



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

+1PH/N/2007/205.D

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2007

FACULTE DE PHARMACIE

**PRISE EN CHARGE VIROLOGIQUE
DU RISQUE INFECTIEUX A ADENOVIRUS
CHEZ LES PATIENTS ALLOGREFFES
DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES**

THESE



Présentée et soutenue publiquement

Le 17 juillet 2007

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Hélène JEULIN**
né le 27 novembre 1979 à Lure (70)

Membres du Jury

Président : Madame le Professeur C. Finance

Juges : Madame le Professeur S. Gangloff
Monsieur le Professeur P. Bordigoni
Madame S. Henn-Ménétré
Madame le Docteur V. Venard (Directeur)



UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2007

FACULTE DE PHARMACIE

**PRISE EN CHARGE VIROLOGIQUE
DU RISQUE INFECTIEUX A ADENOVIRUS
CHEZ LES PATIENTS ALLOGREFFES
DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 17 juillet 2007

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Hélène JEULIN**
né le 27 novembre 1979 à Lure (70)

Membres du Jury

Président : Madame le Professeur C. Finance

Juges : Madame le Professeur S. Gangloff
Monsieur le Professeur P. Bordigoni
Madame S. Henn-Ménétré
Madame le Docteur V. Venard (Directeur)



Membres du personnel enseignant 2006/2007

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Filière officine

Gérald CATAU

Responsables de la Filière industrie

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

Responsable de la Filière hôpital

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne

Mlle GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. LOPPINET Vincent

M. MIRJOLET Marcel

M. MORTIER François

M. PIERFITTE Maurice

M. SCHWARTZBROD Louis

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

M. SIEST Gérard

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Mme FUZELLIER Marie-Claude

Mlle IMBS Marie-Andrée

M. MONAL Jean-Louis

Mme POCHON Marie-France

Mme ROVEL Anne

Mme WELLMAN-ROUSSEAU Marie Monica

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain

M. ATKINSON Jeffrey

M. AULAGNER Gilles

M. BAGREL Alain

M. BLOCK Jean-Claude

Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine

Mme FINANCE Chantal

Mme FRIANT-MICHEL Pascale

Mlle GALTEAU Marie-Madeleine

M. HENRY Max

M. JOUZEAU Jean-Yves

M. LABRUDE Pierre

M. LALLOZ Lucien

Mme LARTAUD Isabelle

Mme LAURAIN-MATTAR Dominique

M. LEROY Pierre

M. MAINCENT Philippe

M. MARSURA Alain

M. MERLIN Jean-Louis

M. NICOLAS Alain

M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard

M. RIHN Bertrand

Mme SCHWARTZBROD Janine

M. SIMON Jean-Michel

M. VIGNERON Claude

Pharmacie clinique

Pharmacologie cardiovasculaire

Pharmacie clinique

Biochimie

Santé publique

Pharmacologie cardiovasculaire

Virologie, immunologie

Mathématiques, physique, audioprothèse

Biochimie clinique

Botanique, mycologie

Bioanalyse du médicament

Physiologie, orthopédie, maintien à domicile

Chimie organique

Pharmacologie

Pharmacognosie

Chimie physique générale

Pharmacie galénique

Chimie thérapeutique

Biologie cellulaire oncologique

Chimie analytique

Chimie thérapeutique

Biochimie

Bactériologie, parasitologie

Economie de la santé, législation pharmaceutique

Hématologie, physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Communication et santé
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	BOURRA Cédric	Physiologie
M.	CATAU Gérard	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, organisation animale
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique, mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Mme	Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique
M.	François DUPUIS	Pharmacologie
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Informatique, biostatistiques
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mle	MARCHAND Stéphanie	Chimie physique
M.	MEHRI-SOUSSI Faten	Hématologie biologique
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MERLIN Christophe	Microbiologie environnementale et moléculaire
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAPIN Anne	Pharmacie galénique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M.	ZAIYOU Mohamed	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe Anglais

ASSISTANTS

Mme BEAUD Mariette Biologie cellulaire
Mme BERTHE Marie-Catherine Biochimie
Mme PAVIS Annie Bactériologie

A notre directeur

Madame le Docteur V. Venard

Maître de conférence - Praticien Hospitalier au Laboratoire du CHU de Nancy

Nous vous remercions d'avoir accepté de diriger ce travail avec attention.
Pour vos conseils, vos connaissances et votre disponibilité.

Veillez trouver, ici, le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur B. Fortier

Chef du Service de Virologie du CHU de Nancy

Pour avoir accepté de nous aider dans la réalisation de ce travail.
Veillez trouver, ici, l'expression de notre profonde gratitude.

A notre président,

Madame le Professeur C. Finance

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nancy

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury de mémoire.
Veuillez trouver ici l'expression de mon sincère respect.

A nos juges,

A Madame le Professeur S. Gangloff

Professeur de microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Reims

Vous avez bien voulu m'honorer de votre présence dans ce jury de mémoire.
Soyez assurée de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur P. Bordigoni

Chef de Service de Médecine Infantile 2 du CHU de Nancy

Vous avez accepté de juger ce travail.
Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

A Madame S. Henn-Ménétré

Praticien Hospitalier à la pharmacie du CHU de Nancy Brabois

Vous avez accepté de participer à mon jury et je vous en témoigne ma sincère reconnaissance.

Au cours de mon année de pharmacie hospitalière, votre expérience et votre rigueur m'ont beaucoup apporté.

A Alexandra Salmon

Praticien hospitalier du Service de Transplantation Médullaire du CHU de Nancy

Nous vous sommes reconnaissant de votre aide apportée au cours des recherches nécessaires à la rédaction de notre mémoire.

Veillez recevoir toute notre reconnaissance.

A Lysiane et Vincent pour leur soutien technique.

A Madame Chouquet et toutes les techniciennes des secteurs de virologie, de sérologie et de biologie moléculaire, M. Mayer, P. Bocquillon,

A Hermine, Emmanuel, Ghania, Saousan, Anne-Charlotte,

A Corentine, Marie

Pour leur soutien tout au long de mon parcours, leur patience et leur gentillesse.

Et surtout,

A toute ma famille.

SERMENT DES APOTHICAIRES



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

De honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

De 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 ; 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 et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

"Un virus est une entité biologique dont le génome est un élément d'acide nucléique (ADN ou ARN) qui se reproduit dans des cellules vivantes en utilisant leur appareil de synthèse pour coder et diriger la production de structures spécialisées, les virions. Ceux-ci contiennent le génome viral et sont capables de le transférer à d'autres cellules et donc de les infecter à leur tour. Ce sont des parasites absolus"

Lwoff, 1981

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
Liste des abréviations	5
Liste des tableaux.....	6
Liste des figures	7
INTRODUCTION	8
GENERALITES.....	9
I. LES ADENOVIRUS	9
I.1 Historique et classification	9
I.2 Morphologie et structure de l'adénovirus [Shenk 1996].....	10
I.2.1 La capside	10
I.2.2 Le core	12
I.2.3 Le génome viral	12
I.3 Le cycle de réplication viral [Shenk 1996].....	13
I.3.1 Adsorption et entrée du virus	14
I.3.2 Activation des gènes viraux précoces	14
I.3.3 Interactions avec la cellule hôte	15
I.3.4 Réplication de l'ADN viral	15
I.3.5 Activation de l'expression des gènes tardifs et extinction de la cellule hôte	16
I.3.6 Assemblage des virus et excrétion cellulaire	18
I.4 Physiopathologie de l'infection à adénovirus [Horwitz 1996].....	18
I.4.1 Le tropisme tissulaire	18
I.4.2 La pathogénie	19
I.4.3 La persistance	19
I.4.4 La virulence	20
I.4.5 L'oncogénèse	20
I.5 La réponse immunitaire [Horwitz 1996].....	21
I.5.1 L'immunité à médiation humorale	21
I.5.2 L'immunité à médiation cellulaire	22
I.6 Epidémiologie [Freymuth 2003]	22

1.6.1	La prévalence	23
1.6.2	Les voies de transmission	23
1.7	Les manifestations cliniques [Freyenth 2003]	23
1.7.1	Atteintes respiratoires	24
1.7.2	Atteintes oculaires	24
1.7.3	Atteintes intestinales	24
1.7.4	Autres localisations	25
1.7.5	Infections chez le sujet immunodéprimé	25
1.7.6	La maladie disséminée à adénovirus	26
1.8	Les outils pour le diagnostic des infections à adénovirus [Venard et al. 2001] ...	26
1.8.1	Prélèvement	26
1.8.2	Diagnostic direct	27
1.8.2.1	La culture cellulaire	27
1.8.2.2	Microscopie électronique	29
1.8.2.3	Détection d'antigènes	29
1.8.2.4	Détection du génome viral	29
1.8.3	Diagnostic indirect	30
1.9	Prévention et traitement des infections à adénovirus	30
1.9.1	Prévention	30
1.9.2	Chimiothérapie anti-virale	31
1.9.2.1	La ribavirine (Virazole®)	31
1.9.2.2	Le cidofovir (Vistide®)	32
II.	L'infection à adénovirus chez le patient immunodéprimé	33
II.1	Prise en charge du risque infectieux chez les patients allogreffés	33
II.1.1	Prévention et incidence des infections	33
II.1.2	Suivi virologique	33
II.2	Définitions de l'infection à adénovirus	35
II.3	Prise en charge de l'infection à adénovirus	35
II.3.1	Généralités	35
II.3.2	Incidence et caractéristiques	36
II.3.3	Facteurs pronostiques	37
II.3.4	Dépistage	37
II.3.5	Traitement	38
METHODES DE DIAGNOSTIC DIRECT DE L'ADENOVIRUS		39
I.	Techniques utilisant la culture cellulaire	39
I.1	Cultures classiques	39

I.2	Cultures dites rapides	40
II.	Détection du virus par microscopie électronique	41
III.	Détection directe des constituants antigéniques du virus	41
III.1	Immunocytodiagnostic.....	41
III.2	Techniques immunoenzymatiques	42
III.3	Agglutination de particules de latex	43
IV.	Détection des génomes viraux par amplification	43
IV.1	Principe de la PCR.....	44
IV.2	PCR Qualitative.....	46
IV.3	PCR Quantitative en méthode TaqMan.....	46
TRAVAIL PERSONNEL.....		48
I.	Evaluation et mise en place de la PCR quantitative en temps réel	48
I.1	Matériel et méthode	48
I.1.1	Echantillons	48
I.1.2	Extraction	49
I.1.3	Dilutions	49
I.1.4	PCR	49
I.1.4.1	PCR qualitative [Hierholzer et al. 1988]	49
I.1.4.2	PCR quantitative (Heim et al., 2003)	50
I.2	Développement de la PCR quantitative dans le sang	52
I.2.1	Evaluation de la technique	52
I.2.2	Application au suivi d'un patient	53
II.	Intérêt de la PCR quantitative dans les selles	55
II.1	Matériels et méthodes.....	55
II.1.1	Patients et échantillons	55
II.1.2	Echantillons de selles	57
II.1.2.1	Etude de l'homogénéité de masse de l'échantillonnage	57
II.1.2.2	Etude de l'homogénéité de la charge virale	57
II.1.3	Mise en évidence de l'adénovirus	57
II.1.3.1	Par culture cellulaire	57
II.1.3.2	Par technique ELISA	58
II.1.3.3	Immunofluorescence	58
II.1.3.4	Extraction ADN	59
II.1.3.5	Amplification génique	59
II.2	Résultats.....	59
II.2.1	Mise en place de la PCR quantitative sur selles	59

II.2.1.1	Répétabilité de l'échantillonnage	59
II.2.1.2	Homogénéité de la charge virale de l'échantillon	60
II.2.2	Echantillons patients	60
II.2.2.1	Patient TE	60
II.2.2.2	Patient FI	61
II.2.2.3	Patient MA	62
II.2.2.4	Patient RI	64
II.2.2.5	Analyse comparative des résultats	67
DISCUSSION.....		69
CONCLUSION		73
BIBLIOGRAPHIE		74
Annexes.....		82

Liste des abréviations

<u>°C</u>	Degrés celsius
<u>ADN</u>	Acide DésoxyriboNucléique
<u>ADNc</u>	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
<u>AdV</u>	AdénoVirus
<u>ARN</u>	Acide RiboNucléique
<u>ARNm</u>	Acide RiboNucléique messenger
<u>CHU</u>	Centre Hospitalier Universitaire
<u>CMH</u>	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
<u>EBV</u>	Virus Epstein Barr
<u>ECP</u>	Effet CytoPathique
<u>ELISA</u>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<u>hCMV</u>	Human CytoMégaloVirus
<u>HHV-6</u>	HerpèsVirus Humain de type 6
<u>IgG</u>	Immunoglobuline de type G
<u>IgM</u>	Immunoglobuline de type M
<u>MEM</u>	Minimum Essential Medium
<u>Nt</u>	Nucléotide
<u>PBMC</u>	Peripheral Blood Mononuclear Cells
<u>PCR</u>	Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction)
<u>SVF</u>	Sérum de veau foetal

Liste des tableaux

Tableau 1. Propriétés des adénovirus humains	10
Tableau 2. Indication du suivi biologique moléculaire sanguin en virologie chez les patients allogreffés de la moelle (RuBIH).....	34
Tableau 3. Fréquence et type d'examen au cours du suivi biologique moléculaire sanguin en virologie chez les patients allogreffés de la moelle (RuBIH)	34
Tableau 4. Définitions des différents stades de l'infection à adénovirus.....	35
Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour la PCR qualitative	49
Tableau 6. Séquence des amorces et sondes utilisées pour la PCR quantitative	50
Tableau 7. Résultats de la PCR quantitative pour la gamme plasmatique et les prélèvements sanguins	52
Tableau 8. Suivi d'un patient : chronologie des évènements cliniques et biologiques.....	54
Tableau 9. Charges virales pour lesquelles le test ELISA et la culture cellulaire se positivent ou se négativent en fonction du patient	67
Tableau 10. Valeur de la charge virale dans les selles à la date d'apparition de la virémie en fonction du patient	68



Liste des figures

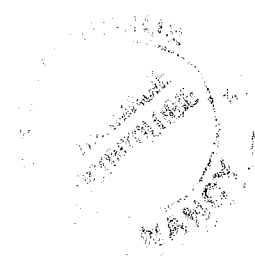
Figure 1. Représentation de l'adénovirus d'après Venard et al. (2001)	11
Figure 2. Organisation du génome de l'adénovirus [Russell 2000]	13
Figure 3. Cycle de réplication de l'adénovirus (d'après Freymuth 2003)	17
Figure 4. Effet cytopathique de l'adénovirus à J4 sur cellules MRC5 à l'état frais.....	27
Figure 5. Effet cytopathique de l'adénovirus à J4 sur cellules MRC5 inoculées après coloration à l'hémalun-éosine (x800)	28
Figure 6. Principe de la réaction ELISA pour la détection d'antigènes solubles en technique "sandwich" d'après Le Faou (2002)	42
Figure 7. Principe de la PCR.....	45
Figure 8. Principe de la méthode TaqMan.....	47
Figure 9. Résultats de la recherche de l'adénovirus par technique ELISA, culture cellulaire et PCR quantitative dans les selles du patient TE	61
Figure 10. Résultats de la recherche d'antigène et de la PCR quantitative dans les selles du patient FI	62
Figure 11. Diagnostic de l'adénovirus dans les selles du patient MA par recherche d'antigène viral, culture cellulaire et PCR quantitative.....	63
Figure 12. Recherche de l'adénovirus par PCR quantitative dans les selles et le sang total du patient MA	64
Figure 13. Diagnostic de l'adénovirus chez le patient RI par recherche d'antigène, culture cellulaire et PCR quantitative dans les selles, et PCR quantitative dans le sang total. Influence du traitement par cidofovir	66

INTRODUCTION

Les adénovirus appartiennent à la famille des *Adenoviridae*. Ils peuvent être responsables d'infections aiguës ou d'infections persistantes souvent asymptomatiques ou banales chez un sujet sain. Ce sont des agents fréquents d'infections respiratoires basses ou hautes et de diarrhées chez l'enfant. Ils sont aussi associés à des conjonctivites, des pneumopathies chez l'adulte, et des cystites hémorragiques. Ces infections entraînent une morbidité et une mortalité importantes chez les patients immunodéprimés, notamment après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques avec donneur non apparenté.

La culture cellulaire est la technique de référence pour le diagnostic des infections locales à adénovirus, mais les délais de réponse peuvent atteindre 3 semaines. Chez les patients hospitalisés dans le Service de Transplantation Médullaire du CHU de Nancy, le dépistage systématique est réalisé chaque semaine à partir des selles, des urines, des sécrétions nasales et pharyngées de J-7 à J100 de la greffe. Ceci permet de détecter les porteurs d'adénovirus et de diagnostiquer une éventuelle dissémination. Le dépistage est réalisé par culture cellulaire sur cellules MRC5 sur tous les prélèvements, par recherche d'antigènes viraux par technique ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) dans les selles et par PCR quantitative dans le sang. Le traitement préemptif par cidofovir est instauré si la recherche d'antigènes viraux dans les selles est positive sur deux prélèvements consécutifs.

La mise en place d'une technique moléculaire de détection de l'adénovirus dans le sang et dans les selles permettrait d'augmenter la sensibilité et d'améliorer la rapidité du diagnostic. Après avoir démontré le bénéfice de la quantification de la virémie dans le sang et sa corrélation à la clinique, une étude rétrospective sur l'intérêt de la recherche de l'adénovirus dans les selles par PCR quantitative a été réalisée sur les patients ayant présenté, au cours de l'année 2005-2006, une virémie à adénovirus.



GENERALITES

Famille des *Adenoviridae*, genre *Mastadenovirus*

52 sérotypes humains

Taille : 80-110 nm

Génome :

ADN 35,9 kilo paire de bases

8 unités de réplication

Réplication dans le noyau

Capside :

Icosaédrique

252 capsomères

I. LES ADENOVIRUS

I.1 Historique et classification

Les adénovirus (AdV) ont été isolés pour la première fois par l'équipe de Rowe en 1953 alors qu'il étudiait le développement de la croissance des poliovirus dans le tissu adénoïdien, en découvrant une dégénérescence de la culture, alors attribuée à un "AD agent" (*adenoid degeneration agent*). Puis l'adénovirus a été associé à une maladie respiratoire aiguë. L'étude des Acides ribonucléiques messagers (ARNm) des adénovirus a été à l'origine de la découverte du phénomène de l'épissage.

Les adénovirus sont des modèles d'étude de la transformation cellulaire et de la cancérisation chez le rongeur, mais il n'existe aucun argument à ce jour pour associer ces virus à des cancers chez l'homme. Ils ont été utilisés comme vecteurs de gènes dans les essais de thérapie génique somatique.

La famille des *Adenoviridae* est divisée sur la base d'un antigène spécifique de genre en *Aviadenovirus* et *Mastadenovirus*, ce dernier genre comprenant 10 espèces de virus infectant les mammifères [De Jong et al. 1999]. Les 52 sérotypes d'adénovirus humains sont classés en 7 espèces de A à G [Jones et al. 2007], sur la base de propriétés structurales ou biologiques distinctes : hémagglutination différentielle, pouvoir oncogène chez les rongeurs, taille des polypeptides, longueur de la fibre d'hémagglutinine (HA), et structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN), notamment pourcentage d'homologie de séquences, composition en G+C, profil de restriction des endonucléases. (Tableau I)

Tableau 1. Propriétés des adénovirus humains

Espèces	Sérotypes	Structure de l'ADN			Type d'HA	Oncogénicité (Hamster)
		% d'homologie	% G+C	Nb. de fragments <i>Sma</i> I		
A	12, 18, 31	48-69	48	4-5	IV	Forte
B1	3, 7, 16, 21	89-94	51	8-10	I	Faible
B2	14, 11, 34, 35					
C	1, 2, 5, 6	99-100	58	10-12	III	0
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 à 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42 à 47	94-99	58	14-18	II	0
E	4	-	58	16-19	III	0
F	40, 41	62-69	52	9-12	IV	0

1.2 Morphologie et structure de l'adénovirus [Shenk 1996]

1.2.1 La capsid

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à ADN, de 80 à 110 nm de diamètre. La capsid icosaédrique est composée de 252 capsomères dont 240 hexons, situés sur les faces, et 12 pentons aux sommets. Chaque penton contient une base qui constitue une partie de la surface de la capsid et une fibre dont la longueur varie en fonction des sérotypes.

La particule virale est composée de onze protéines tandis que la capsid en contient sept. La protéine de l'hexon est composée de l'association de trois molécules de polypeptide II qui est la protéine la plus abondante du virion. Cette protéine trimérique nommée capsomère de l'hexon est également associée aux polypeptides VI, VIII et IX.

L'association de cinq copies du polypeptide III forme le penton et trois copies du polypeptide IV forment la protéine de fibre (Figure 1).

Tous les adénovirus humains connus à ce jour codent une seule protéine de fibre qui interagit avec un récepteur cellulaire protéique, sauf les sérotypes 40 et 41 qui codent deux protéines suggérant qu'ils seraient capables de reconnaître deux types de récepteurs.

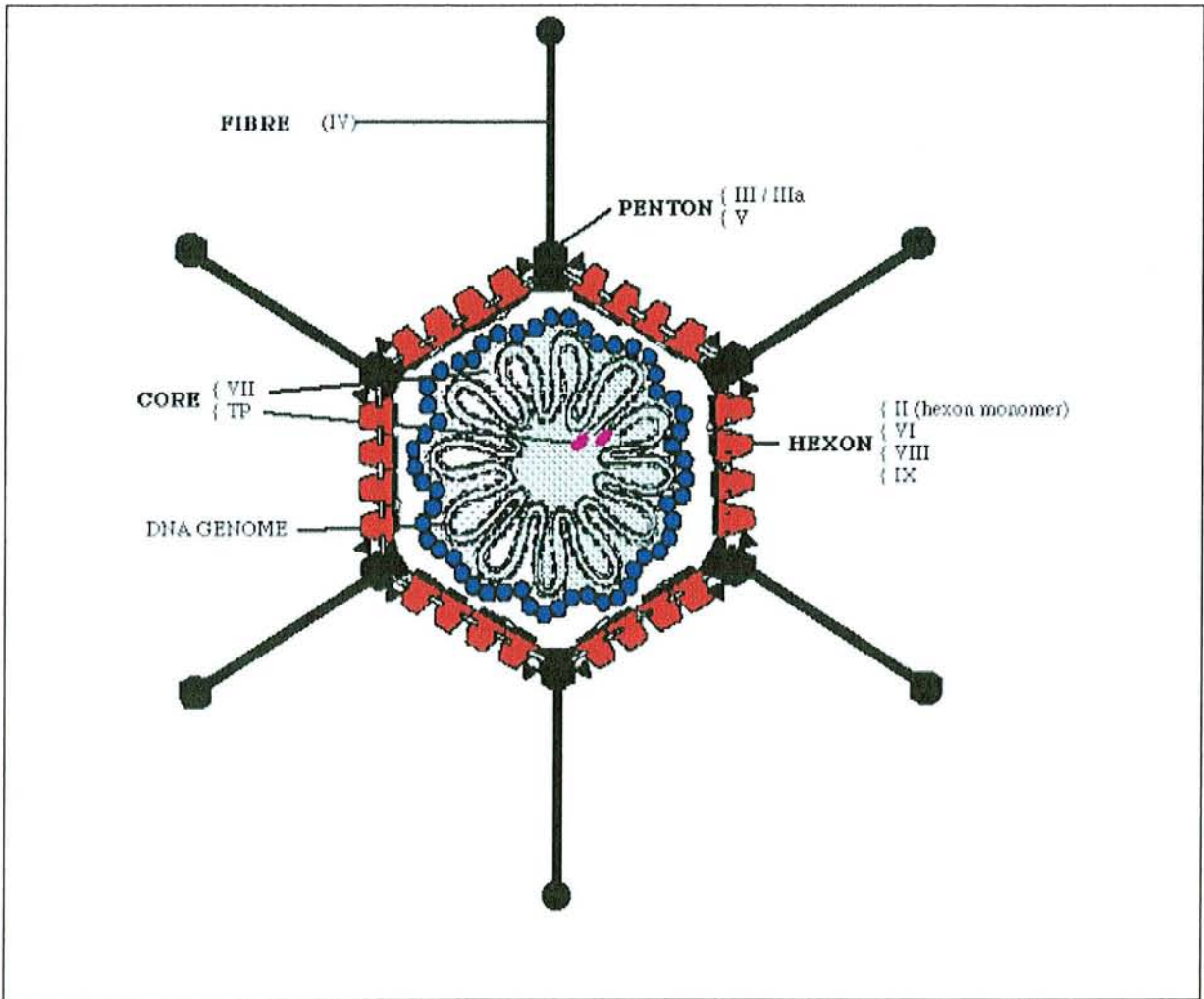


Figure 1. Représentation de l'adénovirus d'après Venard et al. (2001)

En microscopie électronique, les préparations d'adénovirus comportent souvent des particules virales plus petites, appelées AAV "*adenovirus associated virus*". Ce sont des parvovirus de genre *Dependovirus*, qui nécessitent la présence d'un adénovirus pour leur réplication.

