / F

**Annexe** : Réactions croisées en qPCR d'espèce et les résultats de génotypage correspondants

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.*

## RESUME

Les HAdV appartiennent au genre *Mastadenovirus* de la famille des *Adenoviridae*. Ils constituent un ensemble vaste et varié de 7 espèces divisées en plus de 70 types connus à ce jour pouvant être responsables de nombreuses affections différentes, parmi lesquelles les gastro-entérites aiguës et les infections des voies respiratoires.

A l'heure actuelle, leur diagnostic biologique consiste le plus souvent en l'analyse par tests de diagnostic rapide ou par biologie moléculaire des échantillons de selles ou de fluides respiratoires de patients atteints.

L'objectif de ce mémoire est de réaliser d'une part un état des lieux épidémiologique des espèces et types d'HAdV ayant circulé à Marseille au cours de l'année calendaire 2017 et d'autre part une évaluation des techniques disponibles de diagnostic par PCR. Ce travail fut réalisé grâce à l'analyse à la fois par deux systèmes de qPCR, par PCR standard et enfin par séquençage Sanger sur les quelques 196 échantillons cliniques positifs (provenant d'autant de patients différents) collectés au cours de la période en question dans les différents services cliniques de l'APHM.

L'analyse a permis de démontrer entre autre que les enfants sont plus souvent touchés que les adultes (médiane d'âge : 2 ans) et qu'une épidémie communautaire constituée d'HAdV de type 2 et 3 a eu lieu entre décembre 2017 et mi-janvier 2018. Du point de vue technique ce travail a également montré qu'en cas de réaction croisée en qPCR d'espèce, le résultat à retenir était dans 92% des cas celui associé au Ct le plus bas.

Cette étude pourra servir à l'avenir de base pour d'autres réalisées sur un nombre plus important d'échantillons et sur de plus longues périodes.