1.2.2 Le core

Le core est constitué de quatre protéines connues et du génome viral. Les polypeptides VII, principal constituant du core, V et mu sont des protéines basiques en contact avec l'ADN viral. La quatrième protéine du core est la protéine terminale ou *terminal protein* qui est liée de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ADN viral. La liaison entre la protéine terminale et l'ADN viral se fait par un pont phosphodiester entre le groupe β-hydroxyl d'un résidu sérine (position 562) de la protéine terminale et le 5'-hydroxyl terminal d'une désoxycytosine. La protéine terminale permet l'initiation de la réplication de l'ADN viral et l'attachement du génome viral à la matrice nucléaire.

Les polypeptides V, VI et VIII lient la capsid au core.

1.2.3 Le génome viral

Le génome viral est une molécule bicaténaire de 20 à 25 x 10³ kDa, linéaire, non segmentée, de 30 à 38 kpb et correspondant à 30 à 40 cadres de lecture ouverts ou « open reading frames » (ORFs). Il comporte de courtes séquences répétées inversées aux extrémités qui interviennent dans la réplication de l'ADN.

Le génome viral contient deux origines de réplication, identiques, situées dans chaque séquence répétée inversée.

Le génome est constitué de gènes très conservés comme le gène de l'hexon, ou au contraire très variables comme les gènes E (*early*). Il comporte cinq unités de transcription précoces E1A, E1B, E2A, E3 et E4, 2 unités précoces retardées, pIX, IVa2 et une unité de transcription retardée qui code pour 5 familles d'ARN messagers (L1 à L5). Tous ces gènes sont transcrits par l'ARN polymérase II (Figure 2).

Le chromosome contient également, selon le sérotype, un à deux gènes VA qui sont transcrits par l'ARN polymérase III.

Les deux brins de l'ADN viral sont transcrits.

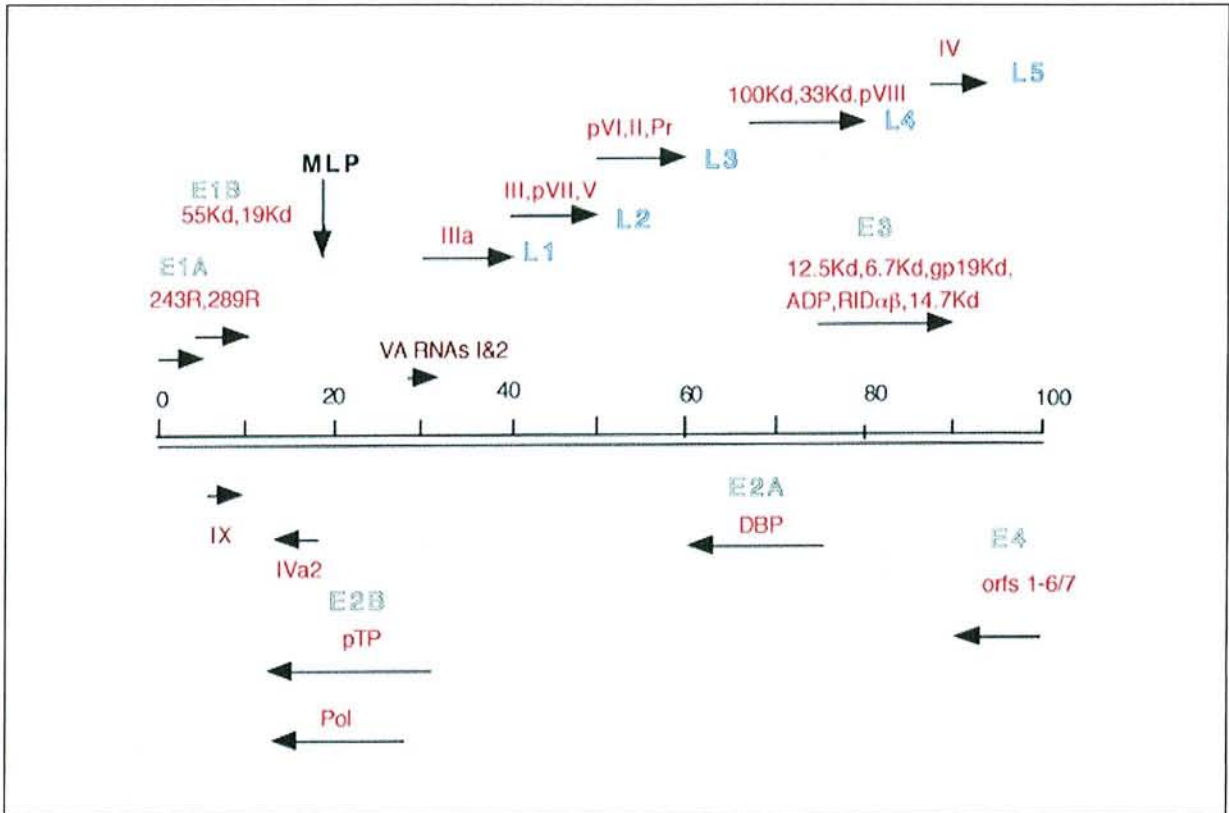


Figure 2. Organisation du génome de l'adénovirus [Russell 2000]

1.3 Le cycle de réplication viral [Shenk 1996]

Le principal site de réplication des adénovirus est l'épithélium respiratoire. Leur réplication dans le tissu lymphoïde semble limitée, mais c'est un site essentiel de persistance virale. Toutes les étapes ont lieu dans le noyau de la cellule.

La réplication virale se déroule en deux étapes séparées par la réplication de l'ADN. La phase précoce débute dès l'interaction entre le virus et la cellule. Elle rassemble l'adsorption, la pénétration, la transcription et la traduction des gènes précoces. Les produits des gènes viraux précoces sont responsables de l'expression des gènes viraux et de la réplication de l'ADN, induisent la progression du cycle cellulaire, bloquent l'apoptose et s'opposent aux différentes mesures antivirales de l'hôte. Parallèlement à l'initiation de la réplication virale, la phase tardive débute avec l'expression des gènes viraux tardifs et l'assemblage des virions. A la fin d'un cycle environ 10^4 particules virales sont produites par cellule ainsi qu'un excès de protéines de structure et d'ADN qui ne sont pas associés en virions. Toutefois au cours du cycle cellulaire les limites entre les phases précoces et tardives sont floues; en effet les gènes précoces continuent à être exprimés tardivement

après l'infection et le promoteur majeur de la transcription tardive est présent à bas niveau dès le début de l'infection (Figure 3).

Les gènes viraux codant les protéines IVa2 et IX, exprimés à un temps intermédiaire, constituent une catégorie précoce retardée.

1.3.1 Adsorption et entrée du virus

L'adénovirus s'attache à la cellule par l'intermédiaire de la protéine de la fibre HA, par le domaine carboxy-terminal de son extrémité. Comme la séquence des acides aminés de la partie du bouton terminal de la fibre varie considérablement en fonction des sérotypes, il est possible que les différents sérotypes d'adénovirus se fixent à différents récepteurs. Le récepteur cellulaire identifié à l'heure actuelle est le coxsackie adénovirus récepteur appelé CAR [Boulanger 1999].

Après adsorption, le complexe adénovirus-récepteur est internalisé par endocytose. Le processus d'intégration est très efficace puisque quatre vingt à quatre vingt cinq pour cent des virus adsorbés à la surface d'une cellule sensible y pénètrent. Puis, les particules virales sont transportées à travers le cytosol jusqu'au noyau.

Au cours de l'internalisation, le virion se désassemble progressivement par dissociation et protéolyse de ses constituants. Le core migre vers le noyau vers la 45^{ème} minute.

Lorsque l'ADN viral atteint le noyau, il s'associe aux histones de l'hôte par l'intermédiaire de la protéine terminale. La protéine terminale qui arrive avec le génome infectieux est également impliquée dans l'initiation de l'expression des gènes viraux.

1.3.2 Activation des gènes viraux précoces

Les gènes précoces sont lus dès le début de l'infection (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4). L'expression des gènes précoces de l'adénovirus a trois objectifs :

- Faire entrer la cellule hôte dans la phase S du cycle cellulaire, permettant l'installation d'un environnement optimal pour la réplication virale. Les gènes E1A et E1B sont impliqués dans ce processus.
- Mettre en jeu les premiers systèmes viraux qui protégeront la cellule infectée des défenses antivirales de l'organisme hôte. Ce sont les gènes E3 et VA RNA qui contribuent à ces défenses.
- Synthétiser les produits des gènes viraux nécessaires à la réplication de l'ADN.

La production de protéines précoces nécessite l'activation de la transcription du génome par des protéines activatrices dont la principale est codée par le gène E1A. La protéine E1A est la première à être exprimée après l'entrée du génome viral dans le noyau.

Après leur synthèse, les ARNm transcrits des gènes précoces sont transportés dans les polysomes avec les ARNm cellulaires.

Les gènes précoces de l'adénovirus restent généralement actifs pendant toute la durée du cycle de réplication viral même si leur taux diminue lentement.

1.3.3 Interactions avec la cellule hôte

L'infection par les adénovirus contraint les cellules quiescentes à entrer dans la phase S du cycle cellulaire par l'action de la protéine E1A. Contrairement à la protéine E1A, l'expression de la protéine E1B seule est insuffisante à stimuler le passage en phase S du cycle cellulaire. L'expression de la protéine E1A dans les cellules quiescentes peut donc stimuler la synthèse de l'ADN cellulaire et la prolifération des cellules.

En plus d'induire la prolifération cellulaire, la protéine E1A a la capacité de déclencher l'apoptose. Elle est en effet capable de stabiliser la protéine p53, entraînant son accumulation dans le noyau. Un haut niveau d'expression de p53 peut bloquer la progression du cycle cellulaire ou induire l'apoptose. Ainsi l'apoptose est une réponse cellulaire à l'infection, participant à l'inhibition de la croissance virale et au blocage de la diffusion du virus dans l'organisme infecté. Ce mécanisme de défense cellulaire est bloqué par le produit d'un gène codé par l'adénovirus. En effet, par un mécanisme à ce jour inconnu, la protéine E1B est capable de bloquer l'apoptose déclenchée par E1A.

1.3.4 Réplication de l'ADN viral

Lorsque le produit du gène E2 s'accumule dans la cellule et que la cellule infectée entre dans la phase S du cycle cellulaire l'étape de réplication de l'ADN viral peut commencer.

Les séquences répétées inverses du chromosome viral servent d'origine à la réplication. Celle-ci se déroule en 2 étapes. Dans un premier temps, la synthèse est initiée à l'extrémité de l'ADN linéaire et se déroule jusqu'à son extrémité. Seul un des deux brins d'ADN sert de modèle. La synthèse conduit donc à la production d'un double brin, constitué d'un bras parent et d'un brin complémentaire, et d'un ADN simple brin déplacé. Au cours de la deuxième étape du processus de réplication, un ADN complémentaire au brin déplacé est synthétisé ce qui génère la formation d'un second duplex complet constitué d'un brin parent et d'un brin fils.

Les domaines B et C de l'origine de la réplication du génome viral ne sont pas indispensables à la réplication de l'ADN mais ils permettent d'augmenter l'efficacité de la réaction d'initiation par la fixation de facteurs cellulaires à ces domaines.

La protéine pré-terminale sert de primer pour la réplication de l'ADN. Elle permet ainsi de préserver l'intégrité de la séquence terminale du chromosome viral au cours des nombreux cycles de la réplication de l'ADN.

L'initiation de la réplication de l'ADN est dirigée par un ensemble de polypeptides comprenant la protéine pré-terminale, la polymérase et les facteurs nucléaires, NFI et NFIII. L'élongation de la chaîne nucléique est, quant à elle, sous la dépendance de la polymérase (E2A), de la protéine liant l'ADN (E2B), codées par le gène E2 de l'adénovirus, ainsi que d'une protéine cellulaire, le facteur nucléaire NFII. La protéine liant l'ADN est une phosphoprotéine. L'ensemble de ces protéines est suffisant pour reconstituer la réaction de réplication de l'ADN viral *in vitro* en présence d'un modèle d'ADN contenant l'origine de réplication de l'adénovirus. Le gène E4 de l'adénovirus code également une ou plusieurs protéines requises pour la réplication de l'ADN, mais leur rôle reste mal connu.

1.3.5 Activation de l'expression des gènes tardifs et extinction de la cellule hôte

Comme pour la plupart des autres virus à ADN, les gènes tardifs de l'adénovirus commencent à être traduits dès le début de la réplication de l'ADN viral. Le gène E1B favorise leur expression.

Les ARNm tardifs ont été regroupés en 5 familles appelées L1 à L5. L'expression de cette famille d'ARNm tardifs est contrôlée par le principal promoteur tardif. Ce promoteur présente un faible niveau d'activité au début de l'infection et devient plusieurs centaines de fois plus actif au cours de la phase retardée. L'activation du promoteur principal est régulée par deux composants, une cis-activation par modification du chromosome et une trans-activation par un facteur néo-synthétisé d'origine viral.

Lorsque la réplication de l'ADN viral débute et que les ARNm tardifs sont synthétisés, l'accumulation cytoplasmique des ARNm cellulaires est bloquée. Un complexe incluant les deux protéines virales codées par E1B et E4 inhibe l'accumulation des ARNm cellulaires et facilite l'accumulation d'ARNm viraux. Lorsque la proportion d'ARNm viraux constituent 20% du pool cytoplasmique total ils sont traduits au dépend des ARNm cellulaires. Ce phénomène de détournement implique la protéine kinase R (Pkr) cellulaire qui est activée par l'ARN double brin s'accumulant dans la cellule infectée par l'adénovirus. L'activation de la Pkr entraîne l'inactivation du facteur d'initiation cellulaire et bloque la traduction des ARNm de la cellule hôte.

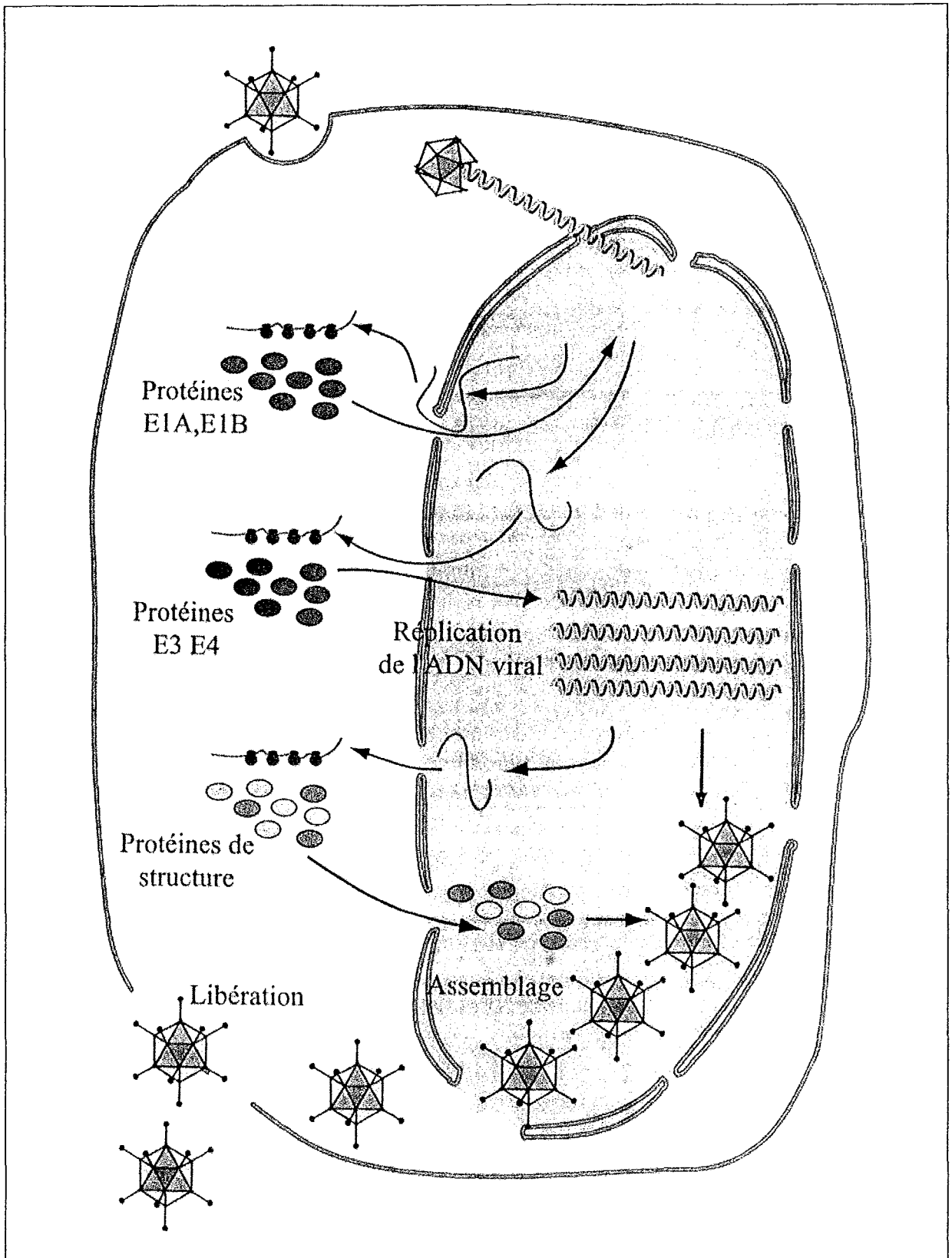


Figure 3. Cycle de répllication de l'adénovirus (d'après Freymuth 2003)

1.3.6 Assemblage des virus et excrétion cellulaire

La réplication associée à la production de grandes quantités de polypeptides structuraux de l'adénovirus est un signal pour le début de l'assemblage viral. Les capsomères trimériques de l'hexon sont rapidement formés à partir des monomères synthétisés dans le cytoplasme, grâce à l'action d'une protéine virale tardive.

Dans le cytoplasme, les monomères du penton s'assemblent lentement puis se rejoignent pour former le capsomère complet du penton, constitué d'une base pentamérique et d'une fibre trimérique. Après leur production les pentons et les hexons s'accumulent dans le noyau où l'assemblage du virion a lieu.

Selon l'état actuel des connaissances, l'assemblage commence par la production de capsides vides et se poursuit par l'entrée d'une molécule d'ADN viral dans la capside. L'encapsidation du chromosome est polarisée et débute par l'extrémité 5' de l'ADN viral.

En fin de cycle, la lyse cellulaire libère les particules virales. Environ 100 000 virus sont produits par cellule, vers la 30^{ème} heure.

1.4 Physiopathologie de l'infection à adénovirus [Horwitz 1996]

1.4.1 Le tropisme tissulaire

L'adénovirus pénètre dans l'organisme par la bouche, le nasopharynx ou la conjonctive oculaire, ainsi la plupart des manifestations de l'infection par les adénovirus sont localisées au niveau des yeux et du pharynx. Mais l'infection peut s'étendre par contiguïté au poumon.

Même si le virus se réplique préférentiellement dans les cellules de l'épithélium respiratoire, une réplication restreinte et persistante peut se dérouler dans les lymphocytes et les tissus lymphoïdes de l'oropharynx.

Au cours de maladies respiratoires fatales, l'adénovirus a également été isolé en culture à partir du sang, suggérant une dissémination par virémie dans certaines situations [Shike et al. 2005]. Une virémie à AdV3 a également été observée au cours d'un syndrome de choc toxique [Price et al. 2001].

Les adénovirus touchent aussi les épithéliums intestinaux avec une réplication locale et une excrétion fécale responsable de la propagation endémique du virus par voie féco-orale. Par exemple les adénovirus 1, 2, 5 et 6, ubiquitaires chez les jeunes enfants, peuvent être excrétés pendant des mois dans les selles.

1.4.2 La pathogénie

Les interactions entre le virus et la cellule permettent d'expliquer les lésions pathologiques observées au cours de l'infection par les adénovirus.

Au cours des infections respiratoires hautes, les adénovirus se fixent à la surface de l'épithélium respiratoire, s'adsorbent à la surface des cellules et y pénètrent pour ensuite se répliquer. Les virus ne sont pas entraînés par le flux en surface de l'épithélium, ils peuvent donc envahir les cellules en dépit des moyens de défense locaux. Les destructions cellulaires entraînent la production d'un exsudat à travers la membrane basale. A la fin de l'infection, les phagocytes de l'hôte affluent et la production d'anticorps est concomitante à la convalescence et à la reconstitution de l'épithélium.

Même si, le plus souvent, l'infection reste limitée à l'épithélium, elle peut également se répandre de proche en proche et gagner l'ensemble de l'arbre respiratoire causant une infection respiratoire basse.

Par ailleurs, bien que de nombreux adénovirus se répliquent dans l'intestin sans causer de gastroentérite, les sérotypes 40 et 41 sont responsables de pathologies intestinales [Gary et al. 1979].

L'existence d'infections à adénovirus dans le tractus urinaire chez les immunocompétents, principalement par les virus du groupe B, suggère que le virus est virémique à un certain stade de l'infection pour atteindre cet organe. En effet, il n'y a pas de preuves d'infection ascendante pour les sérotypes du groupe B, qui sont moins fréquemment retrouvés dans l'intestin et sont plus communs chez les jeunes hommes que chez les femmes.

La voie d'infection du foie, principalement chez les patients immunodéprimés greffés du foie, reste inconnue mais certains patients peuvent être infectés par des adénovirus latents présents dans les lymphocytes du greffon.

1.4.3 La persistance

Les adénovirus sont capables d'établir une infection persistante dans les amygdales, le tissu adénoïde et l'intestin des individus infectés. La réactivation peut apparaître dans les mois ou les années qui suivent. Le mécanisme de persistance des adénovirus chez l'homme ou l'animal est peu connu. De l'ADN d'adénovirus a été détecté, chez l'homme, dans les lymphocytes d'adultes, et leur proportion semble augmenter avec l'âge comme si la persistance était le résultat final de l'infection par les adénovirus.

Toutefois l'importance de la persistance du génome des adénovirus dans les lymphocytes et la capacité de réactivation n'est pas connue. Des cultures cellulaires de tissus infectés par l'adénovirus ont été établies en culture continue, mais les mécanismes moléculaires de maintien de la persistance ou les gènes nécessaires à cet état ne sont pas connus.

1.4.4 La virulence

Les gènes pouvant altérer la virulence de certaines souches d'adénovirus humains sont les gènes E3 et E1B. Toutefois il n'a pas été clairement démontré pour quelle raison ou par quel processus moléculaire certains sérotypes ne causent des pathologies que dans certains organes. Les capacités d'induction de gastroentérites des adénovirus de type 40 et 41 sont inexplicables, ainsi que le tropisme des adénovirus du groupe B pour le tractus urinaire ou des types 8, 19 et 37 qui sont particulièrement virulents pour la conjonctive. La culture tissulaire ou l'existence de modèles animaux ne suffisent pas à expliquer les mécanismes du tropisme cellulaire et de la pathogénicité organe-spécifique. Même le mécanisme d'atténuation de la souche du vaccin oral utilisée pour la prévention des pneumonies à adénovirus (AdV7) chez les militaires américains pourrait dépendre plus de la formulation galénique d'un virus vivant qui traverse l'oropharynx et expose l'épithélium intestinal à un virus, que de la mutation de gènes de virulence.

1.4.5 L'oncogénèse

Tous les adénovirus humains testés sont capables de transformer des cellules de rongeur *in vitro*. Seuls certains sérotypes d'adénovirus peuvent induire directement des tumeurs chez le rat et le hamster. Les adénovirus du groupe A sont hautement oncogènes, entraînant des tumeurs chez la plupart des animaux en 4 mois. Les virus du groupe B sont faiblement oncogènes, induisant des tumeurs en 4 à 18 mois. Et un des virus du groupe D (Adv9) est oncogène, entraînant des tumeurs mammaires en 3 à 5 mois. Les virus des groupes C et E ne sont pas connus comme étant oncogènes.

Les gènes E1A et E1B sont à l'origine de la transformation cellulaire. En effet ces gènes viraux sont exprimés au sein des cellules transformées et la transfection de cultures cellulaires avec des gènes E1A et E1B clonés conduit à la transformation des cellules. De plus des virus mutants déficients au niveau de ces gènes peuvent devenir inefficaces en transformation.

Les protéines E1A et E1B peuvent interférer dans la régulation du cycle cellulaire, respectivement, en incitant les cellules quiescentes à entrer dans la phase S du cycle cellulaire, et en bloquant l'initiation de l'apoptose. Ces mécanismes d'action sont à l'origine des phénomènes de transformation chez les rongeurs.

1.5 La réponse immunitaire [Horwitz 1996]

Elle permet de contrôler la réplication du virus et d'empêcher l'apparition de symptômes chez l'immunocompétent. Les mécanismes de l'échappement des adénovirus aux défenses de l'hôte demeurent inconnus.

La réponse immunitaire précoce par les cytokines (interleukine-1, interleukine-6, et facteur nécrosant de tumeur- α) a été décrite dans un modèle murin de pneumonie après une infection non permissive par un adénovirus humain. Une réponse biphasique des cellules mononucléaires chez le rat du coton suggère une apparition précoce des monocytes et des cellules *natural killer* suivi des lymphocytes spécifiques T et B. L'intensité de cette réponse est augmentée par la délétion de la protéine anti-CMH Adgp19 et l'infiltrat cellulaire est modifié d'une réponse leucocytaire mononucléaire à une réponse leucocytaire polynucléaire par la délétion du gène E3 anti-TNF de l'adénovirus. Ces observations suggèrent que l'immunopathologie peut jouer un rôle dans la réponse de l'hôte à l'infection par l'adénovirus.

1.5.1 L'immunité à médiation humorale

Pendant les 6 premiers mois de la vie, l'immunité est assurée par les Immunoglobulines de type G (IgG) anti-adénovirus, d'origine maternelle, transmis par passage transplacentaire. En effet, la majorité des adultes a rencontré un adénovirus, le plus fréquemment issu du groupe C, sérotype 1, 2, 5, et possède donc des anticorps spécifiques circulants. Ceux-ci sont dirigés contre la protéine de l'hexon, au niveau de la capsid virale. Des infections secondaires à d'autres sérotypes sont possibles.

Après l'infection la plupart des patients développent des anticorps spécifiques de groupe et de type dirigés contre la souche infectante d'adénovirus. Les anticorps spécifiques de groupe ne neutralisent pas l'infection virale mais sont utiles pour mesurer la réponse immunitaire lorsqu'une infection à adénovirus est suspectée. Dans ce cas, des sérums de la phase aiguë et de la convalescence, pris plusieurs semaines plus tard, peuvent montrer une augmentation des anticorps dirigés contre un groupe spécifique

d'adénovirus par immunofluorescence ou ELISA en utilisant un extrait de culture de tissu infecté ou un hexon d'un type unique d'adénovirus purifié.

Les patients peuvent continuer d'excréter les virus de manière intermittente, notamment dans les selles pendant plusieurs mois après avoir développé une réponse immunitaire humorale efficace. Les anticorps neutralisants sont protecteurs contre les manifestations cliniques chez l'hôte infecté ou contre les réinfections par le même sérotype mais ils n'éliminent pas le portage viral. De nombreux patients immunodéprimés par une infection par le virus de l'immunodéficience humaine ont des infections persistantes du tractus urinaire par des adénovirus du groupe B, des types 34 et 35, sans développer d'anticorps neutralisants spécifiques de type.

1.5.2 L'immunité à médiation cellulaire

L'immunité cellulaire joue un rôle important dans le contrôle d'une infection à adénovirus. Elle est mise en évidence par une augmentation transitoire des lymphocytes T.

La réponse par les lymphocytes T cytotoxiques est induite par un peptide issu de gène de la région E1A du virus. Elle concerne essentiellement les lymphocytes T CD4+. Les cellules infectées par l'adénovirus expriment des protéines virales associées aux molécules de classe II. Leur présence stimule les lymphocytes T CD4+, qui activent à leur tour la production des anticorps par les lymphocytes B. Chez les patients immunodéprimés, il y a rupture de l'équilibre entre la réponse cellulaire T spécifique adénovirus et la réplication virale [Flomenberg et al. 1995; Sester et al. 2002].

A ce jour il n'a pas été clairement démontré si les pathologies tissulaires et les manifestations des infections à adénovirus sont liées à l'interaction entre le virus et les cellules ou à la réponse immunitaire développée contre le pathogène.

Il est important de comprendre les mécanismes de pathogénie des adénovirus car ceux-ci sont couramment étudiés comme vecteurs pour délivrer des gènes étrangers chez l'être humain, même si la majorité des adénovirus ont été affaiblis par délétion de la région E1A et E1B et ne peuvent se multiplier dans des cellules humaines.

1.6 Epidémiologie [Freymuth 2003]

La répartition des adénovirus est mondiale, mais leur prévalence varie en fonction des saisons dans les pays tempérés (automne, hiver et début de printemps). Dans les régions tropicales, la prévalence est plus forte durant les périodes froides et humides.

1.6.1 La prévalence

Les infections à adénovirus évoluent sous forme endémique ou épidémique. Les endémies s'observent majoritairement chez le jeune enfant où 50% des infections sont asymptomatiques, avec une fréquence plus importante chez les nourrissons et à l'âge préscolaire, entre 6 mois et 5 ans [Cooper et al. 2000]. Les adénovirus sont responsables de 5 à 10% des viroses respiratoires de l'enfant et de 10 à 15% des gastroentérites infantiles. Elles évoluent sous la forme de foyers d'infections peu extensifs, souvent localisées à des collectivités d'enfants (famille, crèche, ...).

Ces infections, souvent liées à un sérotype donné, s'observent toute l'année avec une légère recrudescence saisonnière (fin hiver, début printemps).

Les épidémies d'infections à adénovirus correspondent le plus souvent à des conjonctivites des piscines, des kératoconjonctivites, des infections respiratoires, des gastro-entérites infantiles.

Il n'existe pas d'immunité croisée entre les sérotypes.

1.6.2 Les voies de transmission

Du fait de l'absence d'enveloppe, les adénovirus sont thermorésistants et résistent dans le milieu extérieur. Ils peuvent être transmis par les eaux de surface, les objets souillés. Ainsi les souches entériques sont transmises par voie féco-orale. Les infections respiratoires à adénovirus se transmettent surtout par contact direct ou indirect avec les sécrétions respiratoires (aérosols, mains sales). Les réflexes de toux et d'éternuements assurent la dissémination du virus dans l'environnement. La contamination oculaire, entraînant des conjonctivites, peut se faire par l'eau des piscines ou le matériel d'ophtalmologie mal nettoyé [Bordigoni et al. 2001].

1.7 Les manifestations cliniques [Freymuth 2003]

Les manifestations cliniques dépendent de l'hôte et de l'état de son immunité cellulaire. Les adénovirus peuvent infecter les voies respiratoires, l'œil, le tube digestif et les voies urinaires. La majorité des infections à adénovirus sont sub-cliniques.

1.7.1 Atteintes respiratoires

Les atteintes respiratoires à type de rhino-pharyngite, d'angine, d'otite moyenne aiguë, de laryngite, de bronchiolite ou de pneumonie sont généralement modérées avec des symptômes usuels tels que la fièvre, le rhume, la toux, des myalgies et des céphalées.

Lorsqu'une conjonctivite accompagne les signes respiratoires, la maladie est désignée sous le nom de fièvre pharyngo-conjonctivale (Adv 3, Adv 4).

Certaines amygdalites sont exsudatives. Les pharyngites à adénovirus, aiguës et congestives, se distinguent des atteintes bactériennes par la présence conjointe d'une rhinite et d'une conjonctivite. Chez l'enfant, les pneumonies à adénovirus nécessitent une hospitalisation dans 8% des cas; leur début est généralement brutal avec une rhinite, une dyspnée, une toux rebelle et des râles de bronchite.

Les sérotypes les plus courants sont les adénovirus 1, 2, 5, 6. Les adénovirus 4 et 7 peuvent provoquer de véritables épidémies. Les formes graves, rares, sont principalement dues à l'AdV7 : la détresse respiratoire est alors associée à des signes nerveux de type méningisme et à des troubles de la conscience. La mortalité peut atteindre 30%.

1.7.2 Atteintes oculaires

Les conjonctivites congestives sont fréquentes, isolées ou associées à un syndrome pharyngé. Elles sont accompagnées d'une adénopathie satellite (prétragienne) et apparaissent après 6 à 9 jours d'incubation. Elles sont principalement liées aux Adv 3 et 7 et surviennent par petites épidémies. Le mode de contamination est souvent d'origine hydrique (conjonctivite des piscines).

Des atteintes plus sévères de type kérato-conjonctivite, parfois hémorragique, sont observées avec l'Adv 8, mais aussi les Adv 19 et 37. La kératite superficielle apparaît après une incubation de 8 jours, notamment chez des sujets présentant des microtraumatismes de la conjonctive. Elle évolue sous un mode épidémique dans les milieux où l'empoussièrement est important ou dans les services d'ophtalmologie. L'évolution est lente mais l'infection est majoritairement résolutive sans séquelles.

1.7.3 Atteintes intestinales

Les gastroentérites aiguës à adénovirus constituent 5 à 15% des gastroentérites nécessitant une hospitalisation et sont le plus souvent dues aux adénovirus 40 et 41 (67% des cas).

Les atteintes intestinales peuvent être, d'une part, des diarrhées accompagnant une infection respiratoire à adénovirus. Dans ce cas la diarrhée est de courte durée (5 jours),

associée à de la fièvre, des vomissements et des signes respiratoires respectivement dans 50% et 80% des cas. Soit, d'autre part, une infection entérique épidémique liée aux AdV 40 et 41, appelés adénovirus non cultivables. Dans ce cas, la diarrhée est plus longue (10 jours) avec des vomissements (80% des cas) et parfois de la fièvre et des signes respiratoires (20% des cas).

Par ailleurs, on observe, chez les enfants, des excréments asymptomatiques d'adénovirus dans les selles.

1.7.4 Autres localisations

Les adénovirus sont également impliqués dans des exanthèmes maculo-papuleux morbilliformes ou rubéoliformes associés ou non à une atteinte respiratoire, des cystites hémorragiques (AdV 11 et parfois AdV 21), et dans de rares cas d'infections néonatales ou génitales (orchite, cervicite ou urétrite). Ces différentes atteintes sont dues aux Adv 2, 11, 19, 21, 34 et 35 [Swenson et al. 1995].

Dans les atteintes sévères, des cas de méningo-encéphalites ont été décrits.

1.7.5 Infections chez le sujet immunodéprimé

Les infections à adénovirus chez le sujet immunodéprimé, résultent soit d'une primo-infection (chez l'enfant) soit d'une réactivation d'infection latente à partir de tissu lymphoïde (amygdales, plaques de Peyer par AdV 1, 2, 5) ou du rein (par AdV 11, 34, 35). De nombreux autres sérotypes peuvent être mises en cause.

La symptomatologie des infections à adénovirus chez le patient immunodéprimé est le plus souvent aspécifique car masquée par les symptômes de l'immunodépression; de plus les multiples traitements de ces patients masquent les signes locaux ou généraux de l'infection virale. L'infection à adénovirus peut ainsi se traduire par la survenue de cystites hémorragiques [Childs et al. 1998] ou de méningo-encéphalites. Les localisations les plus fréquentes, les pneumonies et les hépatites, sont également les plus graves. Le diagnostic repose donc sur la mise en évidence de l'agent infectieux.

Ces infections surviennent en général durant le premier mois post-greffe chez l'enfant, et sont plus tardives chez l'adulte (3 mois). Chez les immunodéprimés, les infections à adénovirus évoluent fréquemment vers des infections disséminées potentiellement fatales.

1.7.6 La maladie disséminée à adénovirus

Essentiellement observée chez les enfants immunodéprimés, elle peut également se développer chez des enfants immunocompétents (2,5 % des infections de l'enfant) ou des adultes immunodéprimés (SIDA, cancers, greffés de la moelle) [Munoz et al. 1998].

L'infection disséminée à adénovirus, caractérisée par une atteinte multi-organes, est d'une extrême gravité. Sur le plan biologique, la dissémination de l'infection se traduit par une virémie, qui semble constante.

Le taux de mortalité s'élève à 60 et 83 % respectivement chez les enfants immunocompétents et immunodéprimés.

1.8 Les outils pour le diagnostic des infections à adénovirus [Venard et al. 2001]

La recherche de l'adénovirus s'applique chez l'immunocompétent au cours d'un diagnostic différentiel : d'une fièvre éruptive, d'un syndrome mononucléosidique, d'une infection gastro-intestinale, d'une conjonctivite, ou plus encore d'une kératoconjonctivite, d'une infection respiratoire basse ou haute.

Chez l'immunodéprimé, elle est réalisée en dépistage systématique (selles, écouvillonnage nasal) ou dans le cadre d'un syndrome infectieux avec atteinte respiratoire ou intestinale, hépatite ou cystite. La recherche d'une virémie à adénovirus entre dans le cadre d'une surveillance hebdomadaire des patients greffés.

1.8.1 Prélèvement

Le choix des prélèvements est orienté par la clinique. Ce sont le plus souvent des sécrétions nasales, pharyngées, trachéo-bronchiques, pour les atteintes respiratoires, des prélèvements conjonctivaux pour les infections oculaires, des selles pour les diarrhées, ou des urines. Le prélèvement pharyngé est déconseillé du fait de la présence quasi-constante d'adénovirus latents. D'autres prélèvements tels que le sang, le liquide céphalo-rachidien, les biopsies et des prélèvements post-mortem peuvent être indiqués chez l'immunodéprimé.

Les sécrétions nasales sont recueillies par un écouvillonnage profond des fosses nasales. Chez le petit enfant, un rinçage du rhinopharynx avec un dispositif à usage unique monté sur une aspiration est recommandé. Les écouvillons placés dans un milieu de transport peuvent être conservés 24 à 36 heures à +4°C. Les selles et les urines sont

recueillies dans un récipient stérile. Celles-ci doivent être transmises rapidement au laboratoire (< 2 - 3 heures).

Les prélèvements virologiques doivent être effectués le plus tôt possible après le début de l'infection. Malgré la résistance des adénovirus, les règles habituelles de conservation et de transport des échantillons doivent être respectées.

1.8.2 Diagnostic direct

1.8.2.1 La culture cellulaire

La culture cellulaire est une des bases du diagnostic virologique. C'est une technique sensible qui permet le diagnostic en 3 à 7 jours.

Pour l'inoculation d'un prélèvement susceptible de contenir de l'adénovirus, plusieurs systèmes cellulaires peuvent être utilisés : MRC5, Vero, MDBK, MDCK, Hep-2, KB.

La réplication cytotytique de l'adénovirus est à l'origine de modifications morphologiques de la nappe cellulaire. L'effet cytopathique (ECP) observé est caractérisé par un arrondissement des cellules et un aspect en dentelle de la nappe cellulaire.



Figure 4. Effet cytopathique de l'adénovirus à J4 sur cellules MRC5 à l'état frais

Après coloration à l'hémalun-éosine, la présence d'un adénovirus est révélée par des inclusions intra-nucléaires, basophiles dites « en fleur de marguerite ».



Figure 5. Effet cytopathique de l'adénovirus à J4 sur cellules MRC5 inoculées après coloration à l'hémalun-éosine (x800)

La mise en évidence d'un adénovirus en culture cellulaire nécessite généralement confirmation par une technique immunologique utilisant des anticorps monoclonaux. Ainsi des réactions d'immunofluorescence ou d'immunopéroxydase peuvent être réalisées sur des cellules détachées du tapis de culture.

Seules exceptions, les sérotypes 40 et 41 ne sont cultivables que sur des systèmes cellulaires spécifiques (Graham 293) qui ne sont pas cultivés dans les laboratoires de diagnostic.

1.8.2.2 Microscopie électronique

La microscopie électronique pour le diagnostic des infections à adénovirus est peu utilisée en routine dans les laboratoires. En effet c'est une technique qui nécessite un matériel coûteux et qui peut s'avérer longue lorsque la mise en évidence d'un virus nécessite l'analyse de plusieurs échantillons d'un même prélèvement, notamment lorsque la charge virale est faible.

Supplantée au quotidien par des techniques plus rapides et plus sensibles telles que l'ELISA ou l'agglutination, la microscopie électronique reste une référence dans les études comparatives, notamment dans les selles.

1.8.2.3 Détection d'antigènes

La recherche d'adénovirus est réalisée par des techniques immunologiques, à l'aide d'anticorps monoclonaux, qui détectent un antigène spécifique de genre, structure commune aux adénovirus humains située sur l'hexon. L'immunofluorescence est réalisée sur frottis ou étalement de sécrétions respiratoires.

Pour la recherche d'adénovirus dans les selles, différentes techniques sont disponibles : l'ELISA, l'agglutination de particule de latex et l'immunoblot.

- La technique ELISA est généralement réalisée par série en microplaque; elle est automatisable et présente une excellente sensibilité, mais détecte au mieux 41 des 52 sérotypes connus.
- L'agglutination et l'immunoblot se présentent sous forme de tests unitaires. Ils possèdent une sensibilité inférieure à l'ELISA.

Des kits commerciaux pour la détection spécifique des Adv 40 et 41 dans les selles sont également disponibles.

1.8.2.4 Détection du génome viral

La détection de l'ADN viral par amplification génique (PCR) n'est pas indiquée pour les infections bénignes de l'immunocompétent. Elle est réservée au diagnostic des infections disséminées chez les patients immunodéprimés qui présentent une symptomatologie non spécifique et à la recherche systématique.

La détection du génome viral peut-être réalisée à partir de biopsie, de liquide céphalo-rachidien ou de sang total après extraction de l'ADN. Etant adaptée au suivi des patients immunodéprimés, elle doit permettre de détecter le plus grand nombre possible de sérotypes, pour cela les amorces sont généralement choisies dans le gène de l'hexon.

Cette recherche par PCR est habituellement réservée aux laboratoires hospitaliers. Il n'existe à ce jour aucune trousse commerciale disponible.

1.8.3 Diagnostic indirect

Les techniques de diagnostic indirect sont peu utilisées en raison de la prévalence des infections à adénovirus. La sérologie sera réalisée sur un échantillon de sang recueilli sur tube sec.

Les anticorps dirigés contre l'adénovirus peuvent être recherchés par la réaction de fixation du complément ou par la technique ELISA. Le ciblage de l'antigène de groupe permet le développement d'une réaction sérologique commune à tous les adénovirus. Toutefois la réaction de fixation du complément est peu sensible. La technique ELISA nécessite deux prélèvements consécutifs à 15 jours d'intervalle. Ces techniques sont donc peu répandues.

Par ailleurs, la réponse humorale est souvent incomplète chez les enfants, population cible de l'adénovirus. Les immunoglobulines de type M (IgM) sont présentes dans 48% des cas et l'ascension des IgG n'est observée que dans 77% des cas.

1.9 Prévention et traitement des infections à adénovirus

Les principales molécules antivirales efficaces dans les infections à adénovirus chez l'immunodéprimé sont : la ribavirine et le cidofovir. Ces antiviraux sont actifs sur le virus en répllication, mais pas sur le virus en latence. Fortement toxiques, ils sont utilisés pour le traitement préemptif ou curatif.

1.9.1 Prévention

L'adénovirus est sensible à l'eau de Javel et à la solution de Dakin, mais il est résistant à la chlorhexidine et aux ammoniums quaternaires.

En milieu hospitalier, les infections banales à adénovirus ne nécessitent pas de précautions particulières. En dehors des mesures d'isolement et d'hygiène habituelles, il n'existe actuellement aucune prophylaxie spécifique de ces infections. Il faut cependant insister sur l'utilisation de gants pour éviter une contamination manuportée, difficile à éliminer par un simple lavage, même soigneux [Jemigam et al. 1993]. Dans les syndromes entériques, un isolement fécal associé à un renforcement des mesures d'hygiène suffit.

Un vaccin vivant oral anti-AdV7 et AdV4 est disponible exclusivement pour la prévention des pneumonies dans les collectivités militaires aux Etats Unis.

1.9.2 Chimiothérapie anti-virale

1.9.2.1 La ribavirine (Virazole®)

La [1-(β-D-ribofuranosyl)-1,2,4-triazole-3-carboxamide] ou ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanosine. Elle est commercialisée pour administration parentérale sous le nom de Virazole® (ICN Pharmaceuticals Switzerland).

- Mécanisme d'action

La ribavirine est un agent antiviral à large spectre, inhibiteur de l'ARN polymérase. Après avoir pénétré dans les cellules, la ribavirine est convertie en dérivés mono, di et triphosphate, qui inhibent la synthèse des acides nucléiques viraux.

- Toxicité

Le principal effet secondaire rapporté est l'anémie hémolytique, le plus souvent asymptomatique et totalement réversible à l'arrêt du traitement.

Un risque tératogène et/ou embryotoxique significatif de la ribavirine a été démontré chez toutes les espèces animales chez lesquelles des études appropriées ont été menées, et pour des doses aussi faibles que le vingtième de la dose recommandée chez l'homme. Des malformations du crâne, de la fente palatine, des yeux, de la mâchoire, des membres, du squelette et du tractus gastro-intestinal ont été notées. L'incidence et la sévérité des effets tératogènes ont augmenté avec la dose de ribavirine. La ribavirine s'accumule dans l'espace intracellulaire et est éliminée très lentement de l'organisme. On ne sait pas si la ribavirine présente dans le sperme peut provoquer des effets tératogènes ou génotoxiques chez l'embryon.

- Précautions d'emploi

Toutes les précautions doivent être prises afin d'éviter la survenue d'une grossesse chez les patientes traitées. Le traitement par la ribavirine ne doit être débuté qu'après obtention d'un résultat négatif à un test de grossesse effectué juste avant l'initiation du traitement. De même toutes les précautions doivent être prises afin d'éviter la survenue d'une grossesse chez les partenaires des patients traités par la ribavirine. L'administration de ribavirine est aussi contre-indiquée chez la femme qui allaite. Par ailleurs, le traitement par ribavirine est contre-indiqué en cas de pathologie cardiaque sévère préexistante, d'insuffisance hépatique sévère, de cirrhose du foie décompensée, et dans les hémoglobinopathies (telles que thalassémies, drépanocytose).

L'utilisation d'antiviraux, notamment la ribavirine, est souvent associée à l'administration d'immunoglobulines humaines en IV. Mais leur titre en anticorps neutralisants anti-adénovirus n'est en général pas connu. Cependant ces différents traitements n'ont pas fait la preuve de leur efficacité dans le cadre d'études randomisées à grande échelle.

1.9.2.2 Le cidofovir (Vistide®)

Le HPMPC, 1-[(s)-3-hydroxy-2-(phosphonométhoxy)-propyl] cytosine dihydrate, ou cidofovir est un analogue nucléotidique de la cytidine. Il est commercialisé pour administration parentérale sous le nom de Vistide® (laboratoire Pharmacia et Upjohn) depuis 1997.

- Mécanisme d'action

Le cidofovir est un agent virustatique à large spectre. C'est une molécule monophosphatée. Sa double phosphorylation au sein de la cellule, conduit au nucléoside triphosphate actif. Ces phosphorylations sont effectuées par les kinases cellulaires.

Le cidofovir empêche la réplication virale en inhibant la synthèse d'ADN viral, ceci par inhibition sélective de l'ADN-polymérase virale. Après la double phosphorylation, la molécule rentre en compétition avec les nucléotides (nt) naturels. Le cidofovir est un terminateur de chaîne. Il tient sa spécificité de sa plus grande affinité pour l'ADN-polymérase virale que pour l'ADN-polymérase cellulaire.

- Toxicité

On constate des cas fréquents de neutropénie non dose-dépendante et de néphrotoxicité dose-dépendante, aboutissant à une protéinurie et à une élévation du taux de créatinine sérique.

- Précautions d'emploi

Afin de prévenir la toxicité rénale, la perfusion de cidofovir doit impérativement s'accompagner d'une hydratation adéquate. L'administration de médicaments néphrotoxiques est à éviter durant un traitement au cidofovir, car ils pourraient potentialiser la néphrotoxicité du cidofovir. De même, après utilisation de substances néphrotoxiques telles que les aminosides, la pentamidine IV, l'amphotéricine B ou le foscavir, un délai d'au moins 7 jours est nécessaire avant d'effectuer la perfusion IV de cidofovir. De plus les posologies sont à moduler en fonction des valeurs de la clairance rénale de la créatinine.

En conséquence, l'administration de cidofovir est contre-indiquée chez le sujet présentant une insuffisance rénale, et il convient d'effectuer une surveillance rapprochée des constantes rénales au cours du traitement par vistide.

II.L'infection à adénovirus chez le patient immunodéprimé

II.1 Prise en charge du risque infectieux chez les patients allogreffés

II.1.1 Prévention et incidence des infections

Au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nancy, les patients qui vont bénéficier d'une allogreffe de cellules souches périphériques, de moelle ou de sang de cordon sont hospitalisés dans l'unité de transplantation médullaire, en secteur stérile, en chambre à flux laminaire avec haut renouvellement d'air et filtres HEPA. Ils bénéficient d'une alimentation stérile jusqu'à J30 et d'une décontamination digestive par voie orale.

Ces patients présentent un fort risque d'infection virale, par l'adénovirus ou d'autres virus capables de latence. Une étude réalisée en 2003 dans le Service de Transplantation Médullaire du CHU de Nancy sur 92 patients allogreffés montrait une incidence de l'infection à adénovirus de 35,9%, celle-ci survenant dans la majorité des cas durant le premier trimestre après la greffe.

Sur les 92 patients de l'étude, sept ont présenté une infection à herpes virus humain de type 6 (HHV-6) et une répllication virale de l'EBV a été mise en évidence chez treize patients.

II.1.2 Suivi virologique

Le suivi des patients allogreffés de cellules souches périphériques est fondé sur la recherche en systématique de certains agents pathogènes. Cette démarche permet la mise en place d'un traitement préemptif lorsque le résultat est positif, sans attendre l'apparition de signes cliniques.

En virologie, sont systématiquement recherchés par PCR quantitative dans le sang total, le cytomégalovirus humain (hCMV), l'Epstein Barr virus (EBV), l'HHV-6 et l'adénovirus (tableau 1).

Tableau 2. Indication du suivi biologique moléculaire sanguin en virologie chez les patients allogreffés de la moelle (RuBIH)

Niveaux de recommandation	Obligatoire	Recommandé	Cas particuliers
CMV	Allogreffes (< J100)	Allogreffes à haut risque (> J100)	
EBV	Allogreffes à haut risque (< J100)	Allogreffes à haut risque (> J100)	Allogreffes à bas risque
Adénovirus	Allogreffes à haut risque (J-10-J180)	Allogreffes à haut risque	Allogreffes à bas risque
HHV-6	Si signes cliniques évocateurs		

Le CMV et l'EBV sont recherchés 1 fois par semaine (de J-10 à J100 de la greffe) puis 1 fois toutes les deux semaines. L'adénovirus est recherché 2 fois par semaine de J-10 à J100, puis également une fois toutes les 2 semaines.

Tableau 3. Fréquence et type d'examen au cours du suivi biologique moléculaire sanguin en virologie chez les patients allogreffés de la moelle (RuBIH)

	Fréquence		Technique
	J-10 à J100	> J100	
CMV	1 fois/semaine	1 fois/2 semaines jusqu'à J180 (groupes à haut risque)	Q-PCR
EBV	1 fois/semaine (groupes à haut risque)	1 fois/2 semaines jusqu'à J180 (groupes à haut risque)	Q-PCR
Adénovirus	1-2 fois/semaine (groupes à haut risque)	1 fois/2 semaines jusqu'à J180 (groupes à haut risque)	Q-PCR

Les virus sont aussi recherchés de manière hebdomadaire par culture cellulaire dans des prélèvements de nez, bouche, gorge, vulve, selles et urines, et par culture cellulaire rapide dans les urines pour le CMV.

II.2 Définitions de l'infection à adénovirus

Les différents stades de l'infection à adénovirus sont définis d'après les critères de Wisconsin [Flomenberg et al. 1994] et permettent de différencier trois entités : le portage asymptomatique, l'infection probable à adénovirus et la maladie à adénovirus.

Tableau 4. Définitions des différents stades de l'infection à adénovirus

Portage asymptomatique	Le virus est mis en évidence par culture cellulaire et/ou par PCR quel que soit le site de prélèvement, sans qu'il y ait de symptôme clinique.
Infection probable à adénovirus	Le virus est présent dans au moins deux prélèvements différents d'un même site, ou dans au moins deux sites d'isolement différents associés à des symptômes cliniques.
Maladie à adénovirus	Le virus est présent dans un site normalement stérile (sang, biopsie d'organe), associé à des symptômes cliniques.

II.3 Prise en charge de l'infection à adénovirus

II.3.1 Généralités

Après une primo-infection, le virus peut persister dans l'organisme, avec une excrétion dans les selles et les urines pendant plusieurs mois.

Les infections à adénovirus chez le sujet immunodéprimé sont soit secondaires à la réactivation d'un foyer local, principalement chez l'adulte, soit la conséquence d'une primo-infection, surtout chez l'enfant [Carrigan 1997].

Flomenberg et al. ont démontré que presque la moitié des adultes présentant une infection à AdV 35 avaient une sérologie positive avant la greffe de cellules souches hématopoïétiques, ce qui est en faveur de la réactivation d'un virus latent [Flomenberg et al. 1995].

Cette réactivation est favorisée par une forte immunodépression. Ainsi une anomalie qualitative ou quantitative des lymphocytes, essentiellement CD4+, favorise la survenue de ces infections notamment chez les patients ayant bénéficié d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

II.3.2 Incidence et caractéristiques

Au cours d'une étude précédemment réalisée au CHU de Nancy au sein du Service de Transplantation Médullaire [Salmon 2002] sur 92 patients allogreffés, l'adénovirus avait été isolé chez 33 patients, soit une incidence cumulée de 35,9%. La moyenne d'âge des patients était de 12,15 ans (2,64-40,72). Cinq étaient des adultes et 28 des enfants.

Sur ces 33 patients, 14 (2 adultes et 12 enfants) ont présenté une maladie à adénovirus, 8 enfants avaient une maladie probable et 11 patients (3 adultes et 8 enfants) ont présenté un portage asymptomatique.

Le portage asymptomatique est surtout présent au niveau des selles, avec un cas de localisation ORL. La maladie probable est le plus souvent représentée par l'existence d'une diarrhée avec mise en évidence du virus dans les selles et/ou dans les biopsies digestives, associées parfois à une hyperthermie sans autre cause identifiable à cette symptomatologie.

Les résultats de cette étude concordent avec la littérature (Annexe 1).

Dans les données de la littérature, l'incidence des infections à Adénovirus varie de 5% [Shields et al. 1985] à 29% [Runde et al. 2001] si l'on considère les études incluant des adultes et des enfants. L'étude réalisée au CHU de Nancy montre une incidence largement supérieure à la moyenne qui s'explique en partie par le fait que tous les patients sélectionnés avaient bénéficié d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques avec donneur non apparenté, ce qui est un facteur de risque [Hale and Braithwaite 1999]. Les autres études démontrent également une survenue plus fréquente de l'infection à adénovirus chez les enfants sans que cela ne soit significatif.

Le délai d'apparition de l'infection à adénovirus dans la littérature est similaire à celui retrouvé dans cette étude avec une apparition plus tardive chez l'adulte pouvant s'expliquer par la probable primo-infection chez l'enfant et possible réactivation d'un virus persistant chez l'adulte. Les sérotypes les plus fréquemment rencontrés chez l'enfant immunodéprimé sont les sérotypes 1, 2, 3, 5 responsables d'infections banales chez l'immunocompétent. Les autres données obtenues au cours de l'étude sont similaires à celles retrouvées dans la littérature, mais aucune ne s'est intéressée au type de greffon.

L'étude des patients co-infectés n'a montré aucune différence significative sur la survenue d'une adénovirose entre les patients présentant une infection à CMV et ceux sans infection à CMV. En revanche cette étude montre une association significative entre la survenue d'une adénovirose et d'une infection à EBV, avec un risque relatif de développer

une adénovirose multiplié par 2,9 chez les sujets ayant ou ayant eu une infection à EBV [Salmon 2002].

II.3.3 Facteurs pronostiques

Dans la survenue d'une adénovirose, certains éléments cliniques ou virologiques ont été déterminés comme étant des facteurs de risque. Ainsi le nombre de sites dans lesquels l'adénovirus a été isolé peut s'avérer déterminant et un nombre de site supérieur ou égal à 2 est un facteur de risque de développer une maladie à adénovirus [Flomenberg et al. 1994]. Les autres facteurs de risque sont une immunodépression longue [Avivi et al. 2004], une reconstitution immunitaire retardée [van Tol et al. 2005], une réaction du greffon contre l'hôte, notamment de grade au moins égal à 3 [Bordigoni et al. 2001], un donneur non apparenté [Chakrabarti et al. 2000].

De même, il existe une différence d'incidence entre les adultes et les enfants mais qui n'apparaît de manière significative que si l'on regroupe la maladie à adénovirus et l'infection probable. Le taux de reconstitution immunitaire à J60 est également un facteur pronostique avec notamment un nombre de CD3+ inférieur à 150/mm³ et de CD4+ inférieur à 50/mm³.

L'existence d'une co-infection virale n'a pas été démontrée comme étant un facteur de risque d'apparition d'une adénovirose. Toutefois une infection concomitante par un autre virus est fréquemment observée au cours d'une adénovirose.

L'immunodépression, la réaction du greffon contre l'hôte et ses traitements associés sont des risques de survenue d'infections virales concomitantes.

En revanche, cette étude ne permet pas de mettre en évidence de différence significative sur la survenue d'une infection à adénovirus selon le mode de conditionnement, le type de greffon, l'administration de sérum anti-lymphocytaire, la T-dépletion ex-vivo du greffon ou le développement d'une réaction du greffon contre l'hôte.

II.3.4 Dépistage

Le dépistage de l'adénovirus est réalisé de manière hebdomadaire dans le but de détecter les porteurs et de réaliser le plus tôt possible le diagnostic d'une éventuelle dissémination afin d'instaurer un traitement préemptif rapide.

L'adénovirus est recherché systématiquement dans les selles, les urines, les sécrétions nasales et pharyngées une fois par semaine de J-7 à J100. En cas de signes cliniques évocateurs, il peut être recherché dans les biopsies d'organe (foie, tube digestif, ...), le liquide céphalo-rachidien, le lavage broncho-alvéolaire ou la moelle.

Les techniques utilisées pour la mise en évidence de l'adénovirus sont la culture cellulaire sur tous les types de prélèvement, la recherche d'antigène viral dans les selles et des techniques de biologie moléculaire dans le sang total, le liquide céphalo-rachidien, le lavage broncho-alvéolaire, ou les biopsies.

Lorsque qu'un adénovirus est isolé en culture cellulaire il est envoyé au CHU de Lyon pour détermination du sérotype par inhibition d'hémagglutination.

Une sérologie sur deux prélèvements consécutifs peut renseigner sur une séroconversion ou une augmentation du taux d'anticorps. Cette méthode n'est pas utilisable chez les patients greffés.

II.3.5 Traitement

A l'heure actuelle, dans le Service de Transplantation Médullaire du CHU de Nancy, un traitement est instauré si la recherche d'antigène viral dans les selles est positive à deux reprises et/ou si le virus est isolé dans deux sites et/ou si le virus est mis en évidence dans les biopsie digestives et/ou si la virémie est positive. Il consiste en l'injection par voie intraveineuse (IV) de cidofovir (Vistide®) à la posologie de 5 mg/kg/semaine pendant 2 à 3 semaines, puis tous les 15 jours jusqu'à négativation des résultats biologiques.

L'importante toxicité rénale du cidofovir en limite son utilisation et rend indispensable un suivi très strict des valeurs biologiques rénales. Pour prévenir ces effets secondaires, des mesures symptomatiques sont associées au traitement pour augmenter son élimination urinaire, telles qu'une hyperhydratation par voie intraveineuse et un traitement par probénécide.

Le traitement par ganciclovir donné à titre préventif contre le hCMV pourrait également jouer un rôle protecteur contre les infections à adénovirus [Bruno et al. 2003].

La majorité des autres équipes retrouvées dans la littérature préconisent la mise en place du traitement lors de la découverte de l'adénovirus dans le sang. Ainsi Leruez et al. fixent un seuil à $10^{5,5}$ copies/mL de sang alors que d'autres auteurs traitent en fonction de la cinétique de la virémie : augmentation d'un facteur 10 [Lion et al. 2003] ou d'un facteur 100 [Lankester et al. 2002] (Annexe 2).

METHODES DE DIAGNOSTIC

DIRECT DE L'ADENOVIRUS

Lorsqu'un virus ou un antigène viral est mis en évidence dans un prélèvement, la probabilité de son rôle causal dans la pathologie est forte, notamment lorsque le virus est isolé au sein du foyer pathologique. Toutefois il est possible de mettre en évidence par l'examen direct, des virus responsables d'un portage asymptomatique, de façon chronique ou transitoire.

Par ailleurs, la détection de génomes viraux dans un prélèvement ne signe pas systématiquement la présence d'une réplication virale active. En effet la réaction d'amplification ne multiplie qu'une petite partie du génome viral et peut mettre en évidence un virus présent à l'état latent.

I. Techniques utilisant la culture cellulaire

I.1 Cultures classiques

Strictement dépendants de la cellule pour leur réplication, les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires. Les cellules vivantes nécessaires à leur culture peuvent être de trois origines, les animaux vivants réservés aux modèles expérimentaux sont très peu utilisés en diagnostic. En raison du tropisme des différents virus, il est nécessaire de maintenir plusieurs lignées cellulaires au laboratoire pour être capable d'isoler le plus grand nombre de virus.

L'inoculation du virus sur un tapis cellulaire peut avoir différents effets :

- L'absence de réplication si la cellule est non permissive au virus inoculé, ce qui laisse la nappe cellulaire intacte.

- Une réplication cytolytique, altérant la morphologie de la nappe cellulaire; l'ECP observé est caractéristique de certains virus ou familles de virus. Un ou plusieurs passages en aveugle (repiquage de la culture cellulaire inoculée sur une culture cellulaire fraîche) sont parfois nécessaires pour révéler un virus présent en faible quantité ou se répliquant difficilement dans le type de culture cellulaire utilisé.

Le diagnostic virologique sera ainsi orienté en fonction des caractéristiques de l'ECP observé, mai aussi de son délai d'apparition et de l'origine du prélèvement. Cependant un ECP peu caractéristique, altérant de manière non spécifique la morphologie de la nappe cellulaire, est à différencier d'un effet toxique du prélèvement sur les cellules (métabolites médicamenteux, toxines bactériennes, ...). C'est pourquoi il est préférable de confirmer la présence du virus dans le tapis cellulaire à l'aide de techniques immunologiques telles que l'immunofluorescence, l'immunopéroxydase, la séroneutralisation ou l'inhibition d'hémagglutination. Ces techniques permettent également parfois d'identifier le type viral en présence.

Les techniques de culture cellulaire sont longues et fastidieuses, mais elles sont les seules, avec la microscopie électronique, à permettre un diagnostic virologique non orienté. Elles restent un outil indispensable du diagnostic virologique notamment pour l'obtention de souche virale, pour l'épidémiologie et l'étude phénotypique de la sensibilité aux antiviraux.

1.2 Cultures dites rapides

Afin de réduire le délai de réponse de la culture cellulaire, un procédé visant à favoriser les interactions entre le virus et les cellules grâce à une étape de centrifugation des prélèvements sur le tapis cellulaire a été développé. La culture cellulaire rapide associe généralement un marquage des cellules infectées en immunofluorescence ou en immunopéroxydase à l'aide d'anticorps monoclonaux.

Cette technique peut être appliquée à l'adénovirus mais présente une sensibilité trop faible pour être utilisée comme technique diagnostic [Van Doornum and De Jong 1998].

II. Détection du virus par microscopie électronique

La microscopie électronique reste une technique de référence du diagnostic virologique, notamment sur certains prélèvements complexes tels que les biopsies ou les selles. Elle permet après coloration négative de visualiser les virus directement dans le prélèvement.

Très utile pour mettre en évidence des virus non cultivables, cette technique nécessite toutefois des prélèvements riches en virus. De plus, basant le diagnostic sur les caractéristiques morphologiques de la particule virale observée, elle ne permet pas de différencier deux virus d'une même famille.

L'immuno-microscopie électronique consiste à mettre le prélèvement en contact avec un sérum contenant des anticorps dirigés contre le virus suspecté et à visualiser ainsi des virus sous forme complexée. Ceci permet d'améliorer nettement la sensibilité par rapport à la microscopie électronique classique, mais ne s'applique plus au diagnostic non orienté.

III. Détection directe des constituants antigéniques du virus

Ces techniques se sont développées grâce de la découverte des anticorps monoclonaux qui leurs ont apporté spécificité et reproductibilité. Ce sont des techniques rapides, de quelques minutes à quelques heures, qui ne nécessitent pas que le virus soit infectieux. En revanche, elles ne peuvent être appliquées qu'à des prélèvements riches en matériel viral car leur limite est le manque de sensibilité. On peut distinguer deux grandes techniques que sont l'immunocytodiagnostic par immunofluorescence ou immunopéroxydase et les techniques immunoenzymatiques.

III.1 Immunocytodiagnostic

- l'immunocytodiagnostic consiste à visualiser directement la présence d'antigènes viraux dans les cellules infectées à l'aide d'un anticorps spécifique du virus à rechercher. L'immunofluorescence est dite directe si l'anticorps est marqué par un fluorochrome ou

indirecte si l'anticorps spécifique du virus est reconnu spécifiquement par un deuxième anticorps anti-IgG marqué. Cette technique est appliquée aux sécrétions pharyngées et lavage broncho-alvéolaire pour la recherche des virus respiratoires.

- L'immunopéroxydase se distingue de l'immunofluorescence par la nature du marqueur; le fluorophore est remplacé par une enzyme, la peroxydase, qui est à l'origine d'une coloration des cellules infectées au niveau du site de fixation de l'anticorps anti-viral, en présence d'un substrat spécifique.

III.2 Techniques immunoenzymatiques

La technique ELISA est très utilisée pour la détection d'antigènes solubles viraux.

L'antigène viral se fixe aux anti-corps viraux fixés sur un support solide (micro-plaque de polystyrène, bille de plastique, membrane de nylon, ...). Un deuxième anticorps marqué par une enzyme est ajouté au milieu réactionnel et se fixe sur l'antigène viral lié à l'anticorps de capture. La réaction colorée se développe lors de l'ajout du substrat.

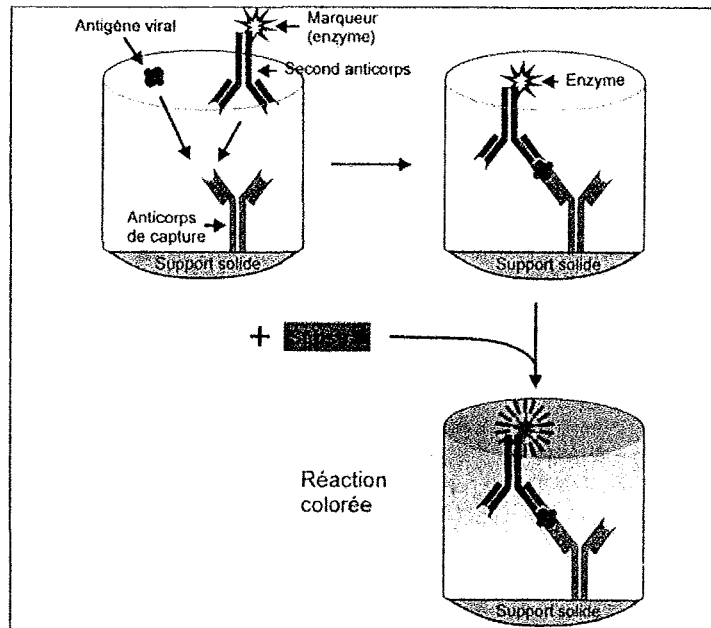


Figure 6. Principe de la réaction ELISA pour la détection d'antigènes solubles en technique "sandwich" d'après Le Faou (2002)

La technique ELISA peut être appliquée à différents antigènes viraux présents dans les selles comme les antigènes des rotavirus et des adénovirus.

Ces tests sont commercialisés sous forme unitaire ou sous forme automatisée.

III.3 Agglutination de particules de latex

Le principe de la détection des antigènes solubles par agglutination de particules de latex est basé sur la réaction antigène-anticorps. Les antigènes présents dans le prélèvement sont mélangés avec un réactif contenant des microbilles recouvertes d'anticorps spécifiques entraînant une agglutination visible à l'oeil nu. Les agglutinations non spécifiques sont éliminées en utilisant des particules non sensibilisée.

Les tests d'agglutination de particules de latex sont essentiellement utilisés pour la détection des rotavirus et des adénovirus dans les selles.

Ces tests ont l'avantage d'être très rapides, mais présentent une moins bonne sensibilité que les tests immunoenzymatiques.

IV. Détection des génomes viraux par amplification

Les techniques de détection des génomes viraux sont applicables à tous les agents viraux y compris ceux difficiles à cultiver. Le prototype de ces techniques d'amplification est la réaction de PCR, utilisée sous différentes variantes. D'autres techniques d'amplification de séquences nucléotidiques sont utilisées en virologie comme la technique NASBA (*Nucleic acid sequence-based amplification*) qui fait intervenir trois enzymes différentes.

Il faut également citer une technique de détection des génomes viraux par hybridation, sans amplification, l'ADN branché ou bDNA en microplaque qui utilise de multiples sondes de capture et de révélation, amplifiant ainsi le signal coloré au lieu de la cible.

Les techniques de détection des génomes viraux sont très sensibles et maintenant largement utilisées dans les laboratoires de diagnostic virologique. Toutefois il convient d'être très vigilant face aux résultats faussement positifs, dus à des contaminations d'échantillons négatifs et aux résultats faussement négatifs liés à la présence de substances inhibitrices dans les prélèvements. Ces deux phénomènes seront limités respectivement par d'importantes précautions de manipulation avec notamment une sectorisation des étapes de la préparation de la PCR au sein du laboratoire et l'introduction de témoins internes d'inhibition.

IV.1 Principe de la PCR

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (*Polymerase chain reaction*) a été mis au point en 1985 par Kary Mullis. Cette technique consiste à amplifier *in vitro* une séquence d'ADN par répétition de réactions d'élongation. Elle est réalisée en présence de deux amorces oligonucléotidiques d'ADN spécifiques et d'une ADN polymérase. C'est la découverte d'une eubactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, et de sa polymérase stable jusqu'à des températures proches de 100°C qui a permis le développement de cette technique.

L'amorce ou primer est un oligonucléotide synthétique de 17 à 30 paires de bases dont la séquence est complémentaire à celle du brin à amplifier. La fixation de l'amorce à l'ADN cible est suivie de son élongation par la polymérase aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin. La PCR est une succession cyclique des trois étapes :

- La dénaturation des deux brins d'ADN à température élevée (environ 95°C) aboutissant à des molécules d'ADN monocaténaïres par rupture des liaisons hydrogènes.
- L'hybridation (*annealing*) des amorces à l'ADN cible à étudier. La température optimale pour l'hybridation est fonction de la séquence des amorces, elle se situe généralement entre 40°C et 65°C.
- L'élongation des amorces au cours de laquelle l'ADN polymérase thermostable incorpore les désoxy-ribonucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée. La synthèse s'effectue dans le sens 5'→3' à 72°C.

A la fin du cycle deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues. Les produits de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur. Les amorces sont à nouveau hybridées avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à la polymérase. A chaque cycle, le nombre de copies du fragment d'ADN est doublé : 2^n molécules sont ainsi obtenues après n cycles. De manière générale, 25 à 40 cycles sont effectués.

Le milieu réactionnel tamponné comprend tous les éléments indispensables soit les précurseurs trinucleotidiques (désoxy-Adénosine triphosphate, désoxy-cytosine triphosphate, désoxy-thymidine triphosphate et désoxy-guanosine triphosphate), le cation Mg^{++} , l'ADN polymérase et les amorces.

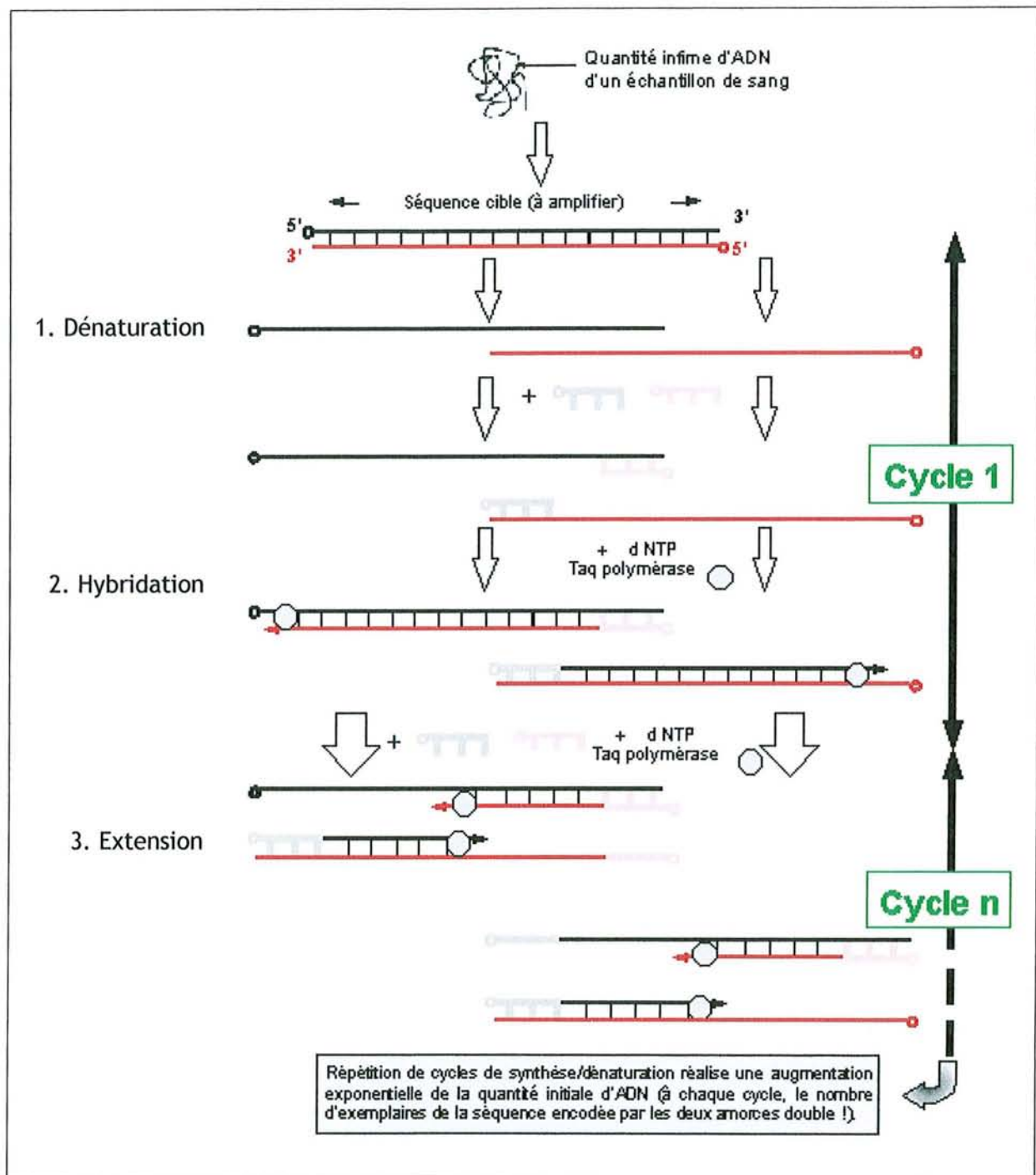


Figure 7. Principe de la PCR

IV.2 PCR Qualitative

Après amplification, la détection des fragments d'ADN est réalisée par électrophorèse sur gel. Deux types de gel peuvent être utilisés, le gel d'agarose et le gel de polyacrylamide. Ce dernier permet une meilleure séparation des fragments d'ADN mais son utilisation est plus délicate. Les gels forment des mailles qui piègent les acides nucléiques, la migration dans le gel est donc fonction de la concentration d'agarose ou d'acrylamide présente dans le gel.

Après PCR, l'ADN migre vers le pôle positif de la cuve à électrophorèse. La distance de migration des acides nucléiques est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de paires de bases du fragment. En parallèle des fragments étudiés, un marqueur de poids moléculaire contenant des fragments de taille connue est déposé sur le gel. Cet ADN étalon permettra d'estimer la taille du segment d'ADN amplifié.

La visualisation des acides nucléiques se fait après addition de bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant. Une fois intercalé entre les bases des acides nucléiques, le BET présente une fluorescence orangée sous lumière ultra violette ($\lambda = 321\text{nm}$).

L'extrême sensibilité de la PCR qualitative en fait un outil de choix pour la détection de faibles quantités d'acides nucléiques : la présence ou l'absence de séquence nucléique spécifique cible au sein d'un échantillon biologique est interprétée comme un résultat "positif" ou "négatif".

IV.3 PCR Quantitative en méthode TaqMan

La PCR quantitative permet de dénombrer la quantité de virus initiale dans l'échantillon analysé. La synthèse des copies est révélée par la fluorescence émise par le fluorophore.

La PCR quantitative repose sur l'exploitation de la cinétique de la réaction de PCR qui se décompose en deux parties principales : une phase exponentielle au cours de laquelle le nombre de molécules d'ADN cible augmente jusqu'à un certain nombre de cycles, suivie d'un plateau. En considérant le rendement de la PCR identique pour chaque cycle, on observe au cours de la phase exponentielle une relation de proportionnalité entre le nombre de cycles et la quantité de produit formé.

La méthode TaqMan utilise l'activité 5'→3' nucléase de la Taq polymérase et une sonde de séquence complémentaire à celle de la cible à quantifier qui est ajoutée au

milieu réactionnel en plus des deux amorces. Cette sonde possède un dérivé de la fluorescéine (reporter) intégré en 5' et un dérivé de la rhodamine en 3', de sorte que la rhodamine située à proximité de la fluorescéine absorbe l'énergie émise par celle-ci lorsqu'elle est soumise à une source d'excitation. La rhodamine inhibe donc la fluorescence, elle sera nommée "quencher".

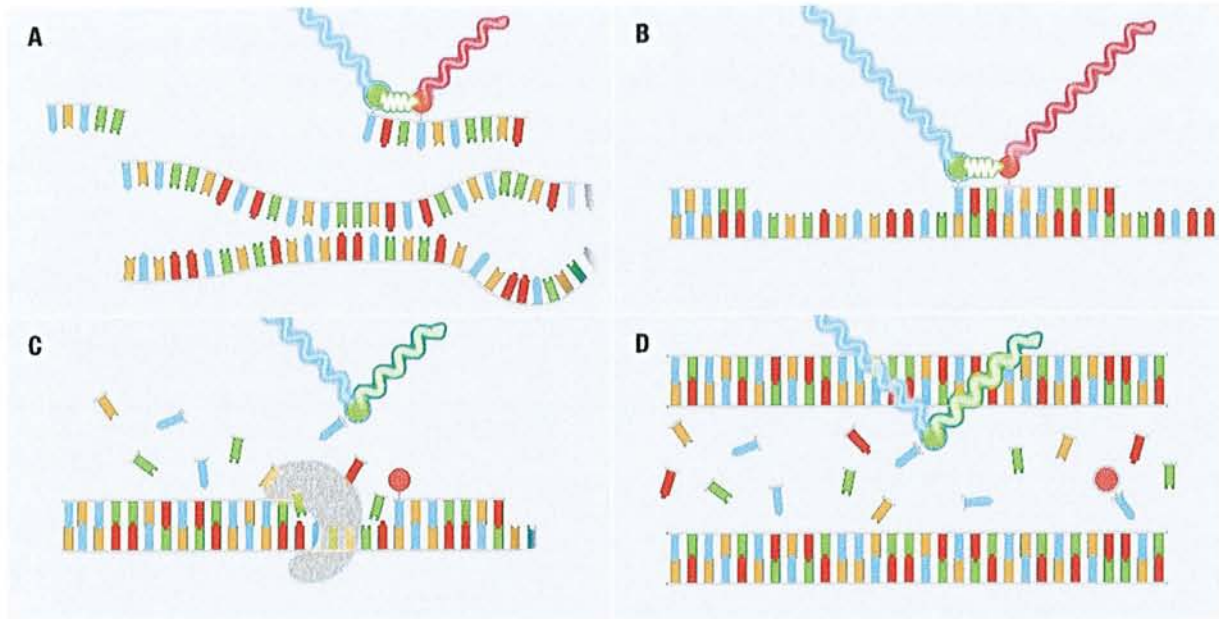


Figure 8. Principe de la méthode TaqMan

Au cours de la réaction d'amplification, la Taq ADN polymérase détruit la sonde par son extrémité 5', séparant le quencher et rétablissant la fluorescence du reporter. L'intensité de la fluorescence émise est alors proportionnelle à la quantité de produit de PCR formés permettant une quantification. Le développement de la fluorescence est mesuré en continu au cours de la réaction d'amplification. On peut ainsi suivre l'amplification de la séquence cible après chaque cycle, d'où le terme de « PCR en temps réel ».

La quantification est ensuite réalisée dans la zone linéaire de fluorescence à l'aide d'un standard externe amplifié simultanément. La courbe étalon est réalisée sur une série de dilutions d'un standard ADN de quantité connue. L'intensité du signal observé pour le tube échantillon permet de déduire la concentration d'ADN correspondante.

TRAVAIL PERSONNEL

I. Evaluation et mise en place de la PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel par méthode TaqMan évaluée pour le diagnostic et le suivi des infections à adénovirus chez les patients allogreffés de cellule souches hématopoïétiques [Heim et al. 2003]. Dans un premier temps, cette technique a été testée sur des ADN extraits de souches d'adénovirus et sur des ADN extraits de prélèvements biologiques de patients du Service de Transplantation Médullaire.

Puis, des dossiers de patients ayant présenté une virémie positive à adénovirus (PCR qualitative) et pour lesquels l'ADN extrait du sang total a été conservé, ont été étudiés. Les valeurs biologiques correspondant à l'infection à adénovirus et les signes cliniques présents au moment de l'infection ont été relevés.

Un dossier patient parmi ceux-ci a été sélectionné pour la suite de l'étude. Les virémies positives relevées entre juillet et août 2003 ont été quantifiées et mises en regard des événements cliniques observés à ces mêmes dates.

I.1 Matériel et méthode

I.1.1 Echantillons

- Douze souches d'adénovirus de différents sérotypes : A31, B3, B7, B34, C2, C1, D47, D13, D9, D19, D23, D36. Le sérotypage a été réalisé au laboratoire de virologie du CHU de Lyon par inhibition d'hémagglutination.
- ADN extraits de sangs totaux de patients allogreffés de moelle, hospitalisés en 2003 dans le Service de Transplantation Médullaire (STM) de l'Hôpital d'Enfants du CHU de Nancy, Pr. Bordigoni. Les échantillons ont tous été contrôlés positifs par PCR qualitative.

Les souches d'adénovirus typées et les ADN extraits ont été conservés à -80°C.

1.1.2 Extraction

Elle est réalisée à l'aide du kit Qiagen : QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Annexe 3).

- L'échantillon est préalablement lysé en présence de protéases dans un tampon AL.
- Les lysats sont ensuite déposés dans une colonne contenant un gel de silice sur lequel l'ADN va se lier. Les caractéristiques physicochimiques du lysat sont telles que les protéines et les autres contaminants pouvant inhiber la PCR ne sont pas retenus sur la membrane. Le tampon AL permet d'optimiser les capacités de liaison de l'ADN sur ce gel.
- Une fois l'ADN fixé sur la colonne, celle-ci est lavée à l'aide de 2 tampons AW1 et AW2 du kit Qiagen. Cette opération permet d'éliminer la totalité des éventuels contaminants sans affecter la liaison de l'ADN au gel.
- L'étape d'élution, par du tampon AE ou de l'eau distillée, permet d'obtenir un ADN purifié directement utilisable en PCR. L'ADN élué avec le tampon AE pourra être conservé à 80°C.

1.1.3 Dilutions

Les échantillons des patients ont du être dilués pour permettre leur quantification. La dilution se fait en cascade de 10 en 10 jusqu'à obtenir des échantillons dilués de 10^{-1} à 10^{-4} .

La solution de dilution est constituée de 40% de tampon AE (kit Qiagen) et de 60% d'eau.

1.1.4 PCR

1.1.4.1 PCR qualitative [Hierholzer et al. 1988]

Avant d'être amplifié, l'ADN viral a été purifié selon le protocole décrit précédemment.

- Les amorces utilisées sont situées dans le gène de l'hexon :

Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour la PCR qualitative

Nom	Séquence	Position
A2H/pcrAR	5' ATG ACT TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA 3'	21592-21617 nt
A2H/pcr1	5'GCC GAG AAG GGC GTG CGC AGG TA 3'	21725-21703 nt

Les solutions mères des amorces sont synthétisées au laboratoire commun de Biologie Moléculaire du CHU Brabois sur Expédite 8909 d'Applied Biosystem. Elles sont ensuite distribuées en fractions aliquotées à la concentration de 5 pmol/μL.

- Cycle de PCR

La dénaturation initiale se fait à 94°C pendant 10 min. Puis se succèdent 30 cycles de :

- Dénaturation 45 secondes à 94°C,
- Hybridation 20 secondes à 52°C,
- Elongation 45 secondes à 74°C, au sein du thermocycleur.

- Révélation

L'électrophorèse est réalisée sur un gel à 2% d'agarose sur lequel est déposé 5 μL du produit de PCR. La migration se fait environ sur les ¾ du gel puis celui-ci est placé dans un bain de bromure d'ethidium pendant 20 à 30 minutes et la présence d'un amplicon est détectée grâce à une lampe UV à 302 nm de longueur d'onde.

1.1.4.2 PCR quantitative (Heim et al., 2003)

- On utilise des amorces et une sonde situées dans le gène de l'hexon.

Tableau 6. Séquence des amorces et sondes utilisées pour la PCR quantitative

Nom	Séquence	Position (nt)
AQ1 (sens)	5' GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT 3'	18989 - 18967
AQ2 (antisens)	5' GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C 3'	18858 - 18882
AQ (sonde)	5'6FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-TAMRA 3'	18926 - 18898

La sonde TaqMan est obtenue de Proligo SA (Paris, France) et reconstituée au laboratoire à 200 μM dans l'eau distillée. Le groupement fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescéine) émet une fluorescence à 495 nm et le groupement quencher TAMRA (6-carboxy-tetraméthyl-rhodamine) à 557 nm. On utilise pour la PCR des solutions filles à 20 μM (20 pmol/μL).

- Protocole de la PCR

Réactifs pour le mix	Pour 1 tube
Kit (taqman X2)	12,5 µL
Amorce Aq1 (10 µM) ou ADVS	0,75 µL
Amorce Aq2 (10 µM) ou ADVAS	0,75 µL
Sonde Aq (10 µM)	0,50 µL
Eau	2,50 µL
Total	17 µL

Dans la pièce propre, 17 µL du mix sont ajoutés dans chaque puits, ainsi que 8 µL d'eau distillée dans le puits « Eau propre ».

Sous une hotte à flux laminaire, avec la pipette dédiée, 8 µL d'eau distillée est ajouté dans le puits « Eau sale », et 8 µL de chaque ADN patient est ajouté dans chaque puits correspondant. La gamme étalon plasmidique (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) est ajoutée dans les puits correspondants avec la pipette dédiée, à raison de 8 µL par puits.

- Cycles de PCR

La PCR est réalisée sur 45 cycles :

- Dénaturation à 95°C pendant 15 secondes
- Hybridation à 55°C pendant 15 secondes
- Elongation à 65°C pendant 1 minute

- La gamme plasmidique

Elle est obtenue par dilution d'un plasmide dans lequel est inséré la cible de la PCR.

Ce plasmide nous a été fourni gracieusement par l'équipe du Professeur Heim. Il a été obtenu par clonage d'un amplicon de PCR de HadV-2 dans un vecteur plasmidique pGEM-T. L'ADN plasmidique a été purifié d'*Escherichia coli*. Un séquençage a permis de confirmer l'identité du clone HadV-2 avec la séquence du prototype Hadv-2 de la Genbank.

La concentration du plasmide a été déterminée par photométrie à 260 nm et calculée en copies/mL.

1.2 Développement de la PCR quantitative dans le sang

1.2.1 Evaluation de la technique

La pente de la droite de calibration est inférieure à 3,5 et possède un coefficient de régression linéaire proche de 1. Le seuil de détection se situe à 1000 copies/mL.

La gamme plasmidique est linéaire de 10^4 copies à 10^7 copies.

La PCR quantitative permet de détecter et de quantifier les 12 souches d'adénovirus testés et tous les échantillons patients détectés positifs par la PCR qualitative sont confirmés par la PCR quantitative.

Les résultats quantitatifs sont reproductifs d'une série à l'autre et au sein d'une même série sur des dilutions d'un même échantillon.

Tableau 7. Résultats de la PCR quantitative pour la gamme plasmatique et les prélèvements sanguins

Gamme	Echantillon	Sérotype	Dilution	Nombre de cycles	Quantité (log) (copies/mL)
10^4	-	-	-	33,45	4
10^5	-	-	-	29,44	5
10^6	-	-	-	26,46	6
10^7	-	-	-	23,20	7
			pur	27,81	5,59
	Ech 1289	Non Typé	1/10	31,17	4,59
			1/100	34,69	4,55
			pur	27,37	5,73
	Ech 2183	C1	1/10	30,38	4,83
			1/100	34,10	3,73

1.2.2 Application au suivi d'un patient

Les échantillons des patients ayant eu une virémie positive à adénovirus par PCR qualitative et pour lesquels l'ADN extrait du sang total avait été conservé, ont été re-testés par PCR quantitative. Les résultats obtenus ont été comparés aux données cliniques.

Dans les dossiers des patients sélectionnés, ont été relevés les données virologiques correspondant à la recherche de l'adénovirus et les signes cliniques reliés à l'infection à adénovirus.

Un dossier patient a été sélectionné pour illustrer la corrélation entre la charge virale en adénovirus et l'histoire clinique de l'infection à adénovirus. Les virémies positives relevées entre juillet et août 2003 ont été quantifiées et mis en regard des signes cliniques observés à ces mêmes dates.

Des signes cliniques de type diarrhées et fièvre ont été observés au cours de l'infection probable à adénovirus, avec mise en évidence du virus par technique ELISA dans les selles. Les signes cliniques semblent s'aggraver au cours de la maladie à adénovirus (charge virale détectable dans le sang). Les données sont insuffisantes pour conclure à l'efficacité du traitement. On observe toutefois une diminution de la charge virale au cours du traitement par cidofovir. Il faut noter que ce patient n'a pas bénéficié d'un traitement dès la mise en évidence d'antigènes adénovirus car il avait reçu une allogreffe de cellules souches périphériques génoidentiques et présentait une insuffisance rénale contre-indiquant le traitement par cidofovir.

Tableau 8. Suivi d'un patient : chronologie des événements cliniques et biologiques

Date	Post-greffe	Biologie	Virémie qualitative	Virémie quantitative	Clinique	Traitement
Historique	Greffe cellules souches hématopoïétiques le 01/04/2003; GVH, Insuffisance rénale					
09/07/2003	J 98	selles +				
11/07/2003	J 100		positive	nr		
15/07/2003	J 104		positive	nr	diarrhée >2L, fièvre	
16/07/2003	J 105				diarrhée +++ fièvre >39°C	Vistide®
17/07/2003	J 106		positive	3,9.10e5		
21/07/2003	J 110	selles +	négative		↘ diarrhée	
22/07/2003	J 111	selles +			↑ diarrhée	
23/07/2003	J 112		négative			
24/07/2003	J 113				adenovirose digestive	Vistide®
26/07/2003	J 115				adenovirose	
28/07/2003	J 117	selles +	négative		adenovirose selles molles	
29/07/2003	J 118	sang Ag +				
30/07/2003	J 119	selles +				
04/08/2003	J 124		positive	2,9.10e5		
05/08/2003	J 125				adénovirose fièvre 38,8°C	Vistide® 1/2 dose
06/08/2003	J 126				apyrétie	
07/08/2003	J 127		positive	5,3.10e5		
10/08/2003	J 130				adénovirose ↑ fièvre	
11/08/2003	J 131		positive	7,4.10e5		
14/08/2003	J 134		positive	nr		
18/08/2003	J 138		positive	nr		
25/08/2003	J 145				décès	

II. Intérêt de la PCR quantitative dans les selles

II.1 Matériels et méthodes

II.1.1 Patients et échantillons

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur les patients du Service de Transplantation Médullaire du CHU de Nancy Brabois Enfant, hospitalisés entre août 2005 et août 2006 pour une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques avec donneur non apparenté, et suivis régulièrement avec le dépistage de l'adénovirus dans les selles et le sang total. Au cours de cette période, 40 adultes âgés de 15 à 54 ans (âge médian 33 ans) et 7 enfants âgés de 3 mois à 8 ans (âge médian 6 ans) ont été hospitalisés au Service de Transplantation Médullaire.

Les échantillons utilisés sont des selles prélevées de manière systématique une fois par semaine chez ces patients. Comme l'intérêt de cette étude repose sur le diagnostic précoce de l'infection à adénovirus et l'initiation d'un traitement préemptif, les prélèvements ont été choisis au début de l'infection.

Nous avons également recherché l'historique du traitement par cidofovir (date et posologie) en consultant les dossiers des patients au Service Pharmacie de l'hôpital de Brabois Enfant.

Pour ce travail, nous avons sélectionné quatre patients ayant présenté une infection à adénovirus : TE né en 1968, FI né en 1981, MA né en 1987 et RI né en 2000 et dont l'historique médical est détaillé ci-dessous.

- Patient TE : sexe masculin, âgé de 38 ans au moment de l'étude. Ce patient, suivi pour une leucémie aiguë lymphoblastique en première rémission complète, chimiorésistant, a été hospitalisé du 03/10/05 au 25/11/05. Il a bénéficié, le 14/10/2005 d'une allogreffe non apparentée de moelle après un traitement myéloablatif par fludarabine et melphalan. Malgré un traitement par sérum anti-lymphocytaire, il a développé une réaction du greffon contre l'hôte cutanée chronique. Sur le plan infectieux, il n'a jamais reçu de traitement par cidofovir pour son infection à adénovirus et a développé un syndrome lympho prolifératif EBV induit post-greffe (charge virale culminante à 80 780 copies/mL) (Annexe 4).
- Patient FI : ce jeune adulte était âgé de 24 ans au moment de l'étude. Il a été hospitalisé au Service de Transplantation Médullaire du 16/09/05 au 14/04/06 pour une

anémie réfractaire sidéroblastique avec syndrome de Fanconi. Il a bénéficié le 26/10/05 d'une allogreffe non apparentée de moelle osseuse après un traitement non myéloablatif par Fludarabine et endoxan. Malgré un traitement par sérum antilymphocytaire il a développé une réaction du greffon contre l'hôte aiguë cutanée et hépatique de grade 4, résistant aux différents traitements immunosuppresseurs instaurés. Il a reçu neuf doses de cidofovir pour traiter son infection à adénovirus. Le décès a fait suite le 14/04/06 à une défaillance multiviscérale survenant dans un contexte de GVH aiguë sévère (Annexe 5).

- Patient MA : ce patient avait 19 ans au moment de l'étude. Il était suivi pour un sarcome d'Ewing de l'extrémité supérieure du fémur gauche avec métastases pulmonaires et médullaires. Hospitalisé à partir du 03/10/2005, il a bénéficié d'une allogreffe médullaire géno-identique en avril 2005. Celle-ci s'est compliquée d'une réaction du greffon contre l'hôte aiguë cortico-sensible à J19 et en juin 2005. Suite à un rejet de greffe, il recevra en septembre 2005 une deuxième allogreffe géno-identique du même donneur. C'est à ce moment qu'il a développé adénovirose traitée par cidofovir. Le 12/10/2005, une autogreffe de cellules souches périphériques sera rejetée par les cellules de l'allogreffe. Le patient développera alors une réaction du greffon contre l'hôte aiguë digestive et médullaire. Les chimiothérapies pré-greffe ont été accompagnées de sérum anti-lymphocytaire. Il sortira en janvier 2006 après une ré-injection de greffe haplo-identique T déplétée et décédera le 27/02/2006 d'une pneumopathie à virus respiratoire syncytial (Annexe 6).
- Patient RI : ce patient âgé de 5 ans au moment de l'étude était atteint d'un déficit immunitaire primitif de type hyper IgM non classé et a été hospitalisée initialement du 27/06/2005 au 28/08/2005. Il a bénéficié le 11/07/2005 d'une greffe non apparentée de sang placentaire après un conditionnement myéloablatif. Il a reçu une prophylaxie anti-rejet par sérum anti-lymphocytaire. Deux mois après la greffe il a développé une réaction du greffon contre l'hôte aiguë de stade II, puis chronique digestive. Il a également présenté une infection à HHV-6 culminante à J14 de la greffe et une infection à entérovirus en janvier 2006. Le patient est décédé le 17 mai 2006 d'une défaillance multiviscérale, secondaire à une GVH chronique (Annexe 7).

Au décours des trois premiers mois de greffe, le patient RI a présenté une infection à adénovirus ayant nécessité un traitement par cidofovir (Annexe 7).

II.1.2 Echantillons de selles

La recherche de l'adénovirus dans les selles par technique de biologie moléculaire pose le problème de la nature de l'échantillon. En effet, les selles sont des prélèvements à la texture et à la composition variable, ce qui peut influencer sur l'échantillonnage du prélèvement et sur la répartition du virus et de son génome. De plus, la mise en place d'une technique quantitative nécessite une prise d'essai de masse ou de volume connue.

II.1.2.1 Etude de l'homogénéité de masse de l'échantillonnage

Les selles sont des prélèvements de consistance variée, de pâteuse à liquide, qui doivent être échantillonnés avant utilisation. L'obtention d'un échantillon de masse déterminée, en s'affranchissant de la pesée, se base sur l'estimation visuelle du volume prélevé.

Pour étudier la répétabilité de l'échantillonnage nous avons prélevé 5 fois le même volume de selles sur un prélèvement donné. Les aliquotes sont ensuite pesés un à un. La même expérience est réalisée deux jours plus tard sur 10 échantillons, d'une autre selle.

II.1.2.2 Etude de l'homogénéité de la charge virale

Parallèlement, et afin de vérifier l'homogénéité de la charge virale au sein du prélèvement, l'ADN viral de 5 échantillons d'une même selle a été extrait et quantifié par PCR en temps réel.

II.1.3 Mise en évidence de l'adénovirus

II.1.3.1 Par culture cellulaire

La culture cellulaire est sensible et permet le diagnostic en 4 à 15 jours. Plusieurs systèmes cellulaires peuvent être utilisés. La présence d'un adénovirus est évoquée sur un aspect en dentelle du tapis cellulaire associée à une acidification du milieu.

Le laboratoire de virologie du CHU de Nancy utilise des cellules MRC5. Lorsque le prélèvement de selle arrive au secteur de virologie, un échantillon de la taille d'une noisette est prélevé et suspendu dans 5 mL de tampon phosphate salin. Après centrifugation, 20 minutes à 4000 tour/minute, le surnageant est passé à travers un filtre de 0,45 µm. Le filtrat additionné d'antibiotiques (amoxicilline et amikacine) est inoculé sur un tapis cellulaire à confluence. Les cellules sont maintenues pendant 5 jours dans du milieu MEM Earle's à 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et l'ECP est recherché tous les jours. Au-delà de ce délai, le milieu de culture est changé (milieu MEM Earle's à 2% de SVF)

et le tapis cellulaire est vérifié de façon hebdomadaire jusqu'au 21^{ème} jour. En l'absence d'altération de la nappe cellulaire au 21^{ème} jour la culture cellulaire est rendue négative.

Toute culture positive est confirmée par une technique d'agglutination de particules de latex.

II.1.3.2 Par technique ELISA

La recherche d'adénovirus dans les selles est réalisée par une technique immunologique qui détecte l'antigène spécifique de genre, structure commune aux adénovirus humains située sur l'hexon, par technique ELISA.

Au Laboratoire de Virologie du CHU de Nancy, cette technique est automatisée sur l'ETI-LAB de Diasorin avec le kit diagnostic utilisé PremierTM Adenoclone de la société Meridian Bioscience Inc qui permet de révéler 41 sérotypes d'adénovirus différents. Ce test utilise des anticorps monoclonaux en phase solide dans un essai de type sandwich. Des micropuits sécables sont recouverts d'anticorps monoclonal anti-adénovirus. Une aliquote de suspension fécale est ajoutée dans le micropuit et incubé avec un anticorps monoclonal anti-adénovirus conjugué à la peroxydase de Raifort. La suspension de selle a été réalisée en mélangeant par aspiration et refoulement un échantillon de selle et 1 mL de diluant (tampon phosphate salin contenant 0,02% de thimerosal comme conservateur, fourni dans le test). Après l'incubation 60 minutes à température ambiante, les puits sont rincés avec de l'eau distillée pour éliminer l'échantillon et l'excès d'anticorps couplés à l'enzyme non fixés. Le substrat de l'enzyme (peroxyde d'urée) et le chromogène (tétraméthylbenzidine) sont ajoutés dans les micropuits et incubés pendant 10 minutes à température ambiante. Tout conjugué fixé dans les micropuits va permettre au substrat incolore de se transformer en produit de couleur bleue. Un contrôle positif et négatif, fournis avec le test, sont utilisés dans chaque série de test.

Le résultat est déterminé de façon spectrophotométrique. Les échantillons avec une Densité optique (DO) à 450 nm supérieure à 0,15 sont considérés comme positifs.

II.1.3.3 Immunofluorescence

L'immunofluorescence est effectuée sur étalement des sécrétions respiratoires.

La recherche d'adénovirus par immunofluorescence est réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal "Anti-adenovirus groupe (ADV)" de la société ARGENE BIOSOFT. L'anticorps se fixe sur l'antigène exprimé dans le noyau des cellules infectées obtenues à partir de prélèvements de sécrétions et cellules des voies respiratoires. Les cellules ayant fixé l'anticorps monoclonal spécifique apparaissent fluorescentes à l'observation au microscope à fluorescence : fluorescence nucléaire granulaire.

L'anticorps monoclonal est dilué au 1/40^{ème} dans du tampon phosphate salin avant utilisation.

II.1.3.4 Extraction ADN

La réalisation de la PCR quantitative nécessite l'extraction de l'ADN contenu dans les selles ou le sang des patients. Cette étape a été réalisée respectivement à l'aide du kit d'extraction Qiagen spécial selles : QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (Annexe 3) ou du kit Qiagen QIamp[®] DNA Blood Mini Kit (Annexe 4).

Après une étape préalable de lyse de l'échantillon de selles en présence de protéases dans un tampon ASL, le procédé d'extraction est identique à celui décrit précédemment pour les échantillons de sang total (cf. § I.1.2).

Certains échantillons présentant une très forte charge virale ont du être dilués avant d'être quantifiés. Ces dilutions ont été effectuées en cascade de 10 en 10 jusqu'à 10⁻⁶ pour les échantillons les plus forts. Ceux présentant une charge virale inférieure à 1000 copies/mL d'ADN extrait ne peuvent être quantifiés car ils ne sont pas dans la zone de linéarité de la gamme utilisée. Ils sont qualifiés de détectable, non quantifiables

II.1.3.5 Amplification génique

L'amplification de l'ADN par PCR quantitative est réalisée grâce à la PCR quantitative adaptée de Heim et décrite précédemment (cf. § I.1.4.2).

II.2 Résultats

II.2.1 Mise en place de la PCR quantitative sur selles

II.2.1.1 Répétabilité de l'échantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés sur deux échantillons de selles différents, au cours de deux journées différentes, par la même personne. La masse attendue de l'échantillon est 200 mg.

Sur la totalité du test (15 échantillons) on obtient une masse moyenne de 233,28 mg avec un écart type de 56,34 mg. Cette variabilité est retrouvée sur des échantillons réalisés au cours de la même journée, avec une masse moyenne de 266,21 ± 29,83 mg.

Ces résultats indiquent que le volume de l'échantillon prélevé n'est pas représentatif de la masse et qu'une estimation visuelle de la quantité de selles prélevée ne suffit pas à

assurer la répétabilité de la technique. La valeur de l'écart type sera probablement encore plus élevée si l'opération est réalisée en routine par des techniciens différents.

Les selles seront donc pesées avant chaque extraction et le résultat sera rendu en copies/g de selles. Pour ce faire, il est nécessaire de convertir le résultat obtenu après traitement des données en copies/mL d'ADN extrait, en copies/g de selles à l'aide de l'égalité suivante :

$$\text{Copies/g de selles} = \frac{\text{Copies/mL} \times \text{Volume d'ADN extrait final (0.2 mL)} \times \text{Dilution}}{\text{Masse de l'échantillon (g)}}$$

II.2.1.2 Homogénéité de la charge virale de l'échantillon

Le premier test a été réalisé sur 5 aliquotes d'une même selle présentant une charge virale élevée. Les résultats montrent une répartition homogène du virus avec une moyenne de $11,09 \pm 0,09 \log_{10}$ copies/g de selles.

Pour s'assurer que cette homogénéité ne soit pas liée à la très forte charge virale, un deuxième essai de 5 aliquotes sur une selle plus faiblement chargée a été effectué. Les résultats sont tous aussi homogènes, avec une moyenne de $5,72 \pm 0,04 \log_{10}$ copies/g de selles.

La répartition du génome viral au sein de la selle est uniforme. Le résultat obtenu dans l'échantillon est représentatif de la charge virale du prélèvement.

II.2.2 Echantillons patients

II.2.2.1 Patient TE

Le premier test positif dans les selles a été une culture cellulaire du 28/10/2005. Les échantillons de selles conservés ont donc été sélectionnés du 08/10/05 au 26/12/05.

La charge virale dans les selles se positive 10 jours avant la mise en évidence de l'antigène par technique ELISA et 7 jours avant l'isolement du virus. Cependant, le résultat de la culture cellulaire n'a été validé que le 21/11/2005 soit 24 jours après la date du prélèvement ce qui retarde d'autant le diagnostic d'infection par adénovirus et la mise en place du traitement. L'antigène viral est détecté les 31/10/2005, 04/11/2005 et 08/12/2005, lorsque la charge virale dans les selles est la plus forte, 10,29 et 10,54 \log_{10} copies/g de selles respectivement (Figure 9).

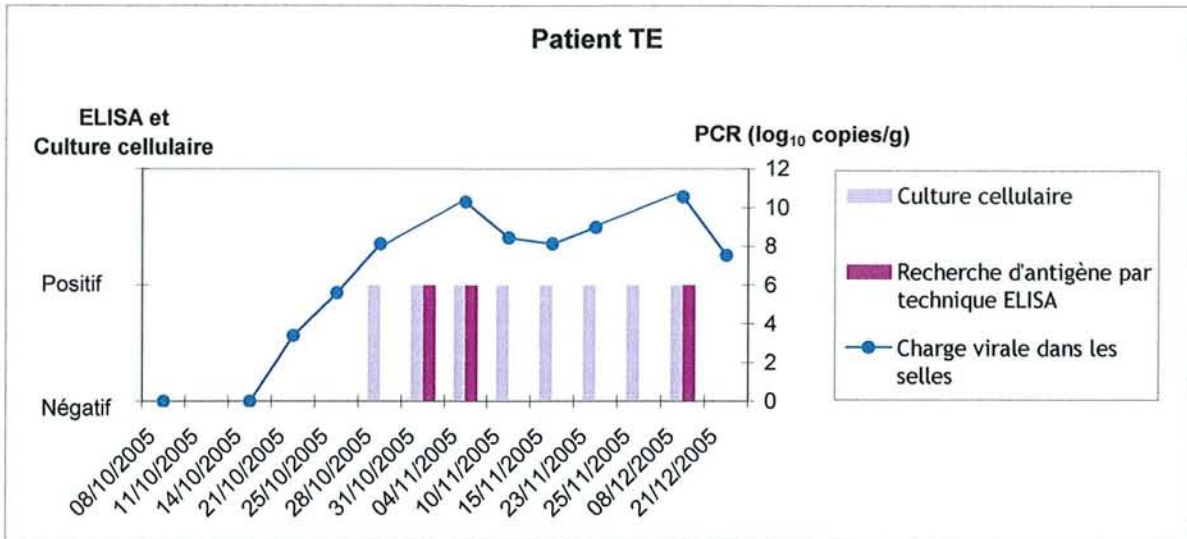


Figure 9. Résultats de la recherche de l'adénovirus par technique ELISA, culture cellulaire et PCR quantitative dans les selles du patient TE

La charge virale a été détectable mais non quantifiable dans le sang le 01/12/2005, alors que la charge virale dans les selles était élevée ($> 8 \log_{10}$ copies/g de selles) depuis plusieurs semaines.

II.2.2.2 Patient FI

La recherche de l'adénovirus par biologie moléculaire dans les selles a été réalisée sur certains prélèvements recueillis durant les 2 semaines précédant le premier résultat positif par technique ELISA dans les selles et durant les 2 mois qui ont suivi.

Chez ce patient la charge virale dans les selles est bien corrélée à la recherche d'antigène par technique ELISA. Cependant, la charge virale se positive 6 jours plus tôt. Les valeurs de charge virale sont proches du seuil de détection, et culminent à $4,5 \log_{10}$ copies/g de selles. L'administration de cidofovir se répercute sur la charge virale dans les selles puisqu'elle devient indétectable le 21/12/2006 puis du 03 au 16/01/2006 (Figure 10).

En l'absence de virémie détectable, il est possible de conclure à une infection localisée (maladie probable à adénovirus). C'est probablement la mise en place d'un traitement précoce par cidofovir, le 30/12/2005 (au 2^{ème} résultat ELISA positif) qui a permis d'éviter la dissémination virale et la maladie à adénovirus.

Chez ce patient le virus ne sera jamais isolé par culture cellulaire dans les selles.

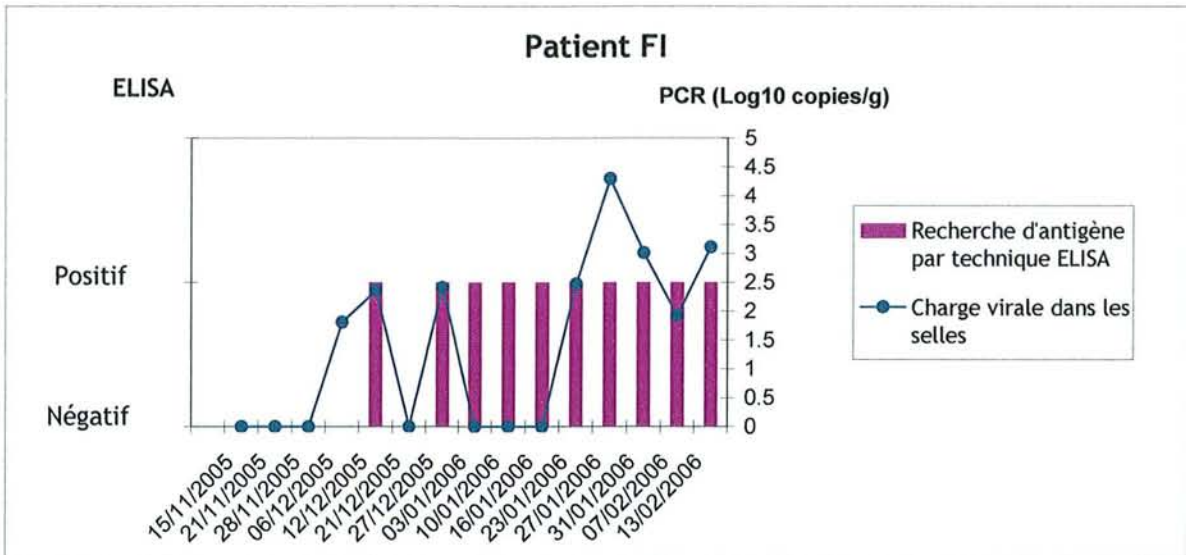


Figure 10. Résultats de la recherche d'antigène et de la PCR quantitative dans les selles du patient FI

II.2.2.3 Patient MA

Lors de la recherche de l'adénovirus dans les selles, la charge virale est la première à se positiver (4 jours avant la technique ELISA). Puis la détection de l'antigène virale et la culture cellulaire se positivent alternativement de manière sporadique alors que la charge virale oscille de 7,2 à 11,87 \log_{10} copies/g de selles. Ainsi le patient n'a été traité que le 07/10/2006, alors que la charge virale était déjà supérieure à 8 \log_{10} copies/g de selles (Figure 11).

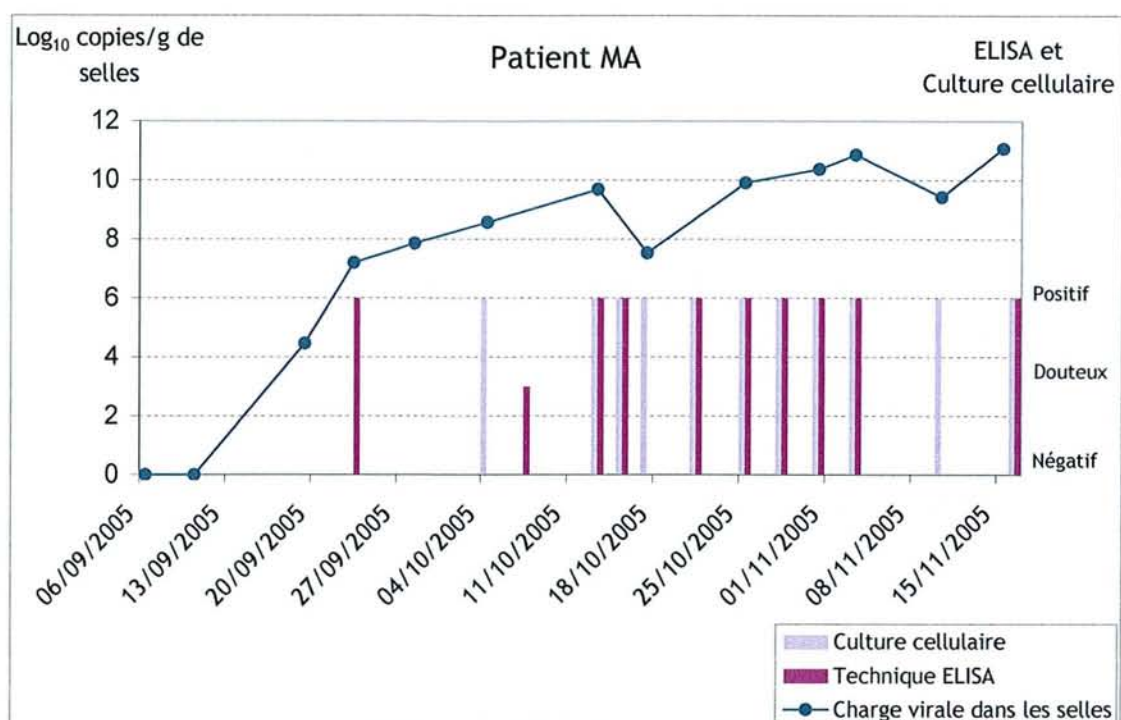


Figure 11. Diagnostic de l'adénovirus dans les selles du patient MA par recherche d'antigène viral, culture cellulaire et PCR quantitative

Le patient a présenté une infection disséminée avec une virémie apparaissant le 13/10/2005 et plafonnant à $3,56 \log_{10}$ copies/mL de sang total le 14/11/2005, malgré la mise en place d'un traitement par cidofovir. En revanche la charge virale dans le sang se négative après chaque dose de traitement, reflétant l'évolution positive de la maladie à adénovirus.

La réponse au traitement ne semble pas impacter la charge virale dans les selles puisque seulement deux diminutions (de $2,16 \log_{10}$ le 17/10/2006 et $1,43 \log_{10}$ le 10/11/2006) sont observées au cours de la cure de 6 doses d'antiviral. La diminution de charge virale dans les selles serait plutôt secondaire à la diminution de la réplication virale dans le sang (Figure 12).

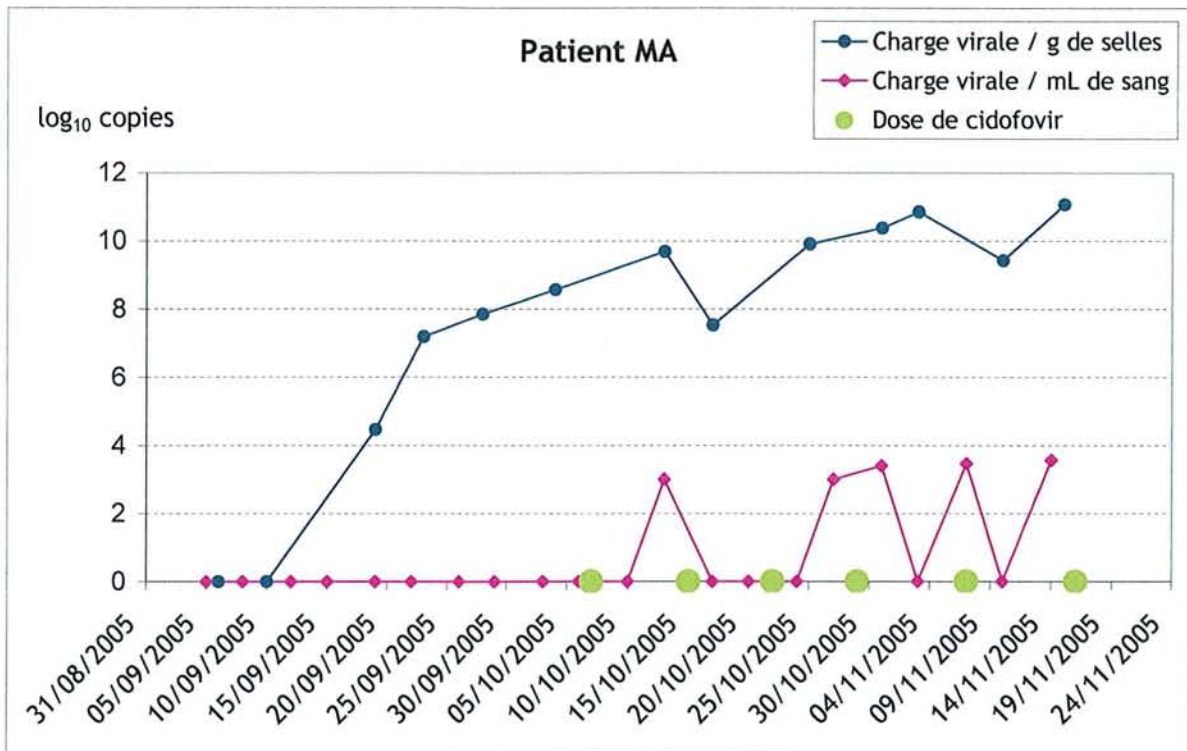


Figure 12. Recherche de l'adénovirus par PCR quantitative dans les selles et le sang total du patient MA

II.2.2.4 Patient RI

Le diagnostic de la maladie à adénovirus chez le patient RI a été rendu particulièrement délicat en raison de l'absence de détection de l'antigène par technique ELISA et de l'isolement tardif du virus en culture cellulaire le 27/09/2005. L'absence de diagnostic au début de la maladie est d'autant plus étonnant que la charge virale dans les selles augmente de manière continue au cours de cette période, atteignant 7,75 log₁₀ copies/g de selles le 19/09/2005 (Figure 13).

L'absence de traitement explique la dissémination de l'infection et l'apparition d'une virémie le 22/09/2005. L'instauration du traitement permet la négativation de la charge virale dans le sang après deux injections de cidofovir et la diminution de la charge virale dans les selles. La PCR à adénovirus reste positive dans des biopsies du rectum, du sigmoïde de l'estomac et du duodénum.

Après l'arrêt du traitement, le virus continue à être détecté par PCR dans les selles, ce qui pourrait s'expliquer par l'excrétion fécale post-infectieuse, mais la charge virale augmente à nouveau de manière importante sans que le virus ne soit mis en évidence, sauf par culture cellulaire dont le résultat est rendu sous une dizaine de jour au service. Le traitement sera à nouveau restauré à la faveur de la détection de l'adénovirus par immunofluorescence dans une aspiration nasale. Le traitement est efficace, car la charge virale dans les selles diminue après avoir atteint un maximum de $7,87 \log_{10}$ copies/g de selles le 27/10/2005. Toutefois l'arrêt du traitement entraîne une nouvelle réactivation de l'infection avec multiplication locale ($11,1 \log_{10}$ copies/g des selles) et dissémination virale ($5,05 \log_{10}$ copies/mL de sang). Cette infection sera traitée de manière efficace par cidofovir, négativant les marqueurs diagnostics viraux.

Le test ELISA ne se positive que sur deux prélèvements (le 09 et 13/12/2005) lorsque l'infection est particulièrement virulente avec une charge virale à $11,1 \log_{10}$ copies/g de selles et $5,05 \log_{10}$ copies/mL de sang. C'est également au cours de cette période que le virus est isolé en culture cellulaire sur plusieurs prélèvements successifs. (Figure 13)

La clairance du virus est progressive avec une charge virale négative à J168, soit le 26 décembre, une disparition du virus dans les selles le 21 décembre. Lors de l'endoscopie digestive basse du 23 janvier et de l'endoscopie digestive haute du 2 février (J206), les PCR adénovirus sur les biopsies sont négatives.

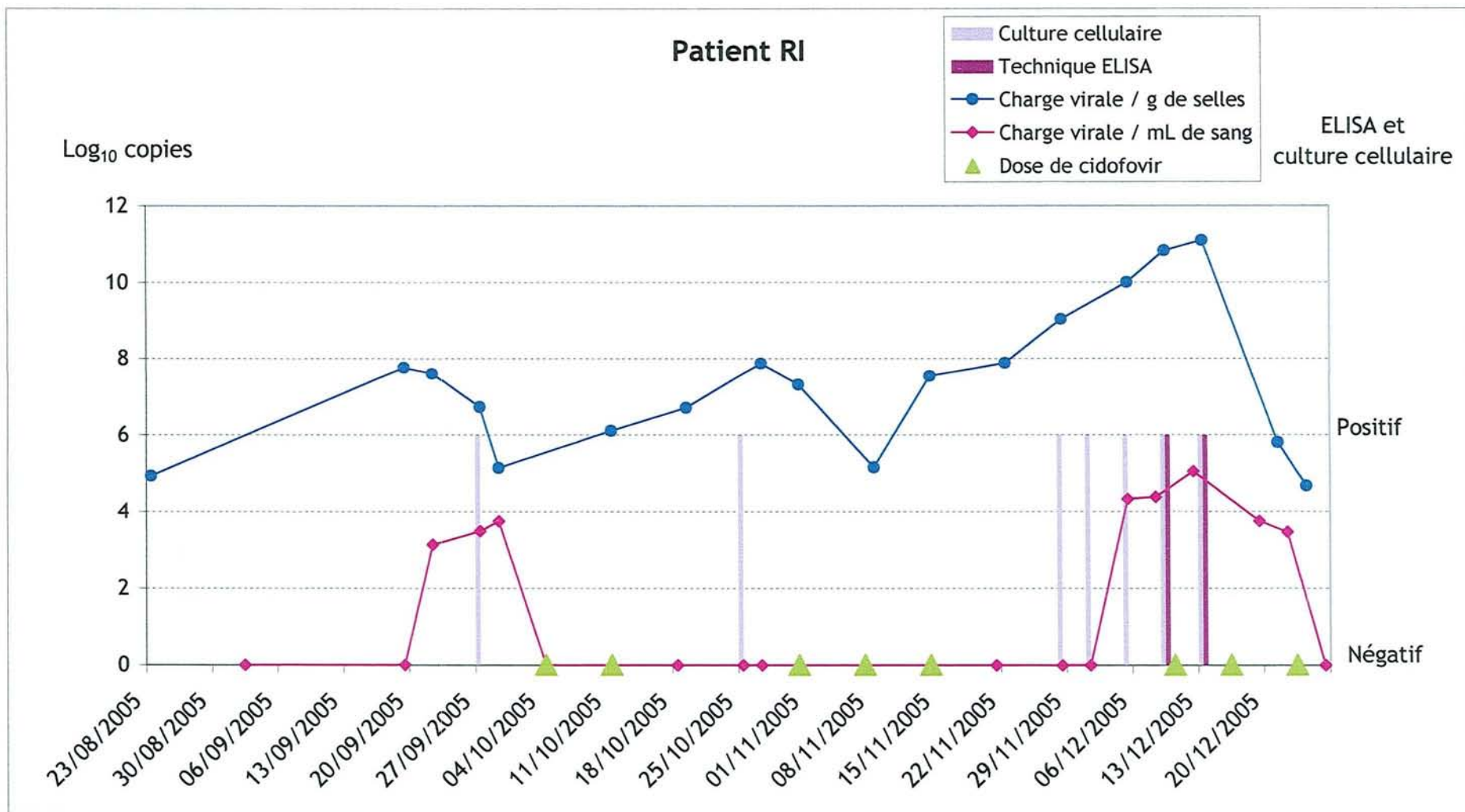


Figure 13. Diagnostic de l'adénovirus chez le patient RI par recherche d'antigène, culture cellulaire et PCR quantitative dans les selles, et PCR quantitative dans le sang total. Influence du traitement par cidofovir

II.2.2.5 Analyse comparative des résultats

Le tableau 9 présente la plus haute charge virale dans les selles pour laquelle la recherche d'antigène viral et la culture cellulaire ont été retrouvées négatives et la plus faible charge virale dans les selles pour lesquelles elles se positivent, en fonction du patient.

Tableau 9. Charges virales pour lesquelles le test ELISA et la culture cellulaire se positivent ou se négativent en fonction du patient

Charge virale (/g de selles)	Antigène par ELISA		Culture cellulaire	
	Négatif	Positif	Négative	Positive
FI	1,81 log ₁₀	2,36 log ₁₀	4,5 log ₁₀	/
TE	7,52 log ₁₀	10,29 log ₁₀	7,52 log ₁₀	8,12 log ₁₀
MA	7,86 log ₁₀	9,69 log ₁₀	7,86 log ₁₀	8,57 log ₁₀
RI	9,03 log ₁₀	10,83 log ₁₀	7,88 log ₁₀	9,03 log ₁₀

Il n'est pas retrouvé de lien entre la sensibilité du test ELISA et la valeur de la charge virale dans les selles. Ainsi l'Antigène est détecté pour une charge virale de 2,36 à 10,83 log₁₀ copies/g mais reste négatif à 9,03 log₁₀ copies/g (RI). En revanche, il apparaît, sur ce nombre restreint de patients, que le virus est isolé en culture cellulaire lorsque la charge virale dépasse 8 log₁₀ copies/g de selles.

Si ce raisonnement est appliqué à la mise en place du traitement : le traitement a été initié, ou l'aurait été pour TE, après deux tests positifs en technique ELISA soit à une charge virale dans les selles à 10,29, 8,57 ou 2,41 log₁₀ copies/g de selles, respectivement pour TE, MA et FI. Ces données sont insuffisantes pour définir un seuil mais celui-ci serait supérieur à 8/9 log₁₀ copies/g de selles.

La charge virale dans les selles et dans le sang sont comparées en analysant la quantité de génome retrouvé dans les selles au moment où la virémie se positive, en fonction du patient (Tableau 10).

Les résultats de la PCR dans le sang et dans les selles semblent corrélés chez MA, mais la corrélation n'est pas significative. De manière plus générale, la virémie reste négative chez FI qui ne présente qu'une charge virale faible dans les selles et se positive chez TE, MA et RI lorsque la charge virale dans les selles atteint 8 à 9 log₁₀ copies/g de selles. Il avait été démontré dans le Service de Transplantation Médullaire que traiter avant l'apparition d'une virémie est propice à une évolution favorable de La

maladie à adénovirus chez le patient, il faudrait donc traiter avant une charge virale de 8 log₁₀ copies/g de selles.

Tableau 10. Valeur de la charge virale dans les selles à la date d'apparition de la virémie en fonction du patient

Patient	MA	TE	RI	FI	
Date d'apparition de la virémie	22/09/2005	01/12/2005	22/09/2005	05/12/2005	Ø
Charge virale dans les selles (copies/g)	7,59 log ₁₀	8,97 log ₁₀	7,59 log ₁₀	10 log ₁₀	<4,5 log ₁₀

L'analyse de la corrélation entre la charge virale dans les selles et la présence d'antigène viral, ou de la charge virale dans les selles et de la virémie aboutit à la même conclusion dans les deux cas, avec l'établissement d'un seuil de traitement à environ 8 log₁₀ copies/g des selles.

Par ailleurs, on ne peut dire si le traitement agit directement sur la charge virale dans les selles ou si celle-ci diminue suite à une baisse du taux de réplication du virus. En effet l'effet du cidofovir sur la charge virale dans les selles est plus marqué chez FI qui présente à priori une infection localisée que chez RI et MA qui ont présenté des infections disséminées.

DISCUSSION

Les infections disséminées à adénovirus sont favorisées par l'état d'immunodépression, ce qui explique leur survenue dans les suites de greffe de cellules souches hématopoïétiques. Les infections à adénovirus de l'immunodéprimé sont peu fréquentes mais sont grevées d'une mortalité importante. Toutefois le nombre de patients ayant présenté une infection disséminée à adénovirus a considérablement augmenté ces dernières années, ce qui est probablement lié à la proportion grandissante des enfants pris en charge dans les services de transplantation médullaire [Bordigoni et al. 2001]. Parmi les patients ayant bénéficié d'une transplantation de moelle osseuse, seuls ceux traités pour une pathologie hématologique maligne ont présenté une infection à adénovirus, et non ceux suivis pour une tumeur solide ou des pathologies non tumorales [Hale et al. 1999].

Au cours de ces infections tous les sérotypes d'adénovirus peuvent être isolés, et les sérotypes habituellement considérés comme peu pathogènes peuvent être responsables d'adénoviroses disséminées graves. Le suivi virologique est essentiel à la mise en place du traitement. L'efficacité de ribavirine ou de vidarabine n'a pas été démontrée, en revanche le cidofovir est une alternative thérapeutique intéressante si le traitement est instauré suffisamment tôt [Bordigoni et al. 2001].

La dissémination du virus chez les patients immunodéprimés passe par une phase virémique au cours de laquelle le virus peut être détecté dans le sang. La détection du génome viral dans le sang des patients immunodéprimés par amplification génique a été proposée pour le diagnostic de la maladie à adénovirus [Chakrabarti et al. 2002]. La PCR quantitative dans le sang est prédictive d'une maladie à adénovirus grave voire fatale [Echavarria et al. 2001; Schilham et al. 2002], c'est également le marqueur de référence pour le suivi de la réponse au traitement [Leruez-Ville et al. 2004] et de la cinétique de l'infection [Heim et al. 2003]. Actuellement la détection de l'ADN adénovirus dans le sang par PCR quantitative en temps réel est une méthode de référence.

Différentes techniques ont été décrites sur sérum [Gu et al. 2003; Schilham et al. 2002], sur plasma [Lankester et al. 2002] ou sur sang total [Heim et al. 2003]. Au Laboratoire de Virologie du CHU de Nancy Brabois, l'analyse sur sang total a été préférée à l'analyse sur sérum qui peut entraîner une sous-estimation de la charge virale, par rapport au sang total [Teramura et al. 2004]. Ce choix a aussi permis d'uniformiser le type de prélèvement aux autres charges virales réalisées en routine au laboratoire (HHV-6, EBV, CMV).

Des PCR plus ou moins spécifiques sont décrites dans la littérature, capables de détecter les adénovirus du groupe C [Lankester et al. 2002], des groupes A à C [Gu et al. 2003], ou les sérotypes les plus fréquemment isolés dans les services de transplantation (sérotypes 12, 18, 31, 7, 11, 34, 35, 1, 2, 5, 6) dans une PCR multiplex [Claas et al. 2005]. La PCR développée par Heim et al. (2003) permet la détection des 51 sérotypes connus d'adénovirus au sein de la même PCR, en utilisant une seule paire d'amorce (la détection du nouveau sérotype 52 n'a pas encore été démontrée). Ceci est rendu possible par l'amplification d'une région très conservée du génome de l'adénovirus, situé dans le gène de l'hexon. Cette méthode a été sélectionnée car il a été démontré que chez les patients allogreffés, tous les sérotypes peuvent être impliqués et que la localisation des signes cliniques n'est plus reliée aux sérotypes comme chez le patient immunocompétent [Venard et al. 2000].

Même si cette technique peut également être appliquée sur divers prélèvements tels que selles [Lion et al. 2003], prélèvements urinaires dans le cadre du diagnostic des cystites hémorragiques [Teramura et al. 2004], ou sécrétions respiratoires grâce à une PCR Adénovirus Consensus® destinée à remplacer l'immunofluorescence [Vabret et al. 2004], seul l'intérêt des prélèvements sanguins a été validé dans le cadre d'une thérapie curative précoce. Le seuil d'instauration du traitement est actuellement discuté. Le patient choisi pour l'étude présente des signes cliniques d'adénovirose reliés à une charge virale de 10^5 copies/mL de sang total. Ces données concordent avec celles de la littérature qui corrélient l'apparition des signes cliniques à une charge virale variant de 10^5 [Teramura et al. 2004] à 10^6 [Claas et al. 2005]. Dans les infections fatales, la charge virale peut atteindre 10^{11} copies/mL de sérum ou de plasma [Claas et al. 2005]. La mise en place d'un traitement curatif précoce sera donc recommandée à partir d'une charge virale de $10^{5,5}$ copies/mL [Leruez-Ville et al. 2004] ou en fonction de la cinétique de la virémie : augmentation d'un facteur 10 [Lion et al. 2003] ou d'un facteur 100 [Lankester et al. 2002].

Dans le cadre d'une stratégie préemptive, la mise en place d'un traitement doit être la plus précoce possible et repose entièrement sur le diagnostic biologique. Une étude menée au CHU de Nancy dans le Service de Transplantation Médullaire a montré l'intérêt de la mise en place d'un traitement préemptif avec une diminution significative de la mortalité liée à l'adénovirus, chez les patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques avec donneur non apparenté et une diminution des complications néphrologiques dus aux effets secondaires du cidofovir [Paczesny et al. 2005].

Cette stratégie est appliquée à l'heure actuelle, avec l'instauration d'un traitement par cidofovir lorsque la recherche d'antigènes viraux dans les selles est positive à deux reprises et/ou en présence du virus dans deux sites de prélèvement et/ou en présence du virus dans les biopsies digestives (anatomo-pathologie) ou lorsque la virémie est positive. Pour la recherche de l'adénovirus dans les selles, les laboratoires disposent de techniques ELISA pour la détection de l'antigène et de la culture cellulaire.

L'isolement du virus en culture cellulaire reste la technique de référence pour le diagnostic d'infection à adénovirus. Ceci a été démontré dans plusieurs études la comparant à la culture cellulaire "rapide" [Van Doornum and De Jong 1998] ou à la PCR, dans les urines [Raboni et al. 2003]. De plus la culture cellulaire permet le typage du virus isolé. Mais dans le cadre de la stratégie préemptive, cette technique n'a pas sa place car son inconvénient majeur est le délai d'obtention de l'ECP qui peut atteindre 3 semaines.

La recherche de l'antigène viral, réalisé par le kit Premier™ Adenoclone de la société Meridian Bioscience, Inc, permet la détection de 41 des 52 sérotypes d'adénovirus connus, ce qui pourrait expliquer dans certains cas l'absence de résultat positif pour certains patients présentant une infection confirmée à adénovirus. L'avantage de la technique ELISA par rapport à la culture cellulaire réside donc essentiellement dans la rapidité de réalisation (4h) et dans le délai de réponse, qui se situe actuellement à 7 jours. Ce délai de réponse pourrait encore être raccourci à 8 heures grâce à l'utilisation de techniques de diagnostic rapide, par immunochromatographie, qui présentent une sensibilité similaire [Taty and Lebon 2002].

La détection par PCR de l'adénovirus dans les selles, qui apporte une réponse plus rapide avec une excellente sensibilité répond aux exigences du diagnostic précoce dans le cadre d'un traitement préemptif. Le but de notre travail était de vérifier l'intérêt de la quantification de l'adénovirus dans les selles. Parmi les quatre patients inclus dans cette

étude rétrospective, trois ont été sélectionnés car ils ont présenté une virémie à adénovirus. Les selles ont été sélectionnées dans les semaines précédant l'apparition de la virémie pour évaluer l'apport de la PCR au diagnostic précoce de l'infection. La PCR quantitative est prédictive de l'infection disséminée à adénovirus puisque l'on retrouve une augmentation constante de la charge virale dans les selles avant l'apparition de la virémie. La charge virale dans les selles est également plus précoce que la culture cellulaire et la recherche d'antigène (médiane de 30 jours et 6 jours respectivement). En revanche la quantification du génome d'adénovirus dans les selles n'est pas toujours corrélée à la clinique ou en faveur d'un risque de dissémination. L'utilisation de cette technique passe donc par la détermination d'un seuil d'alerte qui va entraîner la mise en place d'un traitement préemptif.

Dans l'étude menée en 2002-2003 par Thomas Lion et ses collaborateurs sur les maladies à Adénovirus chez des patients greffés de moelle, la technique de PCR cible le même gène du virus (gène de l'hexon) mais avec des amorces et des sondes spécifiques de chaque type d'adénovirus. Ils ont utilisé le même kit d'extraction d'ADN et la PCR quantitative a été réalisée en méthode TaqMan, leur seuil de détection est ainsi identique au notre (10^3 copies/mL d'échantillon). Chez les patients de cette étude qui ne présentent pas de virémie, la charge virale dans les selles n'excède pas $2 \cdot 10^4$ copies/g de selle, résultat que l'on retrouve chez le patient FI (charge virale $< 4,5 \log_{10}$ copies/g de selles). Mais lors d'une infection disséminée à adénovirus, l'auteur relève une augmentation rapide de la charge virale dépassant 10^8 copies/g de selles, tout comme chez MA et RI (charge virale de $1,17 \cdot 10^{11}$ et $1,25 \cdot 10^{11}$ respectivement). Lion et al. (2003) concluent que dans les selles comme dans le sang, la cinétique de la maladie à AdV est plus informative qu'une valeur à une date donnée. Au-delà du seuil proposé de $8 \log_{10}$ copies/g de selles qui serait fortement prédictif de l'apparition d'une maladie à adénovirus, l'évolution de la charge virale est donc un deuxième critère de surveillance à appliquer.

L'étude est actuellement étendue, à quatre autres patients ayant présenté des infections disséminées à adénovirus. Il serait intéressant d'évaluer cette technique au cours d'une étude prospective, portant sur les patients le plus à risque de développer une maladie à adénovirus. L'application de cette technique à un plus grand nombre de patients nécessitera une automatisation de l'extraction d'ADN à partir des selles, non encore disponible à ce jour.

CONCLUSION

Les infections à adénovirus restent un problème majeur dans les unités de transplantation médullaire car elles sont responsables d'une mortalité importante. Bien que la culture cellulaire soit la technique de référence pour le diagnostic des infections à adénovirus, il était intéressant d'étudier l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel qui est une méthode de diagnostic sensible, spécifique et rapide.

Les obstacles à la validation de cette technique étaient la répartition hétérogène du virus dans les selles, le coût de la manipulation, et la faisabilité du test en routine notamment à cause de la durée de l'extraction (environ 4h30 pour 10 échantillons)

Tous les résultats de la PCR quantitative sur les selles indiquent la présence du virus dans le prélèvement en moyenne 6 jours avant les autres techniques (culture cellulaire ou ELISA). Nous réduisons ainsi le délai de mise en évidence du virus grâce à une meilleure sensibilité de la technique. De plus, les tests de répétabilité réalisés sur le prélèvement ont montré une répartition homogène de la charge virale au sein de la même selle, si toutefois on s'affranchit de la variation de masse de l'échantillon.

Le bénéfice de cette technique est donc bien réel étant donné qu'il a été démontré qu'une administration précoce du traitement par cidofovir augmentait l'efficacité du traitement.

L'utilisation de la PCR quantitative en temps réel sur les selles des patients allogreffés permettrait ainsi de réduire la prévalence des infections disséminées à adénovirus responsables d'une mortalité importante mais les contraintes liées au coût des kits spécifiques d'extraction et à la durée l'étape d'extraction ne sont pas négligeables.

Une étude sur un plus grand nombre de patients sera nécessaire à la validation de la technique. Dans un premier temps, cette méthode de diagnostic pourrait être appliquée à une population très ciblée.

BIBLIOGRAPHIE



1. Avivi I, Chakrabarti S, Milligan DW, Waldmann H, Hale G, Osman H, Ward KN, Fegan CD, Yong K, Goldstone AH, Linch DC and Mackinnon S. Incidence and outcome of adenovirus disease in transplant recipients after reduced-intensity conditioning with alemtuzumab. *Biol Blood Marrow Transplant* 10: 186-194, 2004.
2. Bordigoni P, Carret AS, Venard V, Witz F and Le Faou A. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 32: 1290-1297, 2001.
3. Boulanger P. [Cell receptors for human adenoviruses]. *J Soc Biol* 193: 77-84, 1999.
4. Bruno B, Gooley T, Hackman RC, Davis C, Corey L and Boeckh M. Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 9: 341-352, 2003.
5. Carrigan DR. Adenovirus infections in immunocompromised patients. *Am J Med* 102: 71-74, 1997.
6. Chakrabarti S, Collingham KE, Stevens RH, Pillay D, Fegan CD and Milligan DW. Isolation of viruses from stools in stem cell transplant recipients: a prospective surveillance study. *Bone Marrow Transplant* 25: 277-282, 2000.

7. Chakrabarti S, Mautner V, Osman H, Collingham KE, Fegan CD, Klapper PE, Moss PA and Milligan DW. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 100: 1619-1627, 2002.
8. Childs R, Sanchez C, Engler H, Preuss J, Rosenfeld S, Dunbar C, van Rhee F, Plante M, Phang S and Barrett AJ. High incidence of adeno- and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant* 22: 889-893, 1998.
9. Claas EC, Schilham MW, de Brouwer CS, Hubacek P, Echavarria M, Lankester AC, van Tol MJ and Kroes AC. Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J Clin Microbiol* 43: 1738-1744, 2005.
10. Cooper RJ, Hallett R, Tullo AB and Klapper PE. The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. *Epidemiol Infect* 125: 333-345, 2000.
11. De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ, Khoo SH and Hierholzer JC. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 37: 3940-3945, 1999.
12. Echavarria M, Forman M, van Tol MJ, Vossen JM, Charache P and Kroes AC. Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR. *Lancet* 358: 384-385, 2001.

13. Flomenberg P, Babbitt J, Drobyski WR, Ash RC, Carrigan DR, Sedmak GV, McAuliffe T, Camitta B, Horowitz MM, Bunin N and et al. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 169: 775-781, 1994.
14. Flomenberg P, Piaskowski V, Truitt RL and Casper JT. Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus. *J Infect Dis* 171: 1090-1096, 1995.
15. Freymuth F. Adenoviridae. In: *Traité de virologie médicale*, edited by Estem. Paris: De Boeck, 2003, p. 247-266.
16. Gary GW, Jr., Hierholzer JC and Black RE. Characteristics of noncultivable adenoviruses associated with diarrhea in infants: a new subgroup of human adenoviruses. *J Clin Microbiol* 10: 96-103, 1979.
17. Gu Z, Belzer SW, Gibson CS, Bankowski MJ and Hayden RT. Multiplexed, real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. *J Clin Microbiol* 41: 4636-4641, 2003.
18. Hale GA, Heslop HE, Krance RA, Brenner MA, Jayawardene D, Srivastava DK and Patrick CC. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 23: 277-282, 1999.
19. Hale TK and Braithwaite AW. The adenovirus oncoprotein E1a stimulates binding of transcription factor ETF to transcriptionally activate the p53 gene. *J Biol Chem* 274: 23777-23786, 1999.
20. Heim A, Ebnet C, Harste G and Pring-Akerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 70: 228-239, 2003.

21. Hierholzer JC, Wigand R, Anderson LJ, Adrian T and Gold JW. Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J Infect Dis* 158: 804-813, 1988.
22. Horwitz MS. Adenoviruses. In: *Fields VIROLOGY*, edited by B.N. F. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p. 2149-2171.
23. Jemigam JA, Lowry BS, Hayden FG, Kyger SA, B.P. C, D.H.M. G and Farr BM. Adenovirus type 8 epidemic keratoconjunctivitis in an eye clinic: risk factors and control. *J Infect Dis* 167: 1307-1313, 1993.
24. Jones MS, 2nd, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, Dela Cruz WP, Riedel B, Pan C, Delwart EL and Schnurr DP. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol* 81: 5978-5984, 2007.
25. Lankester AC, van Tol MJ, Claas EC, Vossen JM and Kroes AC. Quantification of adenovirus DNA in plasma for management of infection in stem cell graft recipients. *Clin Infect Dis* 34: 864-867, 2002.
26. Le Faou A. Adenoviridae : les adénovirus humains. In: *Virologie Médicale*, edited by A. M. Paris: Presses Universitaires de Lyon, 2002, p. 463-467.
27. Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, Buzyn A, Abachin E, Blanche S, Freymuth F and Rouzioux C. Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 38: 45-52, 2004.

28. Lion T, Baumgartinger R, Watzinger F, Matthes-Martin S, Suda M, Preuner S, Futterknecht B, Lawitschka A, Peters C, Potschger U and Gadner H. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 102: 1114-1120, 2003.
29. Munoz FM, Piedra PA and Demmler GJ. Disseminated adenovirus disease in immunocompromised and immunocompetent children. *Clin Infect Dis* 27: 1194-1200, 1998.
30. Paczesny S, Salmon A, L. C, Venard V and Bordigoni P. Prompt versus preemptive intervention with cidofovir for adenovirus diseases after allogeneic stem cell transplantation: impact on survival in a single center experience of 25 patients. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 27: 463, 2005.
31. Price NO, Hacker JK, Silvers JH, Crawford-Miksza L, Hendry RM, Flood J, Hajjeh RA, Reingold AL and Passaro DJ. Adenovirus type 3 viremia in an adult with toxic shock-like syndrome. *Clin Infect Dis* 33: 260-262, 2001.
32. Raboni SM, Siqueira MM, Portes SR and Pasquini R. Comparison of PCR, enzyme immunoassay and conventional culture for adenovirus detection in bone marrow transplant patients with hemorrhagic cystitis. *J Clin Virol* 27: 270-275, 2003.
33. Runde V, Ross S, Trenschei R, Lagemann E, Basu O, Renzing-Kohler K, Schaefer UW, Roggendorf M and Holler E. Adenoviral infection after allogeneic stem cell transplantation (SCT): report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. *Bone Marrow Transplant* 28: 51-57, 2001.

34. Russell W. Update on adenovirus and its vector. *Journal of general virology* 81: 2573-2604, 2000.
35. Salmon A. *Les infections à adénovirus après allogreffe de cellules souches hémaopoiétiques avec donneurs non apparentés : Facteurs pronostic*: Université Henri Poincaré 1, 2002.
36. Schilham MW, Claas EC, van Zaane W, Heemskerk B, Vossen JM, Lankester AC, Toes RE, Echavarría M, Kroes AC and van Tol MJ. High levels of adenovirus DNA in serum correlate with fatal outcome of adenovirus infection in children after allogeneic stem-cell transplantation. *Clin Infect Dis* 35: 526-532, 2002.
37. Sester M, Sester U, Alarcon Salvador S, Heine G, Lipfert S, Girndt M, Gartner B and Kohler H. Age-related decrease in adenovirus-specific T cell responses. *J Infect Dis* 185: 1379-1387, 2002.
38. Shenk T. *Adenoviridae: The Viruses and Their Replication*. In: *Fields VIROLOGY*, edited by B.N. F. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p. 2111-2148.
39. Shields AF, Hackman RC, Fife KH, Corey L and Meyers JD. Adenovirus infections in patients undergoing bone-marrow transplantation. *N Engl J Med* 312: 529-533, 1985.
40. Shike H, Shimizu C, Kanegaye J, Foley JL and Burns JC. Quantitation of adenovirus genome during acute infection in normal children. *Pediatr Infect Dis J* 24: 29-33, 2005.

41. Swenson PD, Lowens MS, Celum CL and Hierholzer JC. Adenovirus types 2, 8, and 37 associated with genital infections in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol* 33: 2728-2731, 1995.
42. Taty RT and Lebon P. [Diarlex LA and Diarlex MB: study for direct detection of rotaviruses and adenoviruses in stools]. *Ann Biol Clin (Paris)* 60: 697-700, 2002.
43. Teramura T, Naya M, Yoshihara T, Kanoh G, Morimoto A and Imashuku S. Adenoviral infection in hematopoietic stem cell transplantation: early diagnosis with quantitative detection of the viral genome in serum and urine. *Bone Marrow Transplant* 33: 87-92, 2004.
44. Vabret A, Gouarin S, Joannes M, Barranger C, Petitjean J, Corbet S, Brouard J, Lafay F, Duhamel JF, Guillois B and Freymuth F. Development of a PCR-and hybridization-based assay (PCR Adenovirus Consensus) for the detection and the species identification of adenoviruses in respiratory specimens. *J Clin Virol* 31: 116-122, 2004.
45. Van Doornum GJ and De Jong JC. Rapid shell vial culture technique for detection of enteroviruses and adenoviruses in fecal specimens: comparison with conventional virus isolation method. *J Clin Microbiol* 36: 2865-2868, 1998.
46. van Tol MJ, Kroes AC, Schinkel J, Dinkelaar W, Claas EC, Jol-van der Zijde CM and Vossen JM. Adenovirus infection in paediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with a delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant* 36: 39-50, 2005.

47. Venard V, Bordigoni P and Le Faou A. Les infections à adénovirus en milieu hospitalier. *Virologie* 5: 245-253, 2001.

48. Venard V, Carret A, Corsaro D, Bordigoni P and Le Faou A. Genotyping of adenoviruses isolated in an outbreak in a bone marrow transplant unit shows that diverse strains are involved. *J Hosp Infect* 44: 71-74, 2000.



Annexes

Annexe 1 : PCR quantitative de l'adénovirus dans la littérature	I
Annexe 2 : Les seuils de virémie à adénovirus dans la littérature	II
Annexe 3 : Protocole d'extraction de l'ADN à partir du sang total à l'aide du Kit Qiagen, QIAamp® DNA Blood Mini Kit	III
Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ADN à partir des selles à l'aide du Kit Qiagen, QIAamp® DNA Stool Mini Kit	IV
Annexe 5 : Dossier biologique du patient TE	VI
Annexe 6 : Dossier biologique du patient FI	VII
Annexe 8 : Dossier biologique du patient RI	X



Annexe 1 : PCR quantitative de l'adénovirus dans la littérature

Technique	Prélèvements	Gène étudié	Espèces reconnues	Seuil de sensibilité	Auteurs
PCR Quantitative	Sang	Hexon	51 sérotypes	< 51 copies/run	Heim. et al. Med. Vir. 2003
PCR Quantitative	Sang, urine	Hexon	Sérotypes 3, 7, 11, 35	50 copies/mL	Teramura et al. BMT 2004
PCR Quantitative	Sang, selles	Hexon Va RNA	6 mix		Lion et al. Blood 2003
PCR Quantitative	PBMC, sérum, plasma, sang total	Hexon	A-C E 8 sérotypes D	200 copies/mL	GU et al. JCM 2003
PCR Quantitative	Gorge	Hexon	Adv 4	2 à 4 pfu/essai	Houng et al. Diagnos. Microbiol. Infect. Dis. 2002
PCR Semi-quantitative	Sérum	Hexon	51 sérotypes		Schilham et al. CID 2004
PCR Quantitative	Plasma	Hexon	51 sérotypes		Lankester et al. CID 2002

Annexe 2 : Les seuils de virémie à adénovirus dans la littérature

Patients	Cohorte	Virémie	Prélèvements	PCR	Traitement préemptif	Auteurs
Adultes	27	1.7^E+05	Sang total	Quantitative	Pas de données	Heim. et al. Med. Vir. 2003
Enfants	93	2.30^E+05				
Donneurs de sang	306	$< 1.7^E+03$				
Enfants (12ans)	33		Selles, sang, nez, bouche, gorge	Qualitative	cidofovir 2 selles positives	Alexandra Salmon
Enfants (7ans)	Pas de donnés	4.00^E+03	Sérum, urine	Quantitative	Vidarabine, ribavirine	Teramura et al. BMT 2004
Enfants	132		Sang total, selles, urines, sérum		Cinétique x10	Lion et al. Blood 2003
Enfants	36		Sérum	Semi-quantitative	Ribavirine ou cidofovir Cinétique x100	Shilham et al. CID 2004
Cas cliniques		9000 particules/mL	Plasma, leucocytes		Cinétique x100	Lankester et al. CID 2002

Annexe 3 : Protocole d'extraction de l'ADN à partir du sang total à l'aide du Kit Qiagen, QIAamp® DNA Blood Mini Kit

- ❖ Dans un micro tube ajouter :

20 µL de protéase K

200 µL d'échantillon

200 µL de Buffer AL

Vortex 15 secondes

Incuber 10 minutes à 56°C

Centrifuger brièvement

- ❖ Ajouter 200 µL d'éthanol absolu (96-100%)

Vortex 15 secondes

Centrifuger brièvement

- ❖ Transférer le contenu de ce tube dans la colonne posée sur un tube

Bien fermer la colonne et centrifuger 6000g:1min

Jeter le tube

- ❖ Ajouter 500 µL AW1 Buffer dans la colonne

Centrifuger 6000g/1min/18°C

Jeter le tube

- ❖ Ajouter 500 µL AW2 Buffer dans la colonne

Centrifuger 20 000g/3min/18°C

Jeter le tube

Poser la colonne sur le tube final (tube Eppendorf 1,5 mL)

- ❖ Ajouter 200 µL Buffer AE chauffé au bain marie à 70°C 10 minutes

Incuber à température ambiante 1 minute

Centrifuger à 6000g/1min

- ❖ L'ADN extrait est conservé à -80°C

Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ADN à partir des selles à l'aide du Kit Qiagen, QIAamp® DNA Stool Mini Kit

❖ Ajouter :

- environ 200 mg de selles

- 1,4 mL de tampon ASL

Vortexer jusqu'à homogénéisation complète

❖ Chauffer à 70°C pendant 5 min

Vortexer 15 secondes

❖ Centrifuger à 20000 g pendant 1 min

❖ Prélever 1,2 mL du surnageant dans un nouveau tube

Eliminer le culot

❖ Ajouter une tablette Inhibitex

Vortexer jusqu'à dissolution totale de la tablette

Incuber à température ambiante pendant 1 min

❖ Centrifuger à 20000 g pendant 3 min

❖ Pipeter tout le surnageant dans un nouveau tube

❖ Centrifuger à 20000 g pendant 3 min

❖ Mettre 15 µL de Protéinase K dans un nouveau tube

❖ Prélever 200 µL du surnageant et le placer dans le tube contenant la Protéinase K

❖ Ajouter 200 µL de tampon AL

Vortexer

Incuber à 70°C pendant 10 min

❖ Ajouter 200 µL d'éthanol absolu au lysat et vortexer

- ❖ Etiqueter les colonnes Qiagen

Transférer tout le lysat sur la colonne

Fermer le tube

- ❖ Centrifuger à 20000 g pendant 1 min

- ❖ Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur et jeter l'ancien

- ❖ Ajouter 500 µL de tampon AW1

Centrifuger à 20000 g pendant 1 min

Changer de tube collecteur

- ❖ Ajouter 500 µL de tampon AW2

Centrifuger à 20000 g pendant 3 min

Changer de tube collecteur

Re-centrifuger pendant 1 min à 20000 g

- ❖ Placer la colonne sur le tube définitif (répertorié)

- ❖ Ajouter 200 µL de tampon AE

Incuber 1 min à température ambiante

- ❖ Centrifuger à 20000 G pendant 1 min pour éluer l'ADN

- ❖ Conserver l'ADN à - 20°C pour une longue conservation

Annexe 5 : Dossier biologique du patient TE

Date	PCR	ELISA	Culture
Du 04/10/05 au 27/10/05	Non détectable	Négatif	Négatif
31/10/2005		Positif	Positif
31/10/2005	Non détectable		
03/11/2005	Non détectable		
04/11/2005		Positif	Positif
07/11/2005	Non détectable		
10/11/2005		Négatif	Positif
10/11/2005	Non détectable		
14/11/2005	Non détectable		
15/11/2005		Négatif	Positif
17/11/2005	Non détectable		
21/11/2005	Non détectable		
23/11/2005		Négatif	Positif
24/11/2005	Non détectable		
25/11/2005		Négatif	Positif
28/11/2005	Non détectable		
01/12/2005	Détectable		
05/12/2005	Non détectable		
08/12/2005		Négatif	Positif
08/12/2005	Non détectable		
12/12/2005	Non détectable		
15/12/2005	Non détectable		
20/12/2005	Non détectable		
21/12/2005		Négatif	
Du 26/12/05 au 28/10/06	Non détectable	Négatif	Négatif

Annexe 6 : Dossier biologique du patient FI

Date	PCR	ELISA	Culture	Traitement
Du 19/09/2005 au 08/12/05	Non détectable	Négatif	Négatif	
12/12/2005	Non détectable	Positif	Négatif	
Du 15/12/2005 au 29/12/2005	Non détectable	Négatif	Négatif	
30/12/2005		Douteux	Négatif	
31/12/2005				cidofovir 140 mg
02/01/2006	Non détectable			
03/01/2006		Positif	Négatif	
05/01/2006	Non détectable			
06/01/2006				cidofovir 140 mg
09/01/2006	Non détectable			
10/01/2006		Positif	Négatif	
12/01/2006	Non détectable			
13/01/2006		Positif	Négatif	cidofovir 140 mg
16/01/2006	Non détectable	Positif	Négatif	
19/01/2006	Non détectable			
20/01/2006				cidofovir 90 mg
23/01/2006	Non détectable	Positif	Négatif	
27/01/2006		Positif	NI	
30/01/2006	Non détectable			
31/01/2006		Positif	Négatif	
02/02/2006	Non détectable			
03/02/2006		Positif	Négatif	cidofovir 90 mg
06/02/2006	Non détectable			
07/02/2006		Positif	Négatif	
09/02/2006	Non détectable	Positif	Négatif	
13/02/2006	Non détectable	Positif	Négatif	
16/02/2006	Non détectable			
18/02/2006	Non détectable			cidofovir 90 mg
20/02/2006	Non détectable	Négatif	Négatif	
27/02/2006	Non détectable	Positif	Négatif	
02/03/2006	Non détectable			
03/03/2006		Douteux	Négatif	
05/03/2006				cidofovir 90 mg
06/03/2006	Non détectable			
07/03/2006		Négatif	Négatif	
09/03/2006	Non détectable			
13/03/2006	Non détectable	Négatif	Négatif	
16/03/2006	Non détectable	Négatif	Négatif	
18/03/2006				cidofovir 90 mg
20/03/2006	Non détectable			
21/03/2006		Positif	Négatif	
23/03/2006	Non détectable			
24/03/2006		Positif	Négatif	
Du 27/03/2006 au 01/04/2006	Non détectable	Négatif	Négatif	Le 01/04/2006 cidofovir 90 mg
07/04/2006		Douteux	Négatif	
13/04/2006	Non détectable			

Annexe 7 : Dossier biologique du patient MA

Date	PCR	ELISA	Culture	Traitement
28/11/2005		Positif	Positif	
15/12/2005	12211			
12/12/2005	10 758	Négatif		
10/12/2005		Négatif		
08/12/2005	15 089			
09/11/2005			Positif	
06/12/2005		Négatif		
03/12/2005		Négatif		
05/12/2005	15845			
01/12/2005	18642			
28/11/2005	2180	Positif		
25/11/2005		Positif	Positif	
23/11/2005		Positif	Positif	
21/11/2005	1651	Positif	Positif	
16/11/2005		Positif	Positif	
10/11/2005		Positif	Positif	
03/11/2005		Positif	Positif	
17/11/2005	47561			
15/11/2005				
31/10/2005		Positif	Positif	
10/11/2005	Non détectable	Négatif		
14/11/2005	3670			
07/11/2005	Non détectable		Négatif	
07/11/2005	Détectable		Négatif	
07/11/2005	Détectable		Négatif	
07/11/2005	Détectable			
07/11/2005	2863			
03/11/2005		Positif		
03/11/2005	Non détectable			
21/10/2005		Positif	Positif	
31/10/2005	2484			
28/10/2005		Positif	Positif	
25/10/2005		Positif	Positif	
27/10/2005	Détectable			
24/10/2005	Non détectable			
20/10/2005	Détectable			
17/10/2005	Non détectable	Négatif	Positif	
15/10/2005		Positif	Positif	
13/10/2005		Positif	Positif	
04/10/2005		Négatif	Positif	
28/09/2005		Négatif	Négatif	
29/09/2005		Négatif	Négatif	
23/09/2005		Positif	Négatif	
13/10/2005	Détectable			
10/10/2005	Non détectable			
06/10/2005		Négatif	Négatif	
19/09/2005		Négatif	Négatif	

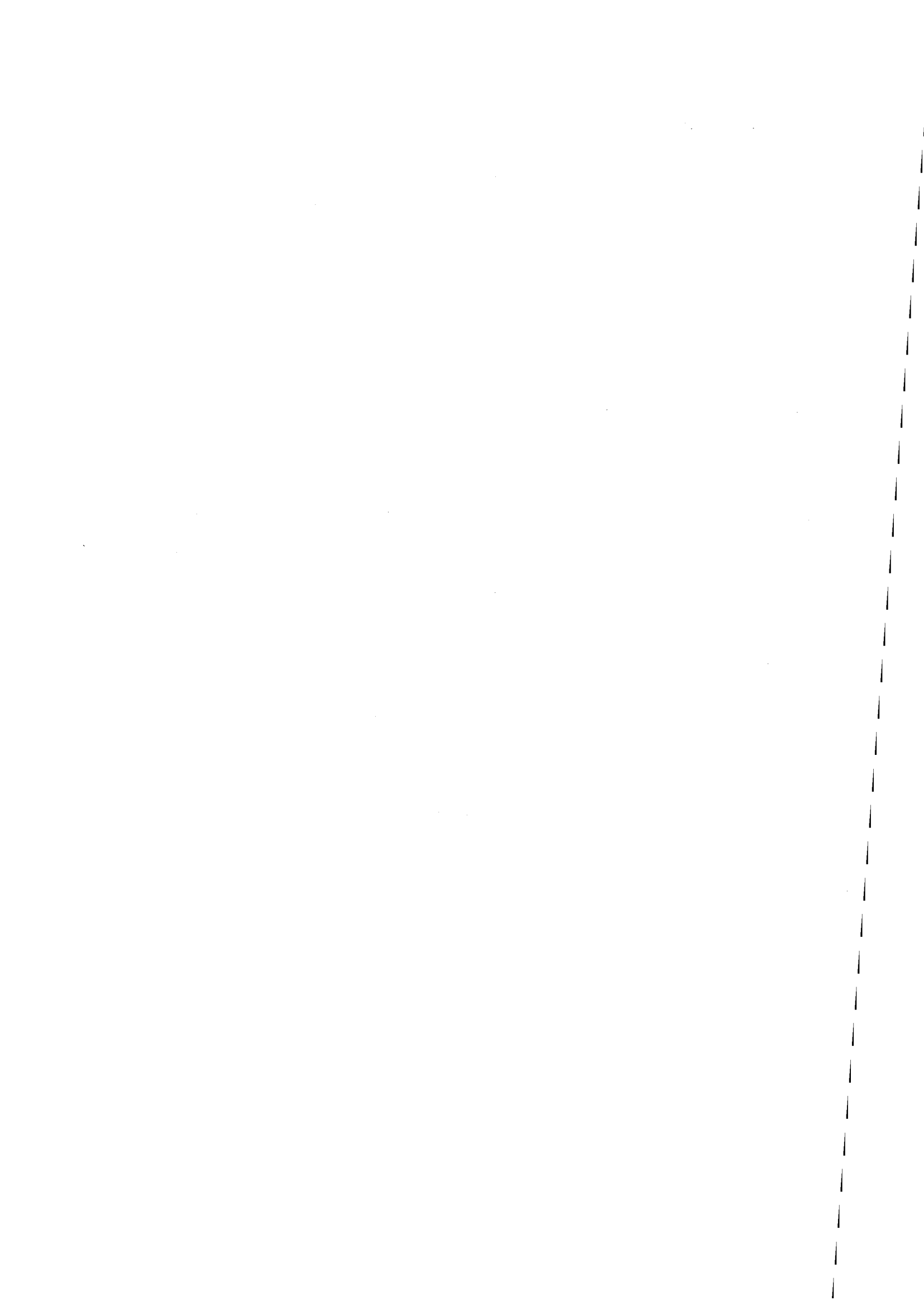
07/10/2005		Douteux		
04/10/2005		Négatif		
05/10/2005				
03/10/2005	Non détectable			
29/09/2005		Négatif	Négatif	
10/09/2005		Négatif	Négatif	
06/09/2005		Négatif	Négatif	
26/09/2005	Non détectable			
02/09/2005		Négatif	Négatif	
23/09/2005		Positif		
22/09/2005	Non détectable			
Du 30/08/2005 au 27/06/2005		Négatif	Négatif	
23/06/2005	Détectable	Négatif		
24/05/2005		Négatif		
20/06/2005	Non détectable			
30/05/2005	Non détectable			
10/06/2005	Non détectable			
08/06/2005	Non détectable			

Annexe 8 : Dossier biologique du patient RI

Date	PCR	ELISA	Culture	Traitement
Du 18/05/2005 au 04/08/2005	Non détectable	Négatif	Négatif	
08/08/2005	Non détectable	Douteux		
Du 10/08/2005 au 22/09/2005	Non détectable	Négatif	Négatif	
22/09/2005	1344	Négatif		
23/09/2005	Détectable			
26/09/2005	3111			
27/09/2005		Négatif	Positif	
29/09/2005		Négatif		
29/09/2005	5622			
04/10/2005	Détectable			cidofovir
07/10/2005	Non détectable			
11/10/2005		Négatif	Négatif	cidofovir
11/10/2005	Détectable			
14/10/2005		Négatif	Négatif	
14/10/2005	Détectable			
18/10/2005	Non détectable			
19/10/2005		Négatif	Négatif	
21/10/2005		Négatif	Négatif	
21/10/2005	Non détectable			
25/10/2005	Non détectable	Négatif	Positif	
27/10/2005		Négatif		
27/10/2005	Détectable		Négatif	
27/10/2005	Non détectable	Négatif	Négatif	
29/10/2005		Positif		
30/10/2005				cidofovir
31/10/2005	Non détectable	Négatif	Négatif	
03/11/2005	Non détectable	Négatif	Négatif	
06/11/2005				cidofovir
07/11/2005	Non détectable			
08/11/2005		QI	Négatif	
10/11/2005	Non détectable			
12/11/2005		Négatif		
14/11/2005	Non détectable	Négatif	Négatif	cidofovir
17/11/2005	Non détectable			
21/11/2005	Non détectable			
22/11/2005		Négatif	Positif	
23/11/2005		Négatif	Négatif	
25/11/2005		Négatif	Négatif	
28/11/2005			Positif	
28/11/2005	Non détectable			
01/12/2005		Négatif	Positif	
01/12/2005	Détectable	Négatif		
05/12/2005			Positif	
05/12/2005	21312			
08/12/2005	24234			
09/12/2005		Positif	Positif	
09/12/2005		Positif		

10/12/2005				cidofovir
12/12/2005	113311			
13/12/2005		Positif	Positif	
13/12/2005		Positif		
15/12/2005	63128	Positif	Positif	
				cidofovir
19/12/2005	5639			
21/12/2005	Non détectable	Négatif	Négatif	
22/12/2005	2921			
23/12/2005				cidofovir
24/12/2005	Non détectable	Négatif	Négatif	
Du 26/12/2005 au 30/01/2006	Non détectable	Négatif	Négatif	
02/02/2006	Non détectable	Négatif		
02/02/2006		Négatif	Négatif	
02/02/2006			Positif	
02/02/2006			Négatif	
02/02/2006			Négatif	
02/02/2006			Négatif	
03/02/2006			Positif	
06/02/2006	Non détectable	Négatif		
06/02/2006		Négatif	Négatif	
06/02/2006		Négatif	Positif	
06/02/2006		Négatif	Négatif	
06/02/2006		Négatif	Positif	
Du 09/02/2006 au 24/04/2006	Non détectable	Négatif	Négatif	





N° d'identification : 205 sur registre

TITRE

**PRISE EN CHARGE VIROLOGIQUE DU RISQUE INFECTIEUX
A ADÉNOVIRUS CHEZ LES PATIENTS ALLOGREFFES
DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES**

Thèse soutenue le 17 juillet 2007

Par Hélène JEULIN

RESUME :

Les greffes de cellules souches hématopoïétiques sont les principales causes d'infections disséminées à Adénovirus (AdV), notamment lorsque le donneur est non apparenté. Elles sont responsables d'une morbidité importante et sont fatales dans 10 à 50 % des cas. Chez ces patients à risque, le suivi virologique est essentiel pour permettre un diagnostic précoce d'infection ou de maladie, et éventuellement la mise en place d'un traitement. L'utilisation de la PCR quantitative en temps réel pour la recherche de l'AdV dans le sang a maintenant fait les preuves de son intérêt pour le suivi de la maladie et du traitement. Cette technique peut être appliquée à des prélèvements de selles. Dans le cadre d'une stratégie préemptive, seule l'utilisation des prélèvements sanguins a été validée. Le but de cette étude a été de vérifier l'intérêt de la quantification de l'ADN AdV dans les selles pour instaurer et suivre la réponse au traitement.

Quatre patients ayant reçu une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, hospitalisés dans le service de Transplantation Médullaire du CHU de Nancy-Brabois et ayant présenté une virémie quantifiable à AdV (3,13 à 5,05 Log₁₀Eq copies/mL) ont été sélectionnés pour ce travail. Ils ont bénéficié de J-7 à J+100 post-greffe, et après J100 en cas de réhospitalisation pour une maladie du greffon contre l'hôte chronique, d'une recherche hebdomadaire systématique d'AdV. Celle-ci est réalisée par culture cellulaire, sur cellules MRC5, dans les selles, les urines, les sécrétions nasales et pharyngées, par recherche d'antigène viral dans les selles (Premier™ Adenoclone®, Meridian Bioscience, Inc.) et par PCR quantitative dans le sang. Le traitement préemptif par cidofovir a été instauré lorsque la recherche d'antigène viral dans les selles était positive à deux reprises et interrompu lorsque la virémie et la recherche d'antigène dans les selles étaient négatives.

Les selles des patients ont été aliquotées et conservées à -20°C pendant toute la durée de l'étude. L'ADN viral a été extrait à l'aide du kit QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen), à partir d'une masse connue de selles homogénéisées. L'ADN extrait a été quantifié par PCR en temps réel sur ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). Le résultat est exprimé en copies par gramme de selles. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de la technique ELISA et de la charge virale, utilisées pour le suivi des patients.

La détection d'AdV dans les selles par PCR quantitative s'est avérée plus précoce, que la mise en évidence d'antigène, se positivant 4 à 10 jours plus tôt. Ses résultats sont plus constants que ceux de la technique ELISA. La charge virale précède la virémie de 32 jours en moyenne. Chez un de ces patients, de l'AdV a été détecté dans les selles par PCR, pendant les six semaines qui ont précédées une rechute, alors que la recherche d'antigène dans les selles et d'ADN dans le sang étaient négatives. L'utilisation de cette technique devrait permettre d'anticiper la mise en place d'un traitement préemptif. De même, la persistance du génome viral dans les selles pourrait être une indication à la poursuite du traitement.

MOTS CLES : Adénovirus, Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, PCR.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
<u>Mme le docteur V. Venard</u>	<u>Laboratoire de Virologie CHU de Nancy Brabois</u>	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/> 5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle