



Mécanismes d'action et de résistance des Adénovirus C au Brincidofovir

Linda Feghoul

► To cite this version:

Linda Feghoul. Mécanismes d'action et de résistance des Adénovirus C au Brincidofovir. Virologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. ⟨NNT : 2017USPCC303⟩. ⟨tel-02305971⟩

HAL Id: tel-02305971

<https://theses.hal.science/tel-02305971v1>

Submitted on 4 Oct 2019

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

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



HAL Authorization

Thèse de doctorat

de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale BIO SPC Infectiologie Microbiologie

*Inserm U941, Génétique et Pathogénèse des Maladies Virales,
Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris*

Mécanismes d'action et de résistance des Adénovirus C au Brincidofovir

Par Linda Feghoul

Thèse de doctorat de Virologie

Dirigée par Jérôme Le Goff

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 13 novembre 2017

Président du jury : Jean-Hugues Dalle, PUPH, Université Sorbonne Paris Cité

Rapporteur : Marie-Edith Lafon, PUPH, Université de Bordeaux

Rapporteur : Florence Morfin, PUPH, Université de Lyon I

Examineur : Bernard Klonjowski, Enseignant Chercheur, Ecole Vétérinaire de Maison-Alfort

Directeur de thèse : Jérôme Le Goff, MCUPH, Université Sorbonne Paris Cité

Titre : Mécanisme de Résistance des Adénovirus C au Brincidofovir

Résumé :

Les adénovirus humains (HAdV) sont responsables d'une importante morbidité et mortalité chez les patients receveurs de cellules souches hématopoïétiques (CSH), en particulier chez les enfants.

Le brincidofovir (BCV) prodrogue du cidofovir est un analogue de la cytosine. Il inhibe l'activité de l'ADN polymérase (ADN pol) des HAdV par arrêt de l'élongation et compétition avec les nucléotides naturels.

Les objectifs de ce travail sont d'étudier la diversité génétique de l'ADN pol des HAdV et de mettre en place des outils pour l'analyse de la sensibilité des HAdV C et de résistance aux BCV.

Dans une première partie, nous avons réalisé le séquençage complet du gène ADN pol de 60 souches virales cliniques. Les résultats montrent une variabilité nucléotidique de 9,9% et peptidique de 8,7%, variable en fonction du type. La région la plus variable est la région NH2 terminale avec 44,2% des mutations d'acides aminés. Aucune des mutations décrites comme associées à la résistance au CDV ou au BCV n'a été détectée. L'analyse du polymorphisme a aussi montré que les séquences ADN pol permettent d'identifier les sources de transmission au cours d'une épidémie. Enfin nos observations suggèrent la faible probabilité d'évènements de recombinaison comme facteur d'évolution du gène codant pour l'ADN pol. Dans une seconde partie, nous avons développé une stratégie de génétique inverse à partir de deux plasmides, un codant pour le génome entier délété de l'ADN pol (Adv-deltaPol) et un codant uniquement pour l'ADN pol (Pol) (3 kilobase) dans lequel les mutations sont introduites par mutagenèse dirigée (Pol-muté). Après une étape de recombinaison bactérienne en un seul plasmide (Adv-deltaPol-Pol-muté), des cellules 293T sont transfectées afin de produire les virus recombinants. La susceptibilité au BCV des virus mutés sera analysée sur des cellules A549. Au total de 12 plasmides Pol-muté ont été produits, le virus recombinant L677F a été obtenu. Les productions des autres virus recombinants sont en cours.

Mots clefs : Adénovirus, brincidofovir, ADN polymérase, épidémie, recombinaison, génétique inverse

Title : Mechanism of Adenovirus C Resistance to Brincidofovir

Abstract :

Human adenoviruses (HAdV) are responsible for significant morbidity and mortality in hematopoietic stem cell (HSC) recipients, particularly in children.

Brincidofovir (BCV) prodrug of cidofovir is an analogue of cytosine. It inhibits the DNA polymerase (DNA pol) activity of HAdV by stopping elongation and competition with natural nucleotides.

The objectives of this work are to study the genetic diversity of the pol DNA of HAdV and to set up tools for the analysis of HAdV C sensitivity and resistance to BCV.

In a first part, we carried out the complete sequencing of the DNA pol gene of 60 clinical viral strains. The results show a nucleotide variability of 9.9% and peptide variability of 8.7%, variable according to the type. The most variable region is the NH2 terminal region with 44.2% of the amino acid mutations. None of the mutations described as associated with CDV or BCV resistance were detected. Polymorphism analysis has also shown that DNA pol sequences can identify sources of transmission during an outbreak. Finally, our observations suggest the low probability of recombination events as a factor of evolution of the gene coding for the DNA pol. In a second part, we developed a reverse genetic strategy from two plasmids, one coding for the whole genome deleted from the DNA pol (Adv-deltaPol) and one coding only for the viral DNA pol (Pol). 3 kilobase) in which the mutations are introduced by site-directed mutagenesis (Pol-mutated). After a bacterial recombination step into a single plasmid (Adv-deltaPol-Pol-mutated), 293T cells are transfected to produce the recombinant viruses. BCV susceptibility of mutated viruses will be analyzed on A549 cells. A total of 12 Pol-mutated plasmids were produced, recombinant virus L677F was obtained. Production of other recombinant viruses is ongoing.

Keywords : Adenovirus, brincidofovir, DNA polymérase, outbreak, recombination, reverse genetic

« Les faits sont matière, la science est esprit, et la science grandit avec les faits comme l'âme se développe avec le corps. »

Henri-Frédéric Amiel

REMERCIEMENTS

Me voici enfin en train de rédiger la page des remerciements, page que j'affectionne particulièrement dans les thèses car c'est la partie où les thésards laissent parler leur cœur. Cette page, annonce aussi pour moi la fin, la fin de cette thèse qui a pris plusieurs aspects pendant 4 ans. Elle aura vu naître mes deux enfants, elle a connu autant de moments de doutes que de bons moments. Au bout du compte malgré quelques moments difficiles, elle aura été une formidable aventure que je ne regrette pas le moins du monde. La thèse aura été surtout une belle aventure humaine, et j'espère rendre hommage dans cette page à chacune des personnes qui y auront contribué.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements aux différents membres du jury : **le Professeur Florence Morfin** et le **Professeur Marie-Edith Lafon** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Ainsi que le **Professeur Jean-hugues Dalle** et le **Docteur Bernard Klonjowski** pour avoir accepté d'être examinateurs de ce travail. Merci à vous d'avoir accepté de siéger au jury de ma thèse.

Je tiens à remercier sincèrement également **le Professeur François Simon**, vous m'avez encouragé à faire cette thèse. Merci de laisser la porte de votre bureau toujours ouverte aux étudiants et aux internes de votre service qui ont besoin de bons conseils.

Je voudrais adresser mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse **le Docteur Jérôme le Goff**. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissée mener mes travaux en toute liberté. Merci Jérôme pour ta disponibilité, ta compréhension et ton écoute. Tu es un modèle de professionnalisme, tu as su au sein de ton équipe tirer le meilleur parti de chacun.

Je voulais aussi remercier toute l'équipe de Virologie de l'Hôpital Saint-Louis, **Constance Delaugerre** qui a toujours été de bons conseils et qui sait tellement bien nous transmettre sa passion pour le VIH, **Marie-Christine Mazon**, **Catherine Scieux** et **Felix Agbalika** ; votre sagesse et votre expérience m'ont beaucoup apporté. Je remercie **Nathalie Schnepf** et **Nadia Mahjoub** mes anciennes « copines » de bureau avec qui j'ai partagé beaucoup de moments agréables, vous m'avez sans le savoir été d'un grand soutien.

Et toi **Sarah Maylin**, sans toi, je ne serai pas là à écrire mes remerciements, tu as toujours été présente à mes côtés, tu m'as encouragé dans mes moments de doutes et dans mes choix. Les vrais amis sont souvent les personnes qui veulent nous hisser vers le haut. C'est ce que tu as toujours fait Sarah, depuis mes débuts d'internat où on partageait nos soirées en garde.

Je tenais aussi à remercier toute l'équipe des techniciens de Virologie, ils accomplissent un travail remarquable malgré les conditions qui ne sont pas toujours faciles. Je remercie également **Janine** pour son aide, son expérience, sa sagesse, tu vas beaucoup manquer au Laboratoire.

Je remercie également notre duo d'ingénieures **Marie-Laure Nere** et **Severine Mercier-Delarue**. Vous m'avez accompagné pendant mes débuts d'AHU, je garderai le souvenir de beaucoup de bons moments avec vous.

Je remercie **Maud Salmona**, de « super interne » tu es passé à « super AHU », la relève a été assurée grâce à toi, tu m'as été d'une aide très précieuse et surtout en fin de thèse. Merci pour tout.

Je remercie toute l'équipe de l'Inserm U941, **Julie Migraine**, **Anne de Verneuil**, **Anthony Machado**, **Arlette Malepou**, **Déborah Portilho**, **Nathalie Arhel**, **Juliette Fernandez**, **François Clavel**, **Fabrizio Mamano**, **Héloïse Delagreverie**, l'année de thèse passée à vos côtés a été la plus belle. Je n'ai passé que des moments enrichissants et agréables, merci de m'avoir accompagné pendant mes envies de Milkshakes. **Julie** et **Anne**, nous avons partagé le bureau pendant une année ensemble, j'ai eu beaucoup de bons moments avec vous, de discussions filles passionnantes...et j'espère qu'il y aura encore beaucoup d'autres.

Je remercie également les étudiants qui ont participé à ce travail, **Lakshika wijekulasingham**, **Nora Ntsiba** et **Edouard Derommelaere**. Merci pour votre implication et votre sérieux.

Je remercie **Lucie Mollet**, toi aussi tu m'as aidé à finir cette thèse sans le savoir c'est bientôt ton tour ma petite Lucie, ne lâche rien ! Et **Sepideh Akhavan**, tu m'as été d'un grand soutien, surtout à la fin de cette thèse, il y a des personnes qui vont et viennent dans notre vie, j'espère toi et Lucie vous garder très longtemps dans ma vie. Je remercie également **Achraf**, mon amie fidèle qui m'accompagne depuis le premier jour de mes études de pharma.

Maintenant c'est à ma famille que j'adresse mes remerciements, **mes parents**, **mes grands-frères**, vous avez toujours été d'un grand soutien, vous avez fait preuve de beaucoup de patience et de compréhension pendant ces nombreuses années d'études. Vous avez été mon moteur. Vous m'avez inculqué la valeur du travail et de l'effort.

Et le meilleur pour la fin ;) **Abdelkrim**, je ne pouvais pas rêver meilleur époux et père que toi. Merci de m'avoir accompagné, soutenu et supporté mes « états de stress » durant toutes ces années, je ne serais pas là non plus sans toi. Et mes deux bébés, **Hana** et **Emir**, chaque jour sont des moments de bonheur avec vous. Vous êtes ce dont je suis le plus fière.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	4
ABRÉVIATIONS	13
INTRODUCTION.....	15
I. Les adénovirus, généralités.....	16
A. Histoire	16
B. Classification	17
C. Biologie des HAdV	19
1. Morphologie et Structure des HAdV	19
2. La capside.....	19
3. Le génome viral.....	22
4. Cycle viral.....	23
5. L'ADN polymérase	29
II. Pathogénie des Adénovirus.....	36
A. Transmission	36
B. Epidémiologie	36
C. Recombinaison.....	37
D. Persistance/latence.....	39
E. Manifestations cliniques.....	41
1. Les atteintes respiratoires	41
2. Atteintes oculaires	42
3. Atteintes digestives	42
4. Atteinte du tractus génito-urinaire	43
5. Association entre infection à HAdV et obésité.....	43
6. Système nerveux central	43
7. Infections à HAdV chez les immunodéprimés	44
III. Traitement des infections à HAdV	50
A. Immunothérapie adoptive	50
B. Antiviraux	52
1. La Ribavirine.....	53
2. Les inhibiteurs de l'ADN polymérase	55
OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	64
MATÉRIELS ET MÉTHODES	66
I. Etude du polymorphisme de l'ADN pol des HAdV C	67
A. Patients	67
B. Prétraitement des échantillons	67
C. Isolement des virus	68
D. Extraction des acides nucléiques.....	71
E. PCR en temps réel et typage des HAdV.....	71
F. Amplification et séquençage du gène ADN polymérase des HAdV C.....	72
II. Description moléculaire d'une épidémie d'HAdV C2 chez des enfants greffés de CSH	77
A. Pré traitement des échantillons	77
B. Séquençage haut débit Mi Seq.....	77
1. Préparation des bibliothèques et séquençage	77
2. Analyse Bioinformatique	78

III. Génération de virus recombinants pour l'étude des mutations dans le gène codant pour l'ADN polymérase	79
A. Principe.....	79
B. Mutagenèse dirigée.....	83
1. Principe	83
2. Choix des amorces	84
3. Mutagenèse dirigée	85
4. Transformation en bactéries compétentes	85
5. Amplification et purification d'ADN par miniculture et minipréparation	86
6. Vérification des mutations.....	86
7. Purification du fragment pol.....	87
B. Génération des recombinants.....	87
1. Electroporation	87
2. Transfection	88
3. Production des virus recombinants	91
4. Détermination de la sensibilité phénotypique	91
RÉSULTATS.....	92
I. Diversité génétique des ADN pol des HAdV de l'espèce C	93
A. Etude du polymorphisme de l'ADN pol des HAdV C	93
B. Polymorphisme nucléotidique	93
C. Polymorphisme des acides aminés.....	98
D. Localisation des substitutions d'acides aminés dans des domaines fonctionnels ADN polymérase	98
E. Différences entre les types et les domaines.....	104
F. Mutations de l'ADN pol des HAdV C associées à la résistance au CDV ou au BCV	105
II. Description moléculaire d'une épidémie d'HAdV C chez des enfants greffés de CSH	106
A. Patients	106
B. Analyse de la diversité des HAdV C	107
1. Analyse de la diversité en intertype	107
2. Analyse de la diversité en intratype	108
C. Analyse du gène codant pour l'ADN pol	113
D. Analyse du génome complet.....	115
E. Analyse des gènes codant pour les protéines structurales	116
1. Analyse du gène codant pour l'hexon	116
2. Analyse du gène codant pour la fibre.....	117
3. Analyse du gène codant pour le penton.....	117
4. Analyse du gène E3.....	117
F. Etude d'un cas de recombinant.....	122
1. Le patient KL	122
2. Analyse comparative du génome	123
3. Analyse de la recombinaison	124
III. Génétique inverse.....	126
A. Mutagenèse dirigée.....	126
1. Amorces	126
2. Vérification des mutations.....	127
B. Recombinaison.....	130
1. Vérification des recombinants.....	130
C. Transfection.....	131
ANNEXE 1 : Publications, communications et enseignements.....	168

Communications Orales.....	169
Communications Affichées.....	170
ANNEXE 2 : Publication soumis à Antiviral Research en juin 2016, acceptée, en révision.	173

TABLE DES ILLUSTRATIONS :

FIGURE 1. CLASSIFICATION DES ADENOVIRIDAE.....	18
FIGURE 2. STRUCTURE DES HADV	19
FIGURE 3. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE FACE DE LA CAPSIDE	20
FIGURE 4. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA FIBRE	21
FIGURE 5. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENOME DES HADV.	23
FIGURE 6. CYCLE DE REPLICATION DES HADV	24
FIGURE 7. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA REPLICATION CHEZ LES HADV.	28
FIGURE 8. EMPLACEMENT DES MOTIFS CONSERVEES DES ADN POL DE LA FAMILLE B.....	30
FIGURE 9. STRUCTURE CRISTALLINE DE L'ADN POL DU BACTERIOPHAGE ϕ 29	31
FIGURE 10. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS DOMAINES DE L'ADN POL ..	32
FIGURE 11. POLYMERISATION REALISEE GRACE AUX IONS Mg^{2+} ET AUX RESIDUS D685 ET D1014	33
FIGURE 12. MECANISME DE LA REPLICATION DES HADV.	34
FIGURE 13. DIVERSITE DES DNA POLYMERASE DES HADV C	35
FIGURE 14. MECANISME D'ACTION DE CDV DANS UNE CELLULE INFECTEE PAR L'HADV.....	56
FIGURE 15. MECANISME D'ACTION DU CIDOFOVIR ET DU BRINCIDOFOVIR (CMX001).....	59
FIGURE 16. DETERMINATION DE L'ESPECE ET TYPE POUR LES HADV.	72
FIGURE 17. CARTOGRAPHIE DU PLASMIDE ADV-DELTAPOL ET DU PLASMIDE POL PAR OXFORD GENETICS.	80
FIGURE 18. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA GENETIQUE INVERSE	82
FIGURE 19. PRINCIPE DE LA MUTAGENESE DIRIGEE.....	84
FIGURE 20. POSITIONS DES AMORCES DE LA PCR DE VERIFICATION DES RECOMBINANTS ...	88
FIGURE 21. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA TRANSFECTION PAR LA LIPOFECTAMINE 3000.	90
FIGURE 22. POLYMORPHISME NUCLEOTIDIQUE DES HADV C.....	94
FIGURE 23. POLYMORPHISME NUCLEOTIDIQUE DES HADV C1, C2 ET C5.....	95
FIGURE 24. DIVERSITE GENETIQUE DES 80 ADN POL HADV C	97
FIGURE 25. CARTE DU POLYMORPHISME EN ACIDES AMINES DE L'ADN POL DES HADV C. ...	99
FIGURE 26. LES DIFFERENTES INFECTIONS A HADV C DE LA SEMAINE S38 A S50.....	106
FIGURE 27. ANALYSE DE LA DIVERSITE DES HADV C EN INTERTYPE	108

FIGURE 28. ANALYSE DE LA DIVERSITE DES HADV C1	109
FIGURE 29. ANALYSE DE LA DIVERSITE DES HADV C2	110
FIGURE 30. ANALYSE DE LA DIVERSITE DES HADV C5	110
FIGURE 31. ANALYSE DE LA DIVERSITE DES HADV C6	111
FIGURE 32. ARBRE PHYLOGENETIQUE DU GENE CODANT POUR L'ADN POL.....	113
FIGURE 33. LOCALISATION DES PATIENTS HADV C1 ET C2 PENDANT L'EPIDEMIE AU SEIN DE L'UNITE DE GREFFE PEDIATRIQUE	114
FIGURE 34. ARBRE PHYLOGENETIQUE DU GENOME COMPLET DES HADV C.....	115
FIGURE 35. ARBRE PHYLOGENETIQUE DU GENE CODANT POUR L'HEXON.....	118
FIGURE 36. ARBRE PHYLOGENETIQUE DU GENE CODANT POUR LA FIBRE	119
FIGURE 37. ARBRE PHYLOGENETIQUE DU GENE CODANT POUR LE PENTON	120
FIGURE 38. ARBRE PHYLOGENETIQUE DU GENE E3	121
FIGURE 39. EVOLUTION DES CV HADV DANS LE PLASMA ET DANS LES SELLES POUR LE PATIENT KL.	122
FIGURE 40. ANALYSE BOOTSCAN DE LA SEQUENCE DU VARIANT KL	124
FIGURE 41. ANALYSE BOOTSCAN DE LA SEQUENCE HEXON DU VARIANT KL.....	125
FIGURE 42. VERIFICATIONS DES MUTATIONS T87I, V303I, A501E, L677F SUR LE PLASMIDE POL APRES MUTAGENESE DIRIGEE.	128
FIGURE 43. VERIFICATIONS DES MUTATIONS F882I, F882L, T11551I, S1183R SUR LE PLASMIDE POL APRES MUTAGENESE DIRIGEE.....	129
FIGURE 44. PHOTO DE GEL DES RECOMBINANTS.	130

TABLEAU 1. CLASSIFICATION DES HADV REPARTIS PAR ESPECE ET PATHOLOGIES ASSOCIEES	18
TABLEAU 2. LES DIFFERENTS MODELES D'INFECTIONS A HADV SELON LE TYPE ET LA LIGNEE CELLULAIRE DE LYMPHOCYTES T.....	40
TABLEAU 3. MUTATIONS IDENTIFIEES DANS LE GENE DE L'ADN POL SOUS PRESSION DE SELECTION AU BCV ET AU CDV	63
TABLEAU 4. CI50 DES VIRUS MUTANTS RESISTANTS AU CDV.....	63
TABLEAU 5. CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES 60 PATIENTS INCLUS DANS L'ETUDE.....	70
TABLEAU 6. MIX ET PROGRAMME POUR LA PCR HVR7.....	72
TABLEAU 7. AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION ET LE SEQUENÇAGE DES HADV C POL.....	74
TABLEAU 8. NUMEROS D'ACCESSIONS GENE BANK DES 60 SEQUENCES CLINIQUES ET DES 20 SEQUENCES DE REFERENCES D'HADV C INCLUES DANS L'ETUDE	76
TABLEAU 9. MIX ET PROGRAMME POUR LA PCR DE VERIFICATION DES RECOMBINANTS.....	88
TABLEAU 10. POLYMORPHISME EN ACIDES AMINES DES 80 ADN POL HADV C DE L'ETUDE.	101
TABLEAU 11. SUBSTITUTIONS D'ACIDES AMINES SELON LES DIFFERENTS DOMAINES FONCTIONNELS DE L'ADN POLYMERASE HADV.	103
TABLEAU 12. P-DISTANCES POUR LES GENOMES COMPLETS. LES GENES HEXON, DNA POL, FIBRE ET PENTON CALCULES POUR TOUS LES HADV C.....	108
TABLEAU 13. P-DISTANCES POUR LES GENOMES COMPLETS, LES GENES HEXON, DNA POL, FIBRE ET PENTON CALCULEES POUR LES HADV C1.....	109
TABLEAU 14. P-DISTANCES POUR LES GENOMES COMPLETS, LES GENES HEXON, DNA POL, FIBRE ET PENTON CALCULEES POUR LES HADV C2.....	110
TABLEAU 15. P-DISTANCES POUR LES GENOMES COMPLETS, LES GENES HEXON, DNA POL, FIBRE ET PENTON CALCULEES POUR LES HADV C5.....	111
TABLEAU 16. P-DISTANCES POUR LES GENOMES COMPLETS, LES GENES HEXON, DNA POL, FIBRE ET PENTON CALCULEES POUR LES HADV C6.....	111
TABLEAU 17. P-DISTANCES POUR LES GENOMES COMPLETS, LES GENES HEXON, DNA POL, FIBRE ET PENTON CALCULEES POUR LE GENOME KL.....	123
TABLEAU 18. RECAPITULATIF DES DIFFERENTES MUTATIONS AU BCV ET AU CDV DECRITES	126

TABLEAU 19. CARACTERISTIQUES DES AMORCES DE MUTAGENESE DIRIGEE.	127
--	-----

ABRÉVIATIONS

A

ADN pol : ADN polymérase

ADP : Adenovirus Death Protein

AMM : Autorisation de mise sur le marché

B

BCV : Brincidofovir

BPCO : Broncho-pneumopathie
obstructive

C

CAR : Coxsackievirus Adenovirus Receptor

CDV : Cidofovir

CIVD : Coagulation intravasculaire
disséminée

CMV : Cytomégalovirus

CSH : Cellules souches hématopoïétique

CTL : Lymphocytes T cytotoxique

D

DBP : DNA Binding Protein

dCMP : Désoxycytidine monophosphate

DLI : Donor Lymphocyte Infusion

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle
Medium

E

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

EBV : Epstein Barr Virus

G

GCV : Ganciclovir

GI : Gastro-intestinal

GTP : Guanosine triphosphate

GvH : Maladie de greffon contre l'hôte

H

HAdV : Adénovirus Humains

I

IFN : Interféron

IMPDH : inosine monophosphate
déshydrogénase

ITR : Internal terminal repeat

K

Kb : kilobase

L

LB : Lysogeny broth

M

MLP : Major Late Promoteur

MTOC : centre organisateur des
microtubules

N

NK : Natural killer

NLS : Signal de localisation nucléaire

Nt : Nucléotide

P

PBS : Phosphate Buffered Saline

Pol : Polymérase

pTP : Précurseur de la protéine terminale

VST : cellules T spécifiques du virus

R

RGD : tripeptide Arg-Gly-Asp

S

SAdV : Adénovirus simiens

SVF : Sérum de veau fœtal

T

TMAV : Titi Monkey adénovirus

TP : Terminal Protein

TK : Thymidine kinase

V

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience
humaine

INTRODUCTION

I. Les adénovirus, généralités

A. Histoire

L'histoire des Adénovirus remonte à 1953 où Rowe et al., ont mis en évidence un agent pouvant entraîner un effet cytopathique à partir de fragments d'amygdales d'enfants (Rowe et al., 1953). Tout d'abord appelé « *A.D agent* » (*adenoid degeneration*), les Adénovirus ont été retrouvés dans plusieurs pathologies et ont été nommés *ARD* (*Acute Respiratory Disease*) puis *APC* (*Adenoidal Pharyngeal Conjunctival*). Cet agent pathogène a finalement pris le nom d'adénovirus en 1956 du fait de sa présence dans les amygdales (adeno signifie glande en grec) (Enders et al., 1956; Hilleman and Werner, 1954).

L'étude des Adénovirus dans les laboratoires a permis une avancée importante dans les connaissances en biologie fondamentale, notamment dans la compréhension du mécanisme d'épissage des ARN, deux équipes distinctes ont publié leur travaux en 1977 (Berget et al., 2000; Chow et al., 2000) et ont été récompensées d'un prix nobel en 1993. Dans les années 80, le développement de la vectorologie avec la manipulation des génomes viraux notamment des Adénovirus de groupe C, ainsi que la production des vecteurs Adénovirus à de hauts titres viraux a permis leur utilisation en thérapie génique et dans des approches vaccinales (Chartier et al., 1996; Kovesdi et al., 1997; Verma and Somia, 1997). L'utilisation des vecteurs Adénovirus en thérapie génique a montré ses limites en 1999 avec l'affaire « Jesse Gelsinger ». Ce patient souffrant d'un déficit en Ornithine TransCarbamylase (OTC) a reçu une injection d'une forte dose de vecteur Adénovirus et en est décédé du fait d'une réaction immunitaire trop importante (Thacker et al., 2009). Depuis, les vecteurs AdV sont utilisés avec beaucoup de précautions en thérapie génique ainsi que dans certaines approches vaccinales.

Les vaccins vivants oraux dirigés contre les types 4 et 7 de l'Adénovirus, sérotypes les plus fréquemment impliqués dans les infections respiratoires chez les militaires, ont été introduits en 1970 (Dudding et al., 1972). Ils ont permis de réduire sensiblement la morbidité et la mortalité liées aux Adénovirus 4 et 7 au sein de cette population. En 1996, la production de vaccins a été abandonnée, il y a eu dès lors réapparition des épidémies d'infections respiratoires à Adénovirus (Gray et al., 1999). Un vaccin vivant oral de seconde génération a été obtenu et est utilisé depuis octobre 2011. Il est destiné aux militaires âgés de 17 à 50 ans (Choudhry et al., 2016; Radin et al., 2014).

B. Classification

Les ADV humains (HAdV) appartiennent à la famille des Adenoviridae. Cette famille comprend cinq genres retrouvés au sein des 5 principales classes de vertébrés : les Aviadenovirus (oiseaux), les Atadenovirus (oiseaux, reptiles, mammifères ruminants et marsupiaux), les Ichtadenovirus (poissons), les Siadenovirus (oiseaux et amphibiens) et les Mastadenovirus (hommes, singes, bovins, ovins, porc, équidés) auxquels les HAdV appartiennent. Les HAdV sont divisés en sept espèces : d'A à G, avec une sous division de l'espèce B en espèces B1 et B2. La classification des espèces dépend de plusieurs caractéristiques : distance phylogénique (>5 à 15% basée sur l'analyse de séquence de l'ADN polymérase), l'organisation génétique de la région précoce E3, le pourcentage en GC contenu dans le génome, leur oncogénicité chez les rongeurs (Yabe et al., 1962), les familles d'hôtes, le nombre de gènes ARN VA, le tropisme ainsi que les propriétés d'hémagglutination (Harrach B, Benkö M, et al, 2012, Adenoviridae 9 report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p125-141, Virus taxonomy ; Goran Wadell, genetic variability of adenovirus ; (Russell, 2009; Wadell et al., 1980). **Figure 1.**

Au sein de chaque espèce, les HAdV sont classés en type et un type correspond à un chiffre tel que HAdV-5 pour « human adenovirus type 5 » un des HAdV les plus étudiés en laboratoire. Au moins soixante-dix types ont été référencés, la liste s'allonge au fur et à mesure du temps car il existe des phénomènes de recombinaison notamment au sein de l'espèce D (Lukashev et al., 2008a). Les HAdV 1 à 51 étaient appelés auparavant sérotype, car ils étaient définis par séroneutralisation et par hémagglutination ; ils diffèrent des HAdV type 52 à 70 qui ont été découverts par séquençage du génome complet et analyse bioinformatique (Buckwalter et al., 2012; Huang and Xu, 2013). **Tableau 1.**

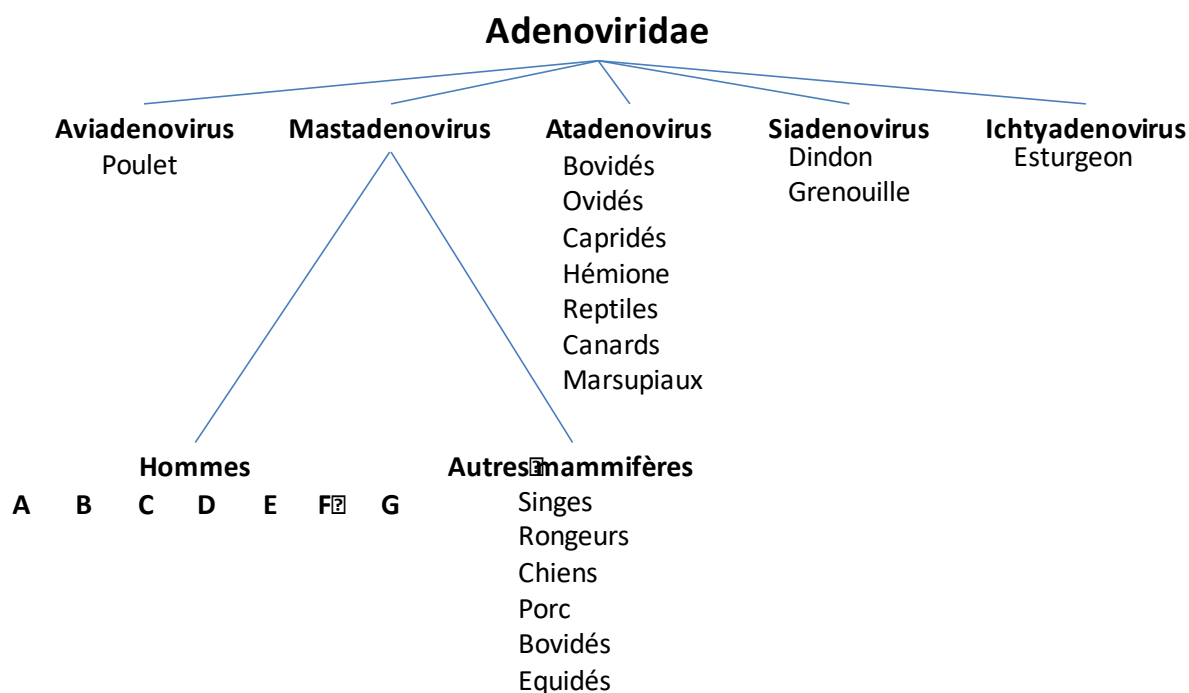


Figure 1. Classification des Adenoviridae. D'après Molinier-Frenkel et al, 2003. (Molinier-Frenkel and Boulanger, 2003)

Les HAdV d'une même espèce partagent le même tropisme cellulaire et sont ainsi responsables des mêmes pathologies qui en découlent. On retrouve ainsi comme association entre espèces et infections à des sites spécifiques : les gastroentérites (HAdV F et G), les infections respiratoires (HAdV B, C et E), les hépatites (HAdV C), les cystites (HAdV B), les conjonctivites (HAdV B et D). **Tableau 1.**

Groupe	Types	Site d'infection
A	12, 18, 31, 61	Système digestif
B	3,7, 16, 21, 50, 66, 68 (B1) 11, 14, 34, 35, 55 (B2)	Voies respiratoires, voies urinaires et oeil
C	1, 2, 5, 6, 57	Voies respiratoires, foie
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56, 58-60, 62-65, 67, 69, 70	Voies respiratoires et Œil
E	4	Voies respiratoires
F	40, 41	Système digestif
G	52	Système digestif

Tableau 1. Classification des HAdV répartis par espèce et pathologies associées. Modifié d'après Lion et al, 2014 (Liu et al., 2014). Les types inscrits en gras ont été identifiés après la publication.

C. Biologie des HAdV

1. Morphologie et Structure des HAdV

La microscopie cryo-électronique et la cristallographie à rayons X ont permis de déterminer une structure tridimensionnelle détaillée de la particule virale (Nemerow et al., 2012; Russell, 2009; Stewart et al., 1993) **Figure 2**.

Les HAdV sont des virus non enveloppés de 70 à 100 nm de diamètre. La capside de type icosaédrique, contient le génome sous forme d'ADN linéaire double brin.

2. La capside

La capside est composée de 252 capsomères comprenant 240 protéines hexon, protéine majeure de la capside et 12 protéines penton au niveau de chaque sommet. Les 240 hexons constituent les 20 facettes triangulaires de l'icosaèdre. Chaque facette du virus est constituée de 12 hexons trimériques. Les trimères d'hexons sont divisés en deux groupes : les hexons peripentonaux (1 trimère par penton base) et les 9 autres trimères forment un groupe appelé : GON (Group of Nine) (Liu et al., 2011; Russell, 2009) **Figure 3**.

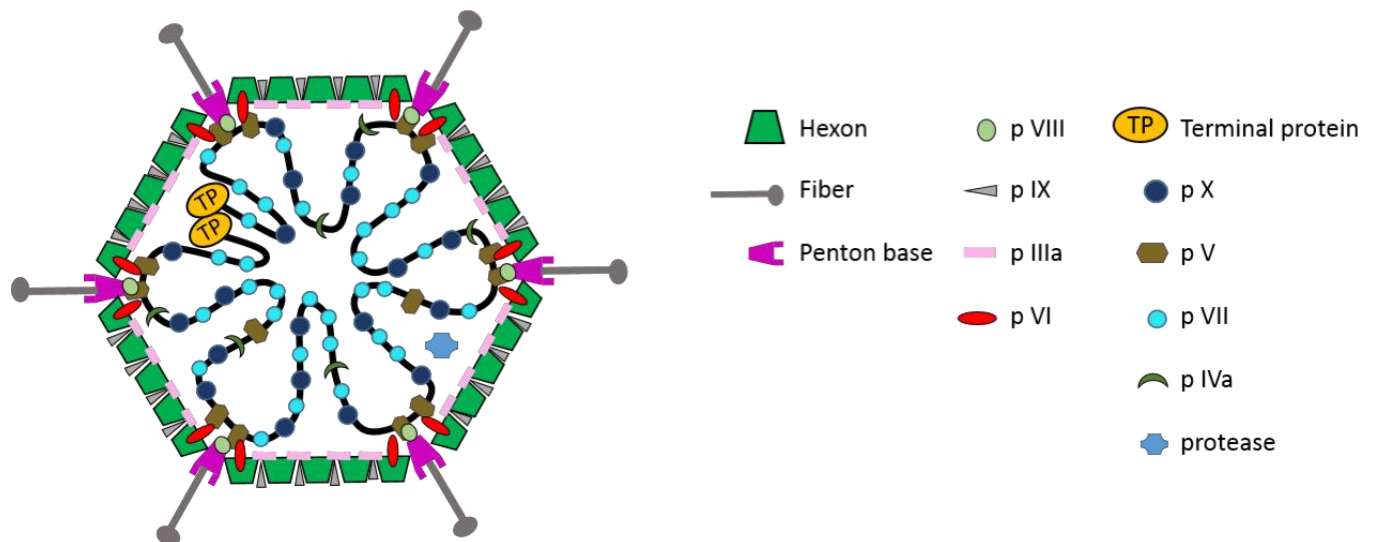


Figure 2. Structure des HAdV. D'après Nemerow et al, 2012. La capside est formée par les protéines Hexon, protéine majeure de la capside, le penton base portant la fibre au sommet. A l'intérieur de la capside se trouve le génome sous forme de molécule d'ADN double brin linéaire. Aux extrémités du génome les protéines TP.

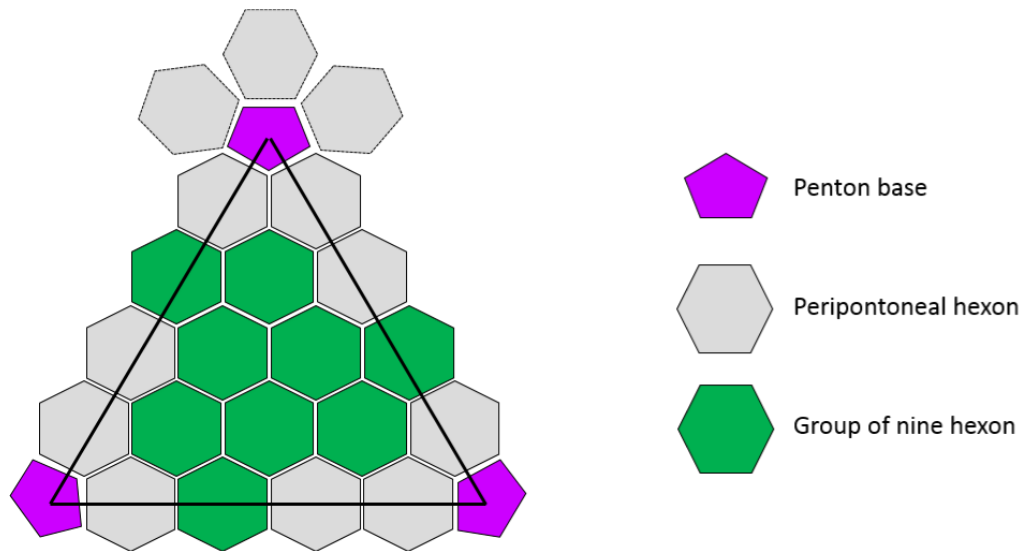


Figure 3. Représentation schématique d'une face de la capside, d'après Liu et al, 2011 (Liu et al., 2011). Les trimères d'hexons sont divisés en deux groupes : les hexons peripontonaux (1 trimère par penton base, en gris) et les 9 autres trimères forment le « Group of Nine hexon » (en vert).

Le penton contient la fibre, molécule trimérique et du penton base, molécule pentamérique. La protéine fibre comprend 3 domaines structuraux : la queue flexible en région N-terminale (tail), la région centrale allongée appelée la tige (shaft), et la tête domaine globulaire en région C-terminale (knob) **Figure 4**. La queue s'attache de manière non covalente au penton base via un motif (FNPVYPY) conservé chez la majorité des HAdV (Zubieta et al., 2005). La tige a une taille variable en fonction des espèces, expliquant une différence de flexibilité ainsi que d'interactions avec les intégrines des cellules hôtes. La tête globulaire de la fibre est responsable de l'attachement de l'HAdV aux récepteurs primaires des cellules hôtes (Nilsson et al., 2011; Trinh et al., 2012; Wang et al., 2011) **Figure 4**.

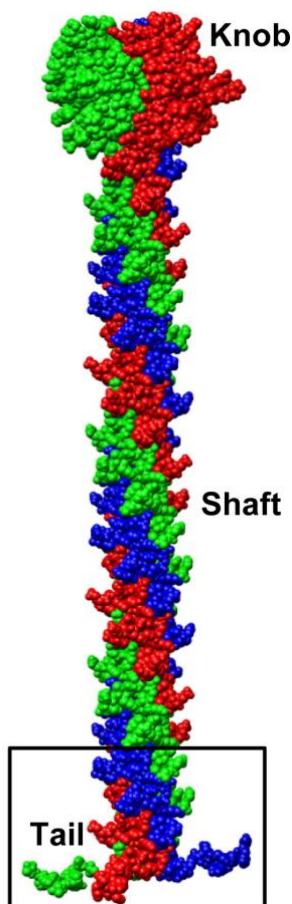


Figure 4. Structure tridimensionnelle de la fibre. D'après Liu et al, 2011. Les trois molécules formant le trimère composant la fibre sont représentées en bleu, vert et rouge. Ces trois molécules forment la tête globulaire (Knob), la tige (Shaft) et la queue (Tail).

La capside comprend également des protéines « mineures », les protéines IIIa, VI, VIII et IX. Elles participent à la stabilité de la capside et sont décrites comme protéines ciment. Elles peuvent également jouer un rôle dans les événements suivant l'internalisation, tels que la pénétration au sein de l'endosome, l'activation de la transcription et la réorganisation nucléaire (protéine IX) (Smith et al., 2010; Wiethoff et al., 2005). **Figure 2.**

D'autres protéines à l'intérieure du core de la capside sont présentes : la protéine V, VII, IVa2, X, la protéine terminale TP et la protéine Mu. Elles sont associées au génome viral.

La protéine V serait impliquée dans le transport de l'ADN viral dans le noyau cellulaire (Matthews and Russell, 1998). La protéine VII, protéine très basique, couvre l'ADN génomique, comme les histones, pour le structurer et former les nucléosomes. La protéine IVa2 se lierait à l'ADN et permettrait l'incorporation du génome viral dans le virion. La

protéine TP est liée de manière covalente aux extrémités 5' de chaque brin d'ADN, elle joue un rôle dans répllication de l'ADN viral. Et enfin la protéine Mu participe à la compaction du génome viral dans le virion (Russell, 2009). **Figure 2.**

3. Le génome viral

Le génome viral est un ADN double brin, dont la taille varie de 34 à plus de 37 kb, codant pour 40 gènes. (Harrach and Benko, 2007; Robinson et al., 2013). Les HAdVs partagent tous la même organisation génomique, celle-ci est divisée en trois régions : région précoce, intermédiaire et tardive (Davison et al., 2003) **Figure 6.**

Les gènes situés sur la région précoce sont exprimés avant la répllication du génome viral et sont composés des gènes E1 (E1A et E1B), E2 (E2A et E2B), E3 et E4. Ils codent pour des protéines nécessaires à l'établissement de l'infection et à l'activation de l'expression des autres gènes viraux. L'unité E2A code pour la protéine de liaison à l'ADN, la protéine DBP et E2B code pour l'ADN polymérase virale (pol) et le précurseur de la protéine terminale (pTP). L'ensemble DBP, pol et pTP en association avec des facteurs nucléaires, forme la machinerie répllicative du virus (Hoeben and Uil, 2013). L'unité E3 est une région hautement diverse entre les espèces des HAdV, elle code pour des protéines à fonction immunomodulatrice. Ces protéines vont contrecarrer la réponse antivirale de la cellule, d'une part en inhibant l'apoptose et d'autre part en empêchant la mise en place d'une réponse immunitaire contre le virus.

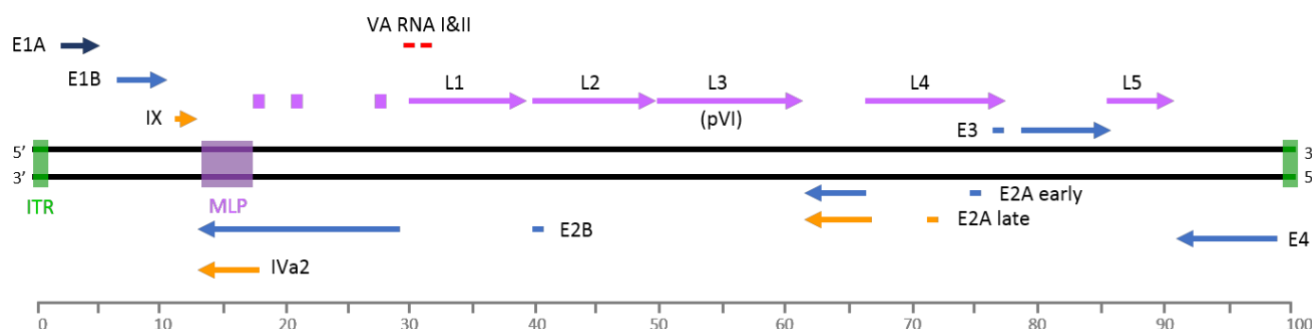


Figure 5. Représentation schématique du génome des HAdV d'après Russel et al, 2009. Les régions précoces sont représentées en bleu, les régions tardives en violet. A l'extrémité du génome se trouvent les ITR représentés en vert. Les unités d'expression intermédiaires codant pour les protéines Iva2 et IX sont représentées en jaune. Les unités d'expression intermédiaires sont exprimées de façon concomitante avec la réplication, et codent pour les protéines de capsid IVa2 et IX (Davison et al., 2003; Giberson et al., 2012).

Les gènes d'expression tardives sont exprimés après la réplication, ils sont regroupés en 5 unités d'expression (L1 à L5) et sont sous la dépendance d'un seul et unique promoteur (MLP = Major Late Promoteur). Un seul transcrit est produit et subira des épissages alternatifs. Ces gènes codent principalement pour des protéines structurales pour créer de nouveaux virions.

De plus, selon le type de l'HAdV, le génome peut présenter un ou deux gènes non codants, les gènes virus-associated RNA (VA RNA I et VA RNA II) impliqués dans la régulation de la traduction. L'un d'entre eux (VA RNA I) peut agir comme un microARN (miRNA). Alors que tous les gènes sont transcrits par l'ARN polymérase II, seuls les VA RNA sont transcrits par l'ARN polymérase III (Kamel et al., 2013; Robinson et al., 2011).

Aux extrémités du génome viral, se trouvent les ITRs qui sont des séquences répétées inversées d'environ 100 pb. Elles contiennent les origines de réplication du génome viral.

Figure 5.

4. Cycle viral

Le cycle de l'HAdV est un cycle lytique, à la fin du cycle viral, les néo-virions, synthétisés et pré-assemblés dans le cytoplasme vont entraîner la mort cellulaire par un mécanisme de lyse et être libérés dans le milieu extra-cellulaire. Le cycle viral dure entre 24 et 72h et peut produire en moyenne 10 000 virions par cellule infectée (Berk, 2005) **Figure 6.**

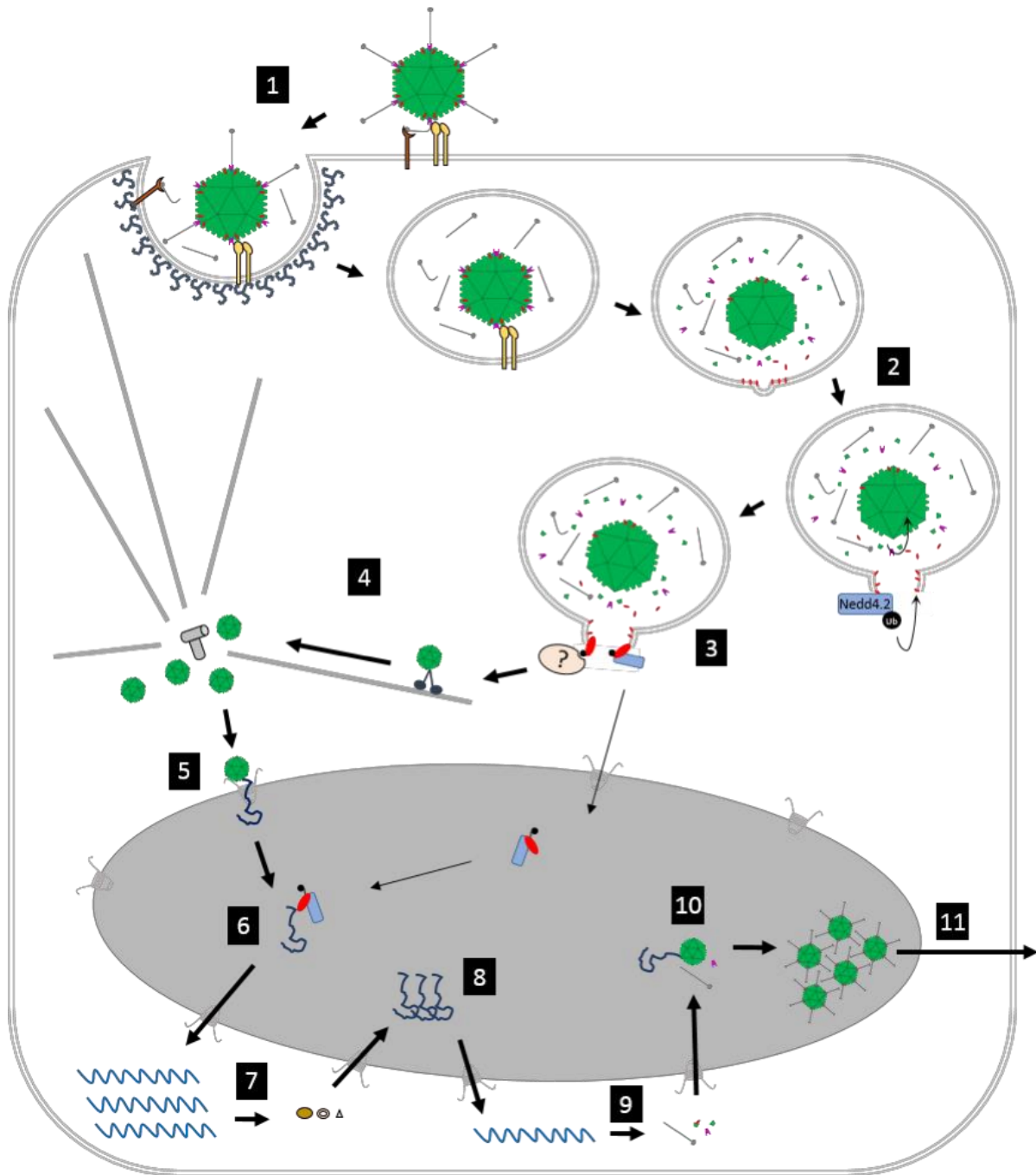


Figure 6. Cycle de réplication des HAdV. Adapté d'après Nemerow et al, 2012.

1. Adsorption des HAdV par liaison au récepteur primaire et internalisation du virus par endocytose dépendante de la clathrine. **2.** Désassemblage partiel des HAdV et rupture de la membrane endosomale par le facteur lytique pVI qui se lie et est ubiquitinylé par l'ubiquitine ligase Nedd4. **3** Libération du virus dans le cytoplasme par via la pVI ubiquitinylée. **4.** Transport cytoplasmique grâce aux microtubules et la dynéine jusqu'au MTOC. **5.** Importation de NPC de la capside virale et libération du génome viral dans le noyau. **6.** Initiation de la transcription du génome viral par le complexe Nedd4.2-pVI. **7.** Expression des gènes précoces. **8.** Réplication de l'ADN viral. **9.** Expression des gènes intermédiaires et tardifs. **10.** Assemblage viral, encapsidation du génome et maturation virale. **11.** Libération des néo virions.

a) Attachement et entrée dans la cellule-hôte

Le cycle viral débute par la reconnaissance de la cellule cible par le virus et l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires. C'est grâce à la fibre que se fait l'attachement du virus à la

cellule hôte. Différents types de récepteurs cellulaires ont été identifiés. La majorité des espèces (A, C, D, E et F) utilisent le récepteur CAR (Coxsackievirus Adénovirus Receptor) (Arnberg et al., 2000; Russell, 2009). Pour les HAdV de l'espèce B et D, plusieurs types de récepteurs ont été identifiés, le CD46, les acides sialiques, le CD80/86, les protéoglycanes héparane sulfate ainsi que la desmoglérine 2 (Arnberg, 2009; Corjon et al., 2011; Russell, 2009; Wang et al., 2011). L'HAdV 5 peut utiliser le CMH1 α 2 et l'HAdV 37 le glycan GD1a (Hong et al., 1997; Nilsson et al., 2011). Les facteurs sériques, tel que le facteur X, joueraient un rôle important pour l'entrée des HAdV des espèces A, B et C (Arnberg, 2009; Corjon et al., 2011).

Suite à l'attachement au récepteur cellulaire, un motif RGD situé dans la protéine penton base est exposé, il permet l'interaction avec les intégrines α 5 cellulaires et l'internalisation du virus par endocytose dans une vésicule de clathrine (Mathias et al., 1994). L'internalisation du virus par macropinocytose peut également se produire par simple reconnaissance des intégrines cellulaires (Meier and Greber, 2004). Pour l'HAdV de l'espèce C, la fibre se détacherait du virus à proximité de la surface de la membrane cellulaire, permettant l'internalisation du virus. Ensuite, l'interaction de la base du penton et des intégrines déclenche une signalisation cellulaire à l'origine de l'endocytose médiée par la clathrine du virus dans la cellule (Russell, 2009) **Figure 6**.

b) Désassemblage et rupture de l'endosome

Immédiatement après son internalisation, le virus se retrouve enfermé dans une vésicule endosomale. Le virus doit y échapper avant que la fusion avec le lysosome et la dégradation du virus ait lieu.

L'acidification au sein de l'endosome par fusion avec une vésicule lysosomale va permettre la libération du virus dans le cytoplasme. En effet, la baisse du pH entraîne une déstabilisation et un désassemblage partiel de la capsid et plus particulièrement la libération de la protéine pVI (Greber et al., 1993). Cette dernière en présence d'un pH acide, aurait une activité lytique sur les membranes et entraînant une destruction de la vésicule et la libération du virus dans le cytoplasme (Wiethoff et al., 2005). L'échappement du virus de l'endosome serait permis par l'interaction de la protéine pVI et de l'ubiquitine ligase Nedd4 (Votteler and Sundquist, 2013) **Figure 6**.

c) Transport jusqu'au noyau

Une fois dans le cytoplasme le virus subit un déshabillage progressif durant son transport vers le noyau. Le transport vers le noyau se fait grâce aux microtubules en utilisant les moteurs dynéines. Certaines études ont montré que l'interaction du virus avec la dynéine serait médiée par la protéine hexon (Bremner et al., 2009; Leopold and Crystal, 2007; Scherer and Vallee, 2011; Suomalainen et al., 1999). Les HAdV vont ensuite s'accumuler au niveau des centres organisateurs des microtubules (MTOC) avant la translocation du génome vers le noyau (Bailey et al., 2003). L'interaction de la protéine pVI avec l'ubiquitine Nedd4 serait également impliquée dans le transport vers le noyau et l'accumulation au niveau des MTOC. C'est grâce à l'attachement de la capsid virale au complexe du pore nucléaire ainsi qu'aux signaux de localisation nucléaire (NLS), présents au niveau la protéine VII (protéine majeure du core) que le génome viral pénètre dans le noyau (Trotman et al., 2001; Wodrich et al., 2006). **Figure 6**

d) Expression du génome viral

L'entrée du génome est marquée par l'expression des gènes précoces. Les rôles de ces gènes sont de préparer la cellule à la réplication virale, de contrecarrer le système immunitaire et de protéger la cellule infectée ainsi que de synthétiser les protéines virales nécessaires à la réplication de l'ADN viral. Le premier gène à s'exprimer est le gène E1A qui permet l'expression des autres gènes dits précoces : E1B, E2A, E2B, E3 et E4. L'expression des gènes précoces et l'initiation de la réplication dure environ 5 à 6h (Berk, 2005).

E1A va libérer le facteur de transcription cellulaire E2F de sa liaison avec la protéine Rb, ce qui va permettre l'autoactivation d'E1A et des autres gènes cellulaires conduisant à la reprise du cycle cellulaire avec le passage du cycle de la phase G0 à la phase S.

Ensuite les protéines E1A et E1B vont activer l'expression des protéines virales nécessaires à la réplication (protéines codées par les régions E2A et E2B). Les produits de la région E3 vont jouer un rôle dans la défense contre le système immunitaire. En empêchant le transport des CMH vers la surface cellulaire, le gène E3 permet l'inhibition de la réponse immunitaire adaptative (Schreiner et al., 2010).

e) Réplication du génome viral

La réplication du génome viral nécessite les produits du gène E2 : la polymérase virale ADN-dépendante, la DBP (DNA binding protein) et le précurseur pTP de la protéine terminale TP. La réplication débute au niveau des ITR présents aux extrémités du génome. La polymérase virale se sert du précurseur pTP comme amorce pour la réplication. L'initiation de la réplication débute par la formation d'une liaison covalente entre un résidu sérine de la pTP et nucléotide désoxycytidine monophosphate (dCMP). La DBP se lie à l'ADN simple brin formant une chaîne de protéines qui entraîne le déroulement de la molécule d'ADN et permet l'élongation. Une fois le premier brin synthétisé, celui-ci va se circulariser grâce à la complémentarité entre les deux ITR et la présence de la TP va permettre la polymérisation du second brin (Hoeben and Uil, 2013) **Figure 7.**

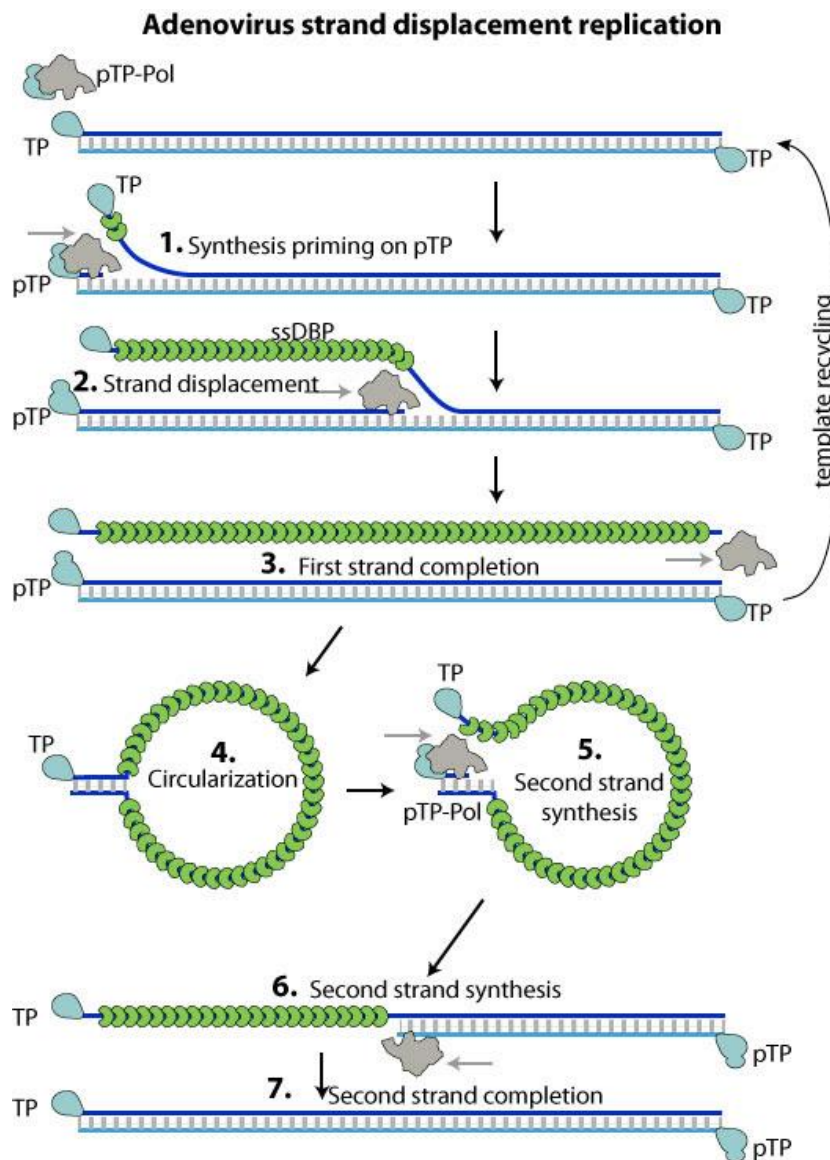


Figure 7. Les différentes étapes de la réplication chez les HAdV (Hoeben and Uil, 2013). 1. Amorçage de la réplication grâce à la pTP. 2 et 3. Elongation grâce à la DBP. 4. Circularisation du brin néosynthétisé. 5 à 7. Synthèse du brin complémentaire.

f) Phase tardive de l'infection et lyse de la cellule infectée

Les régions d'expression tardive sont exprimées. Les protéines de la capside excepté la protéine VI sont produites et sont exportées dans le noyau ainsi que les protéines 100K, 52K, 33K, 22K et la protéase virale. Ces dernières jouent un rôle dans l'assemblage et la maturation de la capside. Les protéines de la capside, en présence de la protéine chaperonne 100K s'assemblent dans le noyau pour former des procapsides dans lequel le génome viral néo-synthétisé va s'incorporer (Perez-Romero et al., 2006; Zhang et al., 2001). La protéase virale va permettre la maturation des capsides par dégradation protéolytique.

Les capsides matures vont par la suite s'accumuler dans le noyau de la cellule infectée. La protéine ADP (Adenovirus Death Protein) protéine codée par la région E3, seule protéine produite de manière tardive durant l'infection va jouer un rôle dans la lyse cellulaire et la libération des nouveaux virions dans le milieu extracellulaire (Tollefson et al., 1996).

5. L'ADN polymérase

a) Famille des ADN polymérases

La réplication du génome d'un organisme est une étape essentielle de sa multiplication et est, de ce fait une cible privilégiée des molécules antivirales. Les ADN polymérases (ADN pol) jouent un rôle dans la maintenance de l'intégrité du génome mais aussi dans la genèse d'une diversité génétique par leur activité de réplication plus ou moins fidèle et leur activité de réparation. Un grand nombre de ces polymérases ont été identifiées, purifiées et caractérisées biochimiquement. Il existe 7 familles d'ADN pol (A, B, C, D, X, Y et RT) classées sur la base des homologies de leur séquence primaire et des analyses de structure en cristallographie (Braithwaite and Ito, 1993; Rothwell and Waksman, 2005).

b) ADN pol de la famille B

La famille peut être divisée en trois sous-classes : les ADN pol cellulaires, les ADN pol bactériennes/virales et les ADN pol « protein priming ». Les ADN pol cellulaires comprennent l'ADN pol α humaine, les polymérases δ et ϵ et l'ADN pol récemment identifiée : ξ . Les ADN pol bactériennes / virales contiennent les ADN pol de plusieurs bactéries, de bactériophages et de virus (tels que ADN pol des herpes virus et virus de la vaccine). La sous-classe « protein priming » comprend les ADN pol des HAdV, et celle des bactériophages $\phi 29$ et RB69. La caractéristique unique de ces polymérases (pol) est qu'elles utilisent toutes une protéine à la place de l'ARN comme amorce. Un alignement des séquences du domaine des pol de la famille B a révélé six régions d'homologie qui ont été désignées de I à VI selon leur degré de similarité, la région I étant la plus conservée et la région VI, la moins conservée (Wang et al. 1989 ; Wong et al. 1988). Récemment, deux autres régions d'homologie ont été décrites, la région VII, identifiée dans l'ADN pol du virus de l'herpès simplex l'ADN pol $\phi 29$; ainsi que le motif XGG (I/Y) , identifié dans l'ADN pol $\phi 29$ (Truniger et al., 1999) et l'ADN pol des HAdV,

Figure 8.

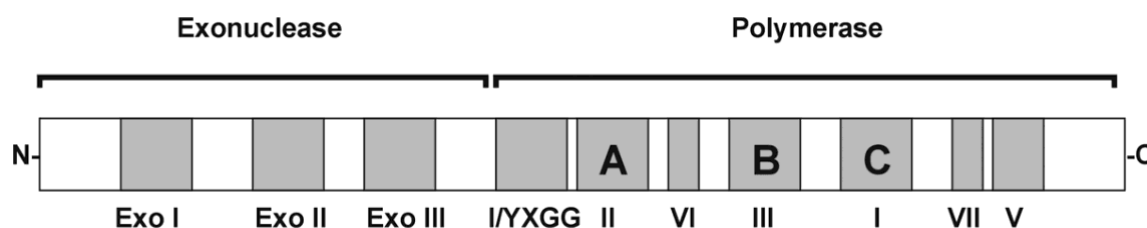


Figure 8. Emplacement des motifs conservés des ADN pol de la famille B. D'après Truniger et al., 1999.

Des études biochimiques approfondies et la mutagenèse dirigée en association avec les données structurales disponibles, ont identifié ces régions comme importantes pour la catalyse, la sélection des nucléotides et la liaison aux substrats.

Par ailleurs, trois motifs hautement conservés, appelés Exo I à III (**Figure 8**), ont été identifiés dans le domaine N-terminal de toutes les pol. Ces motifs comportent l'activité exonuclease (Bernad et al., 1989). Des études de mutagenèse dirigée ont montré qu'ils constituent le site actif exonucléasique et qu'ils jouent un rôle important dans la catalyse et la liaison au substrat.

Les ADN pol du bactériophage RB69, $\phi 29$, et des HSV de type 1, ont été cristallisées (**Figure 9**). Leur architecture générale ressemble à une main droite ouverte, où des sous domaines en N terminal, les « doigts » (fingers) en C terminal, le « pouce » (thumb) encadrent un troisième sous domaine, « la paume » (palm). (Wang et al., 1989 ; Franklin et al., 2001). Cette disposition forme une profonde crevasse le long de laquelle vient se placer l'acide nucléique matrice. Le « pouce » se tourne vers la « paume », entourant et interagissant avec la partie double brin du duplex matrice-amorce, notamment par des contacts avec le petit sillon. L'addition d'un nucléotide triphosphate pour allonger le brin amorce est ensuite catalysée par des ions magnésium, dont la fixation à l'enzyme se fait par des résidus d'acides aspartiques strictement conservés (Delarue et al., 1990) et localisés au creux de la « paume ». Les « doigts » quant à eux, forment deux hélices α qui interagissent avec la partie simple brin de la matrice et participent également à la liaison du nucléotide arrivant. Les ADN pol de la famille B ont également une activité 3'-5' exonuclease contribuant à la fidélité de la réplication en réalisant l'excision des nucléotides incorrectement appariés (Shevelev and Hübscher, 2002).

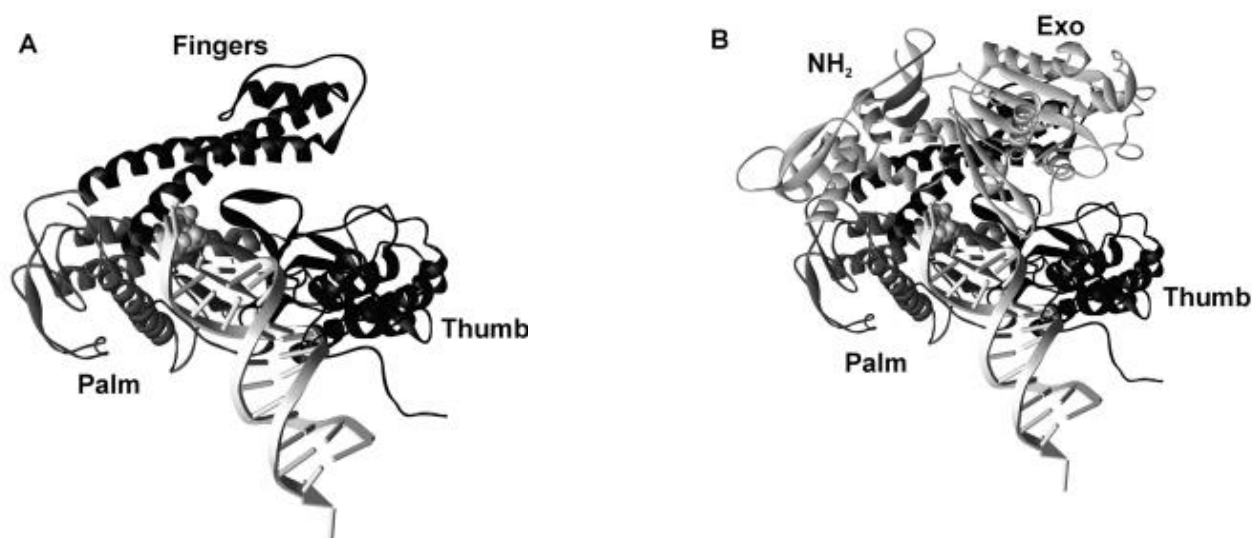


Figure 9. Structure cristalline de l'ADN pol du bactériophage φ29. A. Représentation des différents domaines de l'ADN pol (paume, main et doigts) avec l'ADN matrice localisé au niveau du site actif (représenté par des sphères). B. ADN polymérase en mode « polymérisation », les domaines N-terminal et exonucléase sont représentés. (D'après Berman et al., 2007)

c) L'ADN pol des HAdV

L'ADN pol des HAdV est une protéine de 140 kDa de 1198 aa appartenant à la famille des polymérases B. La structure cristalline des ADN pol des HAdV n'a pas été déterminée, mais les comparaisons de séquences avec des polymérases de structures connues ainsi que des études biochimiques et de mutagenèse ont permis d'établir l'organisation générale des différents domaines de d'ADN pol des HAdV (**figure 10**) (Brenkman et al., 2001, 2002; Joung et al., 1991; Joung and Engler, 1992; Knopf, 1998; Liu et al., 2000, 2003).

Elle présente une structure analogue à celle du bactériophage φ29. Parmi les sous-domaines communs des ADN pol, la paume, les doigts et le pouce, qui sont associés à l'activité de la polymérase, l'ADN pol des HAdV possède un domaine d'exonucléase qui lui est nécessaire pour sa capacité de correction intrinsèque (Brenkman et al., 2002; King et al., 1997; Liu et al., 2003) **Figure 10.**

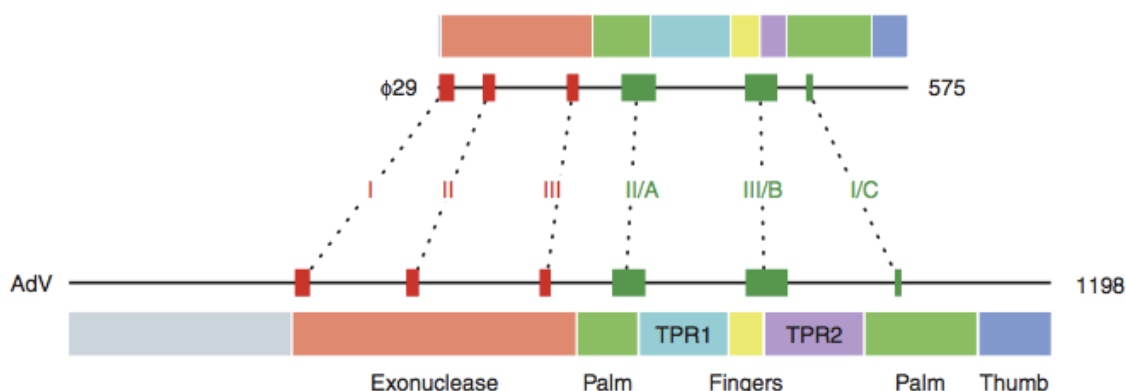


Figure 10. Représentation schématique des différents domaines de l'ADN pol. D'après Hoeben et al, 2013

De plus, les alignements de séquence ont montré que l'ADN pol des HAdV contient certaines insertions, appelées TPR1 et TPR2 (Dufour et al., 2000). Bien qu'aucune information précise ne soit disponible sur les rôles de TPR1 et TPR2 pour les HAdV, les études sur le bactériophage $\phi 29$ ont fourni des informations sur leur fonction.

Elles seraient responsables de la liaison spécifique à l'amorce protéique : la protéine TP (TPR1) et/ou contribuerait au déplacement intrinsèque de la polymérase (TPR2) et/ou à la haute processivité de l'enzyme (TPR1 et TPR2) (Rodríguez et al., 2005).

Un doigt de Zinc putatif a été identifié au domaine NH2-terminal. Il jouerait un rôle indispensable dans la liaison à l'ADN et notamment l'ADN génomique du core des HAdV. (Joung and Engler, 1992).

La partie N-terminale de la pol comporte les trois motifs associés à l'activité exonucléase (Exo-I, II et III). La partie C-terminale contient des motifs conservés impliqués dans l'activité catalytique de l'ADN polymérase. La polymérisation est réalisée par la liaison de deux ions Mg^{2+} à deux résidus acide-aspartique conservés du site actif, D685 et D1014. L'analyse mutationnelle de ces deux résidus a prouvé qu'ils sont critiques pour la catalyse (Liu et al., 2000a). **Figure 11**

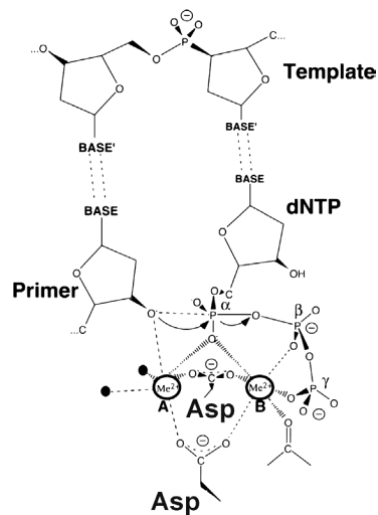


Figure 11. Polymérisation réalisée grâce aux ions Mg^{2+} et aux résidus D685 et D1014. D'après Liu et al, 2003 (Liu et al., 2003).

L'ADN pol des HAdV forme un hétérodimère étroit avec pTP (complexe pTP/pol), cette interaction stable est essentielle pour le processus d'initiation dans lequel l'ADN pol couple de manière covalente le premier résidu dCMP au pTP (Liu et al., 2003). Les études de mutagenèse de l'ADN pol ont démontré que les résidus impliqués dans la liaison de pol au pTP sont largement répartis le long de l'ADN pol. L'ADN pol interagit également avec NFI, mais les résidus de pol qui sont impliqués dans la liaison NFI n'ont pas été clairement établis. Sur la base de l'interaction pTP / pol-NFI, il a été proposé que NFI recrute la pol ou le complexe pTP/pol à l'origine (Liu et al., 2003). **Figure 12**

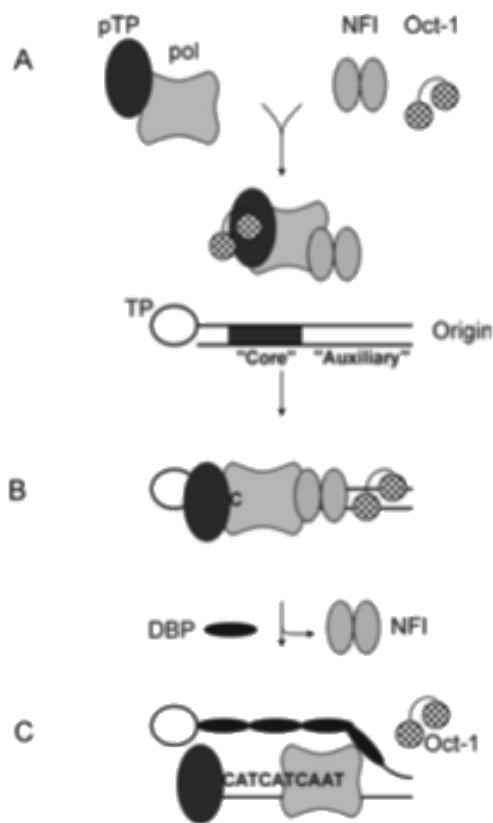


Figure 12. Mécanisme de la réplication des HAdV. D'après De Jong et al, 2003.

a) Polymorphisme

Malgré l'usage et le développement d'inhibiteurs d'ADN polymérase pour le traitement des infections à HAdV, peu de données sont disponibles sur le polymorphisme génétique de l'ADN pol des différentes espèces HAdV. Une seule étude a analysé la variabilité sur une partie du gène codant pour l'ADN pol (Lukashev et al., 2008). Dans cette étude, Lukashev et al, ont voulu analyser la stabilité génétique et les relations phylogénétiques pouvant exister entre 16 HAdV de l'espèce C. Cette analyse s'est focalisée sur les gènes structuraux hexon et fibre, et les gènes E1 et polymérase. Le gène de l'ADN pol n'a été analysé que sur un fragment (nt 7340 à 8466) soit 1/3 de la séquence codante. Les résultats montrent une variation de 1,7% entre les 16 HAdV C étudiés. De plus, sur 49 positions de nucléotides où des substitutions ont été observées, seulement 10 ont entraîné des substitutions d'acides aminés. Les résultats montrent des résultats concordants pour les gènes fibres et hexon, les HAdV de type identique se regroupent au sein du même cluster.

Le groupement phylogénétique de cette région de la polymérase n'était pas conforme à ceux des régions du génome de l'hexon et de la fibre. Les souches de différents types sont

mélangées de manière aléatoire. Dans plusieurs cas, des isolats cliniques de différents types étaient identiques dans la région de la polymérase mais distincts des souches ATCC prototypes, par exemple les souches Ad2 17676 et Ad1 22415, ou les souches Ad6 14555, Ad2 20608 et Ad5 24235. Ces résultats suggèrent que la recombinaison chez les HAdV est un phénomène très fréquent et joue un rôle important dans l'organisation des relations phylogénétiques des génomes des HAdV. La recombinaison intertypique des HAdV C expliquerait le mieux ce phénomène et expliquerait la diversité **Figure 13**.

L'étude de la diversité et du polymorphisme naturel de l'ADN pol est importante pour la compréhension de la susceptibilité des HAdV aux inhibiteurs d'ADN pol et l'interprétation des profils de mutations de souches virales isolées chez des patients traités.

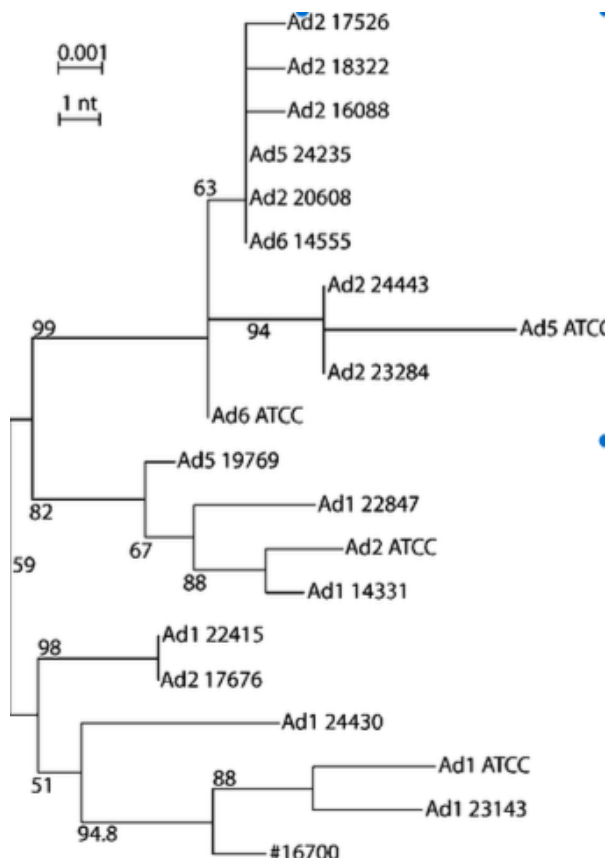


Figure 13. Diversité des ADN polymérases des HAdV C. D'après Lukashev et al (Lukashev et al., 2008)

II. Pathogénie des Adénovirus

A. Transmission

Les HAdV peuvent se transmettre suite à une exposition à des patients infectés, par inhalation d'aérosols, de gouttelettes infectées, par inoculation conjonctivale et par voie féco-orale. De rares cas de transmissions néonatales ont été rapportés. Les nouveau-nés ont été infectés après exposition aux sécrétions cervico-vaginales lors de la délivrance (Montone et al., 1995; Osamura et al., 1993). La possibilité également de transmission liée au greffon a également été évoquée notamment après greffe de rein ou de foie (Koneru et al., 1990).

L'absence d'enveloppe virale confère aux HAdV une résistance dans le milieu extérieur. Ils peuvent persister et garder leurs propriétés infectieuses pendant plusieurs semaines sur des surfaces inertes et devenir des sources de contamination. Ainsi l'eau des piscines, le matériel d'ophtalmologie, des filtres de climatiseurs mal nettoyés peuvent devenir des vecteurs de contamination (Russell et al., 2006). Ils résistent à de nombreux désinfectants, le traitement par des solutions alcooliques (85 à 95% d'éthanol) pendant au minimum 2 minutes, ou bien par du sodium hypochlorite peuvent s'avérer efficaces pour inactiver le virus (Rutala et al., 2006).

B. Épidémiologie

Les infections à HAdV évoluent sur un mode endémique avec des recrudescences pouvant prendre un mode épidémique. Les endémies concernent surtout la population pédiatrique. On les retrouve généralement dans les collectivités d'enfants (crèches, écoles et famille) sous forme de foyers peu extensifs. Les données épidémiologiques montrent que la plupart des primo-infections à HAdV ont durant les 5 premières années de vie due à une faible immunité humorale. Les infections à HAdV sont responsables de plus de 15% des infections respiratoires hautes et d'au moins 5% des maladies respiratoires inflammatoires chez l'enfant. (Hong et al., 2001).

Les HAdV peuvent être responsables d'épidémie d'infections respiratoires fébriles, de fièvres pharyngoconjonctivales, de kératoconjonctivites, de gastroentérites et de diarrhées. La plupart des épidémies ont lieu surtout en hiver, et en début de printemps, même si les infections peuvent se produire tout au long de l'année sans saisonnalité précise (Lynch and

Kajon, 2016). La prévalence des différents types est difficile à évaluer car la plupart des infections à HAdV ne sont pas documentées chez les patients, néanmoins les HAdV les plus fréquemment rapportés sont les types C1, C2, C5, B3, B7, B21, E4 et F41 (Barrero et al., 2012; Lynch et al., 2011; Tabain et al., 2012). Chez les patients immunodéprimés notamment en transplantation, les types les plus fréquents sont les HAdV C1, C2, C5, A12, A31, B3, B11, B16, B34 et B35 avec une forte prédominance de l'espèce C dans la plupart des cas (Al Qurashi et al., 2011; Feghoul et al., 2015). Chez les militaires Américains, ce sont les infections respiratoires à HAdV E4 et B7 que l'on retrouve le plus souvent, ils ont même été associés à des décès (Dudding et al., 1972; Gray et al., 2007).

Des co-infections séquentielles ou concomitantes avec différents HAdV de la même espèce ou d'espèces différentes sont très fréquemment observées à la fois chez le patient immunocompétent et immunodéprimé et peuvent ainsi jouer un rôle dans la génération de recombinauts.

C. Recombinaison

Le phénomène de recombinaison homologue (correspondant à l'échange de matériel génétique entre HAdV) ainsi que les mutations sont des processus évolutifs importants contribuant à la diversité génomique des HAdV (Robinson et al., 2013). Au sein de l'espèce HAdV B, ce sont les mutations qui semblent jouer un rôle important, alors que parmi l'espèce HAdV D, c'est la recombinaison homologue qui est le mécanisme prépondérant (Robinson et al., 2013).

L'HAdV B14p1, résultat de mutations sur la fibre de l'HAdV B14, a été responsable d'une alerte en 2011 suite à plusieurs cas d'infections respiratoires graves. La recombinaison homologue *in vitro* des HAdV tumorigènes a déjà été documentée dans les années 1970 (Takemori, 1972; Walsh et al., 2009). Elle se produit principalement entre les types HAdV appartenant à la même espèce (Robinson et al., 2011). Le séquençage du génome complet a permis la description d'événements de recombinaison au sein des génomes des espèces HAdV A, B et D, en particulier dans les gènes penton base, hexon, fibre et E3 (Lukashev et al., 2008; Robinson et al., 2011b; Walsh et al., 2009).

Pour que la recombinaison puisse se produire, elle nécessite une persistance virale à long terme chez l'hôte ainsi que la présence d'au moins deux HAdV présentant des séquences nucléotidiques très similaires au niveau de point de recombinaison dans leur génome (McCarthy et al., 2009; Vora et al., 2006). L'émergence de nouveaux types d'HAdV de l'espèce D chez les patients atteints du sida est liée à la présence de multiples virus persistants au sein d'un système immunitaire altérée (Curlin et al., 2010; Robinson et al., 2013). Les HAdV D semblent se recombiner plus fréquemment que les autres espèces et plus de 40 HAdV-D proviendraient d'une recombinaison entre les régions hexon fibre et penton (Robinson et al., 2013). Par exemple, l'HAdV D53 résulte de la recombinaison dans les régions penton, hexon et fibre de l'HAdV D22, D37 et D8, respectivement. L'HAdV D56 responsable d'un cas de pneumonie fatale chez un nouveau-né associé à 3 cas de kératoconjonctivite au sein de personnel soignant, serait un recombinant des HAdV D8, 9, 15, 26, 29 et 53. De même, l'HAdV-D67 a été identifié comme un recombinant entre les HAdV-D9, D25, D26, D33 et D46 (Kaneko et al., 2011; Matsushima et al., 2013). Des recombinaisons entre HAdV et d'adénovirus d'origine simienne (SAdV) (Dehghan et al., 2013; Wevers et al., 2011) avec franchissements de barrière d'espèce sont possible. Le TMAdV (Titi Monkey adénovirus) a été identifié en mai 2009, au cours d'une épidémie de pneumonies fulminantes au sein d'une colonie de singes Titi au Centre national de recherches sur les primates de Californie à Davis. Sur les 65 singes logés dans un bâtiment, 23 ont développé des symptômes, y compris une pneumonie, dont 19 en sont morts. Chiu et al, ont analysé des tissus prélevés chez les singes affectés et identifié un nouvelle espèce d'Adénovirus grâce au séquençage haut-débit. Cet Adénovirus avait la particularité de pouvoir se multiplier dans des lignées cellulaire d'origine humaine, suggérant que ce virus pouvait également se transmettre à l'homme. Des investigations auprès du personnel ont permis de mettre en évidence une transmission humaine chez un chercheur en contact proche avec ces singes. Ce chercheur présentait un syndrome grippal sans gravité. Ce virus peut également se transmettre d'homme à homme car il a également été détecté chez un membre de la famille de ce chercheur, celui-ci n'a jamais eu de contact avec les primates et n'a jamais visité le centre.

Un phénomène de recombinaison inter-espèce a également été observé pour l'HAdV E4. L'analyse computationnelle de l'HAdVE4, le seul représentant de l'espèce E, a montré que ce virus serait d'origine zoonotique et a évolué à travers deux événements de recombinaison

inter-espèce. Son génome contient 97% du génome SAdV 26 ainsi que des gènes correspondant aux régions L1 et L2 de l'hexon de l'HAdV B16. Ces gènes auraient permis l'adaptation à l'espèce humaine (Dehghan et al., 2013).

D. Persistance/latence

Certains HAdV sont capables après une infection résolue de persister au sein de l'organisme par différents mécanismes d'échappement au système immunitaire. La latence est définie par l'expression de protéines virales sans réplication complète du virus dans la cellule hôte.

Ces infections persistantes sont sans conséquences cliniques et concernent surtout les HAdV C pouvant persister dans les tissus lymphoïdes pendant des années (Garnett et al., 2002; Neumann et al., 1987). Markel et al, a également montré que Les HAdV A31 et B3 sont également capable de persistance mais dans une moindre mesure que les HAdV C. Les HAdV B3 et A31 ont été impliqués dans des infections à HAdV chez des greffés de cellules souches. Les HAdV B3 ont été responsables d'infections plus graves que infections à HAdV A31, tels que les encéphalites (Feghoul et al., 2015).

Quatre-vingt pour cent des prélèvements d'amygdales d'enfants présentaient de faible quantité d'ADN d'HAdV C dans les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Dans la plupart des cas, le génome des HAdV était retrouvé sous forme non répliquative suggérant que les infections étaient sous forme latente (Garnett et al., 2002). Contrairement à la latence des herpes virus, virus EBV et CMV, la persistance des HAdV C ne dure pas toute la vie, la prévalence des HAdV C dans les amygdales et les cellules lymphoïde décroît avec l'âge (Garnett et al., 2009, 2002; Roy et al., 2011). L'importante prévalence des HAdV C dans les tissus lymphoïdes des jeunes enfants explique ainsi les réactivations d'HAdV C chez les jeunes enfants que chez les adultes en greffe de cellules hématopoïétique (Feghoul et al., 2015a; Lion et al., 2003, 2010). L'HAdV C2 est hautement endémique chez les jeunes enfants (Garnett et al., 2009) Le modèle des infections à HAdV C2 et de latence a été étudié *in vitro* dans les lignées de cellules de lymphocytes T (Markel et al., 2014). Il existe 4 modèles d'infections par les HAdV :

- (1) l'infection lytique aigue, avec production virale à haut titre et lyse cellulaire
- (2) l'infection persistante à HAdV, se manifestant par une production virale mais sans lyse des cellules. Ce schéma d'infection s'accompagne d'une sous-expression du récepteur cellulaire CAR
- (3) l'infection latente qui se traduit par l'absence de production de virus infectieux

(4) le modèle d'infection abortive. Il est intéressant de noter que malgré que les HAdV C2 et C5 sont étroitement apparentés, ils ont été à l'origine de modèles d'infections différentes dans des lignées de lymphocytes T identiques, **tableau 2**.

Les HAdV-C2 semblent plus capables que les autres types d'entraîner des infections latentes expliquant leur prévalence plus importante en greffe de cellules souches hématopoïétique (Markel et al., 2014).

De plus, il a été décrit que des infections latentes à HAdV C pourraient se produire dans les lymphocytes T des cellules épithéliales pulmonaires suggérant un rôle possible dans la pathogénèse des broncho-pneumopathies obstructives (BPCO). L'infection adénovirale persistante serait responsable de la persistance d'une inflammation du parenchyme pulmonaire de l'installation de la BPCO (Hong et al., 2001). De récentes données ont montré que l'ensemble du tractus gastro-intestinal serait un lieu commun pour la persistance des HAdV chez l'enfant (K. Kosulin et al., 2016).

L'échappement au système immunitaire est la condition préalable pour l'établissement d'infections persistantes. Elle serait médiée par différents mécanismes. Des protéines virales spécifiques peuvent bloquer les réponses aux cytokines pro-inflammatoires et cytolytiques, elles peuvent également bloquer l'apoptose cellulaire intrinsèques et l'immunité innée et adaptative (Schneider-Brachert et al., 2006). La protéine virale E3 peut inhiber l'expression des molécules du CMH de classe I, affectant ainsi la présentation de l'antigène et l'attaque des cellules infectées par les lymphocytes T (Lichtenstein et al., 2004; Sester et al., 2010).

	HAdV C		HAdV B		HAdV A
	C2	C5	B3	B11	A31
Jurkat	latence	lytique	latence	lytique	lytique
PM1	latence	persistante	abortive	abortive	latence
CEM	abortive	abortive	abortive	abortive	abortive

Tableau 2. Les différents modèles d'infections à HAdV selon le type et la lignée cellulaire de lymphocytes T.
D'après Markel et al, 2014 (Markel et al., 2014).

E. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques des infections à HAdV sont variées. Elles concernent l'arbre respiratoire, l'œil, le tube digestif, et de façon moins fréquente l'appareil urinaire et le foie. L'HAdV peut atteindre dans de rares cas le pancréas, le myocarde et le système nerveux central. Il a été établi une corrélation entre l'espèce et leur tropisme tissulaire et leurs conséquences cliniques. Les HAdV des espèces B (sous espèce B1), C et E sont responsables principalement d'infections respiratoires, les virus de l'espèce D entraînent majoritairement des infections oculaires, les virus de l'espèce F sont à l'origine de gastro-entérites, et les HAdV de l'espèce B (sous espèce B2) donnent des infections du rein et du tractus urinaire (Russell, 2009). **Figure 1.**

La plupart des infections à HAdV sont sub-cliniques chez l'immunocompétent. Elles entraînent la formation d'anticorps protecteurs contre d'éventuelles réintroductions du même sérotype.

1. Les atteintes respiratoires

Les signes cliniques couramment observés sont le rhume et la toux ; certains patients présentent une amygdalite exsudative et des manifestations systémiques comme de la fièvre, des myalgies et des céphalées. La durée d'incubation varie de 2 à 14 jours et la durée d'infectiosité est concomitante des signes cliniques. Les sérotypes les plus courants sont les C1, C2, C5, C6, et occasionnellement B3. Dans la fièvre pharyngo-conjonctivale (HAdV B3 et E4) la conjonctivite est associée à des signes respiratoires. Les HAdV E4 et B7 peuvent provoquer de véritables épidémies, comme chez les jeunes recrues de l'armée (Zahradnik, 1987). Des atteintes graves telles que les pneumonies peuvent se produire (10 % des pneumonies de l'enfant), plusieurs types ont été mis en cause (type C1, C2, B3, E4, C5, B7, B14, B21, et B35) (Dominguez et al., 2005; Louie et al., 2008), elles peuvent être fatales pouvant atteindre un taux de mortalité de 30% chez l'enfant ou bien être responsables de séquelles respiratoires telles que les bronchiectasies (Hakim and Tleyjeh, 2008). Des complications extra-pulmonaires peuvent se produire de façon exceptionnelle sous forme de méningoencéphalites, hépatites, myocardites, néphrites, neutropénies et CIVD (Similä et al., 1970). Les radiographies pulmonaires dans les pneumonies à HAdV révèlent des infiltrats pulmonaires diffus similaires à ceux observées dans d'autres pneumonies virales. Les

nouveau-nés ou les jeunes enfants présentant une maladie respiratoire sous-jacente sont à haut risque de faire une pneumonie grave à HAdV.

2. Atteintes oculaires

Les conjonctivites à HAdV sont fréquentes, représentant jusqu'à 62% des conjonctivites infectieuses (Sambursky et al., 2007). Elles sont soit isolées, soit associées à un syndrome pharyngé. Il s'agit généralement de conjonctivites folliculaires qui s'accompagnent souvent d'une adénopathie auriculaire apparaissant après 6 à 9 jours d'incubation. Le patient est infectieux durant la période des signes cliniques. Les HAdV les plus souvent impliqués sont les HAdV des espèces D et E, cependant les HAdV des espèces B et C peuvent également être associés à des conjonctivites. Des épidémies de fièvre pharyngoconjonctivale ont été décrites, notamment dans des camps d'été avec des piscines ou bien des lacs (Foy et al., 1968). Les HAdV D8 et D19 et D37 peuvent être responsables de kératoconjonctivites hémorragiques (Nakamura et al., 2012).

3. Atteintes digestives

Les infections à HAdV constituent la troisième cause de gastro-entérite infantile après les rotavirus et les norovirus et sont responsables de 5 à 15% des diarrhées nécessitant une hospitalisation (Uhnnoo et al., 1990). Les HAdV impliqués sont les HAdV entériques 40 et 41 de l'espèce F. Ils ont également été mis en cause dans des cas d'infections nosocomiales (Van et al., 1992). L'HAdV 52, seul sérotype de l'espèce G peut également entraîner des gastroentérites (Jones et al., 2007). La diarrhée est le symptôme majeur. Survenant après une durée d'incubation de 8 à 10 jours, elle persiste pendant environ une à deux semaines. Les autres signes cliniques sont : une fièvre pendant 48 à 72 heures et des vomissements accompagnés parfois de signes respiratoires. L'évolution clinique est généralement bénigne, l'excrétion du virus dure généralement 10 à 14 jours voire plusieurs mois chez les immunodéprimés.

4. Atteinte du tractus génito-urinaire

Les HAdV B11 et B21 ont été associés avec des cystites hémorragiques aiguës chez des enfants immunocompétents (Mufson and Belshe, 1976). Les cystites hémorragiques à HAdV sont généralement plus fréquentes chez les hommes et ne sont pas accompagnés de fièvre ou d'hypertension. Chez les adultes, les HAdV D19 et D37 peuvent être associés à des urétrites (Harnett et al., 1984);(Swenson et al., 1995). Chez les patients immunodéprimés, les HAdV B11, B34 et B35 peuvent être à l'origine de cystites hémorragiques et de néphrites tubulo intersticielle (Akiyama et al., 2001; Hwang et al., 2014).

5. Association entre infection à HAdV et obésité

Une possible association des infections à HAdV D36 avec l'obésité a été évoquée. Une étude transversale réalisée sur 124 enfants aux Etats-Unis a montré une prévalence significativement plus élevée des anticorps dirigés contre l'HAdV D36 chez les enfants obèses (Ponterio and Gnessi, 2015). L'infection à HAdV D36 stimulerait un état inflammatoire via la protéine MCP-1, qui à son tour induirait l'infiltration des macrophages dans les adipocytes. Une inflammation chronique se mettrait ainsi en place et affecterait le métabolisme lipidique (Ponterio and Gnessi, 2015).

6. Système nerveux central

Les méningites et les encéphalites à HAdV sont très rares (Dupuis et al., 2011). Les cas ont surtout été décrits chez des patients immunodéprimés et ont été responsables de décès (Dubberke et al., 2006; Frange et al., 2011). Les méningites à HAdV qui ont été observées de façon occasionnelle chez les patients immunocompétents n'ont pas été associées à des décès. Toutefois des séquelles peuvent être possibles, telles que la surdité unilatérale qui a été observée chez un patient suite à une infection respiratoire à HAdV B3 (Jaffe and Maassab, 1967).

7. Infections à HAdV chez les immunodéprimés

a) Transplantation d'organes

Chez les receveurs d'organes, le site primaire de l'infection à HAdV semble impliquer l'organe transplanté. Ainsi les receveurs de greffe de rein développent plus communément des cystites hémorragiques, se compliquant parfois de néphrites interstitielles (Ito et al., 1991). Les sérotypes en causes sont les HAdV B11, B34 et B35. Le pronostic est généralement bon même si des infections disséminées ont été rapportées (Myerowitz et al., 1975). De façon similaire des hépatites à HAdV post-greffe hépatique notamment en pédiatrie (Michaels et al., 1992) ainsi que des pneumonies à HAdV post-greffe pulmonaires ont été observées (Ohori et al., 1995). Les HAdV ont également été mis en cause dans des cas de rejet de greffe cardiaque ou bien des vasculopathies post-greffe (Shirali et al., 2001).

b) Syndrome d'immunodéficience congénitale

Des infections primaires à HAdV sont souvent fatales chez des enfants à syndrome d'immunodéficience combiné sévère. Chez ce type de patients, ce sont les HAdV A31 et quelques HAdV de l'espèce B et C qui ont été associés à des pneumonies ou hépatites fatales (South et al., 1982).

c) Personnes infectées par le VIH

Les HAdV sont fréquemment présents dans les selles de patients séropositifs sans aucun symptôme. Les HAdV les plus fréquents chez ce type de patient sont les HAdV de l'espèce D. La fréquence augmente avec l'importance de l'immunodépression, et le rôle propre de l'infection à HAdV dans la mortalité est difficile à évaluer, étant donné la grande fréquence des infections opportunistes associées au cours du SIDA, son rôle de cofacteur reste à démontrer (Durepaire et al., 1995; Hierholzer, 1992; Hierholzer et al., 1988). Khoo et al, ont suivi l'excrétion d'HAdV dans les selles, les urines ou la gorge de 63 adultes séropositifs pour le VIH et 9 de leurs partenaires séronégatifs sur une période de 5 à 27 mois de façon prospective, en relevant les manifestations cliniques qui pouvaient être associées. 51 HAdV (49 dans les selles, 1 dans les urines, 1 dans un prélèvement de gorge) chez 18 des 63 patients séropositifs ont été isolés, alors que chez les 9 partenaires séronégatifs, l'HAdV n'a

été retrouvé qu'une seule fois dans un prélèvement de selles au cours d'un syndrome pseudo grippal. L'origine de l'infection la plus fréquente était digestive (17/18 patients) avec principalement des HAdV appartenant à l'espèce D, alors que dans les urinaires les HAdV les plus retrouvés étaient les HAdV B et D. Une excrétion fécale prolongée (range : 2-27 mois) était surtout observée lorsque les lymphocytes T CD4 étaient inférieurs à 150 CD4/mm³. Seul 7 des 17 patients avec de l'HAdV dans les selles ont présenté une diarrhée (n=41%). L'infection à HAdV observée chez la seule partenaire séronégative était due à un HAdV 2. Cette infection était associée à un syndrome pseudo grippal, et l'HAdV 2 n'a pas été retrouvé chez son partenaire séropositif. Il est possible néanmoins que des infections à HAdV chez les patients infectés par le VIH dans les épisodes de diarrhées ainsi que dans d'autres atteintes viscérales soient sous-estimé, car leur recherche est rarement pratiquée. De plus il a été décrit des possibilités de recombinaison dû à des infections simultanées par différents sérotypes notamment entre HAdV de l'espèce D. De nombreux HAdV de l'espèce D ont été identifiés chez les patients atteints du SIDA. Il a été suggéré que l'infection à long terme chez les patients atteints du SIDA et les co-infections avec plusieurs types peuvent donner lieu à des mutations dans une souche ou à une recombinaison (De Jong et al., 1999).

Les HAdV pourraient jouer un rôle dans l'évolution de l'infection VIH notamment par leur rôle de transactivateur de la transcription du génome VIH par les antigènes adénoviraux E1A. Cependant, le rôle aggravant de la coinfection par les HAdV dans l'évolution du SIDA n'est pas clairement établi (Khoo et al., 1995).

d) Greffés de cellules souches hématopoïétique (CSH)

Les infections à HAdV sont associées à une morbidité et à une mortalité élevées chez les receveurs de transplantation de cellules souches hématopoïétiques pédiatriques CSH. La réactivation endogène d'un HAdV latent demeure la principale cause d'infection. (Feghoul et al., 2015; Lion et al., 2003, 2010). En effet, l'absence de saisonnalité des infections ainsi que le fait que la souche détectée en pré-greffe est généralement identique à la souche détectée en post-greffe confirment cette observation. Une étude a montré que la détection d'anticorps neutralisant en pré-greffe dirigés contre un type pourrait prédire une infection à HAdV du même type en période post-greffe (M. J. D. van Tol et al., 2005; Veltrop-Duits et al., 2011).

Les infections à HAdV proviennent principalement du tractus gastro-intestinal (GI) (Lion et al., 2010). Pour caractériser le lieu de persistance, des biopsies digestives provenant de 143 patients pédiatriques non greffés ayant eu une endoscopie du tractus GI, ainsi que des échantillons de selles provenant d'une surveillance de 148 greffés de HSCT pédiatriques ont été analysés par PCR temps réel HAdV. La persistance de HAdV dans le tractus GI a été identifiée chez 31% des enfants. La prévalence d'HAdV la plus élevée a été retrouvée dans l'iléon terminal. L'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie ont identifié une persistance HAdV localisée dans les cellules lymphoïdes de la lamina propria, alors que l'étude de biopsies provenant de 5 enfants transplantés ont montré un nombre important d'HAdV répliquatifs dans les cellules épithéliales intestinales. La persistance HAdV dans le tractus GI est l'origine probable des réactivations à HAdV et des complications infectieuses chez les enfants immunodéprimés. Les lymphocytes intestinaux représentent le réservoir pour la persistance et la réactivation des HAdV alors que l'épithélium intestinal est le principal site de prolifération virale avant la diffusion systémique (K. Kosulin et al., 2016).

Les types les plus fréquemment retrouvés chez les greffés de CSH sont les HAdV C1, C2, C5, A12, A31, B3, B11, B16, B34 et B35 avec une nette prédominance de l'espèce C, notamment l'HAdV C2, du fait de sa plus grande capacité à entraîner des infections latentes que les autres types.

Une étude menée dans un centre de greffe de CSH pédiatrique à Vienne a montré que l'espèce C est responsable de 80% des infections à HAdV (Lion et al., 2010). De façon similaire en Hématologie pédiatrique à l'Hôpital Robert-Debré à Paris, il a été observé dans une étude prospective, que les HAdV C étaient retrouvés dans 56% des virémies à HAdV (Feghoul et al., 2015). Les co-infections à plusieurs types ne sont pas rares (Echavarría, 2008; Feghoul et al., 2015) ce qui favoriseraient les phénomènes de recombinaison et l'émergence de nouveaux types. Les infections à HAdV sont beaucoup plus fréquentes chez l'enfant dont l'incidence varie entre 6 et 42% que chez l'adulte avec une incidence variant de 3 à 15%. Ces infections surviennent souvent dans le premier mois après la greffe de CSH chez l'enfant, alors que chez l'adulte elles sont plus tardives et surviennent deux à trois mois après. Les principaux facteurs de risque de développer une infection à HAdV sont : le jeune âge (Flomenberg et al., 1994), les greffes CSH déplétées en cellules T (Lee et al., 2013), le traitement par un anti-CD52 (Myers et al., 2005) et la présence d'une maladie du greffon contre l'hôte (grade III et IV) ainsi qu'une charge virale dans les selles élevée (Feghoul et al.,

2015a; Lion et al., 2010). Les manifestations cliniques peuvent correspondre à des pneumonies, des hépatites, des cystites hémorragiques, des pancréatites, des colites, des méningo-encéphalites et des infections disséminées d'évolution souvent fatale (Echavarría, 2008).

Différents groupes ont proposé des définitions de l'infection à l'HAdV « localisée et disséminée », ainsi que « maladie à HAdV probable et prouvée / définie, basée sur diverses approches techniques de détection de virus (Lion et al., 2010; Ljungman et al., 2003; Suparno et al., 2004). La détection et la surveillance des infections chez les greffés de CSH étant basées principalement sur la PCR, reconnues comme l'outil de diagnostic standard pour une détection rapide, spécifique, quantitative et hautement sensible de HAdV, la Conférence européenne sur les infections dans les leucémies (ECIL) a récemment recommandé les définitions suivantes (Matthes-Martin et al., 2012) :

- Infection locale à HAdV : PCR positive, isolement du virus ou détection d'antigène dans des matériaux de biopsie ou des fluides autres que le sang périphérique
- Virémie ou infection systémique (invasive) : PCR HAdV positive, isolement du virus ou détection d'antigène dans le sang périphérique
- Infection probable à HAdV : Infection à HAdV avec symptômes et signes cliniques attribués aux infections à HAdV sans confirmation histologique
- Infection prouvée ou maladie à HAdV : Infection à HAdV avec symptômes et signes clinique attribués aux infections à HAdV avec confirmation histologique.

D'autres définitions existent : la maladie intestinale à HAdV définie comme une détection reproductible des HAdV dans les échantillons de selles à des niveaux détectables et quantifiables par PCR en temps réel associée à une entérite, en l'absence d'autres infections ou de maladie de greffon contre l'hôte (GvHD). La maladie disséminée à HAdV a été définie comme une maladie présentant une atteinte de plusieurs organes (hépatite, encéphalite et rétinite) en d'au moins deux PCR positives à HAdV pour le sang périphérique et d'autres sites testés (Liquide céphalo-rachidien, lavage broncho-alvéolaire, sécrétions respiratoires ou urine) et en l'absence d'autres causes identifiées. La mort attribuée à l'HAdV a été définie comme une défaillance d'organes multiples en présence de charges virales à HAdV croissantes ou persistantes dans le sang périphérique associées avec la détection d'HAdV dans plusieurs autres sites (Lion et al., 2010, 2003).

Des recherches post-mortem d'organes qui ont été touchés lors de maladies disséminées à HAdV, tels que le foie, montrent une réplication massive du virus avec une lyse des cellules infectées et une libération importante de particules virales dans le sang périphérique soulignent l'importance de la virémie (Forstmeyer et al., 2008). Dans une étude réalisée à l'hôpital de Vienne, seul 6% des décès en post-transplantation étaient attribués à l'HAdV, alors que les infections disséminées à HAdV avec une virémie importante, lorsqu'elles se produisent chez les enfants greffés, sont responsables d'un taux de mortalité pouvant atteindre les 60% (Lion et al., 2010, 2003; Taniguchi et al., 2012). Chez l'adulte, même si la mortalité est attribuée à l'HAdV dans moins de 1% des cas, une virémie à HAdV est également fréquemment associée à une maladie disséminée avec des taux de mortalité identiques à ceux observés chez les enfants (Ganzenmueller et al., 2011). Un traitement précoce des infections à HAdV avant l'apparition des symptômes de la maladie disséminée s'avère primordial chez ce type de patient.

Chez les receveurs de CSH de adultes, la virémie asymptomatique semble habituelle et fréquente (22%) mais le risque de progression vers une maladie à HAdV en présence d'une virémie à HAdV ainsi que le seuil de charge virale ne sont pas connus (Florescu et al., 2012). Le dépistage systématique de HAdV n'est donc pas recommandé à l'heure actuelle, bien que les infections à HAdV dans ce contexte sont graves et affectent la morbidité, la mortalité et la survie en greffe, en particulier chez les jeunes enfants (Florescu et al., 2012).

Selon les directives ECIL les plus récentes, en autogreffe ou chez les patients ayant une chimiothérapie, la surveillance n'est recommandée qu'en cas de suspicion clinique d'infection ou de maladie HAdV (Matthes-Martin et al., 2012). Pour les receveurs allogreffés de CSH, l'ECIL recommande la surveillance des HAdV uniquement pour les patients présentant au moins l'un des facteurs de risque de la maladie HAdV. Dans ces cas, la surveillance quantitative par PCR du sang périphérique doit être effectuée à des intervalles hebdomadaires ou plus courts jusqu'à ce qu'une reconstitution immunitaire adéquate soit établie (Matthes-Martin et al., 2012).

Les critères ECIL ont établi que la détection d'une virémie à HAdV en présence d'au moins un facteur de risque est actuellement l'indication pour l'initiation d'un traitement antiviral préventif. Les patients concernés sont ainsi les patients atteints de GvHD réfractaire, des receveurs de greffes déplétées en cellules T, les greffes de cordon ombilical et des patients traités par des anticorps anti-CD52. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de

recommandations sur une valeur seuil pour les charges virales qui devraient déclencher l'initiation de l'intervention thérapeutique.

La surveillance moléculaire de la charge virale dans les échantillons de selles pourrait faciliter la détection précoce de la virémie imminente (Feghoul et al., 2015; Jeulin et al., 2011; Lion et al., 2010). En effet, la plupart des patients qui ont une infection HAdV systémique avaient le virus détectable dans les échantillons de selles avec ou sans symptômes cliniques d'entérite, avant le début de la virémie. Étant donné que la réactivation à HAdV débute habituellement d'abord au niveau du tube digestif, la détection de l'ADN HAdV dans les selles pourra permettre d'anticiper la diffusion systémique des HAdV. De plus, les niveaux de charge virale HAdV dans les échantillons de selles semblent être corrélés avec le risque de dissémination sanguine. Dans une analyse sur 138 receveurs de CSH pédiatriques, Lion et al ont montré que l'incidence de la virémie à HAdV chez les individus dont la charge virale dans les échantillons de selles sont supérieures à 1×10^6 copies par gramme était de 73% versus 0% chez les patients ayant des charges HAdV dans les échantillons de selles inférieures à ce seuil (Lion et al., 2010). La sensibilité et la spécificité de la quantification moléculaire des HAdV dans les échantillons de selles pour le diagnostic précoce des virémies HAdV ont été de 100% et 83% respectivement. Dans un autre travail sur 18 patients, Jeulin et al ont trouvé des résultats similaires. Une virémie a eu lieu chez des patients atteints d'une infection digestive HAdV avec des valeurs moyennes supérieures à 5,47 $\log_{10}$ copies / g de selles (Jeulin et al., 2011).

Dans notre série de 73 patients, nous avons constaté que chez les patients avec une excrétion intestinale de HAdV, la charge virale dans les selles était le seul facteur associé à l'apparition d'une infection systémique ($p = 0,001$). Les pics médians de HAdV dans les selles étaient de 7,89 et 2,15 $\log_{10}$ copies / ml respectivement chez les patients atteints d'une infection systémique HAdV et ceux qui n'en présentaient pas ($p < 0,0001$) (Feghoul et al., 2015). Le risque de virémie restait limité pour les charges HAdV dans les selles inférieures à 5 $\log_{10}$ copies / ml. Une analyse de la courbe ROC a montré que la sensibilité et la spécificité d'une infection systémique chez les patients avec excrétion digestive à HAdV étaient respectivement de 93,3% et 62,5% pour les charges dans les selles au-dessus de 5,36 copies $\log_{10}$ / ml (Feghoul et al., 2015). Ces résultats corroborent ceux précédemment publiés.

Au total, ces données suggèrent des liens étroits entre la réplication digestive des HAdV chez les receveurs de CSH et le risque de diffusion systémique, ainsi le risque de virémie à HAdV pourrait être anticipé par une surveillance des HAdV dans les échantillons de selles.

La surveillance moléculaire des HAdV dans les selles pourrait être utilisée pour prévenir la propagation sanguine des HAdV en utilisant une thérapie antivirale pour contrôler et restreindre la réplication au tractus digestif.

III. Traitement des infections à HAdV

Les options thérapeutiques actuelles pour lutter contre les infections à HAdV incluent les médicaments antiviraux et l'immunothérapie adoptive.

A. Immunothérapie adoptive

L'immunothérapie adoptive représente d'une option thérapeutique attrayante, la récupération des lymphocytes T avec une reconstitution des réponses immunitaire anti HAdV permet une élimination efficace des infections à HAdV. La première étape dans le traitement des infections à HAdV chez les greffés de CSH est la réduction du traitement immunosuppresseur utilisé mais cela n'est pas toujours possible notamment lors de maladie de greffon contre l'hôte. Plusieurs stratégies d'immunothérapie adoptive existent, la plus ancienne est la réinjection de lymphocytes du donneur (Donor Lymphocyte Infusion, DLI). La présence potentielle des cellules T alloréactives et les effets secondaires qui en découlent constituent des obstacles majeurs à cette approche. L'immunothérapie adoptive spécifique comprend une étape consistant à éliminer les lymphocytes alloréactifs des cellules du donneur à réinjecter et en conservant intact, en particulier, tout le contingent de cellules anti-infectieuses (déplétion alloréactive en sélectionnant les lymphocytes T anti-infectieux (CTL anti-infectieux). L'isolement des cellules T spécifiques de HAdV à partir du sang périphérique du donneur de CSH original est donc devenu la méthode de choix pour le traitement des infections HAdV chez les receveurs de CSH qui ne répondent pas à la chimiothérapie antivirale. La génération des CTL anti-HAdV consiste à une production *in vitro* de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à partir des cellules du donneur qui seront ensuite injectées au patient. Il existe différentes approches de génération de CTL anti-HAdV. Indépendamment des espèces HAdV auxquelles le donneur a été exposé, les lymphocytes T réactifs devraient être réactifs avec tous les types HAdV, car l'hexon, constituant principal de

la capside virale, cible des cellules T, contient plusieurs épitopes conservés parmi les espèces des HAdV. L'une des premières tentatives réussies de transfert adoptif de cellules T était basée sur l'isolement des cellules mononucléaires dérivées par un donneur, leur stimulation *ex vivo* avec l'antigène HAdV et la séparation magnétique des lymphocytes T réactifs qui sécrétaient l'IFN, ce qui comprenait les cellules T CD4 et les cellules T CD8. Les cellules ont été injectées sans expansion supplémentaire *in vitro*, et les résultats ont montré que l'efficacité de ce traitement ne dépendait pas de la dose de cellules injectées, car même à partir d'un petit nombre de cellules T injectées, celles-ci peuvent facilement se développer *in vivo* en présence constante de l'antigène viral HAdV (Aïssi-Rothé et al., 2010).

Quelques cas de traitement par des DLI ou CTL anti HAdV ont été décrits dans la littérature. Hromas et al., ont rapporté le cas d'un patient présentant une cystite hémorragique liée à HAdV qui a été traitée avec succès suite une injection de 1×10^6 CD3/kg de CTL anti-HAdV (Hromas et al., 1994). Chakrabarti et al, ont décrit le cas de deux patients ayant nécessité une injection de DLI (3×10^7 CD3/kg et 1×10^7 CD3/kg) pour une rechute de leur hémopathie. L'administration des DLI a permis la résolution des infections à HAdV (Chakrabarti et al., 2000). Bordigoni et al., ont rapporté les effets de l'injection de DLI provenant de donneurs HLA non apparentés associées ou non à un traitement antiviral anti-HAdV (vidarabine, cidofovir ou ribavirine) chez 3 receveurs d'allogreffe de CSH (Bordigoni et al., 2001). Deux patients sur 3 ont résolu leur infection à l'HAdV alors que le 3ème patient est décédé de son infection à HAdV.

Feuchtinger et al, a décrit le succès du transfert de CTL anti- HAdV chez cinq des six patients traités, documenté par une expansion dose-indépendante et soutenue *in vivo* de cellules T spécifiques de HAdV, associée à une clairance et une diminution durable de la charge virale. La perfusion de cellules T a été bien tolérée chez les six patients, à l'exception d'un cas de maladie de greffe contre hôte de la peau (stade II) (Feuchtinger et al., 2006).

Néanmoins la réponse clinique au traitement par CTL anti HAdV est liée à une administration précoce au cours de l'infection, avant l'apparition de symptômes de la maladie à HAdV (Pagliara and Savoldo, 2012). Malgré les progrès récents, les contraintes pour leur production et le retard pour leur obtention restent des préoccupations majeures pour généraliser leur utilisation. De plus cette technique demeure limitée aux greffes de CSH de donneurs apparentés, elle n'est pas applicable aux greffes de sang de cordon, aux transplantations d'organes solides de donneurs cadavériques et tous les cas où le donneur

de sang n'est pas disponible. Les injections de lymphocytes de donneurs allogéniques de tierces personnes de représentent une solution alternative particulièrement importante (Eiz-Vesper et al., 2012).

Les cellules T spécifiques de virus (VST) sont produites soit à partir du donneur de CSH soit à partir d'un donneur tierce haploidentique, par culture cellulaire pendant 2 à 8 semaines, puis isolées par sélection immunomagnétique des cellules T sécrétrices d'IFN- γ en moins de 48 h (Creidy et al., 2016; Qasim et al., 2013). L'immunothérapie adoptive par les VST a été reportée comme étant réalisable et efficace pour la prophylaxie et le traitement de l'EBV (Icheva et al., 2013; Moosmann et al., 2010), CMV (Feuchtinger et al., 2010), HAdV (Creidy et al., 2016; Qasim et al., 2013) et récemment des infections à BKV (Pello et al., 2017). Feuchtinger et al, a rapporté deux études où les VST dirigés contre les HAdV (HAdV VST) combinés à de l'IFN- γ ont été donnés chez des patients atteints d'une infection/maladie à HAdV chimio-réfractaire chez des greffés de CSH non apparentés (Feucht et al., 2015; Feuchtinger et al., 2006). L'injection d'une faible dose d'HAdV VST a permis un contrôle viral et une reconstitution immunitaire spécifique sans toxicité aiguë ou GVH.

Récemment des premiers résultats concernant une étude multicentrique phase I/II sur l'utilisation d'HAdV VST après HSCT en cas d'infection ou de maladie à HAdV réfractaire aux antiviraux. Des cellules T spécifiques d'HAdV ont été générées soit à partir d'un donneur tierce haploidentique. Les HAdV VST ont été injectés chez 14 patients ayant reçu une greffe de sang de cordon. Une reconstitution immunitaire Anti-HAdV spécifique a été observée chez tous les patients, ainsi qu'une clairance virale charge virale dans tous les cas sauf un patient. (Qian et al., 2017). Les HAdV VST s'avèrent être une option thérapeutique efficace, notamment chez les greffés de sang de cordon et toutes les greffes de donneurs non apparentés.

B. Antiviraux

Le traitement est généralement réservé aux infections graves chez les patients immunodéprimés. A ce jour, aucun antiviral n'a d'AMM et aucune étude thérapeutique randomisée n'a été réalisée. Néanmoins, certaines molécules telles que la ribavirine et le cidofovir possèdent une activité *in vitro* contre différents types (Morfin et al., 2005; Naesens et al., 2005).

1. La Ribavirine

La ribavirine est un analogue nucléosidique de la purine. Il présente un large spectre mais a été le plus utilisé pour le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C en association avec l'IFN alpha. Il a été également utilisé en monothérapie pour traiter les cas grave d'infection par le virus syncytial respiratoire. Elle nécessite pour exercer son action antivirale une triphosphorylation. La première phosphorylation doit être réalisée par une kinase spécifique virale limitant l'activité de cette molécule aux virus possédant une kinase (Thomas et al., 2012).

Le mécanisme d'action de la ribavirine a été longuement étudié pendant des décennies sans qu'il ne soit clairement établi. La plupart des études ont été réalisées sur l'hépatite C (VHC). Peu de temps après sa découverte en 1972, il a été suggéré que l'activité antivirale de ce médicament serait obtenue par l'inhibition de la protéine cellulaire inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) qui entrainerait une diminution de la guanosine triphosphate intracellulaire (GTP), nécessaire pour la réplication virale (Zhou et al., 2003). D'autres études ont suggéré que l'activité antivirale de la ribavirine peut être liée à sa capacité à inhiber la polymérase virale. L'inhibition directe des polymérases virales de la ribavirine en tant que terminateur de chaîne, a été montrée pour le virus de la stomatite vésiculeuse, le réovirus, le virus de la grippe et le virus de l'hépatite C (Fernandez-Larsson et al., 1989; Maag et al., 2001). Puisque la ribavirine est particulièrement efficace lorsqu'elle est administrée avec de l'interféron, elle pourrait avoir une certaine activité de potentialisation de l'interféron. Des analyses d'expression génique effectuées sur des biopsies de foie de patients traités par interféron avec ou sans ribavirine ont montré que les taux de certains gènes stimulés par l'interféron (ISG) étaient plus élevés chez les patients traités à la fois avec l'interféron et la ribavirine. La ribavirine aurait un rôle dans l'induction des gènes stimulés par l'interféron (Feld et al., 2007).

Ces dernières années, le mécanisme d'action de la ribavirine le plus reconnu serait la mutagenèse létale. L'augmentation du taux d'erreur et l'accumulation de mutations sur le génome contribueraient à une diminution significative de la charge virale (Lutchman et al., 2007). Plus récemment, différentes équipes de recherche ont suggéré que la ribavirine peut jouer un rôle immunomodulateur, en particulier sur les réponses immunitaires adaptatives.

Il peut agir comme inducteur de la réponse cytokine helper-T-cell type 1 (Th1), mais aussi comme un inhibiteur la réponse de type 2 (Th2) (Ning et al., 1998).

Allen et al. et Sidwell et al. ont été les premiers à montrer l'inhibition de l'effet cytopathique des HAdV 3 par la ribavirine (Allen et al., 1978; Sidwell et al., 1972). L'efficacité a été confirmée pour l'HAdV 5 (EC50 : 1,7 µg / ml) et l'HAdV 2 (EC50: 20 µg / ml) (Kirsi et al., 1983).

La ribavirine possède une activité *in vitro* variant selon les espèces. Morfin et al, ont montré sur une étude réalisée sur des souches de laboratoire, seuls les HAdV de l'espèce C étaient sensibles à la ribavirine. La sensibilité des HAdV A (type 12 et 31), des HAdV B (type 3, 7, 11 et 14), des HAdV C (type 1, 2, 5 et 6), des HAdV D (type 9), des HAdV E (type 4) et des HAdV F (type 41) ont été évalués (Morfin et al., 2005). Les résultats sont différents sur des souches d'origine clinique. En effet, Morfin et al (Morfin et al., 2009) a montré que tous les HAdV de l'espèce C testés (n=79/79), mais 75% des HAdV de l'espèce A (n=24/32), 33,3% des HAdV de l'espèce B (n=2/6) et tous les HAdV de l'espèce D (n=3/3) se sont révélés sensibles à la ribavirine. La ribavirine a donc des effets variables sur les HAdV de l'espèce A, B et D d'origine clinique.

Concernant l'efficacité *in vivo* de la ribavirine, les données sont contradictoires. L'activité *in vivo*, a été étudiée sur des modèles de hamsters Syrien immunodéprimés présentant une infection à HAdV C disséminée. Ces animaux ont l'avantage d'être permissifs aux infections à HAdV et de développer des symptômes similaires aux humains. Alors que le cidofovir et le brincidofovir ont diminué de façon significative la réplication virale, la ribavirine n'a pas montré d'effet (Tollefson et al., 2014). Ces données appuient l'intérêt de l'utilisation du cidofovir et du brincidofovir dans les infections à HAdV chez l'homme. L'efficacité de la ribavirine dans le traitement des infections demeure controversée. Dans les études cliniques de Miyamura et al. (Miyamura et al., 2000) et La Rosa et al. (La Rosa et al., 2001), la ribavirine semble plutôt inefficace contre les maladies à HAdV. Alors que la ribavirine aurait permis de traiter avec succès des cystites hémorragiques, des pneumonies et des entérites chez des patients greffés de CSH (Arav-Boger et al., 2000; Cassano, 1991; Lenaerts et al., 2008; Yoon et al., 2017). De plus, l'utilisation de la ribavirine est associée au risque d'anémie hémolytique limitant son utilisation en greffe de CSH.

2. Les inhibiteurs de l'ADN polymérase

a) Le ganciclovir

GCV est un analogue acyclique de la guanosine qui est principalement utilisé pour lutter contre les infections à virus herpétique (Evans et al., 2013). Dans le cas des cellules infectées par l'herpès simplex virus (HSV) ou par le cytomégalovirus humain (CMV), le GCV est d'abord converti en monophosphate de GCV (GCV-P) par une thymidine kinase codée par un génome viral (TK) pour l'HSV ou une protéine kinase (UL97) pour le CMV, puis les enzymes cellulaires phosphorylent le GCV-P en triphosphate de GCV (GCV-PPP). C'est cette forme de triphosphate du médicament qui va inhiber la réplication de l'ADN viral, en agissant comme un inhibiteur compétitif sélectif et substrat de l'ADN polymérase virale (Pol) (Matthews and Boehme, 1988). La première étape, la phosphorylation par une kinase virale, est le principal facteur de sélectivité du ganciclovir, dans la mesure où les kinases cellulaires ont une faible affinité pour la GCV.

Le génome de l'HAdV n'est pas connu pour coder pour une kinase donc par conséquent, on ne s'attend pas à ce que l'HAdV soit susceptible au GCV. Néanmoins, des études sur l'efficacité *in vitro* du GCV sur les HAdV ont montré que le GCV avait la capacité d'inhiber la réplication *in vitro* de plusieurs types notamment les types avec un tropisme oculaire. Les CE50 rapportées s'étendaient de 26 à 206 μM , en fonction du type d'HAdV, de la ligne cellulaire utilisée et de la méthode d'évaluation (Trousdale et al., 1994). Le mécanisme d'action ne semble pas clair, mais certaines données suggèrent que le ganciclovir pourrait inhiber de façon directe la pol (Ying et al., 2014a). De plus, il a été rapporté que le traitement prophylactique des patients transplantés pour prévenir l'infection à CMV pourrait diminuer l'incidence des infections à HAdV (Avivi et al., 2004; Bruno et al., 2003). Certaines publications ont montré que l'utilisation du GCV chez les patients transplantés pourrait être efficace (Chen et al., 1997; Duggan et al., 1997). Le GCV peut également être utilisé contre les infections oculaires à HAdV (Yabiku et al., 2011). L'activité *in vivo* du GCV a été évalué chez des Hamsters Syrien, il a été montré que le GCV a inhibé de façon significative la réplication des HAdV 5 et notamment la synthèse d'ADN et l'expression des gènes tardifs (Ying et al., 2014).

b) Le cidofovir

Le Cidofovir (CDV) est un analogue nucléotidique, il possède un groupe phosphonate lié à la partie acyclique grâce à une liaison phosphonate. Les analogues nucléotidiques doivent subir deux phosphorylations par des kinases cellulaires pour être actifs sous forme triphosphate. Ils ne dépendent pas de kinases cellulaires pour être actifs sous forme triphosphate, ni de kinases virales pour exercer leur action antivirale ciblant l'ADN pol ; **Figure 14**.

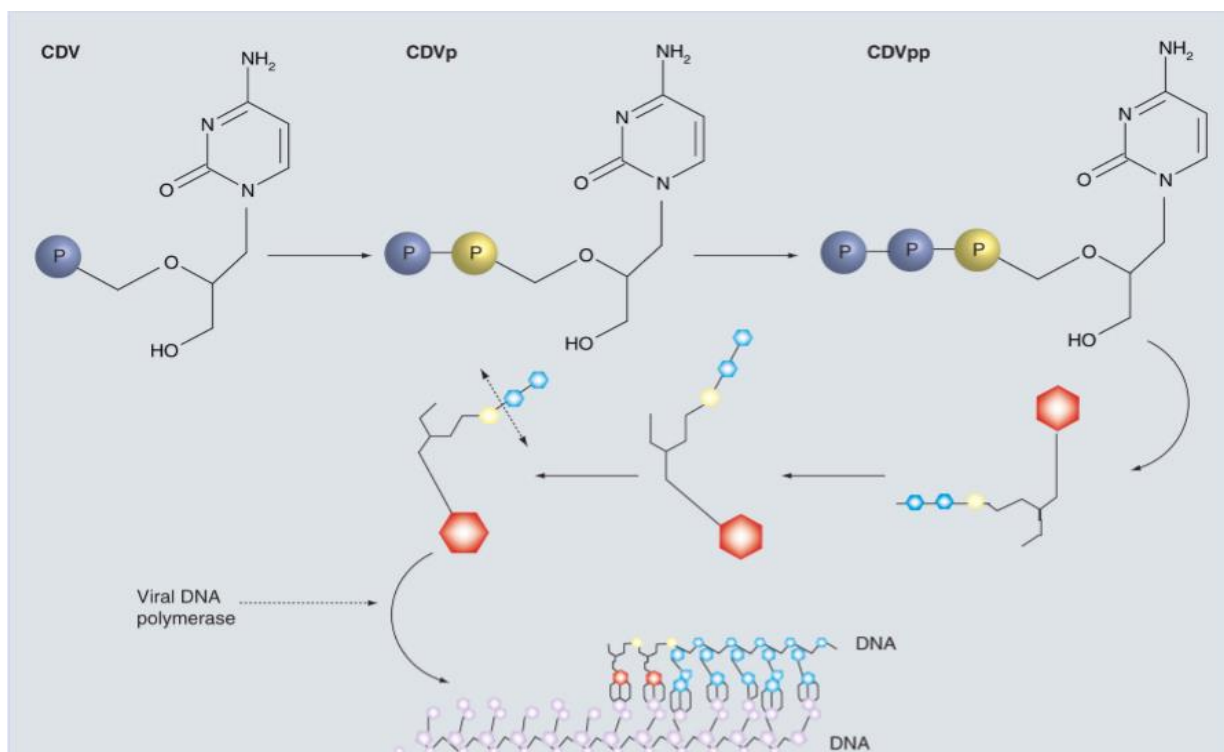


Figure 14. Mécanisme d'action de CDV dans une cellule infectée par l'HAdV. D'après Parker et al, 2008 (Parker et al., 2008). Après son incorporation dans la cellule hôte infectée par l'HAdV, le CDV subit 2 étapes de phosphorylation, via des kinases cellulaires, afin de former un métabolite actif, le CDV diphosphate (CDVpp). Le CDVpp est un analogue nucléotidique et agit comme un inhibiteur compétitif et un substrat alternatif pour l'ADN polymérase. Il s'incorpore dans le brin en formation de l'ADN de l'HAdV et bloque la synthèse de l'ADN viral.

Le CDV (Vistide ®) est un composé acyclique analogue de la désoxycytidine monophosphate qui porte un groupement phosphonate (**figure 14**). Après pénétration dans la cellule par endocytose, deux phosphorylations catalysées par la pyrimidine nucléoside monophosphate kinase puis la nucléoside diphosphate kinase, la pyruvate kinase ou créatine kinase (Cihlar and Chen, 1996). Ces deux étapes de phosphorylation peuvent se faire aussi bien dans des cellules infectées que dans des cellules non infectées. Le CDV diphosphate (CDV PP) agit

alors comme terminateur de chaîne en s'incorporant en 3' de l'ADN viral en formation, en complément du dGMP dans le brin complémentaire. L'activité sélective du CDV PP s'explique par une plus grande affinité pour les polymérases virales que pour les polymérases cellulaires. Le CDV possède une longue durée d'action, due à une demi-vie intracellulaire de ses métabolites très longue, variant de 17 à 63 heures. Ceci permet une administration hebdomadaire ou bimensuelle (Ho et al., 1992). Le CDV a été utilisé avec succès dans le traitement de la rétinite au CMV, il s'agit de la seule indication de cette molécule (De Clercq, 1996). Les effets secondaires sont principalement rénaux et peuvent être très sévères. Néanmoins, les atteintes sont réversibles et l'arrêt du CDV peut suffire à retrouver une fonction rénale normale. Les atteintes rénales peuvent être prévenues par l'utilisation de probénécide (qui augmente l'excrétion de l'acide urique) ainsi que par une hydratation saline.

La pénétration cellulaire du CDV PP est lente et faible du fait du groupement phosphonate chargé négativement.

Le cidofovir demeure actuellement la molécule qui est la plus utilisée lors d'infections à HAdV en greffe de CSH. Cette molécule est active *in vitro* contre de nombreux types et notamment ceux rencontrés en greffe de CSH. L'activité *in vitro* anti-HAdV du CDV a été évaluée dans plusieurs études. Ce composé s'est révélé être un inhibiteur puissant et sélectif des HAdV de toutes les espèces (Morfin et al., 2005). En général, les valeurs EC50 rapportées du CDV contre les HAdV vont de 0,8 à 17 µg / ml (de Oliveira et al., 1996; Gordon et al., 1991; Kaneko et al., 2001; Kodama et al., 1996; Naesens et al., 2005). Concernant l'activité *in vivo* du CDV, bien qu'aucun essai contrôlé par placebo et randomisé n'ait été mené, plusieurs cas décrivant l'utilisation du CDV en greffe de CSH ont été rapportés. Néanmoins, l'interprétation et la comparaison des différentes études sont entravées par le contexte hétérogène des patients (c'est-à-dire les patients pédiatriques versus adultes, type de greffe), différences dans les doses de CDV utilisées, définitions de la maladie à HAdV et dans la prise en charge et le diagnostic de ces virus (Lenaerts and Naesens, 2006). Les résultats sont variables, avec une efficacité variant de 24 à 98% (Bhadri et al., 2009; Ljungman et al., 2003; Robin et al., 2007; Yusuf et al., 2006). L'efficacité du CDV semble limitée lorsque la maladie à HAdV est bien établie. Le taux de réussite est plus élevé lorsque le traitement est initié tôt dans le diagnostic de l'infection à HAdV et avant qu'elle ne progresse en maladie et infection disséminée à HAdV. Cela implique une surveillance poussée des infections à HAdV

par des techniques sensibles chez les patients à risque. L'utilisation du CDV en préemptif pourrait également avoir son intérêt (Caroline A Lindemans et al., 2010; Lion et al., 2010; Matthes-Martin et al., 2012).

Le statut immunitaire du patient est à prendre en compte lors du traitement. Dans plusieurs études rétrospectives, l'échec du traitement anti-adénovirus a été observé chez des patients fortement immunodéprimés qui avaient reçu une greffe appauvrie en cellules T ou qui souffraient d'une GVH grave. À l'inverse, il existe une forte corrélation entre l'efficacité du traitement des maladies à HAdV et le rétablissement immunologique, obtenu par réduction ou retrait du traitement immunosuppresseur (Chakrabarti et al., 2002; M J D van Tol et al., 2005). Dans une étude, l'effet antiviral du CDV en fonction de la reconstitution des cellules T a été étudié. La dynamique de la charge virale à HAdV était liée à la reconstitution des cellules T et natural killer (NK). Dans les cas de reconstitution des lymphocytes T, une réduction rapide de la charge HAdV (n = 14) ou une stabilisation (n = 6) a été observée dans 20 sur 22 traitements. L'effet du CDV a été évalué sur 20 épisodes de traitement chez des patients n'ayant pas eu de reconstitution simultanée des lymphocytes T. La réduction de la charge virale HAdV (n = 7) ou la stabilisation (n = 8) a été observée dans 15 des 20 traitements. Bien que la réduction de la charge HAdV soit toujours accompagnée d'une expansion des cellules NK, la stabilisation de la charge HAdV a été mesurée chez 2 enfants qui n'ont pas eu de reconstitution de cellules T et NK. Ainsi, bien que la contribution des cellules NK ne puisse pas être exclue, le CDV a un potentiel sur la stabilisation de la charge HAdV en attendant la reconstitution des lymphocytes T (Lugthart et al., 2015).

Il existe plusieurs schémas de traitement pour le CDV, il est généralement utilisé en induction, à une dose de 5mg/kg par semaine pendant deux semaines (Matthes-Martin et al., 2012). La dose d'1mg/kg trois fois par semaine a également été suggérée (Caroline A Lindemans et al., 2010). La durée de traitement dépend de la clinique et de la diminution de la charge virale.

Le traitement par des infections à HAdV par CDV possède des limites. Notamment d'un point de vue pharmacologique, par sa faible biodisponibilité et une faible corrélation des effets pharmacologiques avec la dose prescrite. De plus la distribution tissulaire est très faible notamment dans le tube digestif, d'où proviennent les réactivations à HAdV (Cundy, 1999).

c) Le Brincidofovir

Le Brincidofovir (CMX001) (1-O-hexadécyloxypropyl-cidofovir) molécule mise au point par la société Chimerix[®] (Durham, USA), est un conjugué lipidique du CDV qui a une activité antivirale contre les HAdV, tous les herpesvirus humains, le virus BK et le poxvirus. Grâce au conjugué lipidique, le BCV possède des propriétés pharmacocinétiques intéressantes avec des concentrations tissulaires et intracellulaires élevées, augmentant ainsi l'efficacité antivirale. Après administration chez la souris, des concentrations élevées ont été retrouvées dans le tractus gastro intestinal (Quenelle et al., 2010). Après pénétration du BCV dans les cellules cibles, le CDV est libéré et ensuite phosphorylé en métabolite actif par des kinases intracellulaires : le CDV PP. La conjugaison lipidique permet une concentration intracellulaire de CDV-PP 100 fois plus élevée qu'avec le CDV. L'activité anti-HAdV *in vitro* du BCV est environ 65 fois plus importante que le CDV (Aldern et al., 2003). Des études en culture cellulaire montrent que le BCV inhibe la réplication de multiples sérotypes HAdV, avec des EC50 autour des 0,02 µM. **Figure 15.**

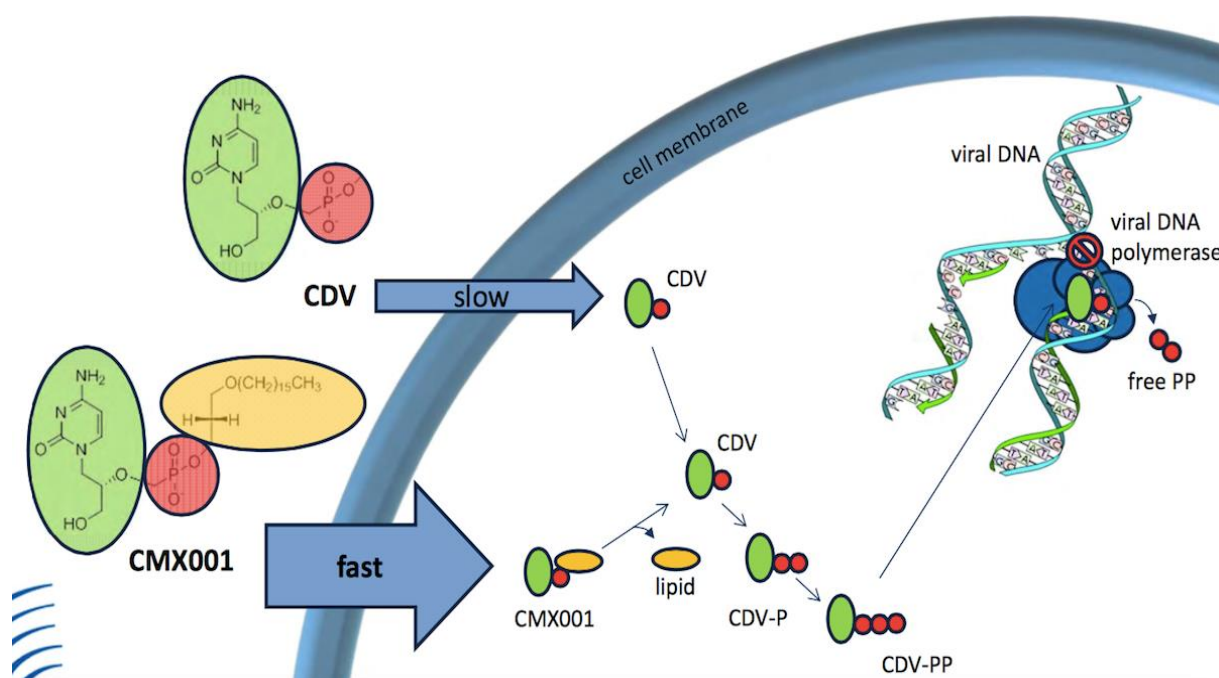


Figure 15. Mécanisme d'action du Cidofovir et du Brincidofovir (CMX001). En rouge : Le Phosphate, en jaune : conjugué lipidique, en vert : CDV ou BCV d'après Chimerix[®].

L'activité antivirale du BCV a été caractérisée *in vitro* dans des systèmes de culture cellulaire et *in vivo* dans des modèles animaux. Des études réalisées *in vitro* ont montré que le BCV est efficace contre plusieurs types (types 3, 5, 7, 8 et 31). La CI50 du BCV pour l'HAdV 5 est

inférieure à 0,02 μM (range : 0,39 – 0,28 μM) versus 1,3 μM pour le CDV (Hartline et al., 2005). Le BCV s'administre par voie orale et l'absorption est rapide avec des concentrations maximales plasmatiques observées 2 à 3 heures post-dose (Painter and Hostetler, 2004). Le métabolisme est principalement hépatique. La demi-vie est longue ($t_{1/2}$ = 6,5 jours) permettant une administration deux fois par semaine à 2-3 mg / kg. Le BCV n'entraîne pas de néphrotoxicité et contrairement au CDV, il n'est pas un substrat de l'hOAT-1 et donc il a peu de risque de néphrotoxicité médiée par l'OAT (Tippin et al., 2016).

Des résultats prometteurs quant à son efficacité clinique des patients adultes et pédiatriques greffés de CSH atteints de la maladie d'HAdV ont été montrés (Florescu et al., 2012; Paolino et al., 2011a).

Le premier cas d'éradication réussie de l'infection à HAdV disséminée par BCV chez un greffé de CSH pédiatrique sévèrement immunodéprimé suite à l'absence de réponse au CDV a été rapporté en 2011 (Paolino et al., 2011). L'HAdV a été détecté 89 jours après la transplantation, avec une augmentation continue de la charge virale HAdV malgré l'administration de cidofovir par voie intraveineuse à J92 et à J132 après la transplantation. Le traitement par BCV a été initié à J133 après la transplantation. L'HAdV est devenu indétectable à J159 après la transplantation, après la 6^{ème} dose de BCV.

Une autre étude a rapporté l'utilisation du BCV sur 13 personnes (huit enfants et cinq adultes) présentant une maladie à HAdV ou une virémie à HAdV. Tous les patients avaient déjà reçu au préalable du CDV. La variation médiane du taux de charge virale, suite au traitement par CDV était de 0,08 $\log_{10}$ copies / ml versus -2,71 $\log_{10}$ copies / ml (p = 0,001) suite au traitement par BCV. Huit patients (61,5%) ont eu une diminution $\geq 1 \log_{10}$ de la charge HAdV seulement après la première semaine de traitement et 9 patients (69,2%) ont une réponse virologique (définie par une diminution de la charge virale de 99% dans le sang) avec une médiane de délai de 7 jours (range : 3-35 jours) pour obtenir une réponse virologique. Aucun événement indésirable grave y compris la toxicité rénale, gastro-intestinale ou de moelle osseuse, n'a été attribué au BCV pendant le traitement (Florescu et al., 2012).

L'essai phase II HALT, essai contrôlé, en double aveugle a évalué le BCV versus placebo dans la prévention des maladies à HAdV chez les patients greffés de CSH virémiques non

symptomatiques. Quarante-huit patients adultes ont été inclus dans l'essai. Trois groupes ont été constitués : un groupe recevant le BCV une fois par semaine (QW) soit 100 mg (n=16 patients) et un groupe recevant le BCV deux fois par semaine (BIW) soit 200 mg (n=14 patients) et un groupe, le placebo (n=18 patients). L'attribution du BCV a été réalisée en double aveugle. Le critère d'évaluation principal était la proportion de sujets présentant un échec du traitement, soit une progression vers une maladie à HAdV, soit une augmentation de la virémie HAdV confirmée ($\geq 1 \log_{10}$ copies / mL) pendant le traitement. La proportion de sujets en échec de traitement dans le groupe BIW était de 21%, 38% dans le groupe QW et 33% dans le groupe placebo. La mortalité était plus faible dans les groupes BIW (14%) et QW (31%) par rapport au groupe placebo (39%), mais ces différences n'étaient pas statistiquement significatives. Après 1 semaine de traitement, 8 des 12 sujets (67%) dans le groupe BIW avaient une virémie HAdV indétectable, 4 des 14 patients (29%) dans le groupe QW et 5 des 15 patients (33%) dans le groupe placebo. Un arrêt du traitement en raison des effets secondaires était plus fréquent chez les sujets traités par le BCV que chez le placebo. La diarrhée était l'effet indésirable plus fréquent dans tous les groupes (57% pour le groupe BIW, 38% pour le groupe QW, 28% pour le groupe placebo) et cela a entraîné l'arrêt du traitement chez 1 sujet du groupe Q. En dépit d'une diminution significative de la charge virale HAdV, aucun impact significatif dans la prévention de la maladie à HAdV n'a été observée chez les patients traités par BCV. Ce résultat souligne l'importance de traiter les patients à haut risque de faire une maladie à HAdV de façon précoce avant l'installation de la virémie à HAdV (Grimley et al., 2017).

d) Résistance aux inhibiteurs d'ADN polymérase

Le risque de sélection de virus résistants au traitement existe, en particulier chez des patients immunodéprimés qui présentent des charges virales élevées et persistantes.

Des premières données concernant la résistance des HAdV ont été observées avec le CDV. En présence de concentrations croissantes de CDV, 6 mutants HAdV de type 5 résistants ont été sélectionnés au total in vitro : R1 à R6. La souche parentale est la souche C5 de laboratoire : C5 ATCC. Des mutations ont été identifiées dans l'ADN pol. Les mutations F882L/S1183R ; pour les variants R1, R2 et R3 ; V303I, F882L pour le variant R4 ; A501E pour le variant R5 et A501E et L677F pour le variant R6 (Paul R. Kinchington et al., 2002) **Tableau**

3.

La société Chimerix a rapporté l'émergence de mutations dans l'ADN pol virale de la souche de laboratoire, HAdV C5 ATCC, après des passages successifs en culture cellulaire à des doses croissantes de BCV (P Sethna et al., 2014). Ces mutations sont associées à une augmentation de 5 fois la concentration inhibitrice 50. Les mutations T87I et V303I ont été identifiées. Cette dernière avait déjà été identifiée par Kichington et al, sur le variant R4 (**Tableau 3**). Ces données suggèrent que des virus résistant au BCV peuvent être sélectionnés. La société Chimerix a également étudié les mutations pouvant apparaître sur l'ADN pol après pression de sélection par le CDV. Seule la mutation T1551I a été mise en évidence après le 15^{ème} passage.

Des tests phénotypiques de résistance réalisés sur les mutants de Chimerix et ceux de Kichington ont montré une augmentation de CI50 allant de 5 à 10 fois pour le CDV, et de 5,1 à 7,4 fois pour le BCV (P Sethna et al., 2014) (**Tableau 3 et 4**).

Cependant le rôle respectif de chacune des mutations identifiées n'a pas encore été établi et ces données sont limitées à un seul type. Par ailleurs, bien que les données établies à partir de souche de laboratoire permettent de valider un concept, l'expérimentation sur des virus isolés à partir d'échantillons cliniques est indispensable pour estimer les risques et les profils de résistance *in vivo*.

Virus	Positions des acides aminés						
	87	303	501	677	882	1151	1183
CR-P (WT)	T	V	A	L	F	T	S
	ACC	GTC	GCG	CTC	TTT	ACC	AGC
HAdV_p5_BCV		I					
		RTC					
HAdV_p10_BCV		I					
		ATC					
HAdV_p12_BCV		I					
		ATC					
HAdV_p14_BCV	I/T	I					
	AYC	ATC					
HAdV_p15_BCV	I	I					
	ATC	ATC					
HAdV_p15_CDV						I	
						ATC	
CR-R1*					L		R
					CTT		AGA
CR-R4*		I			I		
		ATC			ATT		
CR-R5*			E				
			GAG				
CR-R6*			E	F			
			GAG	TTC			

Tableau 3. Mutations identifiées dans le gène de l'ADN pol sous pression de sélection au BCV et au CDV (Chimerix, 27th conference of the International Society for Antiviral Research, Raleigh, NC, 2014)(P Sethna et al., 2014). (* : Mutants résistants au CDV générés par Kinchington (Paul R Kinchington et al., 2002).Ce tableau présente les mutations associées à la résistance au BCV mises en évidence à différents passages (p5, 10, 12, 14, 15).

Mutant	Mutations	Augmentation CI 50	
		CDV	BCV
HAdv-BCV p5	V303I	2.2	ND
HAdv-BCV p15	T87I, V303I	6.0	6.1
HAdv-CDV p15	T1151I	4.5	7.4
R1, Kinchington	F882L, S1183R	0.5	7.2
R4, Kinchington	V303I, F882I	8.1	5.1
R5 Kinchington	A501E	8.7	5.6
R6, Kinchington	A501E, L677F	8.7	5.6

Tableau 4. CI50 des virus mutants résistants au CDV (Paul R Kinchington et al., 2002) **et au BCV** (Chimerix)

OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

Avec l'augmentation du nombre de greffes de cellules souches hématopoïétiques et l'émergence de nouveaux variants HAdV pathogènes associés à des infections sévères, la connaissance de la diversité génétique des HAdV représente un enjeu majeur. Aucune molécule antivirale efficace contre les HAdV n'a d'autorisation de mise sur le marché, cependant les inhibiteurs de l'ADN pol tels que le CDV ou le BCV sont les molécules les plus couramment utilisées.

Comme tout antiviral à action directe, en particulier chez des patients immunodéprimés qui présentent des charges virales élevées et persistantes, il existe un risque de sélection de virus résistants au traitement.

Les objectifs de ce travail sont d'étudier la diversité génétique des HAdV les plus fréquemment observés chez les patients receveurs de CSH, les HAdV d'espèce C et de mettre en place des outils pour l'analyse de la sensibilité et de résistance des différents types d'Adénovirus aux inhibiteurs de l'ADN pol.

Dans une première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à la diversité génétique des ADN pol des HAdV C, afin d'établir une cartographie de la séquence complète et déterminer les différentes positions de polymorphisme, préalable nécessaire pour l'interprétation de mutations de résistance.

Nous avons par la suite voulu savoir si la variabilité sur l'ADN pol peut être mise à contribution lors d'épidémie à HAdV. Nous avons ainsi analysé et comparé des séquences codant l'ADN pol des différents patients infectés à HAdV C2 au cours d'une épidémie dans une unité de greffe de CSH pédiatrique. Ces données ont été confrontées à l'analyse du génome complet des HAdV C2 grâce au séquençage haut débit. Au cours de cette épidémie, nous nous sommes également intéressés à un cas de recombinaison d'HAdV C2/C5 et aux gènes pouvant être impliqués dans cette recombinaison.

Dans une dernière partie, nous avons eu comme objectif de développer des outils pour étudier l'impact des mutations identifiées dans l'ADN pol par des méthodes de génétique inverse pour déterminer le support et le mécanisme de résistance au BCV. Compte tenu de

la taille du génome viral (35 Kilobases), il est impossible d'introduire directement des mutations sur le génome viral entier. Nous avons ainsi choisi de travailler avec deux plasmides, un codant pour le génome entier délété de l'ADN pol (Adv-deltaPol) et un codant uniquement pour l'ADN pol (Pol) (3 kilobases) dans lequel les mutations identifiées sur des virus résistants seront introduites par mutagenèse dirigée (Pol-muté).

Les plasmides Adv-deltaPol et Pol-muté seront utilisés par la suite, pour transformer des bactéries afin de recombiner les 2 plasmides en un seul génome (Adv-deltaPol-Pol-muté). Des cellules 293T seront transfectées avec le plasmide purifié afin de produire un virus recombinant infectieux contenant les mutations dans l'ADN pol. La susceptibilité aux inhibiteurs de l'ADN pol des virus mutés sera ensuite testée sur des cellules A549. Cette stratégie permettra de préciser le rôle des mutations dans la résistance et d'identifier les zones majeures d'interaction avec les inhibiteurs de l'ADN pol.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Etude du polymorphisme de l'ADN pol des HAdV C

A. Patients

Un total de 60 souches d'HAdV C provenant de prélèvements cliniques ont été inclus dans l'étude. Entre 2010 et 2015, 60 prélèvements cliniques (respiratoires ou selles) provenant de 60 patients (26 femmes et 34 hommes) présentant une infection respiratoire, digestive ou disséminée à HAdV C ont été inclus dans l'étude. Les infections digestives ont été considérées lors d'une PCR HAdV positive dans les selles, avec ou sans symptômes digestifs, les infections respiratoires lors d'une PCR HAdV positive seulement dans des prélèvements respiratoires avec des symptômes d'infections respiratoires et une infection disséminée lors d'une PCR HAdV positive dans le plasma associée à des signes cliniques attribués à des infections à HAdV incluant diarrhée, fièvre, signes respiratoires, cystites hémorragiques, hépatites, pancréatites, méningoencéphalite et défaillance multi-viscérale. L'âge des patients s'étendait de 3 mois à 66 ans (moyenne d'âge 21,5 ans $\pm$ 22.0 ans). Les principales caractéristiques cliniques sont résumées dans le tableau 5. Quarante patients étaient des patients greffés de CSH (n=66,7%) (21 enfants et 19 adultes), 11 patients étaient hospitalisés en service de Maladies Infectieuses, 7 patients en Pédiatrie Générale et 2 en Immunologie Clinique. Les souches virales ont été obtenues à partir de 41 selles et 19 prélèvements respiratoires. Aucun patient n'a reçu de traitement anti HAdV, par CDV, BCV ou ribavirine au moment du prélèvement.

B. Prétraitement des échantillons

Avant l'inoculation dans les cellules A549 (ou l'extraction d'acide nucléique) les prélèvements de selles et les échantillons respiratoires nécessitent d'être prétraités. Les échantillons de selles ont été préparés par dilution de 1 g ou 1 ml de selles dans 9 ml de solution salée tamponnée au phosphate (PBS). La suspension résultante a été soumise à trois cycles de congélation-décongélation de -20 ° C suivis d'une étape de centrifugation. Le surnageant est ensuite passé à travers un filtre de 0,45 μ m (filtres à seringue Minisart Plus, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Allemagne) (Feghoul et al., 2016a). Les échantillons respiratoires sont fluidifiés par l'utilisation du digest-EUR [®] (EuroBio,

Courtaboeuf, France) et filtrés dans un filtre de 0,2 µm (filtres à seringue Minisart Plus, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Allemagne).

C. Isolement des virus

Les prélèvements cliniques ont été mis en culture en cellules A549 afin d'obtenir la souche virale. L'entretien des cellules A549 est réalisé deux fois par semaine, en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1(X) Gibco®) supplémenté en sérum de veau fœtal inactivé (SVF) (US Defined Featl Bovine Serum, Perbio®) 10% et en antibiotiques (2%) (Pénicilline 10000 U/ml, Streptomycine 10mg/ml, Cambrex Bioscience®). La trypsination des cellules est réalisée par la trypsine EDTA (Ethylène Diamine Tetra Acetic Acid) (0.25% 1X). Atmosphère : air 95% ; dioxyde de carbone (CO₂) 5%, 37°C.

La propagation virale s'effectue par inoculation de 300 µl d'échantillon et 700 µl de milieu dans un flacon de 25 cm². Vingt-quatre heures plus tard, l'inoculum est retiré et remplacé par 7 ml de DMEM avec 2% de SVF. La suspension cellulaire est récoltée lorsqu'un effet cytopathique a été observé.

Patient	Type HAdV	Sexe	Âge	Service	échantillon	Infection HAdV
C1 1	C1	F	33	Hématologie	selles	digestive
C1 2	C1	F	65	Hématologie	selles	disséminée
C1 3	C1	M	2	Hématologie	selles	digestive
C1 4	C1	M	8	Maladies infectieuses	respiratoire	respiratoire
C1 5	C1	M	7	Hématologie	selles	disséminée
C1 6	C1	F	23	Hématologie	selles	digestive
C1 7	C1	F	3	Hématologie	selles	disséminée
C1 8	C1	F	2	Hématologie	selles	disséminée
C1 9	C1	M	1	Pédiatrie générale	respiratoire	respiratoire
C1 10	C1	M	24	Hématologie	selles	digestive
C1 11	C1	M	12	Hématologie	selles	digestive
C1 12	C1	M	2	Pédiatrie générale	respiratoire	respiratoire
C1 13	C1	M	51	Maladies infectieuses	respiratoire	respiratoire
C1 14	C1	F	2	Pédiatrie générale	respiratoire	respiratoire
C1 15	C1	F	49	Hématologie	selles	digestive
C1 16	C1	F	66	Hématologie	selles	digestive
C1 17	C1	M	3	Hématologie	selles	digestive
C1 18	C1	F	3	Hématologie	selles	disséminée
C1 19	C1	M	29	Maladies infectieuses	respiratoire	respiratoire
C1 20	C1	M	50	Hématologie	selles	disséminée
C1 21	C1	M	44	Maladies infectieuses	respiratoire	respiratoire
C2 1	C2	F	18	Hématologie	selles	disséminée
C2 2	C2	F	45	Hématologie	respiratoire	respiratoire
C2 3	C2	M	8	Hématologie	selles	digestive
C2 4	C2	F	55	Hématologie	selles	digestive
C2 5	C2	M	3	Hématologie	selles	disséminée
C2 6	C2	M	62	Maladies infectieuses	respiratoire	respiratoire
C2 7	C2	M	33	Hématologie	selles	digestive
C2 8	C2	F	39	Maladies infectieuses	respiratoire	respiratoire
C2 9	C2	F	3	Hématologie	selles	disséminée
C2 10	C2	M	55	Hématologie	selles	disséminée
C2 11	C2	M	2	Pédiatrie générale	respiratoire	respiratoire
C2 12	C2	F	3	Hématologie	selles	disséminée
C2 13	C2	M	45	Maladies infectieuses	respiratoire	respiratoire
C2 14	C2	F	1	Pédiatrie générale	selles	digestive
C2 15	C2	M	4	Hématologie	selles	digestive
C2 16	C2	M	5	Hématologie	respiratoire	respiratoire
C2 17	C2	M	6	Hématologie	selles	digestive
C2 18	C2	F	3	Hématologie	selles	digestive
C2 19	C2	F	58	Maladies infectieuses	respiratoire	respiratoire
C2 20	C2	F	6	Hématologie	selles	disséminée

Patient	Type HAdV	Sexe	Âge	Service	échantillon	Infection HAdV
C2 21	C2	M	32	Maladies infectieuses	selles	digestive
C2 22	C2	M	46	Hématologie	selles	disséminée
C2 23	C2	M	13	Hématologie	selles	digestive
C2 24	C2	M	46	Hématologie	selles	disséminée
C2 25	C2	M	15	Hématologie	selles	digestive
C2 26	C2	F	54	Immunologie	respiratoire	respiratoire
C2 27	C2	F	55	Maladies infectieuses	respiratoire	respiratoire
C5 1	C5	F	42	Maladies infectieuses	respiratoire	respiratoire
C5 2	C5	M	3	Pédiatrie générale	respiratoire	respiratoire
C5 3	C5	F	1	Hématologie	selles	digestive
C5 4	C5	M	0	Pédiatrie générale	respiratoire	respiratoire
C5 5	C5	M	5	Hématologie	selles	digestive
C5 6	C5	M	3	Hématologie	selles	digestive
C5 7	C5	M	6	Hématologie	selles	disséminée
C5 8	C5	F	58	Hématologie	selles	digestive
C5 9	C5	M	46	Hématologie	selles	digestive
C5 10	C5	F	1	Hématologie	selles	digestive
C5 11	C5	F	11	Hématologie	selles	digestive
C5 12	C5	M	6	Hématologie	selles	digestive

Tableau 5. Caractéristiques cliniques des 60 patients inclus dans l'étude.

D. Extraction des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont extraits à partir de 200 µl d'échantillons prétraités ou d'isolats de virus. Les acides nucléiques ont été élués dans 100 µl en utilisant le système QIASymphony avec le kit Qiasymphony Virus / DSP pathogène (Qiagen, Courtaboeuf, France).

E. PCR en temps réel et typage des HAdV

Les HAdV ont été détectés et quantifiés avec le kit Adenovirus Rgene (bioMérieux / Argene, Varhilles, France) selon les instructions du fabricant (Feghoul et al., 2016a).

Le typage est réalisé de manière générale sur tous les échantillons présentant une charge virale HAdV détectable. Elle est obtenue par PCR temps réel grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques de groupe provenant de publication (Sarantis et al., 2004). La cible amplifiée est l'hexon pour les HAdV des espèces A, B, C et E, le gène VA RNA pour le groupe D et le gène IV.2 pour le groupe F. Les sondes d'hydrolyse spécifiques pour chaque groupe sont marquées avec de la 6-carboxyfluorescéine en 5' et avec un quencher non fluorescent le Minor Groove Binder® (Applied Biosystems®, Courtaboeuf, France) pour les groupes A, B et C, ou le fluophore TAMRA pour les groupes D, E et F en 3'. Les réactions de PCR sont effectuées dans un mélange réactionnel comprenant du Master Mix TaqMan Universal PCR® (Applied Biosystems®, Courtaboeuf, France), chaque amorce et la sonde. La PCR temps réel est réalisée grâce à l'appareil ABI Prism 7500 (Applied Biosystems®, Courtaboeuf, France).

Figure 15.

La détermination du sérotype se fait par séquençage d'une région hypervariable (HVR7) à l'aide d'amorces publiées (Sarantis et al., 2004). Les conditions de PCR et les amorces sont présentées dans le **tableau 6**. Les produits de PCR purifiés (élimination des nucléotides non incorporés et des amorces) sont séquencés selon la méthode « dye terminator sequencing » sur le séquenceur ABI 3100 (Applied Biosystems®, Courtaboeuf, France). Les séquences obtenues sont alignées grâce au programme Geneious 5.4.3 et comparées aux autres séquences publiées dans GenBank.

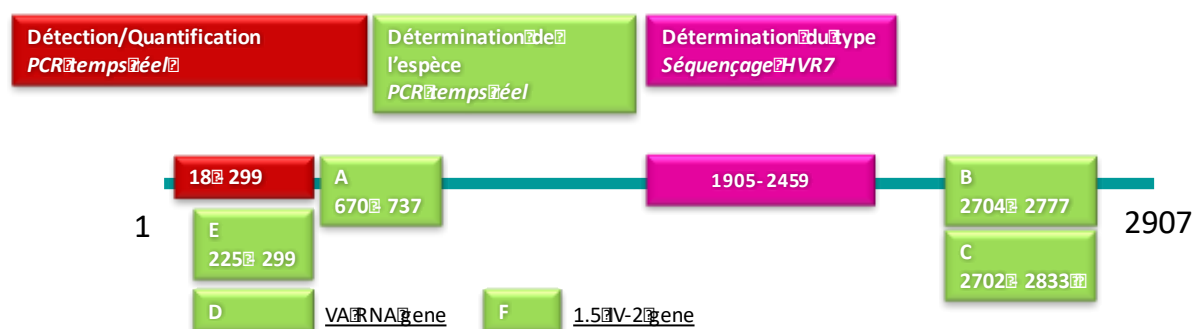


Figure 16. Détermination de l'espèce et type pour les HAdV. Le gène de l'hexon est représenté par la ligne verte, du nucléotide 1 au nucléotide 2907. La détermination de l'espèce est réalisée par PCR temps-réel, ciblant l'hexon pour les espèces A, B, C et E, le gène VA RNA pour le groupe D, et le gène IV.2 pour le groupe F. Le sérotype est obtenu par la séquence de la région hypervariable HVR7.

Réactifs	Volume (µl)
360 GC Enhancer	1
AmpliTaQ Gold 360 Mastermix	25
Amorce sens 10µM CTGATGTACTACAACAGCACTGGCAACATGGG	3
Amorce antisens 10µM TTGCGGTGGTGGTTAAATGGGTTTACGTTGTCCAT	3
ADN	5
H2O	13

Programme de PCR		
40 cycles	Dénaturation	5 min à 95°C
	Dénaturation	45 sec à 95°C
	Hybridation	45 sec à 53°C
	Elongation	1 min 30 à 72°C
	Elongation	7 minutes à 72°C

Tableau 6. Mix et programme pour la PCR HVR7

F. Amplification et séquençage du gène ADN polymérase des HAdV C

La HAdV ADN pol a été amplifiée en deux fragments (F1 et F2) de 2393 pb et 1810 pb, respectivement, en utilisant deux paires d'amorces (F1F, F1R, F2F, F2R) (**tableau 7**). Le mélange réactionnel de PCR pour l'amplification des deux fragments comprend l'AmpliTaQ Gold 360 Mastermix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10 µM d'amorces sens et antisens et 5 µl d'ADN matrice. Les conditions d'amplification se composent d'une première étape de dénaturation de 5 min à 95 ° C suivie de 35 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 57°C pour F1 et 64° C pour F2, 2 min à 72 ° C et d'une étape finale

d'élongation pendant 5 min à 72 ° C. Après la purification à l'aide du kit ExoSAPIT® (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), les produits de PCR F1 et F2 ont été séquencés en utilisant les amorces de PCR F1 et F2 et quatre amorces internes supplémentaires (**Tableau 7**) sur un séquenceur ABI 3100 (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, CA, États-Unis). Selon les recommandations du fabricant, une réaction de séquence a été réalisée sur 3 µl de produit de PCR purifié avec 3 µL d'amorces sens ou antisens à 1 µM, 2 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) dans 5 µL de Buffer 5X dans un volume total de 10 µL. Soixante séquences d'ADN pol HAdV provenant d'échantillons cliniques et 20 séquences publiées par NCBI ont été analysées. La comparaison et les alignements de séquences ont été effectués à l'aide du logiciel Geneious 8.0.5 (Biomatters, Auckland, NZ) et MEGA version 7 (CEMI, Tempe, AZ, USA). Une séquence consensus de l'ADN pol de HAdV a été définie comme le résultat de l'alignement des séquences des 80 HAdV inclus dans l'étude. Tous les numéros d'accès des séquences nucléotidiques des souches cliniques analysées dans cette étude et les séquences précédentes de NCBI publiées (**MF358546 à MF358605**) sont donnés dans le **tableau 8**.

Amorces de PCR F1	HAdVC F1 F	5' TTCTCGCAGCTCATGGCCCG 3'
	HAdVC F1 R	5' CAGGCGCGCGTCGAAGTAGT 3'
Amorces de PCR F2	HAdVC F2 R	5' CCAGCATCCGCGGTGGAAGA 3'
	HAdVC F2 F	5' GGGGGCCACTTCGTTAAGCAT 3'
Amorces internes F1	HAdVC F1.1 F	5' TTCTCGCAGCTCATGGCCCG 3'
	HAdVC F1.1 R	5' TTGCGTGTGATGCGGAAGGGT 3'
	HAdVC F1.2 F	5' CCCGCGCTTCTTGGAACCTTACAT 3'
	HAdVC F1.2 R	5' CAGGCGCGCGTCGAAGTAGT 3'
Amorces internes F2	HAdVC F2.1 F	5' TGCGGCATGTACGCCTCCG 3'
	HAdVC F2.1 R	5' GGGTAGCGGTCGTTGTCCACT 3'
	HAdVC F2.2 F	5' GCGCCCCACCCCCTTTTAT 3'
	HAdVC F2.2 R	5' GGGGGCCACTTCGTTAAGCAT 3'

Tableau 7. Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des pol HAdV C.

Les amorces ont été conçues en utilisant la séquence de référence du génome complet HAdV C5 ATCC (AY339865). Le gène de l'ADN pol débute au nucléotide 5197 et se termine au nucléotide 8793. Les amorces F1F et F2F entourent le gène de l'ADN pol, F2F débute au nucléotide 5000 et se termine au nucléotide 8985.

Patient	HAdV type	Type d'échantillon	N° d'accession
C1 1	C1	selles	MF358546
C1 2	C1	selles	MF358547
C1 3	C1	selles	MF358548
C1 4	C1	respiratoire	MF358549
C1 5	C1	selles	MF358550
C1 6	C1	selles	MF358551
C1 7	C1	selles	MF358552
C1 8	C1	selles	MF358553
C1 9	C1	respiratoire	MF358554
C1 10	C1	selles	MF358555
C1 11	C1	selles	MF358556
C1 12	C1	respiratoire	MF358557
C1 13	C1	respiratoire	MF358558
C1 14	C1	respiratoire	MF358559
C1 15	C1	selles	MF358560
C1 16	C1	selles	MF358561
C1 17	C1	selles	MF358562
C1 18	C1	selles	MF358563
C1 19	C1	respiratoire	MF358564
C1 20	C1	respiratoire	MF358565
C1 21	C1	selles	MF358566
C2 1	C2	selles	MF358567
C2 2	C2	respiratoire	MF358568
C2 3	C2	selles	MF358569
C2 4	C2	selles	MF358570
C2 5	C2	selles	MF358571
C2 6	C2	respiratoire	MF358572
C2 7	C2	selles	MF358573
C2 8	C2	respiratoire	MF358574
C2 9	C2	selles	MF358575
C2 10	C2	selles	MF358576
C2 11	C2	respiratoire	MF358577
C2 12	C2	selles	MF358578
C2 13	C2	respiratoire	MF358579
C2 14	C2	selles	MF358580
C2 15	C2	selles	MF358581
C2 16	C2	respiratoire	MF358582
C2 17	C2	selles	MF358583
C2 18	C2	selles	MF358584
C2 19	C2	respiratoire	MF358585

C2 20	C2	selles	MF358586
C2 21	C2	selles	MF358587
C2 22	C2	selles	MF358588
C2 23	C2	selles	MF358589
C2 24	C2	selles	MF358590
C2 25	C2	selles	MF358591
C2 26	C2	respiratoire	MF358592
C2 27	C2	respiratoire	MF358593
C5 1	C5	respiratoire	MF358594
C5 2	C5	respiratoire	MF358595
C5 3	C5	selles	MF358596
C5 4	C5	respiratoire	MF358597
C5 5	C5	selles	MF358598
C5 6	C5	selles	MF358599
C5 7	C5	selles	MF358600
C5 8	C5	selles	MF358601
C5 9	C5	selles	MF358602
C5 10	C5	selles	MF358603
C5 11	C5	selles	MF358604
C5 12	C5	selles	MF358605
C1 AC_000017	C1	NCBI	AC_000017.1
C1 AF534906	C1	NCBI	AF534906.1
C1 JX173078	C1	NCBI	JX173078.1
C1 JX173080	C1	NCBI	JX173080.1
C1 JX173082	C1	NCBI	JX173082.1
C1 JX173083	C1	NCBI	JX173083.1
C1 JX173086	C1	NCBI	JX173086.1
C2 JX173077	C2	NCBI	JX173077.1
C2 JX173079	C2	NCBI	JX173079.1
C2 JX173081	C2	NCBI	JX173081.1
C2 JX173084	C2	NCBI	JX173084.1
C2 KF268130	C2	NCBI	KF268130.1
C2 KF268310	C2	NCBI	KF268310.1
C2 AC000007	C2	NCBI	AC_000007.1
C5 AC000008	C5	NCBI	AC_000008.1
C5 AY339865	C5	NCBI	AY339865.1
C5 AY601635	C5	NCBI	AY601635.1
C5 KF268127	C5	NCBI	KF268127.1
C5 KF429754	C5	NCBI	KF429754.1
C5 KF268199	C5	NCBI	KF268199.1

Tableau 8. Numéros d'accèsion Genbank des 60 séquences cliniques et des 20 séquences de références d'HAAdV C inclus dans l'étude.

II. Description moléculaire d'une épidémie d'HAdV C2 chez des enfants greffés de CSH

A. Pré-traitement des échantillons

Le traitement des échantillons par RNase et DNase avant séquençage profond est une étape nécessaire avant séquençage car elle permet un enrichissement significatif du prélèvement en particules virales. La stratégie se base sur l'existence d'une capside virale permettant de protéger le génome viral des différents traitements permettant d'éliminer le génome cellulaire.

Les surnageants de culture ont été traités par 85U de RNase ONE (Promega®, Madison, USA) et 40U Turbo DNase (Ambion®, Life Technologies) dans 1x de DNase buffer (Ambion®) puis incubés à 37°C pendant 30 min.

B. Séquençage haut débit Mi Seq

1. Préparation des librairies et séquençage

Les librairies à séquencer ont été créées grâce à la trousse Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, US) selon les recommandations du fabricant.

Un volume d'1 ng d'ADN a été utilisé. Cette trousse utilise un transposome permettant la fragmentation, toutes les 300 pb ainsi que le marquage simultané de l'ADN par ajout des séquences « adaptatrices » à ses extrémités. Puis une réaction de PCR permet l'ajout de séquences index sur les deux extrémités de l'ADN, permettant d'identifier les différents échantillons lors de multiplexage. Les produits de PCR obtenus sont ensuite purifiés par billes AMPure XP. La qualité des librairies générées, est vérifiée grâce à l'appareil Caliper avec la puce DNA HS. La visualisation d'un pic entre 300 et 1500 pb, reflète la bonne qualité de la librairie. Les librairies ont ensuite été quantifiées grâce au Qubit® dsDNA HS Assay Kit. La normalisation des échantillons à séquencer a ensuite été réalisée soit à l'aide de la trousse Nextera XT, soit par dilution de chaque librairie selon sa concentration et sa taille afin d'obtenir un mélange équimolaire avec une concentration finale de l'ensemble des librairies à séquencer de 12 pM. Cette dernière méthode semble permettre une meilleure

répartition du nombre de séquences par échantillon. Le séquençage a été effectué sur l'appareil MiSeq (Illumina) avec la cartouche 2x150 v2 ou la cartouche 2x 250 v2 permettant de générer respectivement 4,5Gb et 7,5Gb.

2. Analyse Bioinformatique

La reconstruction des génomes complets des HAdV C à partir des reads de séquençage a été effectuée grâce au logiciel Viramp implémenté sur le serveur Galaxy.

Les analyses phylogénétiques ont été conduites sur le logiciel MEGA 7 avec 15 génomes complets provenant de GenBank de HAdV type 2, 1, 5, 6, 57 et la souche recombinante CBJ113. Les analyses Bootscan ont été réalisées grâce au logiciel Simplot.

III. Génération de virus recombinants pour l'étude des mutations dans le gène codant pour l'ADN polymérase

A. Principe

Afin d'analyser l'impact des mutations sélectionnées dans l'ADN pol de souches HAdV cultivées in vitro en présence de concentrations croissantes de cidofovir ou brincidofovir, nous avons généré des virus recombinants. Les mutations étudiées sont les suivantes : T87I, V303I, A501E, L677F, F882L, F882I, T1151I, S1183R. Compte tenu de la taille du génome viral (35 kb), il est difficile d'introduire directement des mutations sur le génome viral entier. Nous avons choisi de travailler avec deux plasmides, un codant pour le génome entier délété de l'ADN pol (*Adv-deltaPol*) et un codant uniquement pour l'ADN pol virale (*Pol*) (Oxford Genetics, Oxford, Royaume Uni) dans lequel les mutations identifiées seront introduites par mutagenèse dirigée (*Pol-muté*). Les plasmides *Pol* et *Adv-deltaPol* ont été produits par la société Oxford Genetics, laboratoire privé ayant développé une expertise dans la biologie de synthèse et basé dans la ville d'Oxford au Royaume-Uni. Ils se sont spécialisés dans la synthèse d'ADN, l'optimisation de l'expression des protéines et dans la technologie de développement de lignées cellulaires. Leur plus grand domaine d'expertise concerne la synthèse à façon de plasmides d'intérêt.

Les cartographies de chacun des plasmides sont représentées dans la **figure 17**. Les plasmides *Adv-deltaPol* et *Pol-muté* seront utilisés pour transformer des bactéries BJ5183 afin de recombiner les deux plasmides en un seul génome (*Adv-deltaPol-Pol-muté*). Des cellules 293T sont ensuite transfectées avec le plasmide purifié afin de produire un virus recombinant infectieux contenant les mutations dans l'ADN pol. Les étapes de la production des virus recombinants sont résumées dans la **figure 18**.

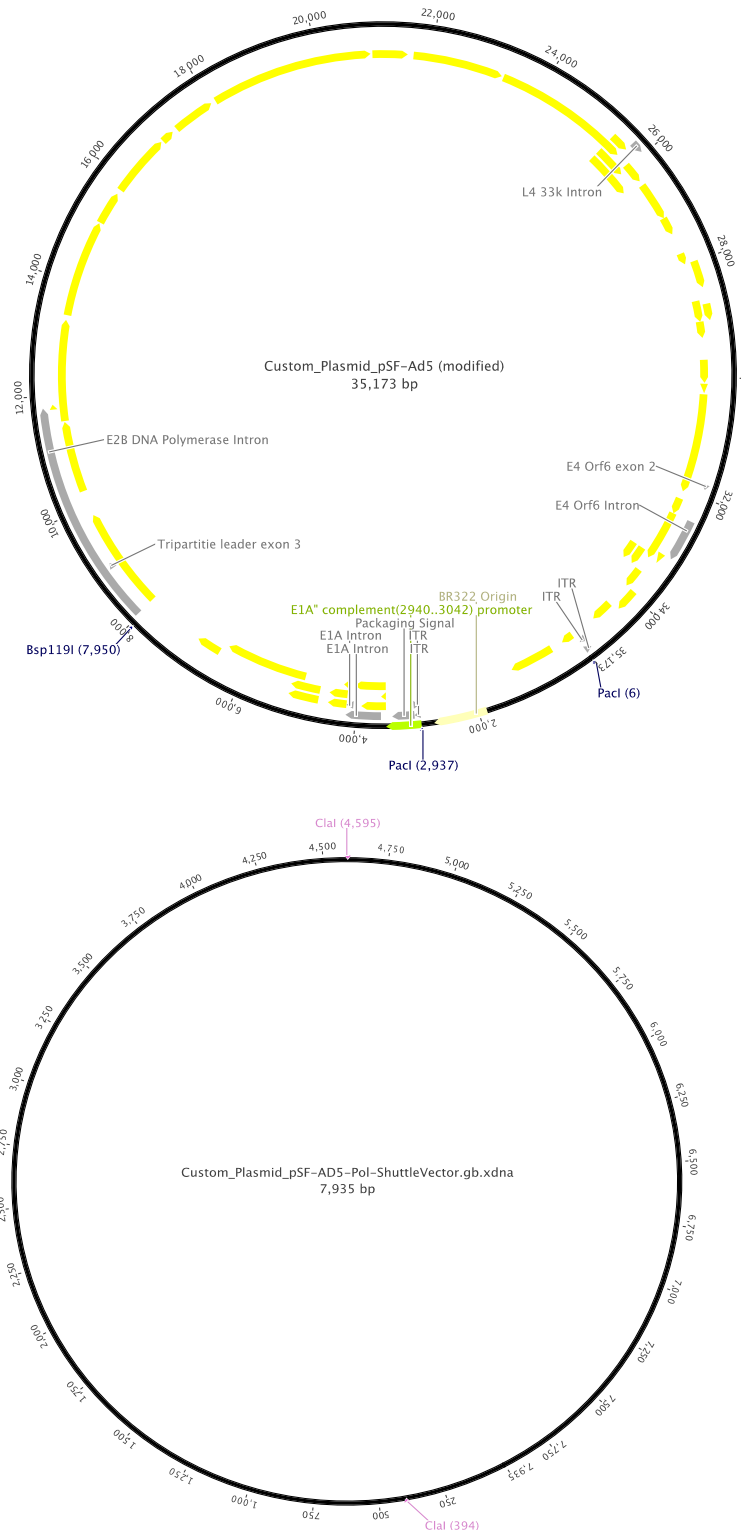


Figure 17. Cartographie du plasmide Adv-deltaPol et du plasmide Pol par Oxford Genetics. D'après Geneious V8. Pour le plasmide *Adv-deltaPol* les flèches jaunes représentent les différents ORF du génome des HAdV C sauf celle codant pour la pol. En positions 6 et 2937 se trouvent les sites de restriction pour l'enzyme PacI. Cette enzyme de restriction va permettre la linéarisation du plasmide et la recombinaison. Pour le plasmide pol, en positions 394 et 4595 se trouvent les sites de restrictions pour l'enzyme ClaI. Cette enzyme de restriction va permettre la libération du fragment pol avant la recombinaison.

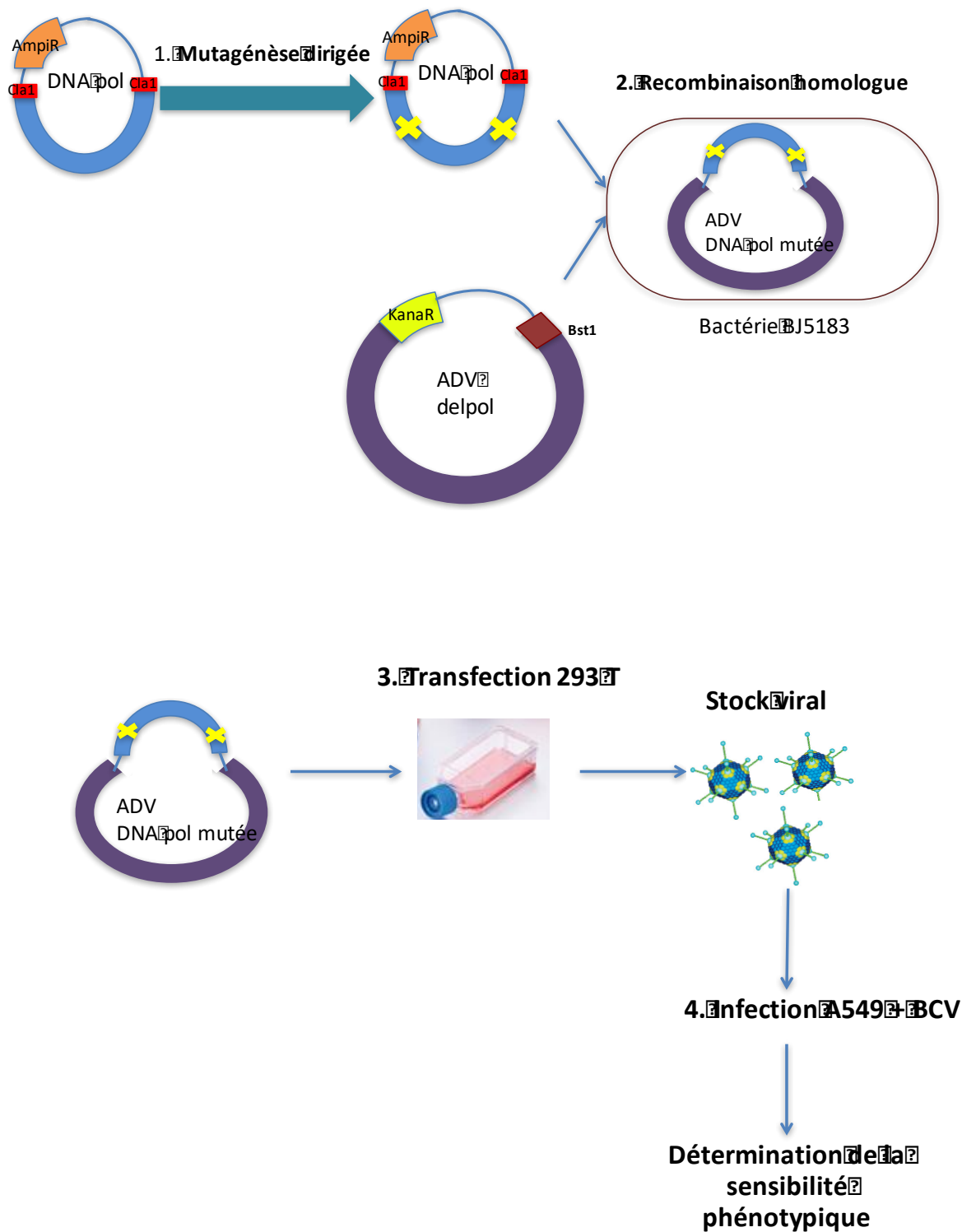


Figure 18. Les différentes étapes de la génétique inverse

B. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide du kit Quickchange II site-directed mutagenesis XL kit, kit adapté pour les longs fragments.

1. Principe

Le kit Quickchange II XL permet d'introduire des mutations ponctuelles, remplacer des acides aminés ou bien réaliser une délétion ou une insertion simple ou multiple d'acides aminés adjacents. La procédure de mutagenèse dirigée est réalisée par PCR et repose sur l'utilisation d'un vecteur ADN double brin « template », de deux couples d'amorces contenant la mutation désirée ainsi que l'enzyme de restriction DpnI. Au cours de la réaction de PCR, les amorces se fixent de part et d'autre sur l'ADN template autour de la mutation. Lors de l'étape d'élongation, un ADN double brin contenant la mutation est créé. Cet ADN double brin comporte des brèches. Enfin, l'utilisation de l'enzyme de restriction la DpnI qui agit de façon spécifique sur l'ADN méthylé et hémiméthylé va permettre la digestion de l'ADN parental et de sélectionner uniquement l'ADN contenant la mutation. L'ADN isolé de la plupart des souches d'*Escherichia Coli* est méthylé et donc sensible à l'action de l'enzyme de restriction DpnI. Des bactéries compétentes vont être transformées pour permettre l'amplification de l'ADN contenant la mutation et ainsi combler les brèches formées lors de la réaction de PCR **Figure 19**.

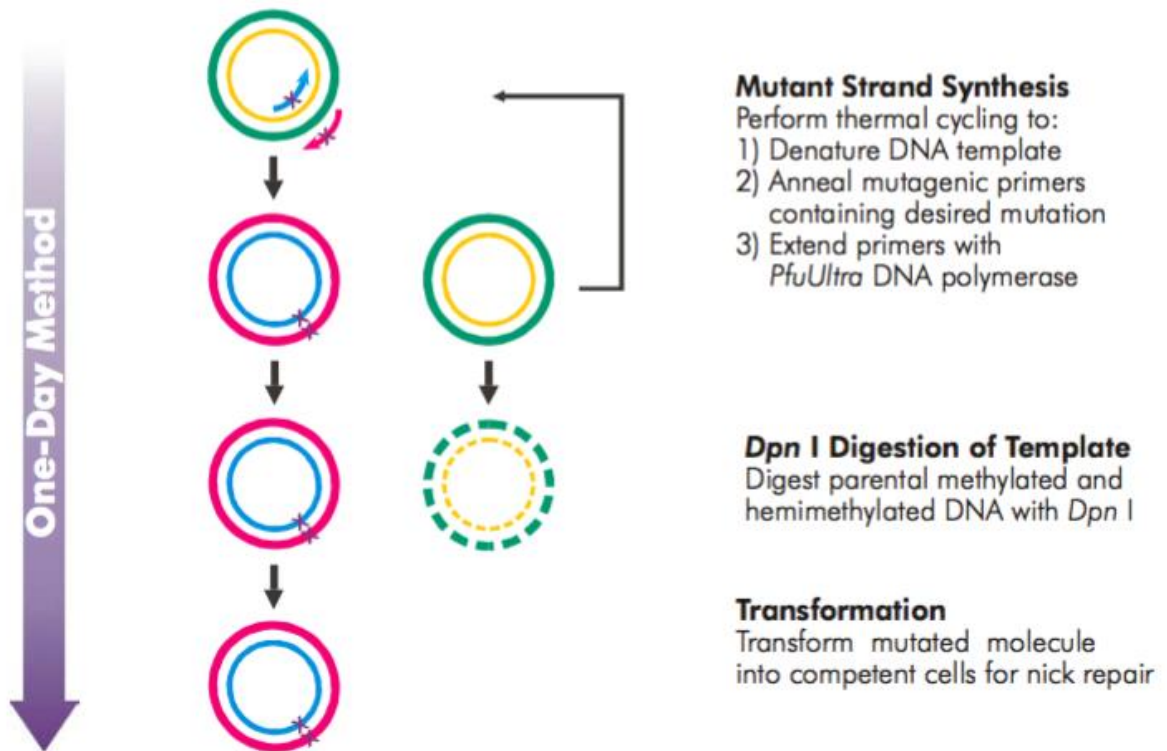


Figure 19. Principe de la mutagenèse dirigée. D'après Agilent technologies.

2. Choix des amorces

Les amorces de mutagenèse dirigée doivent répondre à des critères spécifiques tels que :

- Une longueur comprise entre 25 et 45 bases avec un $T_m > 78^\circ\text{C}$.
- La mutation doit se situer au milieu de l'amorce avec au minimum 10 à 15 bases en amont et aval de la mutation.
- Le pourcentage de GC doit être au minimum de 40%.
- L'amorce doit se terminer par un G ou C.

3. Mutagénèse dirigée

La mutagénèse dirigée a été réalisée selon les recommandations du fournisseur. Le mix pour la réaction de PCR comporte 5 µl du tampon de réaction, 10 ng d'ADN template, 125 ng de primer sens, 125 ng de primer antisens, 1 µl de dNTP mix, 3 µl of QuikSolution, 1 µl of Pfu Ultra HF DNA polymerase (2.5 U/µl), de l'H₂O pour un volume final de 50 µl.

Le programme de PCR comporte une première étape de dénaturation d'1 min à 95 ° C suivie de 18 cycles de 50 s à 95°C, 50 s à 60°C, 4 min à 68 ° C et d'une étape finale d'élongation de 7 min à 68 ° C.

Les produits de PCR sont ensuite digérés avec l'enzyme de restriction DpnI (1 µl) pendant une heure à 37°C.

Une étape de transformation de bactéries XL10 gold est réalisée en présence de l'ADN traité par la DpnI. Deux µl d'ADN traité par la DpnI est rajouté dans des tubes contenant 45 µl de bactéries XL10 gold décongelées dans de la glace. Les tubes sont incubés 30 min dans la glace. Un choc thermique est réalisé à 42°C dans un bain marie pendant 30 secondes. Les tubes sont ensuite incubés dans la glace pendant deux minutes. 500 µl de milieu NZY+ préchauffé sont ajoutés dans chaque tube et une incubation est réalisée sous agitation entre 225 et 250 rpm pendant une heure à 37°C. 250 µl de produit de transformation sont étalés dans des géloses contenant l'antibiotique de sélection (ampicilline pour le plasmide *pol*) ainsi que 80 µg/ml de X-gal and 20 mM d'IPTG. Ces produits vont permettre de sélectionner les colonies contenant le plasmide *pol* muté. Les boîtes de géloses sont incubées pendant au moins 16 heures à 37°C.

4. Transformation en bactéries compétentes

Cette méthode permet de réaliser une amplification clonale du plasmide en bactéries compétentes. En effet, seules les cellules ayant incorporées ce plasmide comportant un gène de résistance à un antibiotique donné, vont pouvoir se multiplier dans un milieu contenant l'antibiotique en question. La multiplication des cellules bactériennes va conduire à

l'obtention de clones qui sont de multiples copies identiques des cellules contenant le plasmide d'intérêt.

Pour transformer 45 µl de bactéries compétentes (XL 10 gold, Agilent®), 2 µl de produit de digestion par la *dpnI* sont utilisés. Les plasmides sont mis en contact des bactéries pendant 30 min. dans la glace. Après un choc thermique de 30 s à 42°C, les bactéries sont replacées dans la glace pendant 2 min. 500 µl de milieu liquide LB (Lennox Broth, Euromedex®) préchauffé à 37°C sont ensuite ajoutés afin de restaurer le métabolisme et la croissance des bactéries. Après une incubation à 37°C pendant 40 min. sous agitation, les bactéries sont centrifugées (4000 rpm pendant 4min) et quelques microlitres de surnageant sont éliminés. Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans 50 µl de surnageant et étalé sur gélose agar supplémenté en ampicilline au 1/1000 (100 mg/L, Euromedex®) pour ne favoriser que la pousse des bactéries ayant incorporé notre plasmide et ainsi qu'en X-gal (80 µg/ml) et d'IPTG (20 mM) pour permettre la sélection des colonies comportant le plasmide muté, pendant 16h à 37°C.

5. Amplification et purification d'ADN par miniculture et minipréparation

Une colonie isolée sur gélose est mise en culture pendant 16h sous agitation à 37°C dans 4 ml de LB liquide supplémenté en ampicilline au 1/1000 permettant ainsi la croissance du clone bactérien ayant intégré le plasmide d'intérêt. Les plasmides sont ensuite extraits et purifiés par minipréparation à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN®) et quantifiés par spectrométrie.

6. Vérification des mutations

Les plasmides *pol* mutés ainsi obtenus doivent être validés par séquençage ciblant la région *pol* (voir chapitre I étude du polymorphisme de l'ADN *pol*) pour vérifier si la mutation est bien présente.

7. Purification du fragment pol

Avant l'étape de recombinaison, il est nécessaire de libérer le fragment codant pour la polymérase. Une réaction de double digestion par les enzymes ClaI (permettant de séparer la polymérase et le plasmide porteur) et PacI (permettant de couper au sein du plasmide). Une étape de migration sur gel d'agarose 0,9% et de purification par le kit QIAquick gel extraction kit (QIAGEN®) est nécessaire pour obtenir le fragment polymérase muté, prêt pour la recombinaison.

B. Génération des recombinants

1. Electroporation

La recombinaison des plasmides *pol muté* et du plasmide *delta pol* est réalisée par électroporation en bactéries. Les cellules BJ5183 compétentes en électroporation sont des souches bactériennes favorables à la recombinaison. Ces cellules fournissent les composants nécessaires pour exécuter l'événement de recombinaison entre un vecteur de transfert contenant le gène d'intérêt et un vecteur contenant le génome adénoviral, à condition que des homologies de séquences soient partagées entre les deux vecteurs. L'électroporation a été réalisée sur l'électroporateur Gene Pulser (BioRad) selon les recommandations du fournisseur. Dans des cuvettes congelées contenant 40 µl de bactéries BJ5183 1 µg de plasmide *pol muté* et 100 ng de plasmide *delta pol* sont ajoutés. Les paramètres suivants : 200 Ω, 2.5 kV, 25 µF, sont réglés sur l'électroporateur. Après la pulsation, 1 ml de milieu LB sont ajoutés, les cellules sont mises en suspension par aspiration-refoulement avec la pipette et transférées dans des tubes falcon de 15 ml. La suspension cellulaire est incubée pendant 1 heure à 37°C, sous agitation à 225–250 rpm. Plusieurs volumes (100 µl, 300 µl et 600 µl) sont étalés dans des boîtes de gélose contenant l'antibiotique de sélection : la kanamycine. En effet la résistance sur le recombinant est apportée par le plasmide *delta pol*. Les boîtes de gélose sont incubées sur la nuit à 37°C.

Les recombinants sont purifiés par minipréparation à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN®) et quantifiés par spectrométrie. Une amplification par transformation chimique en bactéries XL-10 s'avère nécessaire pour augmenter le rendement. Après une minipréparation, les recombinants sont vérifiés par une PCR dont le couple d'amorces cible

d'une part une région du plasmide *delta pol* et d'autre part le gène *pol*, **Figure 20**. Les conditions de PCR sont représentées dans le **tableau 9**. Une fois vérifiés, tous les recombinants ont été amplifiés par maxipréparation grâce au kit Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen®) et quantifiés par spectrométrie de masse.

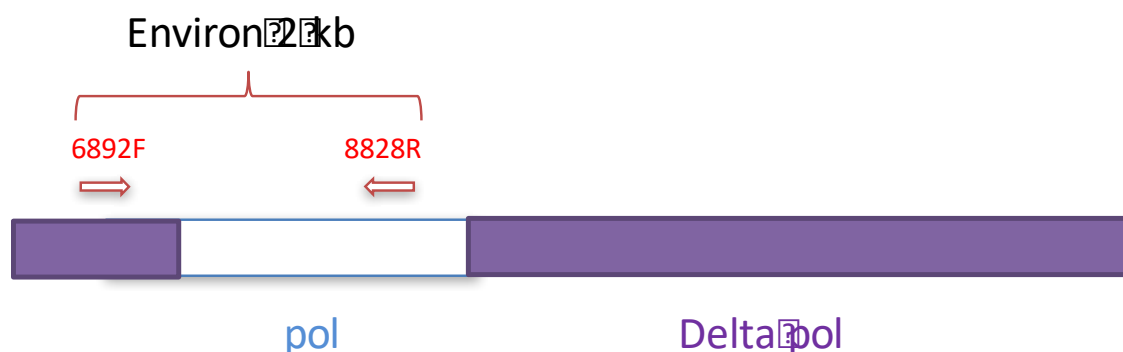


Figure 20. Positions des amorces de la PCR de vérification des recombinants.

Réactifs	Volume (μl)
360 GC Enhancer	1
AmpliTaq Gold 360 Mastermix	25
Amorce sens 10μM 6892F	3
Amorce antisens 10μM 8828R	3
ADN	5
H2O	13

Programme de PCR		
35 cycles	Dénaturation	5 min à 95°C
	Dénaturation	30 sec à 95°C
	Hybridation	30 sec à 60°C
	Elongation	2 min à 72°C
	Elongation	7 minutes à 72°C

Tableau 9. Mix et programme pour la PCR de vérification des recombinants.

2. Transfection

La lipofectamine P3000 (ThermoFisher Scientific®, Courtaboeuf France) a été utilisée pour la transfection des recombinants. Cette transfection se base sur la capture des acides nucléiques à l'intérieur de liposome. Les liposomes de par leur charge positive et leur structure lipidique

traversent facilement la membrane plasmique et permettent le transport des acides nucléiques jusqu'au cytoplasme de la cellule.

La transfection a été réalisée sur des plaques 6 puits de cellules HEK 293A. Les cellules HEK 293A sont des lignées cellulaires dérivées des lignées HEK293, cellules embryonnaires rénales d'origine humaine. Elles ont la particularité d'exprimer le gène E1 des HAdV, permettant la production de recombinaants HAdV défectifs.

La transfection a été réalisée selon les recommandations du fournisseur (figure 20). La transfection se produit sous 1 ml de milieu DMEM. Dans un premier tube (1) 125µl d'OptiMEM Medium et 7.5 µl de Lipofectamine 3000 Reagent sont mélangés. Dans un second tube (2) 1 µg de recombinaut (20µl produit digestion par Pac1), 105µl d'OptiMEM Medium et 5µl (de P3000 Reagent sont mélangés. Dans un troisième tube, mélanger 125µl de la dilution de recombinaut (tube 2) avec 125µl de Lipofectamine 3000 Reagent dilué (tube 1) selon un ratio 1:1. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 5 minutes, puis déposé le complexe sur les cellules. **Figure 21.**

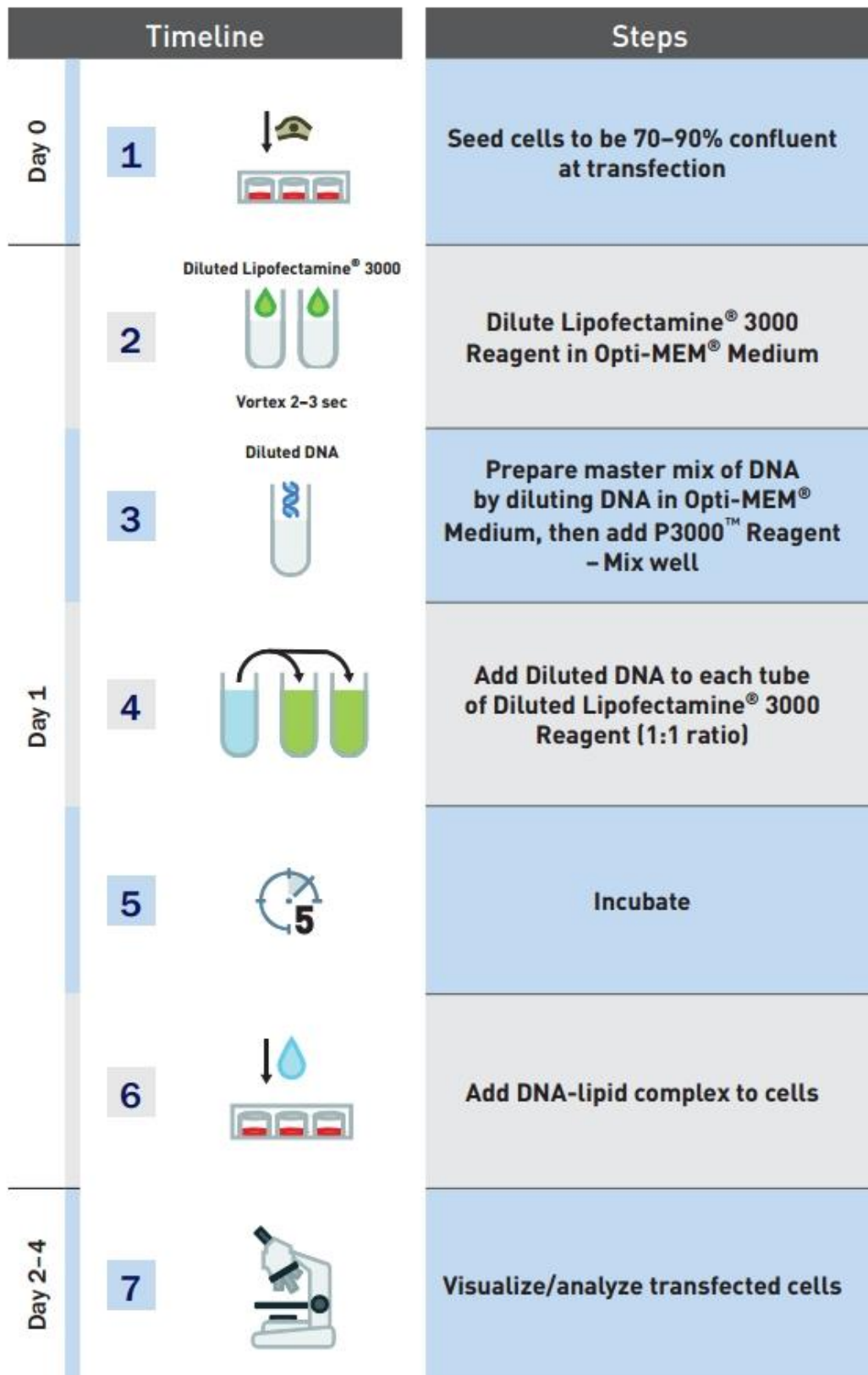


Figure 21. Les différentes étapes de la transfection par la lipofectamine 3000. D'après ThermoFischer Scientific.

3. Production des virus recombinants

Après une transfection attendre 7 jours avant de récolter les cellules et le surnageant afin de faire un premier passage. La récolte est réalisée après une étape de 3 congélations/décongélations successives et une centrifugation à 1300 rpm pendant 10min. 500µl sont ensuite déposés sur un nouveau tapis cellulaire sub-confluent jusqu'à visualisation d'un ECP.

4. Détermination de la sensibilité phénotypique

La CI50 est la concentration d'antiviral nécessaire pour inhiber in vitro la réplication virale de 50%. Une plaque de 48 puits, contenant un tapis cellulaire à 80%-100% de confluence, est utilisée pour déterminer la CI50 au BCV. La plaque est infectée par 100 µL d'inoculum viral, dilué jusqu'à une charge virale correspondant à 4 ou 5 log copies/mL. L'ensemble est incubé pendant 2 heures à 37°C sous 5% de CO₂. Puis le milieu est retiré et 500 µL de différentes concentrations de BCV sont rajoutées : 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0,16 et 0,32 µM. La dilution est réalisée dans du milieu MEM complet avec 2% de sérum de veau fœtal. La plaque est incubée à 37°C sous 5% de CO₂ et sera lysée au bout de 72 heures. La lyse est effectuée en ajoutant 50 µL de tampon de lyse (constitué de Tris HCl (1 M), KCl (1M), MgCl₂ (10 mM), NP40 (4.10-4%, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), Tween 20 (4,5.10-3% Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), Protéinase K (6 µg/mL). La plaque est incubée, dans un bain marie à 56°C pendant 1 heure, puis est centrifugée pendant une minute à 80 g à 4°C, puis 450 µL d'eau stérile sont rajoutés. Les surnageants sont récoltés et quantifiés en PCR temps-réel. La détermination de la CI50 se fait grâce à l'utilisation du logiciel GraphPad Prism[®].

RÉSULTATS

I. Diversité génétique des ADN pol des HAdV de l'espèce C

A. Etude du polymorphisme de l'ADN pol des HAdV C

Nous avons d'abord étudié les fréquences et les positions de polymorphismes dans l'ADN pol, au sein de toutes les espèces HAdV C. La comparaison des gènes de pol de l'ADN de HAdV C de 60 souches cliniques et de 20 souches de référence a montré 356 positions de polymorphisme nucléotidique tout au long de la séquence codante (3597 nt) (9,9%). Parmi ces substitutions nucléotidiques, 102 positions ont donné lieu à des mutations non synonymes (28,0%) représentant 8,7% des codons totaux de la protéine (1198 acides aminés).

B. Polymorphisme nucléotidique

Sur 356 positions nucléotidiques polymorphes, un total de 371 mutations différentes, ont été identifiées dans toutes les souches d'espèces HAdV C (10,3% de la séquence nucléotidique complète) ; 225 mutations pour C1 (6,3%), 227 pour C2 (6,3%) et 101 pour C5 (2,8%). Le nombre de substitutions nucléotidiques par souche HAdV variait de 7 à 51 (moyenne = $23,1 \pm 6,2$) (figure 21) ; 12 à 51 (moyenne = $23,3 \pm 7,0$) pour HAdV C1, 10 à 41 (moyenne = $22,5 \pm 5,9$) pour HAdV C2, 7 à 32 (moyenne = $23,9 \pm 5,4$) pour HAdV C5, **Figure 22 et 23**.

HAdv C

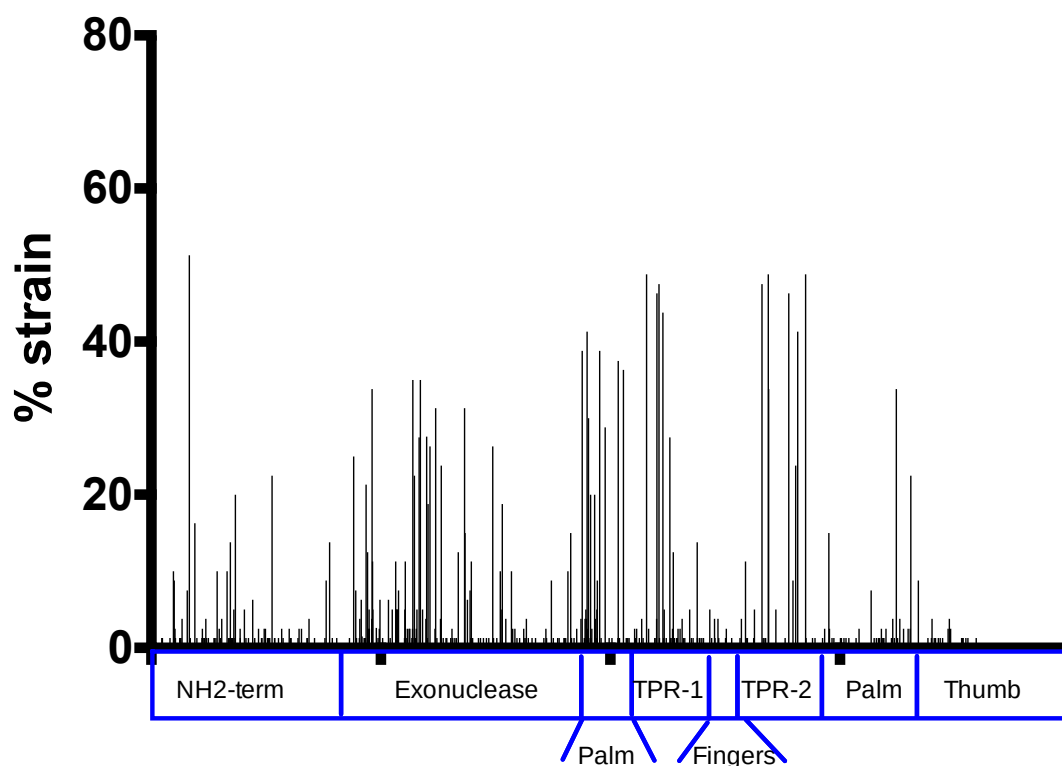


Figure 22. Polymorphisme nucléotidique des HAdv C. Polymorphismes pour toutes les souches de l'espèce HAdv C incluses dans l'étude. Sur l'axe des x, figurent les positions de polymorphismes nucléotidiques dans la séquence codante pour l'ADN pol. Les lignes verticales noires représentent les fréquences des souches avec une mutation pour chaque position de polymorphisme. Les pourcentages correspondants sont donnés sur l'axe y. L'organisation des domaines fonctionnels de la pol représentée par des encadrés bleus est basée sur la description de Hoebe et al, (Hoebe and Uil, 2013).

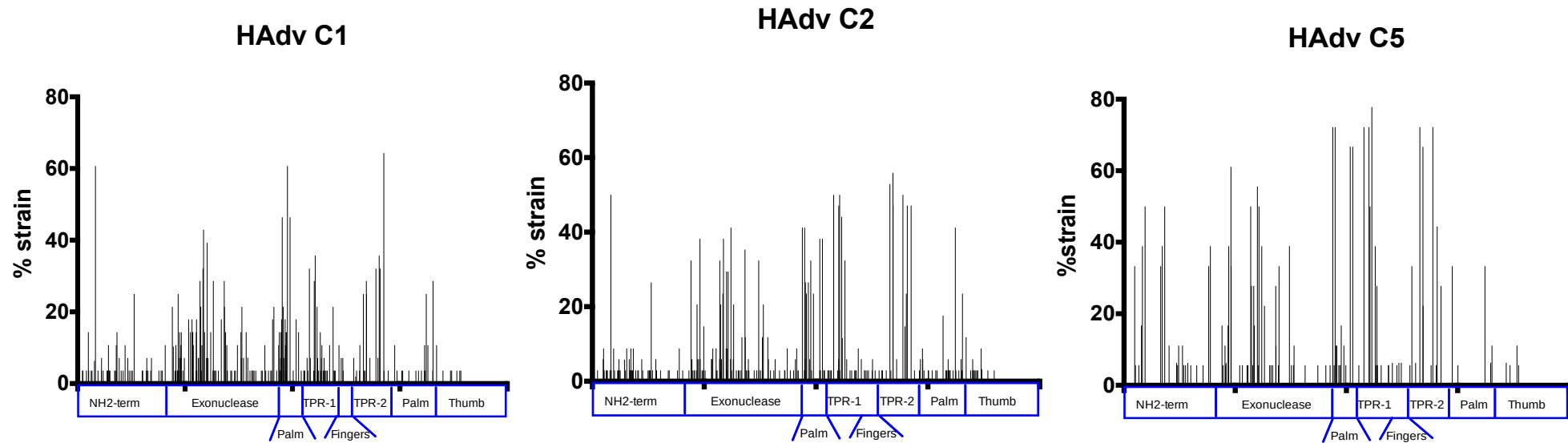


Figure 23. Polymorphisme nucléotidique des HAdV C1, C2 et C5. Polymorphismes nucléotidiques pour chacun des types HAdV C1, C2 et C5 inclus dans l'étude. Sur l'axe des x, figurent les positions de polymorphismes nucléotidiques dans la séquence codante pour l'ADN pol. Les lignes verticales noires représentent les fréquences des souches avec une mutation pour chaque position de polymorphisme. Les pourcentages correspondants sont donnés sur l'axe y. L'organisation des domaines fonctionnels de la pol représentée par des encadrés bleus est basée sur la description de Hoebe et al (Hoebe and Uil, 2013).

En utilisant les séquences nucléotidiques d'ADN pol des HAdV, nous avons construit un arbre phylogénétique comprenant toutes les souches cliniques et les souches de références, **Figure 24**. Aucune des souches cliniques testées dans l'étude n'a eu une séquence identique avec une autre. Cependant, quelques souches cliniques C5 étaient étroitement liées. C5-5 et C5-11 diffèrent par une seule mutation synonyme, C5-10 et C5-2 diffèrent par 11 mutations synonymes et 1 mutation non synonyme. De plus, certaines séquences de référence étaient identiques : C1 AC0000171 et C1 AF53490, cinq séquences C5 (AY339865, AY601635, KF268127, KF429754, AC000008). Les souches des différents types ont été mélangées de façon aléatoire sans qu'aucun cluster formé ne soit lié au type HAdV. Cela montre que le polymorphisme de l'ADN pol HAdV est indépendant du type, contrairement aux gènes très divers codant pour les protéines structurales : hexon et fibre.

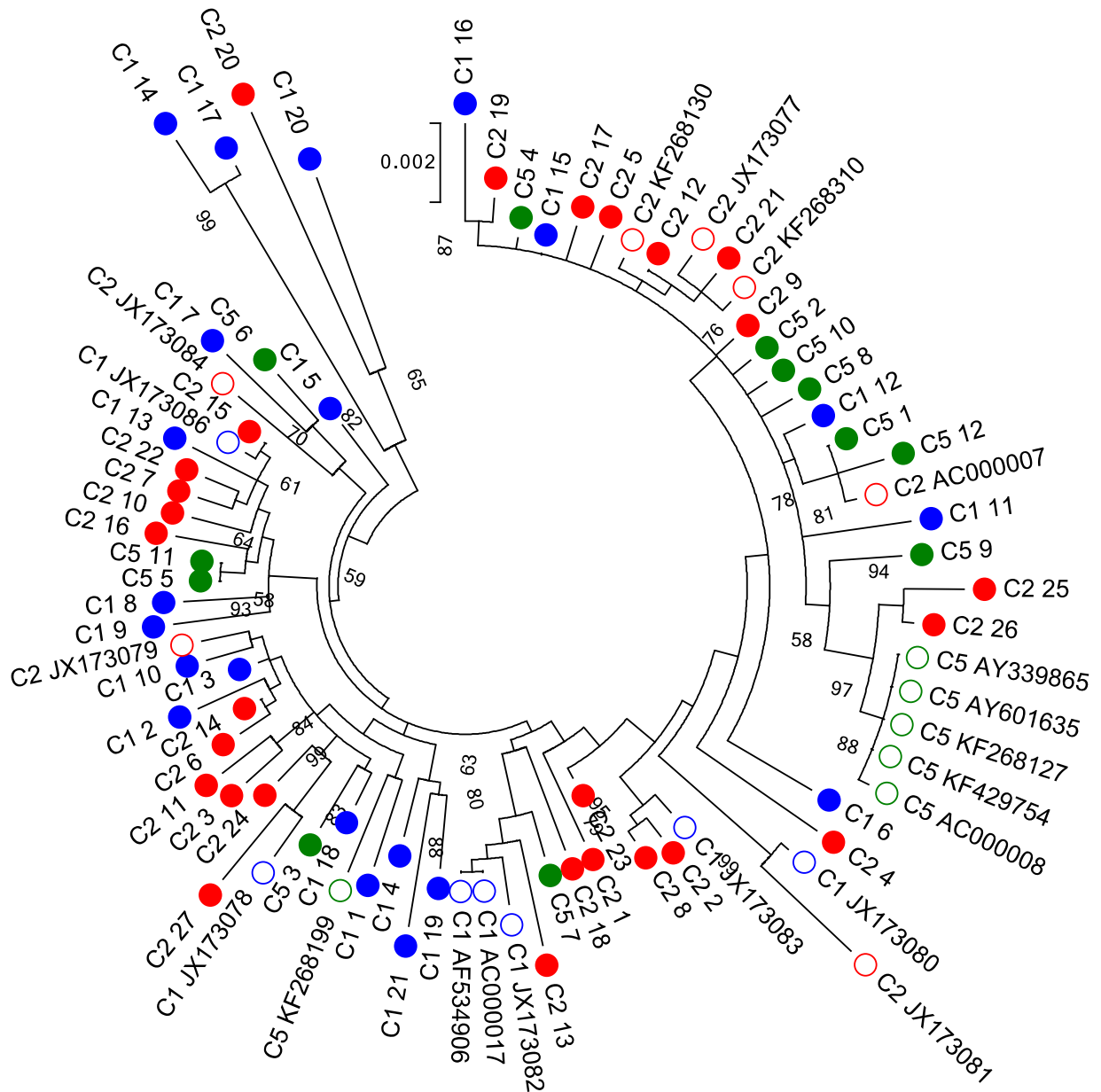


Figure 24. Diversité génétique des 80 ADN pol HAdV C. Les disques représentent les échantillons cliniques testés dans l'étude et les cercles des séquences de références provenant de Genbank. Les HAdV C1 apparaissent en bleu, les C2 en rouge et les C5 en vert. Le meilleur algorithme a été choisi selon la valeur la plus basse du critère d'information bayésienne. L'arbre phylogénétique a ensuite été calculé avec la méthode maximum de vraisemblance sur le modèle Tamura-Nei. Les analyses évolutives ont été menées grâce au logiciel MEGA7.

C. Polymorphisme des acides aminés

Au total, 104 mutations d'acides aminés différentes ont été identifiées dans les 102 positions polymorphes (8,7% de la séquence d'acides aminés complète) ; 51 mutations pour C1 (4,3%), 56 pour C2 (4,7%) et 22 pour C5 (1,8%).

Le nombre de mutations non synonymes par souche d'HAdV d'espèce C variait de 0 à 15 positions (moyenne = $5,2 \pm 2,4$) ; 0 à 13 (moyenne = $4,9 \pm 2,4$) pour HAdV C1 ; 0 à 15 (moyenne = $5,3 \pm 2,5$) pour HAdV C2 ; 0 à 10 (moyenne = $5,7 \pm 2,0$) pour HAdV C5.

La plupart des substitutions d'acides aminés ($n = 63$, 60,6%) ont été observées dans un seul cas. Une minorité de substitutions d'acides aminés ($n = 11$, 13,8%) ont été observées dans plus de 10% de toutes les souches (P33T, G56R, P64S, V176I, V321A, D322N, T405I, V738I, H793R, Q897E, S926T) **tableau 11**.

D. Localisation des substitutions d'acides aminés dans des domaines fonctionnels ADN polymérase

La répartition des substitutions de nucleotides selon les domaines fonctionnels est résumée dans le tableau 11. La plupart des substitutions d'acides aminés ont été détectées dans les domaines de la N-terminale et de l'exonucléase (**figure 25**).

Quarante-six mutations d'acides aminés différentes (44 positions) ont été identifiées dans la région N-terminale, représentant 44,2% de toutes les mutations d'acides aminés identifiées dans l'ADN pol des souches d'espèces HAdV C. Vingt pourcent ($n=9$) des mutations de la région NH2-terminale ont été localisées dans la séquence NLS. Les mutations dans le domaine de l'exonucléase représentaient 27,8% des mutations totales.

Les mutations les plus fréquentes ont été identifiées dans les domaines TPR1 (I738V, 47,5%), TPR2 (S926T, 46,3%), NH2-terminale (G56R, 50,0%) et exonucléase (V321A, 33,8%) (**Tableaux 10 et 11**).

Les substitutions d'acides aminés présentes dans plus de 10% de toutes les souches ont été situées dans le domaine N-terminale (G56R, P64S et V176I), NLS (P33T), exonucléase (V321A, D322N et T405I) et TPR1 (V738I et H793R) et TPR2 (Q897E et S926T) **Figure 25**.

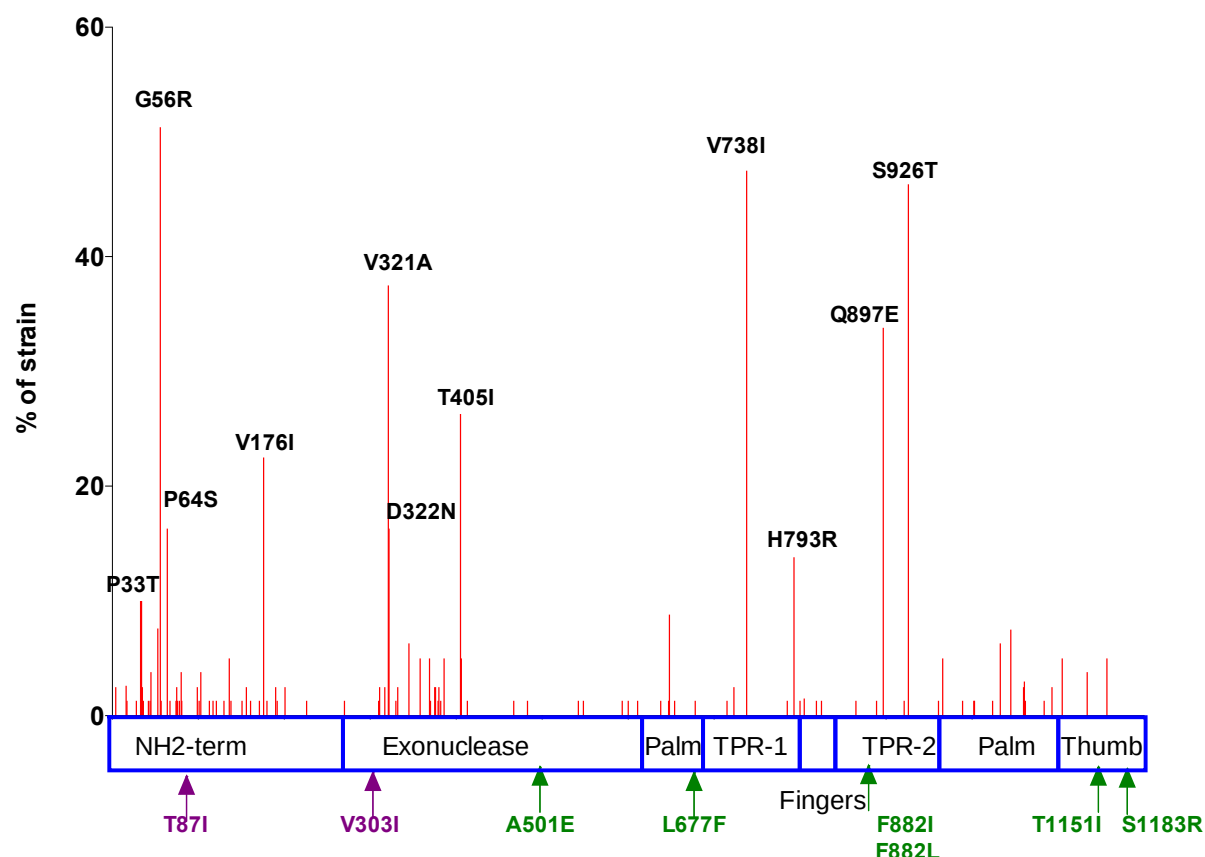


Figure 25. Carte du polymorphisme en acides aminés de l'ADN pol des HAdV C. Sur l'axe des x, figurent les positions de polymorphisme en acides aminés dans la séquence codant l'ADN pol HAdV C. Les fréquences des souches avec chaque mutation sont représentées par des traits verticaux rouges. Les pourcentages correspondants sont donnés sur l'axe y. Les mutations les plus fréquentes, détectées dans plus de 10% des souches, sont indiquées en gras. Les mutations associées à la résistance au brincidofovir (T87I, V303I) sont indiquées en violet et celles associées à la résistance au cidofovir (A501E, L677F, F882I, F882L, T1151I et S1183R) en vert. L'organisation de domaines fonctionnels de l'ADN pol des HAdV est basée sur la description de Hoebe et al. (Hoebe and Uil, 2013). Les différents domaines sont représentés dans des encadrés bleus.

Mutation ²	C ¹ n (%)	C1 n (%)	C2 n (%)	C5 n (%)
V4A	2 (2.5)			2 (11.1)
A16T	1 (1.3)	1 (3.6)		
A16V	1 (1.3)		1 (2.9)	
P17S	1 (1.3)	1 (3.6)		
V28I	1 (1.3)	1 (3.6)		
P33T	8 (10.0)		2 (5.9)	6 (33.3)
R34C	7 (8.8)	4 (14.3)	3 (8.8)	
R34H	1 (1.3)		1 (2.9)	
A35T	2 (2.5)	1 (3.6)		1 (5.6)
A36T	1 (1.3)		1 (2.9)	
A42T	1 (1.3)		1 (2.9)	
R44C	1 (1.3)	1 (3.6)		
R45Q	3 (3.8)	1 (3.6)	1 (2.9)	1 (5.6)
G53S	5 (6.3)	2 (7.1)		3 (16.7)
G53C	1 (1.3)		1 (2.9)	
G56R	41 (50.0)	17 (60.7)	17 (50.0)	7 (38.9)
A57T	1 (1.3)		1 (2.9)	
P64S	13 (16.3)	1 (3.6)	3 (8.8)	9 (50.0)
S67T	1 (1.3)		1 (2.9)	
S74F	1 (1.3)	1 (3.6)		
K75Q	2 (2.5)	2 (7.1)		
D76N	1 (1.3)		1 (2.9)	
P78S	1 (1.3)		1 (2.9)	
A80T	3 (3.8)	1 (3.6)	2 (5.9)	
H81N	1 (1.3)		1 (2.9)	
A99V	2 (2.5)	1 (3.6)	1 (3.2)	
D101N	1 (1.3)	1 (3.6)		
A103T	3 (3.8)		3 (8.8)	
H113Y	1 (1.3)		1 (2.9)	
A117T	1 (1.3)		1 (2.9)	
T121P	1 (1.3)	1 (3.6)		
E130K	1 (1.3)		1 (2.9)	
T136S	4 (5.0)	1 (3.6)	1 (2.9)	2 (11.1)
R138W	1 (1.3)		1 (2.9)	

Mutation ²	C ¹ n (%)	C1 n (%)	C2 n (%)	C5 n (%)
D322E	4 (5.0)	4 (14.3)		
Q330K	1 (1.3)		1 (2.9)	
P332T	2 (2.5)	2 (7.1)		
I345V	5 (6;3)	5 (17.9)		
M358T	4 (5.0)	4 (14.3)		
V369I	4 (5.0)	4 (14.3)		
A370T	1 (1.3)		1 (2.9)	
L375I	2 (7.1)	2 (7.1)		
A376T	2 (2.5)	2 (7.1)		
A379T	1 (1.3)	1 (3.6)		
L380Q	2 (2.5)		2 (5.9)	
E382A	1 (1.3)		1 (2.9)	
S386N	4 (5.0)	3 (10.7)		1 (5.6)
T405I	21 (26.3)	2 (7.1)	10 (29.4)	9 (50.0)
I413M	1 (1.3)	1 (3.6)		
R467H	1 (1.3)		1 (2.9)	
D483N	1 (1.3)		1 (2.9)	
D542N	1 (1.3)	1 (3.6)		
E548Q	1 (1.3)	1 (3.6)		
N593H	1 (1.3)	1 (3.6)		
A600T	1 (1.3)	1 (3.6)		
D611N	1 (1.3)		1 (2.9)	
E638Q	1 (1.3)		1 (2.9)	
P647H	1 (1.3)	1 (3.6)		
D648E	7 (8.8)	4 (14.3)	2 (5.9)	1 (5.6)
H654Y	1 (1.3)		1 (2.9)	
R678K	1 (1.3)		1 (2.9)	
A715T	1 (1.3)	1 (3.6)		
Q723K	2 (2.5)	2 (7.1)		
I738V	40 (50.0)	10 (35.7)	17 (72.2)	13 (72.2)
L785M	1 (1.3)		1 (2.9)	
H793R	10 (12.5)	6 (21.4)	3 (8.8)	1 (5.6)
T800A	1 (1.3)	1 (3.6)		
A819V	1 (1.3)		1 (2.9)	

Mutation ²	C ¹ n (%)	C1 n (%)	C2 n (%)	C5 n (%)		Mutation ²	C ¹ n (%)	C1 n (%)	C2 n (%)	C5 n (%)
V151I	1 (1.3)		1 (1.3)			D825N	1 (1.3)	1 (3.6)		
R156Q	2 (2.5)	2 (7.1)				A865V	1 (1.3)		1 (2.9)	
D161E	1 (1.3)			1 (5.6)		S889C	1 (1.3)	1 (3.6)		
V171L	1 (1.3)	1 (3.6)				Q897E	27 (33.8)	7 (25.0)	16 (47.1)	4 (22.2)
V176I	18 (22.5)	7 (25.0)	9 (26.5)	2 (11.1)		P921R	1 (1.3)			1 (5.6)
E180K	1 (1.3)			1 (5.6)		S926T	39 (48.8)	9 (32.1)	17 (50.0)	13 (72.2)
E190K	2 (2.5)		2 (5.9)			D961N	1 (1.3)		1 (2.9)	
E192K	1 (1.3)	1 (3.6)				S989T	1 (1.3)		1 (2.9)	
E201K	2 (2.5)	1 (3.6)		1 (5.6)		E1002K	1 (1.3)		1 (2.9)	
H226Q	1 (1.3)		1 (2.9)			D1003Y	1 (1.3)		1 (2.9)	
G270S	1 (1.3)		1 (2.9)			R1024Q	1 (1.3)		1 (2.9)	
E310D	1 (1.3)	1 (3.6)				E1046K	6 (7.5)		6 (17.6)	
P311S	1 (1.3)		1 (2.9)			G1061R	2 (2.5)		2 (5.9)	
P311L	1 (1.3)	1 (3.6)				A1062D	1 (1.3)		1 (2.9)	
R317Q	2 (2.5)		2 (5.9)			S1084N	1 (1.3)		1 (2.9)	
V321L	3 (3.8)	2 (7.1)	1 (2.9)			S1093F	1 (1.3)		1 (2.9)	
V321A	27 (33.8)	3 (10.7)	13 (38.3)	11 (61.1)		T1134I	3 (3.8)	1 (3.6)	2 (5.9)	
D322N	9 (11.3)	1 (3.6)	2 (5.9)	6 (33.3)						

Tableau 10. Polymorphisme en acides aminés des 80 ADN pol HAdV C de l'étude.

¹ Tous les polymorphismes d'acides aminés détectés dans toutes les souches cliniques d'espèces HAdV C sont donnés. Le pourcentage indique le nombre de souches cliniques avec la mutation sur le nombre total de souches cliniques.

² La première lettre indique l'acide aminé le plus courant (défini comme le consensus des 80 séquences, généré par Geneious) sur toutes les séquences d'espèces C. Le nombre indique la position des acides aminés dans la séquence codante de l'ADN pol. La deuxième lettre indique les acides aminés différents du consensus et considérés comme du polymorphisme.

	Sequence	Mutations				souches ⁴ (n, %)		Taux de substitutions en aa (%) ⁵	Pvalue
		C ²	C1 ²	C2 ²	C5 ²				
		(n, %)	(n, %)	(n, %)	(n, %)				
NH2 terminal	1 to 272	46 (44.2)	20 (39.2)	31 (55.3)	12 (54.5)	40	50.0	16.9	0.0003
NLS	25 to 46	9 (8.7)	4 (7.8)	7 (12.5)	3 (13.6)	13	16.3	42.9	0.1454
Exonuclease	273 to 621	29 (27.9)	19 (37.3)	13 (23.2)	4 (18.2)	33	41.3	8.3	0.0003
Exo I	276 to 293	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0.0	0.0	NA
Exo II	413 to 427	1 (1.0)	1 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	4.3	7.1	0.2231
Exo III	575 to 588	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0.0	0.0	NA
Palm1	622 to 695	5 (4.8)	2 (3.9)	4 (7.1)	1 (4.5)	7	8.9	6.8	0,1534
Palm2	971 to 1109	9 (8.7)	0 (0.0)	9 (16.1)	0 (0.0)	9	11.3	6.5	<0.0001
Fingers	809 to 848	2 (1.9)	1 (2.0)	1 (1.8)	0 (0.0)	2	2.5	5.1	0.4724
TPR1	696 to 808	6 (5.8)	5 (9.8)	3 (5.4)	2 (9.1)	50	62.5	5.4	0.2070
TPR2	849 to 970	6 (5.8)	3 (5.9)	4 (7.1)	3 (13.6)	47	58.8	5.0	0.7985
Thumb	1110 to 1198	1 (1.0)	1 (2.0)	1 (1.8)	0 (0.0)	3	3.8	1.1	0.2231

Tableau 11. Substitutions d'acides aminés selon les différents domaines fonctionnels de l'ADN polymérase HAdV.

¹Domaine fonctionnel tel que décrit par Hoebe et al, par comparaison avec l'ADN pol du bactériophage Phi 29 (Hoebe et al, 2013).

² Nombre de mutations différentes identifiées dans chaque domaine sur toutes les souches de l'espèce C séquencées. Chaque mutation est comptée une fois quel que soit le nombre de souches avec la mutation. Le pourcentage (%) indique le nombre de mutations dans chaque domaine sur le total des mutations identifiées dans l'ensemble de l'ADN pol (n = 104) pour toutes les souches HAdV de l'espèce C séquencées dans l'étude. Certaines mutations peuvent être considérées deux fois lorsqu'elles sont présentes dans des domaines qui se chevauchent. Sur 104 mutations, 14 sont présentes dans différents domaines. Le pourcentage total est donc supérieur à 100%.

³ Le nombre (n) de souches, avec au moins une mutation dans chaque domaine est donné. Le pourcentage indique le nombre de souches avec au moins une mutation dans chaque domaine sur le total des souches HAdV C incluses dans l'étude (80). Certaines mutations peuvent être considérées deux fois lorsqu'elles sont présentes dans des domaines qui se chevauchent. Sur les 87 mutations, 10 sont présentes dans différents domaines. Le pourcentage total est donc supérieur à 100%.

⁴ Le taux de substitution des acides aminés par domaine indique le nombre de mutations sur le total des acides aminés dans chaque domaine.

⁵ Pvalues calculés par le test chi-carré

Même si les mutations dans le domaine de l'exonucléase étaient fréquentes, un seul a été identifié dans les régions conservées : I413M dans l'exo II. Deux mutations (E1002K et O1003Y), chacune détectée une fois dans deux souches HAdV C2 différentes, ont été trouvées dans le site actif (région 3) du domaine des « Palm ». Une mutation (A865V), détectée dans une souche HAdV C2, dans le domaine TPR2 était située dans le motif B impliqué dans la reconnaissance de la paire de bases (Delarue et al., 1990; Knopf, 1998).

La proportion de mutations serait différente selon les domaines (test du Chi-carré, $p < 0,0001$). Les mutations dans les domaines N terminales (36,4%), exonucléase (26,0%) et le TPR (30,0%) étaient significativement plus fréquentes que dans d'autres domaines. Les domaines TPR présentaient un nombre limité de positions polymorphes (5,4% et 5,0% respectivement pour TPR1 et TPR2). À l'inverse, la fréquence des souches avec un polymorphisme dans les domaines TPR était élevée (62,5 et 58,8 dans TPR1 et TPR2 respectivement) (**tableau 11**). Des mutations rares ont été observées dans des régions hautement conservées (Exo I, II, II, régions 1-5 et motifs A, B, C) (**tableau 11**).

E. Différences entre les types et les domaines

Dans les souches HAdV C1, 20 substitutions d'acides aminés ont été localisées dans la région NH2-terminale de la protéine (39,2%), dont 4 dans le NLS (7,8%). Dix-neuf étaient situées dans le domaine de l'exonucléase (37,2%). Cinq mutations ont été localisées dans le domaine TPR1 (9,8%), 3 dans le domaine TPR2 (5,9%), 1 dans le domaine fingers (2,0%), 2 dans le domaine palm (3,9%) et 1 dans le domaine thumb (2,0 %).

Aucune mutation ne se trouvait dans les régions les plus conservées (Dufour et al., 2000). Dans les souches HAdV C2, 31 substitutions d'acides aminés ont été localisées dans la région NH2-terminale de la protéine (47,0%), dont 7 dans le NLS (13,6%). Treize ont été situées dans le domaine de l'exonucléase (19,7%). Trois étaient situées dans le domaine TPR1 (4,5%), 4 dans le domaine TPR2 (6,0%), 13 dans le domaine palm (19,7%) dont deux : E1002K et O1003Y concernent le site actif. Une mutation était dans le domaine thumb (1,5%) et une dans le domaine fingers (1,5%).

Pour l'HAdV C5, 12 substitutions d'acides aminés étaient situées dans la région terminale NH2 de la protéine (54,5%), dont 3 dans le NLS (12,0%). Quatre étaient situées dans le domaine de l'exonucléase (18,2%) et aucune mutation n'était située dans les domaines conservés de l'exonucléase : exo I, exo II et exo III. Deux étaient situées dans le domaine TPR1 (9,0%), 43 dans le domaine TPR2 (13,6%) et 1 dans le domaine palm (4,5%). Aucune mutation n'a été détectée dans thumb et fingers.

Il n'a pas été observé de différence significative entre les souches C1, C2 et C5 dans la fréquence de substitution en fonction du domaine fonctionnel, à l'exception du domaine Palm2 avec des mutations observées uniquement chez les souches C2 (**tableau 11**).

F. Mutations de l'ADN pol des HAdV C associées à la résistance au CDV ou au BCV

Certaines mutations dans l'ADN pol ont été associées à une résistance aux inhibiteurs de la pol d'ADN, celles associées aux BCV (V303I et T87I) et celles associées au CDV (A501E, L677F, F882L, T1151I, S1183R). Aucune d'entre elles n'a été détectée dans les souches analysées dans l'étude. De plus, aucun polymorphisme n'est observé à ces positions. D'autres mutations (H81N, V89I, A117T, R138W, R1024Q, S1093F, L319P, Q618STP, I670T, M698V, V935L, L1172F) ont été décrites dans des souches HAdV C isolées de patients présentant un échec de traitement par BCV dans des essais cliniques, mais leur impact sur l'activité de l'ADN pol ou la susceptibilité aux inhibiteurs de l'ADN pol n'a pas encore été étudié (Lanier, 2015). Aucune de ces mutations n'a été détectée dans notre analyse.

II. Description moléculaire d'une épidémie d'HAdV C chez des enfants greffés de CSH

A. Patients

Entre la semaine 38 et la semaine 52, 8 infections à HAdV C se sont déclarées : 5 infections à HAdV C2 (patients ALR, DM, MBP, MC et SE) et 3 infections à HAdV C1 (patients BOU, FLO et FUL). Les patients MC et MBP n'ont pas pu être inclus dans l'étude car leur charge virale était trop faible et n'a pas permis la mise en culture et le séquençage. Parmi ces infections, 4 étaient des infections disséminées toutes menant à des décès (patients DM, BOU, FLO et FUL) **Figure 26**.

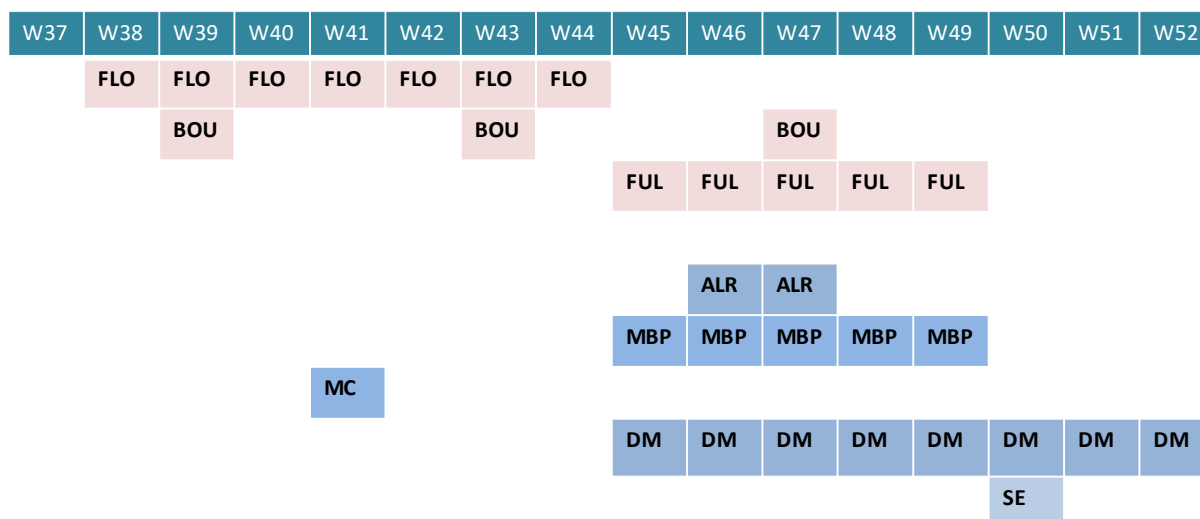


Figure 26. Les différentes infections à HAdV C de la semaine S38 à S50. Les infections à HAdV C1 sont représentées en rouge et les infections à HAdV C2 en bleu.

Pour une interprétation correcte des arbres phylogénétiques, des patients contrôles infectés par HAdV C1 et C2 ont été inclus :

- Des patients de l'unité de greffe pédiatrique mais infectés hors de la période d'épidémie (**GUEY, BOC pour les HAdV C1 ; KH, KL2 pour les HAdV C2**)
- Des patients adultes (**patients DIAC, GULC, BARC et MILC pour les HAdV C1**)
- Des séquences de référence HAdV C1 et C2, provenant de Genbank (JX173086, AC000017, AF534906 pour les HAdV C1 ; KF268310, KF268130, AC000007, ADRCG, NC001405 pour les HAdV C2 ; AC000008, AY601635 pour les HAdV C5 ; LC068718, LC68720, HQ413315 pour les HAdV C6). Un prélèvement de l'environnement, un

écouvillonnage du pèse bébé provenant de la chambre du patient DM, a également été inclus dans l'étude.

- Deux prélèvements à des périodes distinctes, espacés de plus de 6 mois provenant de ALR ont été analysés. Un prélèvement pendant l'épidémie : ALR2 et un prélèvement post-épidémie ALR1.

B. Analyse de la diversité des HAdV C

L'analyse de la diversité du génome complet a été un préalable nécessaire afin de déterminer les gènes candidats à séquencer lors d'épidémies d'infections à HAdV C. Elle a été réalisée sur 30 génomes de référence de GeneBank : 8 HAdV C1 (AF534906, JX173082, JX173078, JX173083, JX 173085, JX173086, JX173080 et AC00017), 7 HAdV C2 (JX173077, KF268310, KF268130, J01917, JX173084, JX173082, JX173081) 5 HAdV C5 (AC000008, AY601635, AY339865, KF268127, KF429754), 9 HAdV C6 (HQ413315, LC068712, LC068714, LC068715, LC068716, L068717, LC068718, LC068719, LC068729) et deux virus recombinants d'espèce C décrits récemment : un HAdV C57 (HQ003817) et le virus CBJ113 (KR699642) (Walsh et al., 2011; Wang et al., 2016). Nous avons réalisé une analyse Bootscan des HAdV C (logiciel Simplot). L'analyse a été réalisée en intertype (intra espèce) et en intratype. Le calcul des p-distances, représentant une estimation de la distance entre plusieurs séquences a été déterminé pour chaque gène.

1. Analyse de la diversité en intertype

L'analyse Bootscan des HAdV C en intertype révèle une diversité au niveau des gènes Hexon, fibre et E3, **Figure 27**.

La p-distance en analyse intertype montre une variabilité significative pour les gènes codant pour l'hexon : 10,0%, le gène codant pour la fibre 18,8% et le gène E3. **Tableau 12**.

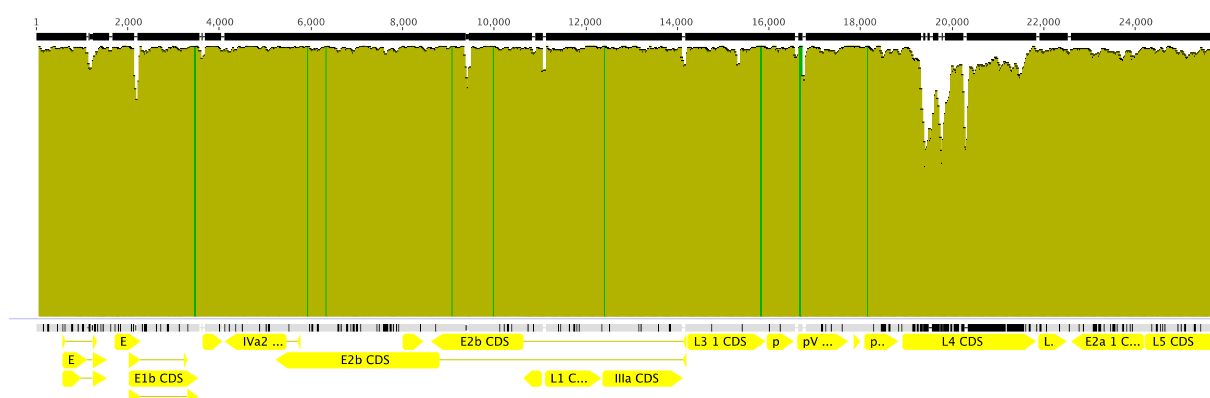


Figure 27. Analyse de la diversité des HAdV C en intertype. Analyse Bootscan du génome complet à partir des 24 séquences de référence HAdV C. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Simplot suivant les paramètres : fenêtre : 1000 pdb ; pas : 200 pdb ; 100 réplicats ; modèle de distance : Kimura ; modèle des arbres : neighbor-joining. La cartographie du génome complet correspondant à l'échelle de l'analyse Bootscan, est présente au bas de la figure pour identifier les zones de variabilité. De haut en bas, la séquence consensus, l'identité (vert : 100%, vert clair entre 30 et 100%, rouge : moins de 30%), la cartographie du génome complet.

L'analyse Bootscan des HAdV C en intertype révèle une diversité au niveau des gènes codant pour l'Hexon, la fibre et E3.

	Génome complet	Hexon (gène L3)	DNApol (gène E2B)	Fibre (gène L5)	Penton (gène L2)	E3
HAdV C	3,4%	10,0%	0,8%	18,8%	0,6%	9,3%

Tableau 12. P-distances pour les génomes complets. Les gènes Hexon, DNA pol, Fibre, Penton et E3 calculées pour tous les HAdV C.

2. Analyse de la diversité en intratype

a) Analyse des HAdV C1

Les valeurs des p-distances sont très faibles (<1%) en intra HAdV C1, les génomes au sein des HAdV C1 sont très conservés sauf pour le gène E3. Le gène E3 possède la plus grande diversité en analyse intra HAdV C1 par rapport aux autres gènes. Pour le gène E2B codant l'ADN pol, la p-distance entre les HAdV C1 est faible (<1%) mais elle est plus élevée que les gènes dits variables de la capsid. **Figure 28 et Tableau 13.**

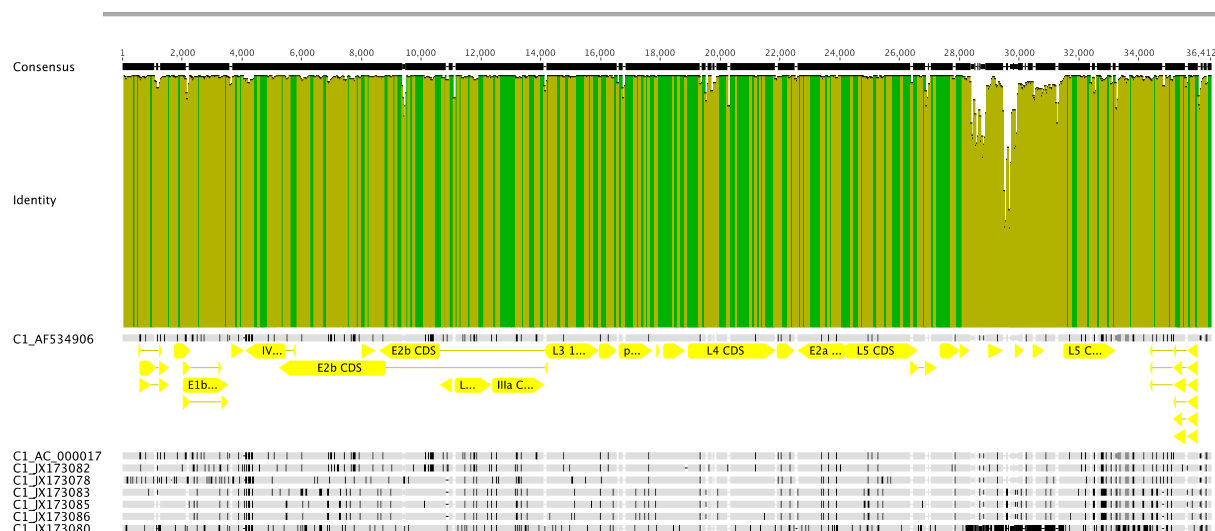


Figure 28. Analyse de la diversité des HAdV C1. Analyse Bootscan du génome complet à partir des 8 séquences de référence HAdV C1. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Simplot suivant les paramètres : fenêtre : 1000 pdb ; pas : 200 pdb ; 100 répliquats ; modèle de distance : Kimura ; modèle des arbres : neighbor-joining. De haut en bas, la séquence consensus, l'identité (vert : 100%, vert clair entre 30 et 100%, rouge : moins de 30%), la cartographie du génome complet et l'alignement des 8 séquences C1 de référence.

	Génome complet	Hexon (gène L3)	ADN pol (gène E2B)	Fibre (gène L5)	Penton (gène L2)	E3
HAdV C1	0,7%	0,2%	0,7%	0,6%	0,6%	4,0%

Tableau 13. P-distances pour les génomes complets, les gènes Hexon, DNA pol, Fibre, Penton et E3 calculées pour les HAdV C1.

b) Analyse des HAdV C2

Nous obtenons les mêmes résultats que pour l'analyse des HAdVC1, les génomes en intra HAdVC2 sont très conservés. De plus, le calcul des p-distances en analyse intra HAdV C2 montre une variabilité plus importante pour le gène E3. Le gène E2B est quant à lui plus variable que les gènes codant pour les protéines de la capside. **Figure 29 et tableau 14.**

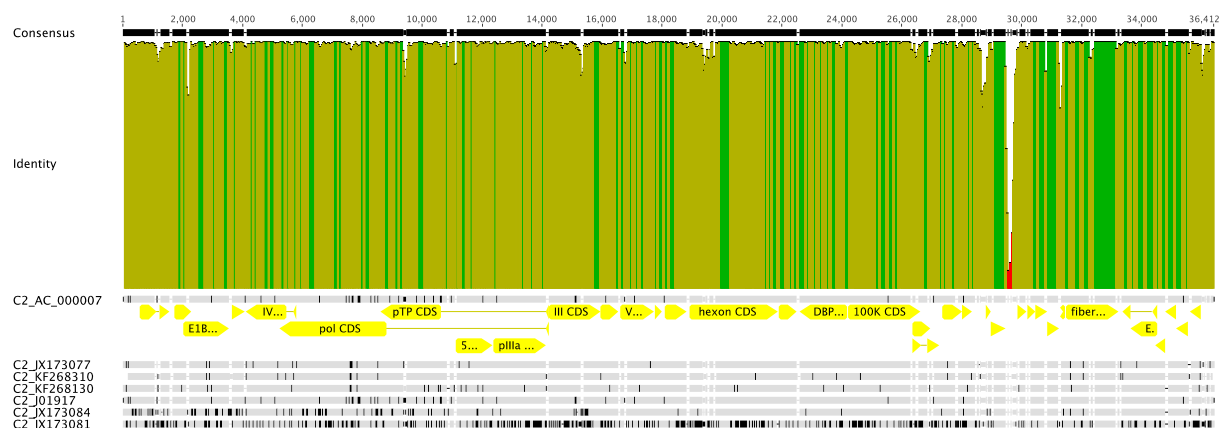


Figure 29. Analyse de la diversité des HAdV C2. Analyse Bootscan du génome complet à partir des 7 séquences de référence HAdV C2. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Simplot suivant les paramètres : fenêtre : 1000 pdb ; pas : 200 pdb ; 100 réplicats ; modèle de distance (Kimura) ; modèle des arbres (neighbor-joining). De haut en bas, la séquence consensus, l'identité (vert :100%, vert clair entre 30 et 100%, rouge : moins de 30%), la cartographie du génome complet et l'alignement des 7 séquences C2 de référence.

	Genome complet	Hexon (gène L3)	ADN pol (gène E2B)	Fibre (gène L5)	Penton (gène L2)	E
HAdV C2	0,6%	0,7%	0,8%	0,2%	0,2%	4,1%

Tableau 14. P-distances pour les génomes complets, les gènes Hexon, DNA pol, Fibre et Penton calculées pour les HAdV C2.

c) Analyse des HAdV C5

Les résultats montrent que les HAdV C5 sont extrêmement conservés, plus conservés que les HAdV C1 et C2. L'analyse des p-distances sur les HAdV C5 montre une variabilité de l'ordre de 0,0 à 0,1% entre les 5 séquences de référence. **Figure 30 et tableau 15.**

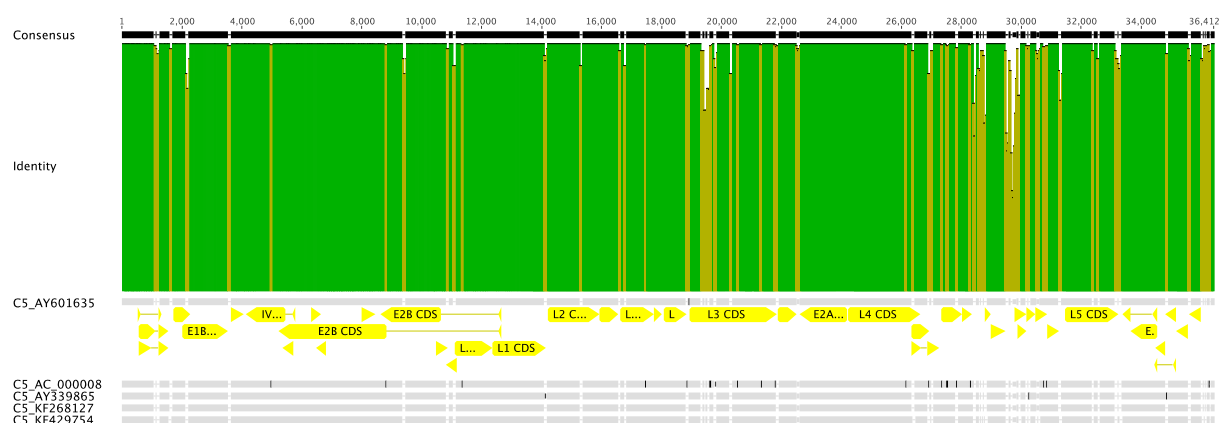


Figure 30. Analyse de la diversité des HAdV C5. Analyse Bootscan du génome complet à partir des 5 séquences de référence HAdV C5. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Simplot suivant les paramètres : fenêtre : 1000 pdb ; pas : 200 pdb ; 100 réplicats ; modèle de distance : Kimura ; modèle des arbres : neighbor-joining. De haut en bas, la séquence consensus, l'identité (vert :100%, vert clair entre 30 et 100%, rouge : moins de 30%), la cartographie du génome complet et l'alignement des 5 séquences C5 de référence.

	Genome complet	Hexon (gène L3)	ADN pol (gène E2B)	Fibre (gène L5)	Penton (gène L2)	E3
HAdV C5	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%

Tableau 15. P-distances pour les génomes complets, les gènes Hexon, DNA pol, Fibre, Penton et E3 calculées pour les HAdV C5.

d) Analyse des HAdV C6

Pour les HAdV C6, l'analyse des p-distances révèle une diversité plus importante sur le gène E3. Le gène codant pour l'ADN pol montre une diversité aussi importante que le penton et la fibre et plus importante que l'hexon. **Figure 31 et tableau 16.**

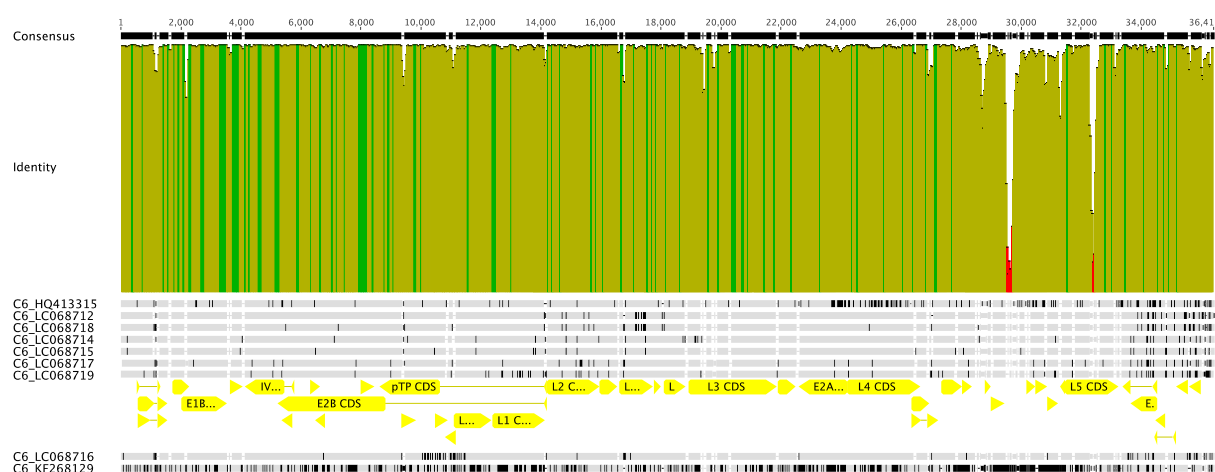


Figure 31. Analyse de la diversité des HAdV C6. Analyse Bootscan du génome complet à partir des 9 séquences de référence HAdV C6. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Simplot suivant les paramètres : fenêtre : 1000 pdb ; pas : 200 pdb ; 100 répliquats ; modèle de distance : Kimura ; modèle des arbres : neighbor-joining. De haut en bas, la séquence consensus, l'identité (vert : 100%, vert clair entre 30 et 100%, rouge : moins de 30%), la cartographie du génome complet et l'alignement des 9 séquences C6 de référence.

	Genome complet	Hexon (gène L3)	ADN pol (gène E2B)	Fibre (gène L5)	Penton (gène L2)	E3
HAdV C6	0,3%	0,4%	0,6%	0,6%	0,6%	5,4%

Tableau 16. P-distances pour les génomes complets, les gènes Hexon, DNA pol, Fibre, Penton et E3 calculées pour les HAdV C6.

e) Conclusion

L'analyse de la diversité des HAdV C en intra type montre que les génomes en intra-type sont très conservés. Le gène E3 est le gène présentant la diversité la plus importante. L'ADN

pol est un gène conservé mais présente une diversité plus importante que les gènes codant pour les protéines de la capsid, l'hexon, la fibre et le penton. Lors d'une épidémie à HAdV C, l'analyse de l'ADN pol peut apparaître pertinente pour discriminer les souches.

C. Analyse du gène codant pour l'ADN pol

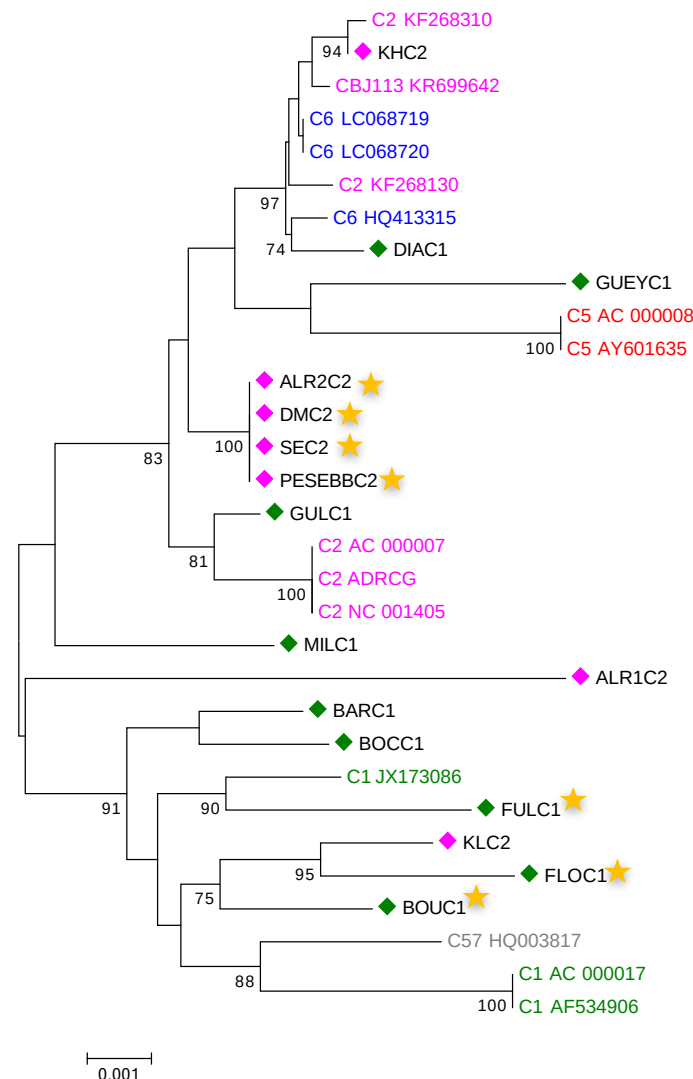


Figure 32. Arbre phylogénétique du gène codant pour l'ADN pol. Les patients infectés par l'HAdV C1 sont identifiés par un losange vert, les patients infectés par l'HAdV C2 sont identifiés par un losange rose et ceux infectés pendant l'épidémie par une étoile jaune. L'alignement des séquences a été effectué avec le logiciel MAFT. L'analyse phylogénétique a été réalisée avec MEGA 5 (Tamura and Nei, 1993). Le meilleur algorithme a été choisi par le critère du score BIC (Bayesian Information Criteria) le plus faible ; l'arbre phylogénétique a été ensuite calculé avec la méthode de « maximum likelihood » et optimisé. La solidité statistique des nœuds a été estimée par la méthode de Bootstrap.

Au vu des précédents résultats, nous avons dans un premier temps entrepris l'analyse de l'ADN pol. L'analyse du gène codant l'ADN pol, montre que les séquences des patients HAdV C2 ALR2, SE et DM et son père bébé, s'associent de façon significative entre eux et aucun patient non épidémique ne se trouve dans ce cluster. Ceci suggère une possible transmission

nosocomiale entre les patients ALR2, SE et DM. Les patients HAdV C1 FUL, FLO et BOU ne s'associent également pas entre eux et seraient donc des cas indépendants, **Figure 32**.

Ces résultats sont en accord avec les données de localisation des patients infectés par les HAdV C1 et C2. En effet, les patients C2 : B, C et N, étaient situés dans des chambres proches, notamment pour DM et ALR à la semaine 46 et DM et SE à la semaine 50, leurs chambres partageaient un sas commun. Alors que les patients HAdV C1 étaient dans des chambres éloignées pendant l'épidémie les semaines 43 et 47. Ces données confirment l'indépendance des cas C1 et le lien épidémiologique pouvant exister entre les cas C2. **Figure 33**. Grâce à l'étude des séquences codant l'ADN pol, nous avons pu mettre en évidence une transmission nosocomiale et discriminer des souches appartenant à un même type.

Concernant le patient ALR, les séquences codant pour l'ADN pol, ALR1 et ALR2 sont différentes suggérant que le patient a été infecté par deux virus HAdV C2 différents.

L'analyse de l'arbre phylogénétique confirme nos précédents résultats sur l'étude du polymorphisme naturel de l'ADN pol en montrant également que les séquences codant pour l'ADN pol ne s'associent pas en fonction type : des séquences de référence C2 s'associent avec du C6, la séquence du patient C1 GUEY s'associe avec des séquences de référence C5.

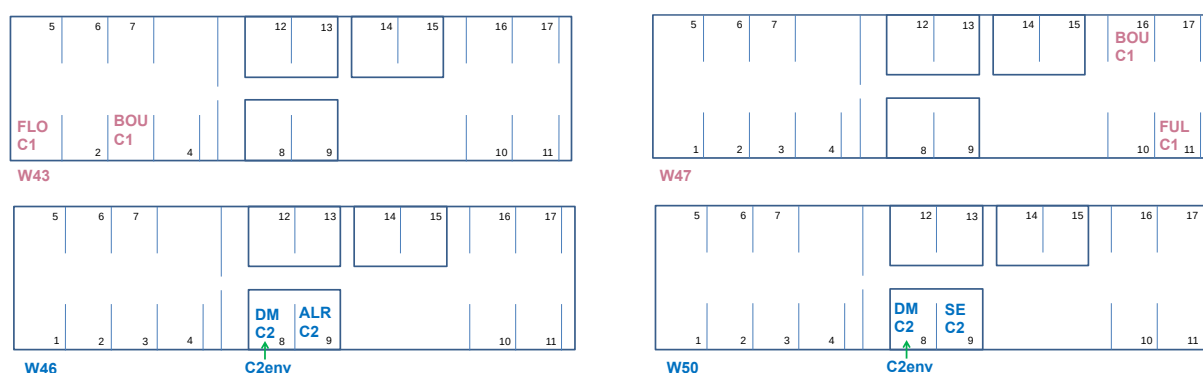


Figure 33. Localisation des patients HAdV C1 et C2 pendant l'épidémie au sein de l'unité de greffe pédiatrique. Chaque rectangle est une représentation simplifiée du plan de l'unité de greffe pédiatrique. Les chambres 12 et 13 ; 14 et 15 ; 8 et 9 sont des chambres partageant un sas commun. En rouge les patients infectés par l'HAdV C1 et en bleu les patients infectés par l'HAdV C2.

D. Analyse du génome complet

Nous avons voulu confronter les données obtenues sur le gène de l'ADN pol aux données du séquençage du génome complet.

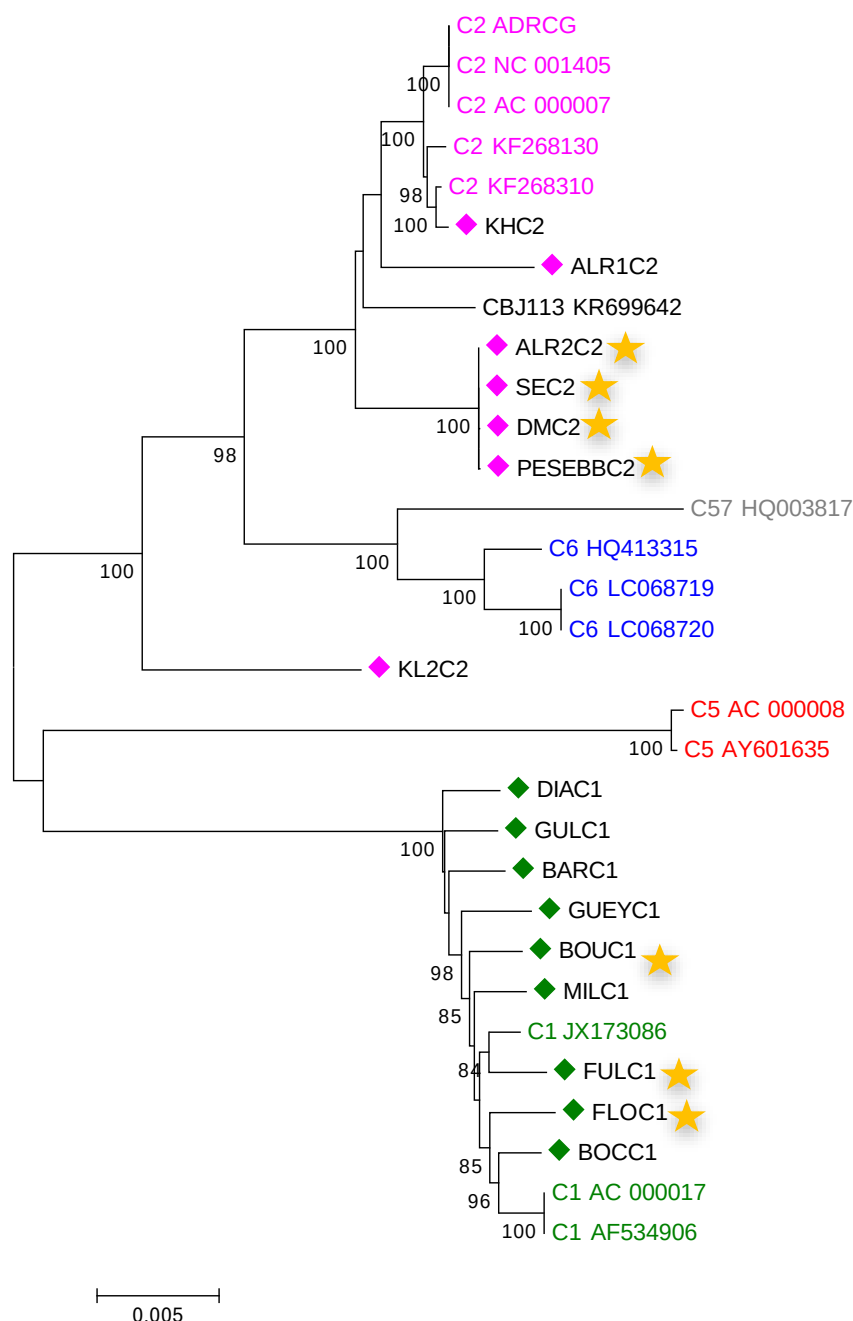


Figure 34. Arbre phylogénétique du génome complet des HAdV C. Les patients infectés par l'HAdV C1 sont identifiés par un losange vert, les patients infectés par l'HAdV C2 sont identifiés par un losange rose et ceux infectés pendant l'épidémie par une étoile jaune. L'alignement des séquences a été effectué avec le logiciel MAFT. L'analyse phylogénétique a été réalisée avec MEGA 5 (Tamura and Nei, 1993). Le meilleur algorithme a été choisi par le critère du score BIC (Bayesian Information Criteria) le plus faible ; l'arbre phylogénétique a été ensuite calculé avec la méthode de « maximum likelihood » et optimisé. La solidité statistique des nœuds a été estimée par la méthode de Bootstrap.

Les données sont en accord avec celles obtenues sur l'ADN pol. Les patients HAdV C2 ALR2, SE et DM et son père bébé s'associent en cluster suggérant une transmission nosocomiale entre ces patients. L'arbre ne montre également pas de lien entre les patients HAdV C1 FUL, FLO et BOU, **Figure 34**.

Les séquences des génomes des virus HAdV C2 ALR1 et ALR2 sont différentes confirmant que le patient ALR a été infecté par deux virus différents.

Il est intéressant de noter que le patient KL, se distingue très nettement des clusters HAdV C1, C2, C5 et C6. Il est situé entre le cluster formé par les HAdV C5 et les clusters formés par les HAdV C2 et C6. Le variant du patient KL, pourrait être un recombinant, une analyse plus poussée de son génôme s'avère nécessaire, **Figure 34**.

E. Analyse des gènes codant pour les protéines structurales

Nous nous sommes également intéressés à la l'analyse des gènes codant pour la fibre, l'hexon et le penton. Les gènes codant pour l'hexon et la fibre sont connus pour être variables, une analyse de ces gènes pourrait également avoir un rôle. Une variabilité a également été observée pour les gènes codant pour les protéines structurales, nous nous sommes ainsi, intéressés à l'analyse de ces gènes.

1. Analyse du gène codant pour l'hexon

On retrouve l'association des patients liés HAdV C2 ALR2, SE et DM et son père bébé, néanmoins concernant les HAdV C1, sur ce gène, la distinction des cas avérés indépendants est moins nette. Contrairement à l'ADN pol, les séquences s'associent en type, les patients HAdV C1 et les séquences de références C1 forment un cluster distinct ainsi que les patients HAdV C2 avec les séquences de références C2.

Pour le variant KL, de façon identique à l'analyse phylogénétique du génome complet, il se distingue des autres clusters formés par les HAdVC1, C2, C5 et C6. Le variant KL semble plus proche des HAdV C2. **Figure 35**.

2. Analyse du gène codant pour la fibre

L'analyse du gène codant pour la fibre montre les mêmes observations que pour l'analyse du gène codant pour l'hexon. Les séquences forment des clusters en fonction du type. Les patients HAdV C2 liés ALR2, DM et SE s'associent avec des patients contrôles HAdV C2, de même que pour les patients HAdV C1 de l'épidémie, rendant difficile toute conclusion.

De la même manière que pour l'analyse du génome complet et du gène codant pour l'hexon, le patient HAdV C2 KL se distingue du cluster formé par les HAdV C2 et des autres clusters HAdV C1, C5 et C6 formant un clade à lui seul. L'arbre phylogénétique montre qu'au niveau de la fibre le variant KL serait plus proche des HAdV C2 **Figure 36.**

3. Analyse du gène codant pour le penton

Bien que le penton soit une protéine structurale, l'analyse de l'arbre phylogénétique ne montre pas de cluster en fonction du type contrairement aux gènes codant pour l'hexon et la fibre. Les patients épidémiques HAdV C2 liés forment un cluster bien distinct et nous retrouvons l'indépendance des patients HAdVC1. **Figure 37.**

4. Analyse du gène E3

L'analyse phylogénétique sur le gène E3 montre une organisation des clusters en type. La diversité du gène permet de mettre en évidence le cluster des patients liés HAdV C2 **Figure 38.**

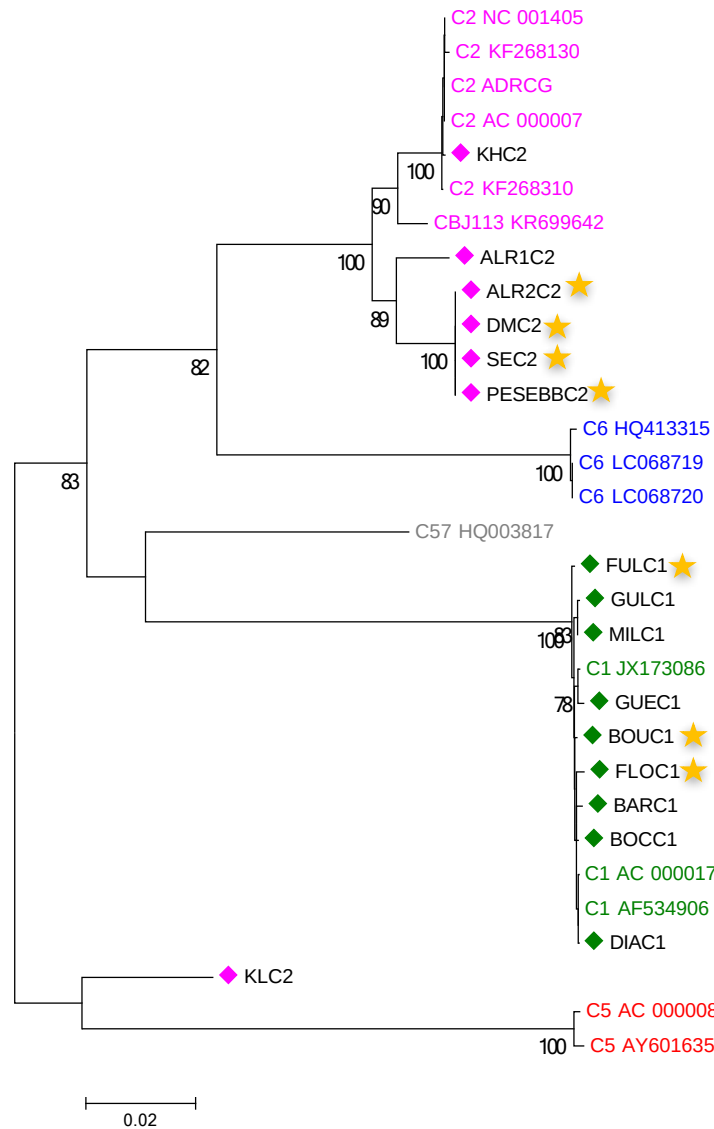


Figure 35. Arbre phylogénétique du gène codant pour l'hexon. Les patients infectés par l'HAAdV C1 sont identifiés par un losange vert, les patients infectés par l'HAAdV C2 sont identifiés par un losange rose et ceux infectés pendant l'épidémie par une étoile jaune. L'alignement des séquences a été effectué avec le logiciel MAFT. L'analyse phylogénétique a été réalisée avec MEGA 5 (Tamura and Nei, 1993). Le meilleur algorithme a été choisi par le critère du score BIC (Bayesian Information Criteria) le plus faible ; l'arbre phylogénétique a été ensuite calculé avec la méthode de « maximum likelihood » et optimisé. La solidité statistique des nœuds a été estimée par la méthode de Bootstrap.

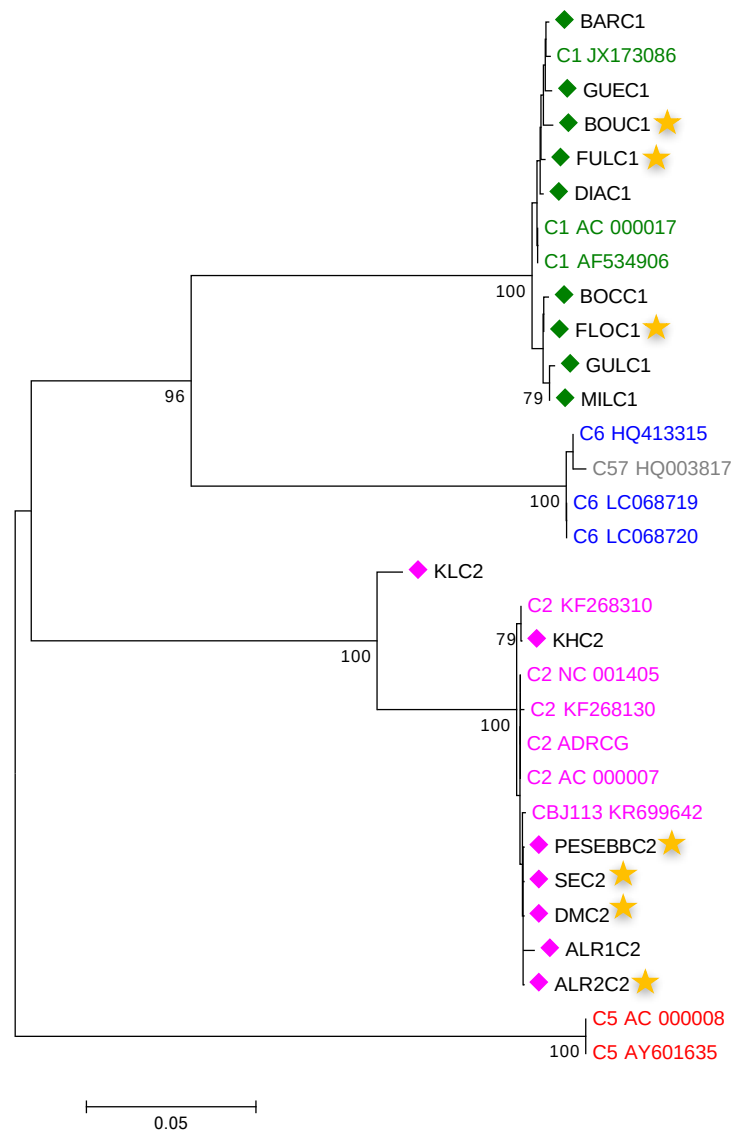


Figure 36. Arbre phylogénétique du gène codant pour la fibre. Les patients infectés par l’HAdV C1 sont identifiés par un losange vert, les patients infectés par l’HAdV C2 sont identifiés par un losange rose et ceux infectés pendant l’épidémie par une étoile jaune. L’alignement des séquences a été effectué avec le logiciel MAFT. L’analyse phylogénétique a été réalisée avec MEGA 5 (Tamura and Nei, 1993). Le meilleur algorithme a été choisi par le critère du score BIC (Bayesian Information Criteria) le plus faible ; l’arbre phylogénétique a été ensuite calculé avec la méthode de « maximum likelihood » et optimisé. La solidité statistique des nœuds a été estimée par la méthode de Bootstrap.

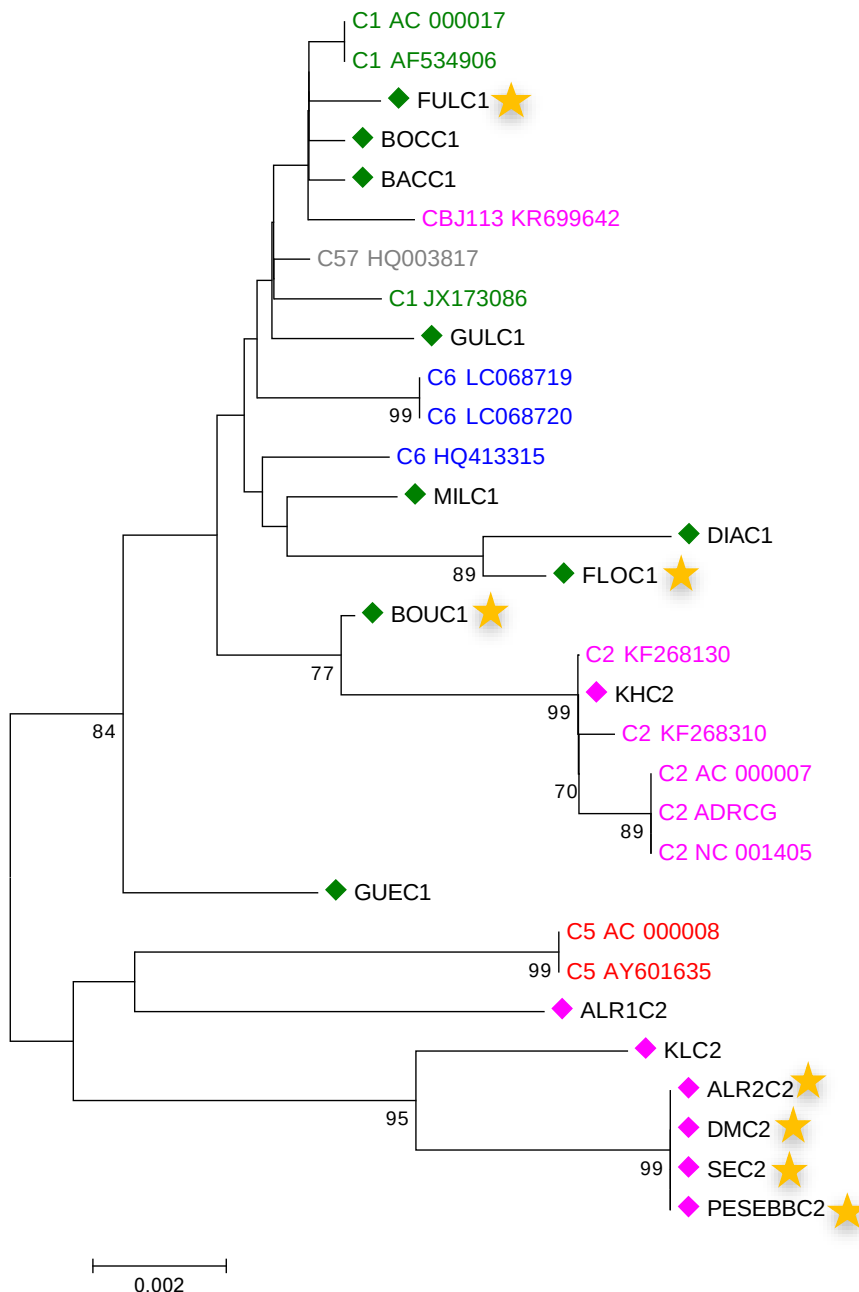


Figure 37. Arbre phylogénétique du gène codant pour le penton. Les patients infectés par l’HAdV C1 sont identifiés par un losange vert, les patients infectés par l’HAdV C2 sont identifiés par un losange rose et ceux infectés pendant l’épidémie par une étoile jaune. L’alignement des séquences a été effectué avec le logiciel MAFT. L’analyse phylogénétique a été réalisée avec MEGA 5 (Tamura and Nei, 1993). Le meilleur algorithme a été choisi par le critère du score BIC (Bayesian Information Criteria) le plus faible ; l’arbre phylogénétique a été ensuite calculé avec la méthode de « maximum likelihood » et optimisé. La solidité statistique des nœuds a été estimée par la méthode de Bootstrap.

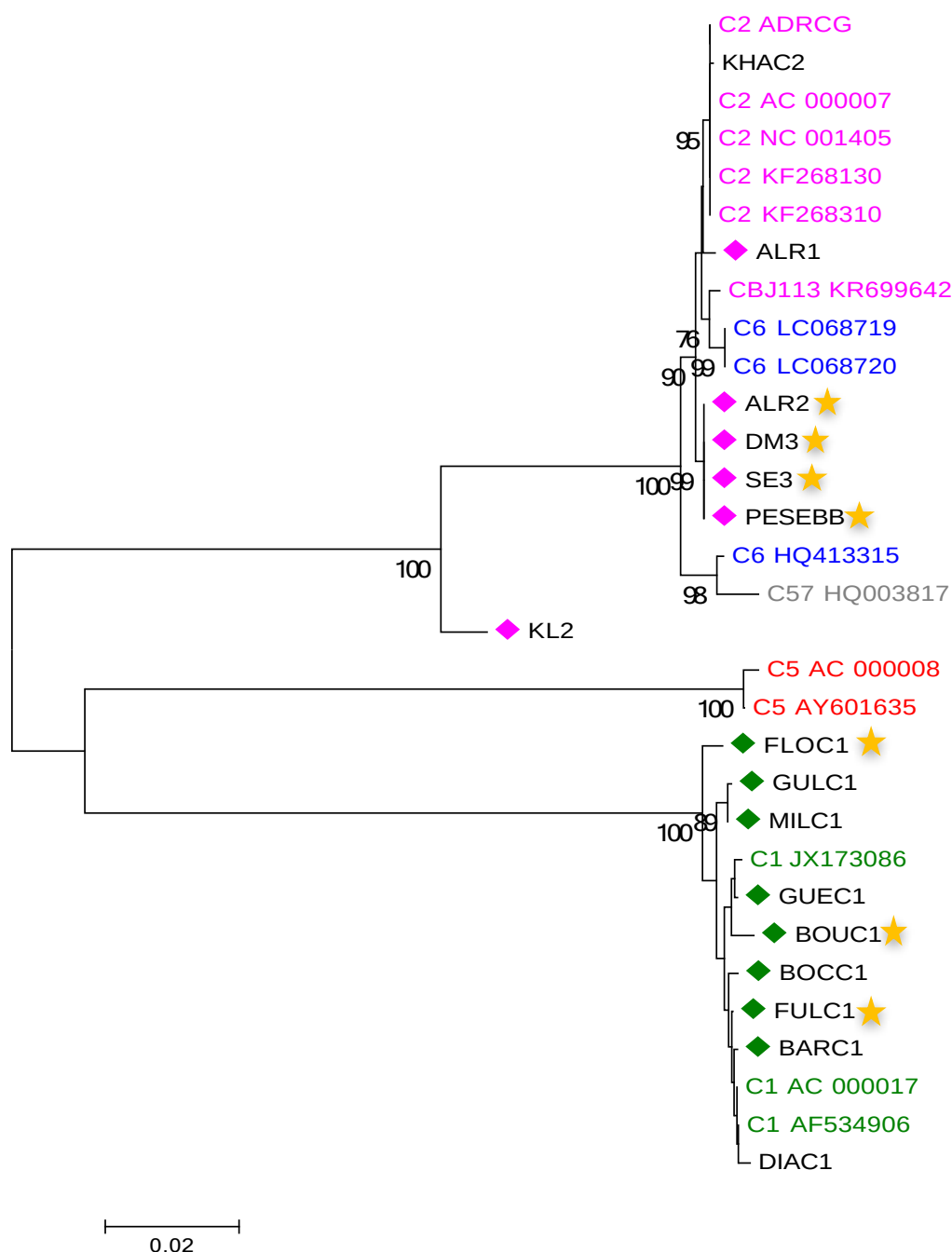


Figure 38. Arbre phylogénétique du gène E3. Les patients infectés par l'HAdV C1 sont identifiés par un losange vert, les patients infectés par l'HAdV C2 sont identifiés par un losange rose et ceux infectés pendant l'épidémie par une étoile jaune. L'alignement des séquences a été effectué avec le logiciel MAFT. L'analyse phylogénétique a été réalisée avec MEGA 5 (Tamura and Nei, 1993). Le meilleur algorithme a été choisi par le critère du score BIC (Bayesian Information Criteria) le plus faible ; l'arbre phylogénétique a été ensuite calculé avec la méthode de « maximum likelihood » et optimisé. La solidité statistique des nœuds a été estimée par la méthode de Bootstrap.

F. Etude d'un cas de recombinant

L'analyse phylogénétique du génome complet et des gènes codant pour l'hexon, la fibre et E3, a montré que le variant KL se distinguait nettement des autres clusters regroupés par type formant une nouvelle sous clade dans la même branche que les autres types d'HAdV C, permettant de mettre en évidence au cours de cette étude un recombinant : le patient KL.

1. Le patient KL

Il s'agit d'un patient de 3 ans qui a reçu une greffe de sang de cordon pour une LAL. Il a réactivé de l'HAdV deux semaines après sa greffe, responsable d'une maladie. Dans un premier temps, de l'HAdV a été typé C5 (après séquençage de l'HVR7) sur le prélèvement du 24/10/2011. Il a bénéficié d'un traitement par CDV à 5 mg/kg 1 fois par semaine pendant un mois. Par la suite, un deuxième typage a été réalisé du fait d'une augmentation de la CV dans les selles sur le prélèvement du 26/11/2011. Ce typage a donné un résultat ininterprétable avec un doute sur une possibilité de recombinant. Le blast de la séquence sur la fibre et l'hexon était partagé entre de l'HAdV C2 et l'HAdV C5, mais avec une tendance pour de l'HAdV C2. **Figure 39.**

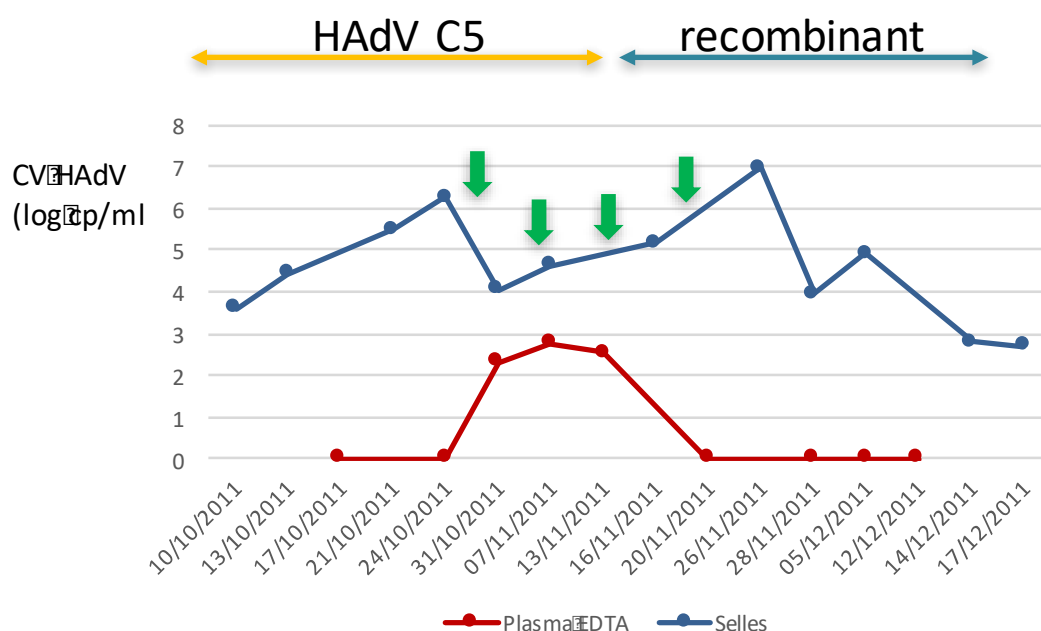


Figure 39. Evolution des CV HAdV dans le plasma et dans les selles pour le patient KL. En rouge la CV HAdV dans le plasma, en bleu la CV dans les selles. Les flèches vertes représentent les injections de CDV à 5mg/kg. La flèche en double sens orange encadre la période où de l'HAdV C5 a été typé, la flèche en bleu turquoise encadre la période où le recombinant a été détecté.

2. Analyse comparative du génome

	Genome complet	ADN pol	Penton	Hexon	Fibre	E3
C1_AC00017	4,10%	1,00%	1,40%	12,90%	20,20%	15,90%
C2_AC00007	2,10%	1,20%	1,60%	7,50%	4,70%	4,40%
C5_AC00008	3,20%	1,10%	1,50%	10,10%	17,70%	12,40%
C6_HQ413315	3,20%	1,10%	1,30%	13,60%	22,70%	4,90%

Tableau 17. P-distances pour les génomes complets, les gènes Hexon, DNA pol, Fibre et Penton calculées pour le génome KL.

Basé sur l'alignement de la séquence du génome complet, avec une p-distance de 2,1% la souche KL partagerait 97,9% de nucléotides identiques avec la séquence de référence HAdV C2 (AC 00007) **Tableau 17.**

La comparaison des séquences nucléotidique des gènes de l'hexon, de la fibre et le gène E3 montre un plus grand degré de similarités de la souche KL avec l'HAdV C2.

Il est difficile de conclure sur l'analyse comparative des gènes ADN pol et penton, les p-distances et la diversité sont faibles.

3. Analyse de la recombinaison

a) Analyse Bootscan

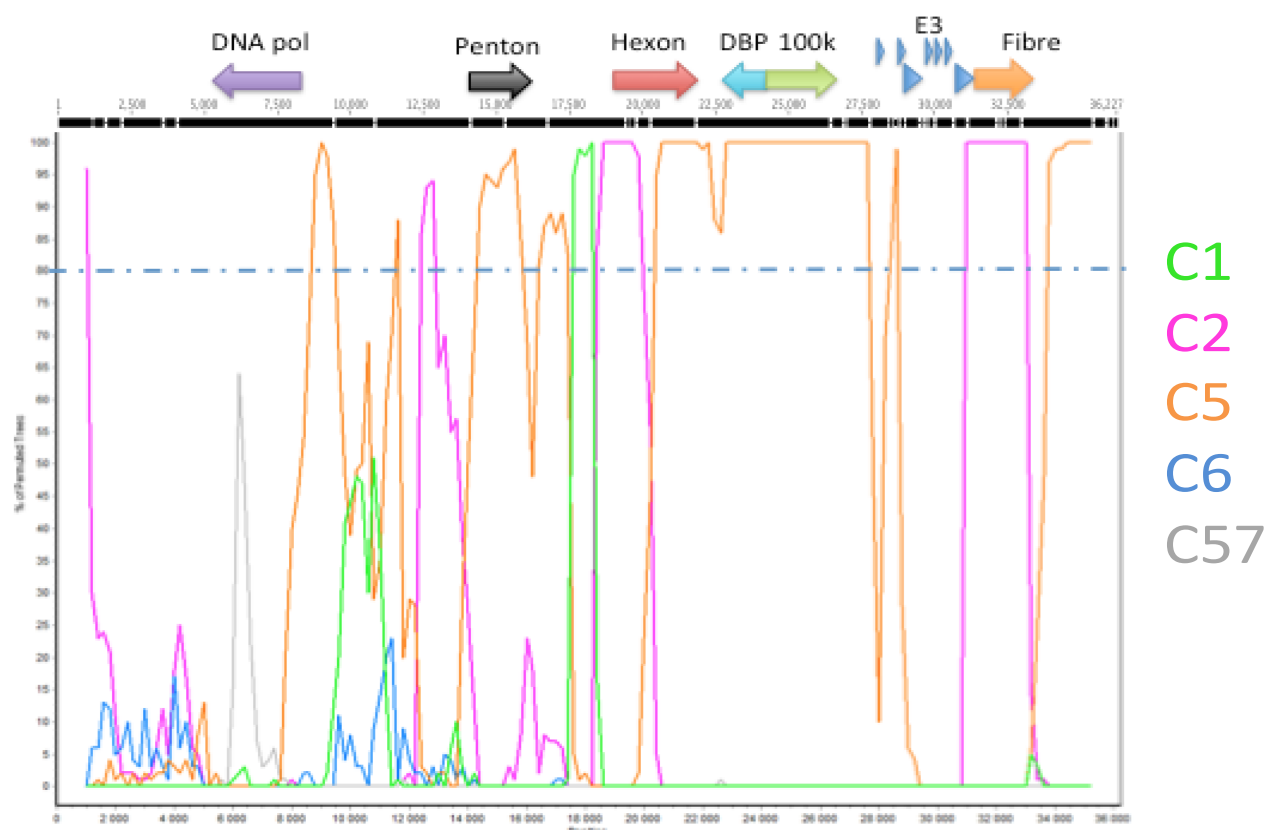


Figure 40. Analyse Bootscan de la séquence du variant KL. L'Analyse Bootscan du génome complet du patient KL à partir de l'alignement de 5 séquences de références : HAdV C1, C2, C5, C6 et C57. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Simplot suivant les paramètres : fenêtre : 1000 pdb ; pas : 100 pdb ; 100 réplcats ; modèle de distance (Kimura) ; modèle des arbres (neighbor-joining). En vert le génome C1, en rose le génome C2, en orange le génome C5, en bleu le génome C6 et en gris le génome C57.

Afin d'identifier les différents événements de recombinaison du génome du variant KL, une analyse BootScan a été réalisée à l'aide du logiciel SimPlot **Figure 40**.

Les résultats montrent que le variant du patient KL est un recombinant dont le penton base proviendrait d'un HAdV C5 et la fibre un HAdV C2 **Figure 40**.

Lorsque l'on fait un focus sur le gène hexon, l'analyse montre une structure mosaïque entre deux HAdV : HAdV C2 et HAdV C5. L'analyse BootScan suggère des événements de recombinaison entre un HAdV C2 et HAdV C5 à l'origine du variant du patient KL **Figure 41**.

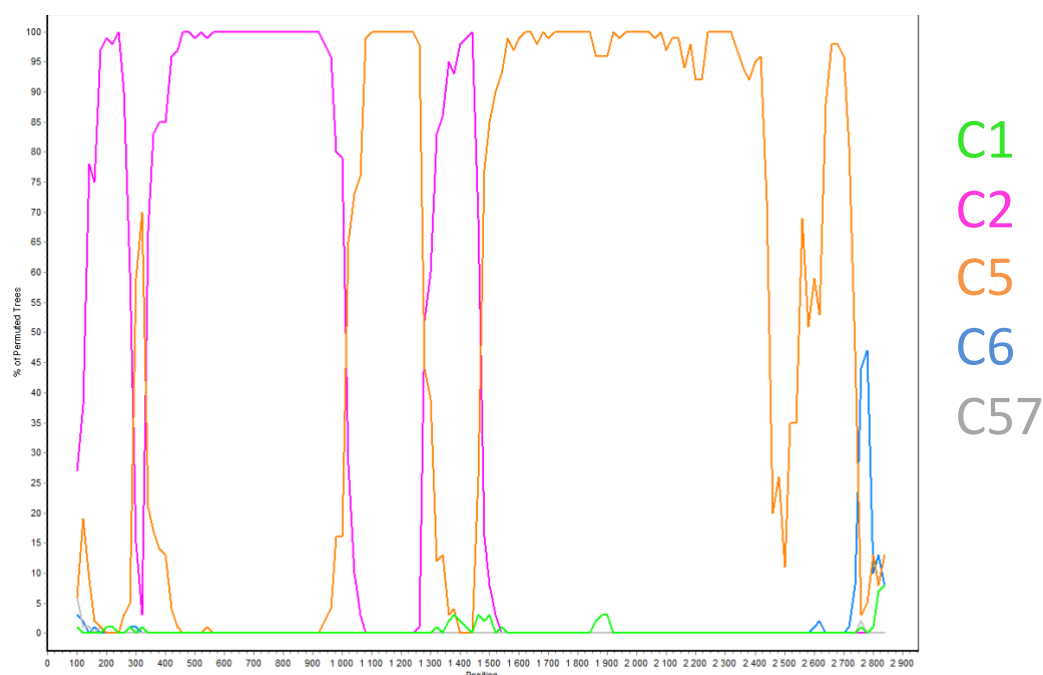


Figure 41. Analyse Bootscan de la séquence hexon du variant KL. L'Analyse Bootscan de l'hexon du patient KL à partir de l'alignement de 5 séquences de références : HAdV C1, C2, C5, C6 et C57. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Simplot suivant les paramètres : fenêtre : 200 pdb ; pas : 20 pdb ; modèle de distance : Kimura ; modèle des arbres : neighbor-joining. En vert le génome C1, en rose le génome C2, en orange le génome C5, en bleu le génome C6 et en gris le génome C57.

b) Analyse des gènes HVR7 (hexon) et ADN pol, avant et après recombinaison

Nous avons comparé les séquences des gènes codant pour la région HVR7 (utilisées dans le laboratoire pour le typage) et l'ADN pol avant recombinaison (prélèvement du 24/10/2011) et après recombinaison (prélèvement du 26/10/2011).

Les résultats montrent que les séquences avant et après recombinaison présentent une identité de 92,8% pour le gène HVR7 et 99,9% pour le gène ADN pol.

Les séquences avant et après recombinaison codant pour l'ADN pol sont quasi identiques alors que pour le gène HVR7 nous avons une variation significative. Contrairement au gène codant l'hexon, le gène codant pour l'ADN pol semble ne pas être impliqué dans la recombinaison.

III. Génétique inverse

A. Mutagénèse dirigée

1. Amorces

Les différentes mutations décrites sont les mutations V303I et T87I pour le BCV et les mutations V303I, T1551I, F882L, S1183R, A501E et L677F. **Table 18.**

Mutant	Mutations
Adv-BCV p5	V303I
Adv-BCV p15	T87I, V303I
Adv-CDV p15	T1151I
R1, Kinchington	F882L, S1183R
R4, Kinchington	V303I, F882I
R5 et R6, Kinchington	A501E, L677F

Tableau 18. Récapitulatif des différentes mutations au BCV et au CDV décrites.

Les amorces doivent répondre à certains critères spécifiques (voir partie Matériel et Méthodes).

Les amorces ont été conçues grâce au logiciel en ligne <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>. Dans le **tableau 19**, figurent toutes les amorces conçues avec leurs différentes caractéristiques.

Amorce	TM (°C)	nb nt	%GC	séquence
T87I F	79,96	24	75	CCGCCGCGCGGTATCGTAGTCGCG
T87I R	79,96	24	75	CGCGACTACGATACCGCGCGGCG
V303I F	78,8	31	54,8	GTGCCCTTCATGCTGATCATGAAGTTCGGCG
V303 R	78,8	31	54,8	TGGGTCACGATGAAGGGGTGCGCTCCG
T1151L F	80,13	27	66,6	TGGGTCACGATGAAGGGGTGCGCTCCG-
T1151L R	80,13	27	66,6	CGGAGCGCACCCCTTCATCGTGACCCA
S1183R F	80,08	26	69,2	GGGTTGGGGCGCCTTTTCGCTGTACGG
S1183R R	80,08	26	69,2	CCGTACAGCGAAAGGCGCCCCAACCC
F882L F	80,90	39	46	CAAATCCTCCTCGCTTTTGAAACTGACAATCTTAGCGC
F882L R	80,90	39	46	GCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAAGCGAGGAGGATTG
F882I F	80,90	39	44	CAAATCCTCCTCGATTTTGAAACTGACAATCTTAGCGC
F882I R	80,90	39	44	GCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAATCGAGGAGGATTG
L677F F	80,60	37	46	CGTAGAGGGGCTCTCTGAATATTCCAAGATATGTAGG
L677 R	80,60	37	46	CCTACATATCTTGAATATTCAGAGAGCCCCTCTACG
A501E F	79,8	29	59	CAGGGACACCTTTGAGCTCACCCACACCT
A501E R	79,8	29	59	AGGTGTGGGTGAGCTCAAAGGTGTCCCTG

Tableau 19. Caractéristiques des amorces de mutagenèse dirigées.

2. Vérification des mutations

Après chaque mutagenèse dirigée, la présence des mutations a été vérifiée par PCR et séquençage ADN pol du plasmide pol. Toutes les mutations : T87I, V303I, A501E, L677F, F882L, F882I, T1151L et S1183R ont été insérées dans le plasmide pol **Figure 42 et 43**.

Les doubles mutants : T87I-V303I (ADV-BCV p15), F882L-S1183R (R1), V303I-F882I (R4), A501E-L677F (R5 et R6) ont été synthétisés dans un deuxième temps.

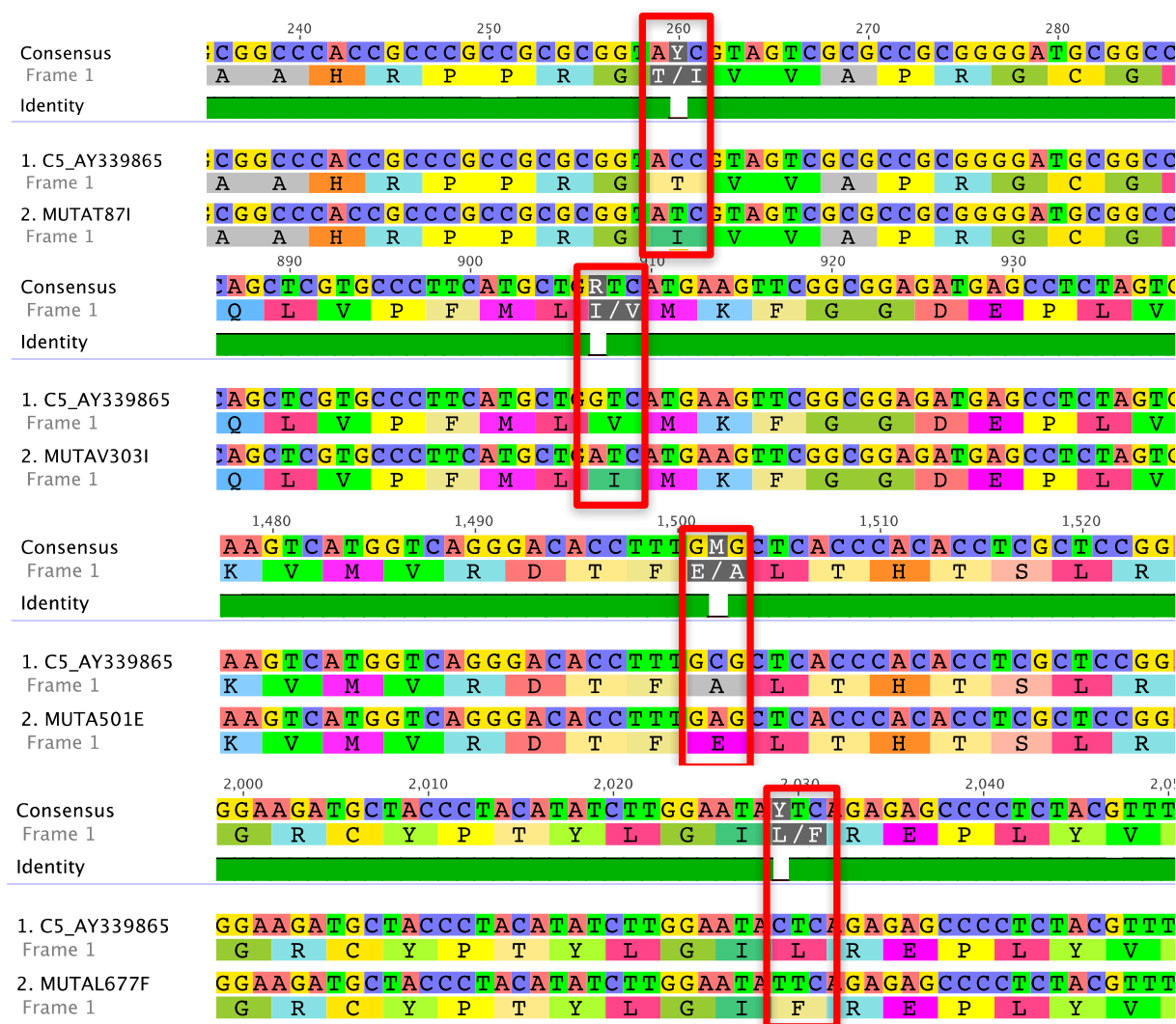


Figure 42. Vérification des mutations T87I, V303I, A501E, L677F sur le plasmide pol après mutagenèse dirigée. Les différentes mutations sont encadrées en rouge.

	2,620	2,630	2,640	2,650	2,660											
Consensus	G C C A G G T G A A T A T C A A A T C C T C C T C G H T T T T G G A A A C T G A C A A T C T T															
Frame 1	G	Q	V	N	I	K	S	S	S	?	L	E	T	D	N	L
Identity	██															

Figure 43. Vérification des mutations F882I, F882L, T11551I, S1183R sur le plasmide pol après mutagenèse dirigée. Les différentes mutations sont encadrées en rouge.

B. Recombinaison

1. Vérification des recombinants

Après les étapes de recombinaison dans les bactéries BJ5183 et amplification en bactéries XL-10 gold, nous avons voulu confirmer le processus de recombinaison par une PCR ciblant une zone de recombinaison (Cf matériels et méthodes), région d'environ 1,5 kb.

Des contrôles ont été utilisés : un témoin négatif, le plasmide pol, le plasmide delta pol, le plasmide WT (plasmide codant pour le génome complet HAdV C).

Nous observons une bande à la taille attendue, uniquement pour le recombinant portant la mutation L677F. Il n'y a eu recombinaison entre le plasmide pol et delta pol, uniquement pour le plasmide pol portant la mutation L677F **Figure 44**.

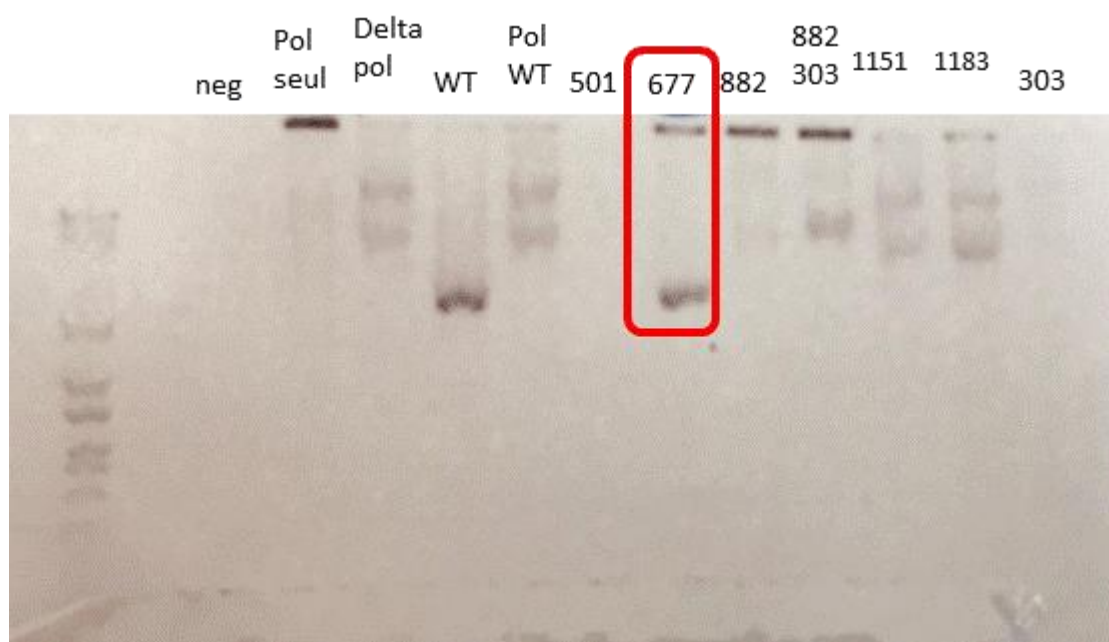


Figure 44. Photo de gel de la PCR vérifiant la recombinaison. De gauche à droite : poids moléculaire, témoin négatif, plasmide pol, plasmide delta pol, plasmide WT, recombinant pol WT, recombinant A501E, recombinant 677, recombinant 882, recombinant 882, 303, recombinant 1151, recombinant 1183.

C. Transfection

Le plasmide recombinant 677 a été transfecté en cellules 293 à l'aide de la lipofectamine. Un stock viral a été produit. Les tests de résistances au BCV par immunophénotypage sont en cours.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les infections à HAdV sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importante chez les receveurs de greffe de CSH, notamment chez les enfants. Les infections chez ce type de patients sont le plus souvent dû à des réactivations d'HAdV latent au niveau de tissus lymphoïdes en particulier celui du système digestif (K. Kosulin et al., 2016; Lion et al., 2010). Les HAdV d'espèce C étant particulièrement capables d'entraîner ce type d'infection, sont les virus les plus fréquemment retrouvés chez les allogreffés de CSH (Markel et al., 2014). Bien qu'il n'existe pas encore de molécule possédant une autorisation de mise sur le marché pour traiter ces infections, les cliniciens ont le plus souvent recours aux inhibiteurs de l'ADN pol : le CDV, et son dérivé estérifié le BCV, disponible en « Autorisation Temporaire d'Utilisation » nominative. Comme tout antiviral à action antivirale directe, il existe un risque de sélection de virus résistant, notamment chez les greffés de CSH qui peuvent présenter des charges virales HAdV importantes au long cours.

Dans une première partie de notre travail nous nous sommes intéressés à l'identification des sites de polymorphismes naturels de l'ADN pol. La cartographie des sites polymorphiques est un prérequis nécessaire pour l'interprétation de mutations de résistance. Dans notre étude, nous avons réalisé le séquençage complet de l'ADN pol provenant de 60 patients n'ayant jamais reçu de CDV ni de BCV. Il s'agit à notre connaissance de la première étude à fournir une large analyse de la variabilité de l'ADN pol des HAdV de l'espèce C réalisée à partir de souches cliniques.

Nous avons mis en évidence un polymorphisme nucléotidique représentant 9,9% des nucléotides de la séquence ADN pol. Nos résultats ont montré une variabilité beaucoup plus élevée que celle rapportée précédemment par Lukhashev et al (Lukhashev et al., 2008a). Lukhashev et al, qui l'évaluent à moins de 1,7%. Cette différence peut être expliquée par le fait que Lukhashev et al, ont analysé une partie seulement de la séquence de l'ADN pol (1127 nt) représentant partiellement les domaines NH2 (328 nt) et l'exonucléase (1452nt) et peu de souches cliniques (16 seulement).

Nous avons rapporté un polymorphisme en acides aminés représentant 8,7% de la protéine ADN pol. Par rapport à d'autres virus humains à ADN possédant une ADN pol, le

polymorphisme HAdV dans les espèces C est inférieur à celui rapporté pour l'HSV1 impliquant 16,3% positions différentes (202/1240) mais supérieur à l'HSV2 (6,3%) (75/1236) (Sauerbrei et al., 2016).

Dans cette série de patients naïfs de médicaments antiviraux ayant une action sur les HAdV, nous n'avons trouvé ni mutations associées à la résistance au BCV ni au CDV, ni les mutations décrites dans une série de patients qui malgré un traitement par BCV ont présenté une répllication persistante à HAdV (Lanier, 2015; Phiroze Sethna et al., 2014). Ces données suggèrent que les mutations de résistance identifiées ont émergé sous la pression du médicament et confirment que la sélection *in vivo* de souches HAdV résistantes aux inhibiteurs de l'ADN pol est hautement probable. Le séquençage du gène ADN pol devrait donc aider à détecter l'émergence de populations HAdV résistantes et anticiper un éventuel échec thérapeutique. Notre cartographie des sites de polymorphisme de l'ADN pol de HAdV aidera à interpréter les données de séquençage.

La plupart des mutations d'acides aminés identifiées ont été localisées dans la région NH2 terminale, qui comprend le signal de localisation nucléaire (NLS). On ne sait pas si l'une des mutations identifiées dans notre étude, peut être impliquée dans des taux différentiels d'importation nucléaire d'ADN pol. Cependant, la protéine pré-terminale permet l'importation nucléaire de l'ADN pol indépendamment de la présence de NLS (Zhao and Padmanabhan, 1988) ainsi les mutations dans la région NLS pourraient avoir un impact limité sur l'importation nucléaire de l'ADN pol.

Une seule mutation a été identifiée dans les domaines de l'exonucléase (I413M, ExoII), mais concernait un acide aminé d'une région non conservée, autre que celles décrites dans d'autres séquences ADN pol de la famille ADN pol alpha (Liu et al., 2000). Peu de mutations ont été identifiées dans les domaines TPR, TPR1 ou TPR2, dans notre étude. Les rôles de ces domaines dans HAdV DNA pol restent inconnus. Aucune des mutations trouvées dans la région TPR1 n'était située dans les motifs conservés décrits par Dufour et al. (Dufour et al., 2000). Une mutation située dans TPR2 (F882L/ F882I) a été précédemment sélectionnée dans un HAdV C5 résistant au CDV, mais toujours en association avec d'autres mutations, ce qui suggère un rôle probable soit dans la résistance ou un rôle dans la compensation pour une perte de l'activité ADN pol du virus résistant (Paul R. Kinchington et al., 2002). Quelques

mutations ont également été rapportées dans les motifs de la polymérase au niveau de la région C-terminale (L785M dans pol VI, S1084N dans pol VII), mais à des positions différentes de celles des régions conservées entre l'ADN pol des bactériophages RB69 et Phi29 et HAdV (Liu et al., 2000).

Ce travail sur le polymorphisme naturel des ADN pol des HAdV C, laisse entrevoir quelques perspectives. Nous souhaiterions étendre l'analyse du polymorphisme naturel de l'ADN pol aux espèces HAdV A et B, espèces également responsables d'infections graves chez les greffés de CSH même si elles sont moins fréquentes. A ce jour, seule la mutation V303I a été retrouvée *in vivo* chez un patient en échec de traitement au BCV (Grimley et al., 2017). Les autres mutations décrites ont été mises en évidence sur des analyses *in vitro* à partir de virus résistant obtenu par passage successif en présence de CDV ou BCV (Paul R. Kinchington et al., 2002; Lanier, 2015; Phiroze Sethna et al., 2014). Ces données sont une preuve génétique que l'effet antiviral du BCV contre les HAdV serait médié par l'ADN pol virale. Il apparaît ainsi indispensable de séquencer le gène des ADN pol des HAdV des patients en échec de traitement. Nos données sur le polymorphisme naturel vont nous permettre d'identifier les mutations responsables de résistance.

Cette première partie, nous a permis de mettre en évidence un polymorphisme nucléotidique ne permettant pas de regroupement en cluster en fonction des types HAdV dans les arbres phylogénétiques, contrairement aux gènes structuraux tels que ceux codant pour l'hexon et la fibre (Lukashev et al., 2008). Des isolats cliniques analysés dans ce travail, de différents types, se sont regroupés. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Lukashev et al qui ont montré que le polymorphisme génétique n'était pas lié au type de virus de l'espèce C, soutenant que l'hypothèse que la diversité de l'ADN pol de HAdV pourrait être due à une recombinaison inter-type entre des virus appartenant à la même espèce (Lukashev et al., 2008). Malgré une variabilité inférieure à celle observée dans les gènes structuraux tels que l'hexon ou la fibre, ce polymorphisme intra-type dans les séquences de l'ADN pol de HAdV peut être utilisé pour distinguer les souches appartenant au même type et peut donc être utilisé pour enquêter sur les épidémies hospitalières pour déterminer les liens épidémiologiques.

Au sein de l'unité de greffe de CSH pédiatrique à l'Hôpital Robert, entre la semaine 38 (année 2010) et la semaine 52 (année 2011), 8 infections à HAdV C se sont déclarées : 5 infections à HAdV C2 (patients ALR, DM, MBP, MC et SE) et 3 infections à HAdV C1 (patients BOU, FLO et FUL), suggérant la possibilité de transmission inter-patient. La forte homologie de séquence des HAdV C rend difficile la discrimination des souches entre elles. Nous nous sommes au cours de ce travail intéressés à la variabilité génétique des HAdV C. Nous avons eu pour objectif d'identifier les régions du génome pouvant être étudiées lors d'épidémies à HAdV et vérifier l'hypothèse que l'étude de l'ADN pol pourrait permettre de discriminer des souches d'HAdV C du même type. Nous avons réalisé le séquençage du génome complet de 6 HAdV C de l'épidémie (deux patients de l'épidémie MBP et MC, présentaient des charges virales trop faibles pour l'isolement en culture et le séquençage du génome complet) ainsi que de patients HAdV C1 et C2 contrôles (patients pédiatrique et patients adultes infectés à HAdV C en dehors de l'épidémie). Nous avons également séquençé le génome d'un HAdV détecté dans le pèse bébé de la chambre du patient HAdV C2 : DM.

Nous avons en premier lieu réalisé une étude de la diversité des HAdV C, à partir de 30 génomes de séquences de référence et une analyse Bootscan de l'alignement des génomes complets de références. Cette analyse confirme que les génomes sont très conservés au sein du même type et surtout pour les HAdV C5. L'analyse des génomes au sein de l'espèce HAdV C révèle une diversité significative pour les protéines codant les protéines de la capsid : l'hexon (p-distance =10%) et la fibre. (p-distance=18%) et surtout pour le gène E3 (p-distance=9,3%). Ces données sont en accord avec de précédentes études, identifiant les gènes codant pour les protéines hexon, fibre et E3 comme étant les plus variables en intra espèce (Robinson et al., 2013, 2011). Les protéines issues de ces gènes sont impliquées dans l'interaction avec les récepteurs cellulaires et le système immunitaire de la cellule hôte (Burgert and Blusch, 2000). La forte variabilité des protéines hexon et fibres peut s'expliquer par la pression immunitaire qui s'exerce sur ces protéines dites « immunogènes ». Les protéines du gène E3 ont pour principal rôle de contrecarrer le système immunitaire de l'hôte, ces protéines subissent ainsi un degré similaire de pression évolutive impliquant que la sélection et la conservation est nettement différente des autres protéines non structurales d'adénovirus.

L'analyse en intratype a montré que les génomes sont très conservés (variation < à 1%) y compris les gènes codant pour les protéines variables de la capside. Seul le gène E3 montre une diversité importante au sein des HAdV C. De façon étonnante le gène codant pour l'ADN pol présente une diversité plus importante que les protéines hexon et fibre suggérant que l'analyse de l'ADN pol pourrait être plus pertinente que l'analyse des protéines hexon et fibre lors d'épidémies à HAdV C du même type.

De plus dans la première partie de notre travail, l'étude du polymorphisme naturel montre une variation nucléotidique de 10,3% en intra espèces et de 2,8 à 6,3% en inter espèces HAdV C, alors que dans l'étude de la variabilité à partir des génomes de référence nous avons une variabilité en intra espèce de 0,8%.et en inter espèce de 0,0 à 0,8%. Cette différence de résultats peut s'expliquer par la fait que l'étude du polymorphisme naturel a été réalisée à partir de 60 séquences de souches cliniques et 20 séquences de référence, alors que l'étude de la diversité ne s'est intéressée qu'à 30 séquences de référence. La plupart des séquences de référence notamment les HAdV C5 proviennent de séquences d'HAdV C de laboratoire, dont le C5 ATCC. La diversité des souches cliniques par rapport aux souches de laboratoire est un donc un élément à prendre en compte.

Cette diversité en intratype de l'ADN pol a été mise à contribution dans cette étude et grâce à l'étude des séquences du gène codant pour l'ADN pol, nous avons pu mettre en évidence une transmission nosocomiale entre 3 patients infectés par de l'HAdV C2 : les patients DM, SE et ALR. Leurs séquences d'ADN polymérase sont identiques entre elles et distinctes de toutes les autres ADN pol HAdV C2 étudiées. Concernant les patients HAdV C1 de l'épidémie, l'analyse de l'ADN pol n'a pas mis en évidence de liaison entre ces patients, les patients HAdV C1 de l'épidémie seraient des cas indépendants. Il s'agit de la première étude à mettre en évidence le potentiel du séquençage de l'ADN pol pour discriminer des souches du même type lors d'épidémies à HAdV C.

Ces résultats ont été confirmés par des données de séquençage haut débit ainsi que par les données épidémiologiques de localisation géographique et temporelle des patients. Bien que plusieurs cas de transmission nosocomiale ont été documentés dans les cliniques d'ophtalmologie (Montessori et al., 1998) dans les services de pédiatrie générale (Gerber et al., 2001), uniquement quelques cas concernant les unités de greffe de CSH ont été décrits : une épidémie à HAdV A31 dans une unité pédiatrique (Leruez-Ville et al., 2006) et une

épidémie à HAdV A12 dans une unité adulte (Jalal et al., 2005). L'HAdV est un virus résistant ; son infectiosité sur une surface non poreuse a été documentée comme pouvant durer jusqu'à 35 jours (Nauheim et al., 1990). L'excrétion prolongée dans les selles et les prélèvements respiratoires chez les patients immunodéprimés et la persistance dans l'environnement représentent des éléments favorables à la transmission nosocomiale des adénovirus dans les unités de greffe de CSH (Echavarría, 2008). Leruez-Ville et al. ont montré que l'analyse phylogénétique sur le gène de l'hexon des patients infectant révélant 100% d'homologie ainsi que l'augmentation du nombre de cas d'infection au sein du même endroit en peu de temps suffisaient à affirmer l'origine nosocomiale de l'épidémie (Leruez-Ville et al., 2006). En revanche dans cette étude aucune comparaison des séquences de l'hexon à des patients témoins n'a été réalisée. L'analyse de nos arbres phylogénétiques des gènes de l'hexon, la fibre et du gène E3 a également pu mettre en évidence le cluster de patients HAdV C2 liés, cependant la distinction des patients HAdV C1 avérés indépendants, est moins apparente dans les arbres phylogénétiques du fait de la « clusterisation » des patients en type. Nos données sont en accord avec celles de Lukashev et al, qui a également montré que les arbres phylogénétiques des gènes fibre et hexon s'organisaient en type (Lukashev et al., 2008). Le gène E3 présente plusieurs ORF, codant ainsi pour sept protéines pour les HAdV C (la taille et le nombre des ORF varient en fonction de l'espèce). Il serait intéressant pour le gène E3 qui apparaît comme le gène présentant une diversité importante à la fois en intertype et en intratype, d'identifier l'ORF présentant la plus grande variabilité. Le séquençage de cette région pourrait permettre de mettre en évidence rapidement des clusters de patients liés lors d'épidémie à HAdV.

Au cours de notre étude, un des patients contrôle : KL s'avère être un recombinant de plusieurs HAdV C. L'analyse des arbres phylogénétiques, montre qu'il forme à lui seul, un clade distinct des autres branchements. L'analyse BootScan montre qu'il s'agirait principalement d'un recombinant C2/C5. L'analyse du gène fibre, hexon et fibre montre qu'il s'agit d'une recombinaison mosaïque entre les HAdV C2, C5 et C6. La comparaison à des génomes complets de référence montre que ce recombinant se rapproche le plus d'un HAdV C2.

Le patient présentait initialement une infection HAdV typé C5, il a soit secondairement été infecté par un HAdV C2 circulant dans le service soit réactivé un HAdV C2 latent. La coinfection HAdV C2 et C5 a été responsable de la recombinaison. Une analyse des HAdV C2 circulants au sein de l'unité serait intéressante pour pouvoir déterminer l'origine.

Les critères pour la définition d'un nouveau type ne sont pas clairement établis, cela repose surtout sur des interprétations qualitatives de données phylogénétiques. Selon Madish et al, la définition d'un nouveau type nécessiterait une variation de plus de 1,2% sur deux régions de l'hexon, loop 1 et loop 2 par rapport à des séquences de références (Madisch et al., 2005). Notre étude a révélé une p-distance pour notre recombinant KL de 7,5 à 13,6% sur toute la région de l'hexon par rapport aux séquences de référence. Ces résultats confirmeraient que notre recombinant KL est un bien un nouveau type de l'espèce HAdV C.

Même si les phénomènes de recombinaison conduisant à la formation de nouveaux types concernent surtout les HAdV d'espèce D (Robinson et al., 2011), plusieurs cas de recombinaison au sein de l'espèce C ont été décrits (Walsh et al., 2011; Wang et al., 2016). Le nouvel HAdV C57 a été décrit en 2011 par l'équipe de Walsh et al. Cette équipe a séquencé le génome complet d'un HAdV isolé à partir des selles d'un enfant présentant une paralysie flasque aigue. Cet HAdV C n'avait pu être typé car la séroneutralisation était ambiguë. L'analyse du génome complet de l'HAdV C57 montre qu'il s'agit d'un recombinant entre un HAdV C2 et C6. Le mécanisme de recombinaison impliquerait les gènes fibre, E3 et particulièrement le gène HVR7 (Walsh et al., 2011).

Plus récemment l'équipe de Wang et al, a identifié le nouvel HAdV CBJ113. Cet HAdV a été isolé à partir de prélèvements respiratoires provenant d'un enfant ayant une infection respiratoire aigüe sévère. L'analyse du génome entier montre qu'il s'agit d'un recombinant mosaïque entre HAdV C1, C2, C5 et C6 mais la comparaison du génome complet montre qu'il partage plus de similarités avec les HAdV C1 et C2. Les protéines hexon, fibre et E1 clusterisent avec les HAdV C2, alors que le penton base les HAdV C1 (Wang et al., 2016). Une recombinaison mosaïque a également été retrouvée dans notre étude, suggérant que ce type de recombinaison peut être très fréquent chez les HAdV d'espèce C. Les recombinaisons mosaïques semblent aussi fréquentes que chez les HAdV d'espèce D (Robinson et al., 2011).

Il est nécessaire de bien comprendre les mécanismes de recombinaison. Les mécanismes de recombinaison feraient surtout intervenir les gènes codant pour les protéines variables de la capsid et le gène E3. Le gène E3 serait particulièrement impliqué dans les mécanismes de recombinaison pour les HAdV d'espèce D notamment l'ORF CR1 (Robinson et al., 2011).

Ces gènes variables, dont nous avons confirmé la diversité dans notre étude, sont entourés par des gènes dit « conservés » formant la majeure partie du génome. Cette alternance « gènes variables » et « gènes conservés » dans l'organisation du génome, serait particulièrement intéressante pour les mécanismes de recombinaison (Robinson et al., 2013). Selon l'analyse de Robinson et al, un faible % de GC d'un gène jouerait un rôle important dans la capacité de recombinaison. Plus le % de GC d'un gène est important moins le gène serait impliqué dans la recombinaison. Les gènes E3, fibre et hexon sont les gènes présentant le % de GC le moins élevé. Les autres gènes et notamment l'ADN polymérase avec un % de GC pouvant atteindre les 60% ont de faible de chance d'avoir un rôle dans la recombinaison (Robinson et al., 2011).

Dans notre étude, nous disposons des séquences codant pour l'ADN pol de notre patient avant et après recombinaison, nous les avons ainsi comparées. Les séquences sont très proches (p distance < à 0,5%) confirmant que le gène codant l'ADN pol serait peu impliqué dans les mécanismes de recombinaison.

Il s'agit de la première description d'un recombinant dans une unité de greffe de CSH. Compte tenu de la fréquence des infections à HAdV C chez ce type de patient, la possibilité de recombinaison et d'apparition de nouveaux types est non négligeable dans ce contexte. La persistance des HAdV et les réactivations lors de l'immunodépression post-greffe pourraient faciliter les événements de recombinaisons. Nous avons ainsi pour perspective d'estimer la fréquence des événements de recombinaison des HAdV C en réalisant le séquençage complet de leur génome chez des enfants hospitalisés et de comparer les fréquences observées entre les enfants greffés et non greffés de CSH.

Selon Lukashev et al, les phénomènes de recombinaison seraient fréquents et participeraient au maintien de l'espèce, du fitness du génome et de la diversité.

Ces phénomènes de recombinaison intra-espèces soulèvent l'importance de l'étude du génome complet pour la classification des HAdV.

Bien que l'infection par cet HAdV C recombinant fut spontanément résolutive chez KL, non grâce à l'intervention de traitement mais sous l'effet de la reconstitution immunitaire, des études sur la virulence et la pathogénicité de tout nouveau type s'avèrent nécessaires. D'autre part il pourrait s'agir d'un cas uniquement sporadique, des études épidémiologiques pour analyser la stabilité des recombinants apparaissent également nécessaires.

Dans une dernière partie de notre travail, nous avons eu pour objectif de vérifier l'impact des mutations sélectionnées dans l'ADN pol par des méthodes de génétique inverse pour déterminer le support et le mécanisme de résistance au CDV et au BCV. Nous avons réalisé les mutagénèses dirigées de toutes les mutations décrites sur le plasmide *pol*. A partir de ces *pol mutés*, nous avons procédé aux étapes de recombinaison par électroporation en bactéries BJ5183. La PCR ciblant une région de recombinaison entre le plasmide *pol* et delta-*pol* a montré que seul le plasmide *pol* contenant la mutation L677F a pu être recombiné avec le plasmide delta *pol*. Ce virus a été transfecté en cellules 293 pour produire un virus répliquatif. A partir de ce virus nous avons pu obtenir un stock viral qui va nous permettre de déterminer le pouvoir infectieux et dans un second étudiier le fitness par comparaison à un virus sauvage de laboratoire la souche ATCC C5 et déterminer la sensibilité aux CDV et BCV par phénotypage.

La mutation L677F a été retrouvée en association avec la mutation A501E dans le variant R6 de kinchington et al. (Paul R. Kinchington et al., 2002). Cette mutation serait située dans le domaine structural de la paume, région à rôle catalytique. La comparaison du pouvoir infectieux du virus L677F obtenu va nous permettre de déterminer si cette mutation va jouer un rôle majeur dans la réplication virale. Notre phénotypage de résistance va nous permettre de savoir si la mutation seule est suffisante pour induire une résistance.

Cette technique de génétique inverse s'est largement inspirée du modèle AdEasy. Cette technique repose sur la recombinaison homologe au sein des bactéries BJ5183, d'un plasmide contenant le gène d'intérêt et le plasmide backbone contenant le génome HAdV (Luo et al., 2007). Cette technique est largement employée pour l'étude de l'expression des gènes et la thérapie génique (Sun et al., 2013; Xu et al., 2016)

Dans notre étude, l'échec de recombinaison des autres plasmides pol mutés avec le plasmide recombinant souligne la difficulté de travailler des génomes de grande taille. D'autres stratégies pour induire les mutations de résistance seraient à envisager, notamment la technologie Crispr Cas 9, technologie qui a déjà été utilisée avec les HAdV (Tang et al., 2016).

La production des virus recombinants contenant les autres mutations est en cours. Des plasmides recombinants ont été obtenus avec l'aide de la société Oxford Genetics® pour les mutations T1151I, V303I et l'association T87I et V303I. La production des virus et le phénotypage de résistance vont suivre. La production des autres plasmides recombinants est en cours. Cette stratégie nous permettra de préciser le rôle des mutations dans la résistance au BCV et d'identifier les zones majeures d'interaction avec le BCV. Ces données de résistance pourront être exploitées pour le design d'autres anti-viraux ciblant l'ADN polymérase virale.

Par ailleurs, le CDV possède une activité antivirale contre les virus de la famille Papovaviridae pourtant dépourvus d'ADN pol, tels que les Papillomavirus et les Polyomavirus BK et JC (Andrei et al., 1998). Le mécanisme antiviral serait indirect avec l'induction de l'apoptose des cellules infectées (Hostetler et al., 2006). Récemment une activité antitumorale a été aussi mise en évidence sur des cellules de glioblastome. Le glioblastome est une tumeur cérébrale fréquemment associée avec une infection par le CMV. Il a été montré que le CDV pourrait induire des cassures dans l'ADN après son incorporation spécifiquement dans les cellules tumorales qu'elles soient ou non infectées par le CMV (Hadaczek et al., 2013). Ces données suggèrent des interactions complexes avec les virus au-delà de l'inhibition de l'ADN pol. D'autres gènes pourraient ainsi être impliqués dans les mécanismes d'action du BCV et donc des mécanismes de résistance du virus à cette molécule.

Il apparaît ainsi important d'identifier si le BCV induit une réponse cellulaire facilitant le contrôle de l'infection virale. En effet les données sur les infections à Polyomavirus et sur le glioblastome suggèrent un impact du BCV au niveau cellulaire. Dans des cellules infectées par de l'HAdV sans ou avec BCV à différentes doses, nous étudierons l'impact du BCV sur le transcriptome cellulaire afin d'identifier si le BCV modifie la réponse innée antivirale de la cellule infectée. Pour l'analyse du transcriptome nous utiliserons le kit TruSeq RNA Access Library Prep kit (Illumina).

Les HAdV sont de plus reconnus comme des pathogènes majeurs en greffes de CSH. Les phénomènes de recombinaison participent à leur diversité et peuvent être à l'origine de variants émergents potentiellement hautement pathogènes. La mise en place d'un traitement par des inhibiteurs de l'ADN pol doit pouvoir être encadrée par de solides connaissances des mécanismes de résistances. Grâce à notre travail nous avons pu identifier les domaines variables de l'ADN pol, montrer le rôle du polymorphisme de l'ADN pol dans la distinction de souches d'HAdV C et mettre en place des outils pour étudier le rôle des mutations sélectionnées dans l'ADN pol par les inhibiteurs de l'ADN pol.

BIBLIOGRAPHIE

Aïssi-Rothé, L., Decot, V., Venard, V., Jeulin, H., Salmon, A., Clement, L., Kennel, A., Mathieu, C., Dalle, J.H., Rauser, G., Cambouris, C., de Carvalho, M., Stoltz, J.F., Bordigoni, P., Bensoussan, D., 2010. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 33, 414–424. doi:10.1097/CJI.0b013e3181cc263b

Akiyama, H., Kurosu, T., Sakashita, C., Inoue, T., Mori Si, null, Ohashi, K., Tanikawa, S., Sakamaki, H., Onozawa, Y., Chen, Q., Zheng, H., Kitamura, T., 2001. Adenovirus is a key pathogen in hemorrhagic cystitis associated with bone marrow transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 1325–1330. doi:10.1086/319992

Al Qurashi, Y.M.A., Guiver, M., Cooper, R.J., 2011. Sequence typing of adenovirus from samples from hematological stem cell transplant recipients. *J. Med. Virol.* 83, 1951–1958. doi:10.1002/jmv.22204

Aldern, K.A., Ciesla, S.L., Winegarden, K.L., Hostetler, K.Y., 2003. Increased antiviral activity of 1-O-hexadecyloxypropyl-[2-(14)C]cidofovir in MRC-5 human lung fibroblasts is explained by unique cellular uptake and metabolism. *Mol. Pharmacol.* 63, 678–681.

Allen, L.B., Boswell, K.H., Khwaja, T.A., Meyer, R.B., Sidwell, R.W., Witkowski, J.T., Christensen, L.F., Robins, R.K., 1978. Synthesis and antiviral activity of some phosphates of the broad-spectrum antiviral nucleoside, 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (ribavirin). *J. Med. Chem.* 21, 742–746.

Andrei, G., Snoeck, R., Piette, J., Delvenne, P., De Clercq, E., 1998. Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cell lines. *Oncol. Res.* 10, 523–531.

Arav-Boger, R., Echavarria, M., Forman, M., Charache, P., Persaud, D., 2000. Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19, 1097–1100.

Arnberg, N., 2009. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev. Med. Virol.* 19, 165–178. doi:10.1002/rmv.612

Arnberg, N., Edlund, K., Kidd, A.H., Wadell, G., 2000. Adenovirus Type 37 Uses Sialic Acid as a Cellular Receptor. *J. Virol.* 74, 42.

Avivi, I., Chakrabarti, S., Milligan, D.W., Waldmann, H., Hale, G., Osman, H., Ward, K.N., Fegan, C.D., Yong, K., Goldstone, A.H., Linch, D.C., Mackinnon, S., 2004. Incidence and outcome of adenovirus disease in transplant recipients after reduced-intensity conditioning with alemtuzumab. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 10, 186–194. doi:10.1016/j.bbmt.2003.11.001

Bailey, C.J., Crystal, R.G., Leopold, P.L., 2003. Association of adenovirus with the microtubule organizing center. *J. Virol.* 77, 13275–13287.

Barrero, P.R., Valinotto, L.E., Tittarelli, E., Mistchenko, A.S., 2012. Molecular typing of adenoviruses in pediatric respiratory infections in Buenos Aires, Argentina (1999-2010). *J.*

- Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. 53, 145–150. doi:10.1016/j.jcv.2011.11.001
- Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A., 2000. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. 1977. Rev. Med. Virol. 10, 356–362; discussion 355–356.
- Berk, A.J., 2005. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. Oncogene 24, 7673–7685. doi:10.1038/sj.onc.1209040
- Berman, A.J., Kamtekar, S., Goodman, J.L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M., Steitz, T.A., 2007. Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. EMBO J. 26, 3494–3505. doi:10.1038/sj.emboj.7601780
- Bernad, A., Blanco, L., Lázaro, J.M., Martín, G., Salas, M., 1989. A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. Cell 59, 219–228.
- Bhadri, V.A., Lee-Horn, L., Shaw, P.J., 2009. Safety and tolerability of cidofovir in high-risk pediatric patients. Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc. 11, 373–379. doi:10.1111/j.1399-3062.2009.00391.x
- Bordigoni, P., Carret, A.S., Venard, V., Witz, F., Le Faou, A., 2001. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 32, 1290–1297. doi:10.1086/319984
- Braithwaite, D.K., Ito, J., 1993. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. Nucleic Acids Res. 21, 787–802.
- Bremner, K.H., Scherer, J., Yi, J., Vershinin, M., Gross, S.P., Vallee, R.B., 2009. Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. Cell Host Microbe 6, 523–535. doi:10.1016/j.chom.2009.11.006
- Brenkman, A.B., Breure, E.C., van der Vliet, P.C., 2002. Molecular architecture of adenovirus DNA polymerase and location of the protein primer. J. Virol. 76, 8200–8207.
- Brenkman, A.B., Heideman, M.R., Truniger, V., Salas, M., van der Vliet, P.C., 2001. The (I/Y)XGG motif of adenovirus DNA polymerase affects template DNA binding and the transition from initiation to elongation. J. Biol. Chem. 276, 29846–29853. doi:10.1074/jbc.M103159200
- Bruno, B., Gooley, T., Hackman, R.C., Davis, C., Corey, L., Boeckh, M., 2003. Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. 9, 341–352.
- Buckwalter, S.P., Teo, R., Espy, M.J., Sloan, L.M., Smith, T.F., Pritt, B.S., 2012. Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources. J. Clin. Microbiol. 50, 766–771. doi:10.1128/JCM.05629-11
- Burgert, H.G., Blusch, J.H., 2000. Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. Virus Genes 21, 13–25.
- Cassano, W.F., 1991. Intravenous ribavirin therapy for adenovirus cystitis after allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 7, 247–248.

- Chakrabarti, S., Collingham, K.E., Fegan, C.D., Pillay, D., Milligan, D.W., 2000. Adenovirus infections following haematopoietic cell transplantation: is there a role for adoptive immunotherapy? *Bone Marrow Transplant.* 26, 305–307. doi:10.1038/sj.bmt.1702508
- Chakrabarti, S., Mautner, V., Osman, H., Collingham, K.E., Fegan, C.D., Klapper, P.E., Moss, P.A.H., Milligan, D.W., 2002. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 100, 1619–1627. doi:10.1182/blood-2002-02-0377
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., Mehtali, M., 1996. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 70, 4805–4810.
- Chen, F.E., Liang, R.H., Lo, J.Y., Yuen, K.Y., Chan, T.K., Peiris, M., 1997. Treatment of adenovirus-associated haemorrhagic cystitis with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant.* 20, 997–999. doi:10.1038/sj.bmt.1700997
- Choudhry, A., Mathena, J., Albano, J.D., Yacovone, M., Collins, L., 2016. Safety evaluation of adenovirus type 4 and type 7 vaccine live, oral in military recruits. *Vaccine* 34, 4558–4564. doi:10.1016/j.vaccine.2016.07.033
- Chow, L.C., Gelinas, R.E., Broker, T.R., Roberts, R.J., 2000. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. 1977. *Rev. Med. Virol.* 10, 362–371; discussion 355–356.
- Cihlar, T., Chen, M.S., 1996. Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol. Pharmacol.* 50, 1502–1510.
- Corjon, S., Gonzalez, G., Henning, P., Grichine, A., Lindholm, L., Boulanger, P., Fender, P., Hong, S.-S., 2011. Cell entry and trafficking of human adenovirus bound to blood factor X is determined by the fiber serotype and not hexon:heparan sulfate interaction. *PloS One* 6, e18205. doi:10.1371/journal.pone.0018205
- Creidy, R., Moshous, D., Touzot, F., Elie, C., Neven, B., Gabrion, A., Leruez-Ville, M., Maury, S., Ternaux, B., Nisoy, J., Luby, J.-M., Héritier, S., Dalle, J.-H., Ouachée-Chardin, M., Xhaard, A., Thomas, X., Chevallier, P., Souchet, L., Treluyer, J.-M., Picard, C., Hacein-Bey-Abina, S., Dal Cortivo, L., Blanche, S., Cavazzana, M., 2016. Specific T cells for the treatment of cytomegalovirus and/or adenovirus in the context of hematopoietic stem cell transplantation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 920–924.e3. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.032
- Cundy, K.C., 1999. Clinical pharmacokinetics of the antiviral nucleotide analogues cidofovir and adefovir. *Clin. Pharmacokinet.* 36, 127–143. doi:10.2165/00003088-199936020-00004
- Curlin, M.E., Huang, M.-L., Lu, X., Celum, C.L., Sanchez, J., Selke, S., Baeten, J.M., Zuckerman, R.A., Erdman, D.D., Corey, L., 2010. Frequent detection of human adenovirus from the lower gastrointestinal tract in men who have sex with men. *PloS One* 5, e11321. doi:10.1371/journal.pone.0011321
- Davison, A.J., Benko, M., Harrach, B., 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses.

J. Gen. Virol. 84, 2895–2908. doi:10.1099/vir.0.19497-0

De Clercq, E., 1996. Therapeutic potential of Cidofovir (HPMPC, Vistide) for the treatment of DNA virus (i.e. herpes-, papova-, pox- and adenovirus) infections. Verh. - K. Acad. Voor Geneesk. Van Belg. 58, 19-47; discussion 47-49.

De Jong, J.C., Wermenbol, A.G., Verweij-Uijterwaal, M.W., Slaterus, K.W., Wertheim-Van Dillen, P., Van Doornum, G.J., Khoo, S.H., Hierholzer, J.C., 1999. 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.

de Oliveira, C.B., Stevenson, D., LaBree, L., McDonnell, P.J., Trousdale, M.D., 1996. Evaluation of Cidofovir (HPMPC, GS-504) against adenovirus type 5 infection in vitro and in a New Zealand rabbit ocular model. Antiviral Res. 31, 165–172.

Dehghan, S., Seto, J., Jones, M.S., Dyer, D.W., Chodosh, J., Seto, D., 2013. Simian adenovirus type 35 has a recombinant genome comprising human and simian adenovirus sequences, which predicts its potential emergence as a human respiratory pathogen. Virology 447, 265–273. doi:10.1016/j.virol.2013.09.009

Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., Argos, P., 1990. An attempt to unify the structure of polymerases. Protein Eng. 3, 461–467.

Dominguez, O., Rojo, P., de Las Heras, S., Folgueira, D., Contreras, J.R., 2005. Clinical presentation and characteristics of pharyngeal adenovirus infections. Pediatr. Infect. Dis. J. 24, 733–734.

Dubberke, E.R., Tu, B., Rivet, D.J., Storch, G.A., Apisarnthanarak, A., Schmidt, R.E., Weiss, S., Polish, L.B., 2006. Acute meningoencephalitis caused by adenovirus serotype 26. J. Neurovirol. 12, 235–240. doi:10.1080/13550280600846633

Dudding, B.A., Wagner, S.C., Zeller, J.A., Gmelich, J.T., French, G.R., Top, F.H., 1972. Fatal pneumonia associated with adenovirus type 7 in three military trainees. N. Engl. J. Med. 286, 1289–1292. doi:10.1056/NEJM197206152862403

Dufour, E., Méndez, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M., 2000. An aspartic acid residue in TPR-1, a specific region of protein-priming DNA polymerases, is required for the functional interaction with primer terminal protein. J. Mol. Biol. 304, 289–300. doi:10.1006/jmbi.2000.4216

Duggan, J.M., Farrehi, J., Duderstadt, S., Turner, N.J., Fekety, R., 1997. Treatment with ganciclovir of adenovirus pneumonia in a cardiac transplant patient. Am. J. Med. 103, 439–440.

Dupuis, M., Hull, R., Wang, H., Nattanmai, S., Glasheen, B., Fusco, H., Dzigua, L., Markey, K., Tavakoli, N.P., 2011. Molecular detection of viral causes of encephalitis and meningitis in New York State. J. Med. Virol. 83, 2172–2181. doi:10.1002/jmv.22169

Durepaire, N., Ranger-Rogez, S., Gandji, J.A., Weinbreck, P., Rogez, J.P., Denis, F., 1995.

Enteric prevalence of adenovirus in human immunodeficiency virus seropositive patients. *J. Med. Virol.* 45, 56–60.

Echavarría, M., 2008. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 704–715. doi:10.1128/CMR.00052-07

Eiz-Vesper, B., Maecker-Kolhoff, B., Blasczyk, R., 2012. Adoptive T-cell immunotherapy from third-party donors: characterization of donors and set up of a T-cell donor registry. *Front. Immunol.* 3, 410. doi:10.3389/fimmu.2012.00410

Enders, J.F., Bell, J.A., Dingle, J.H., Francis, T., Hilleman, M.R., Huebner, R.J., Payne, A.M., 1956. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* 124, 119–120.

Evans, C.M., Kudesia, G., McKendrick, M., 2013. Management of herpesvirus infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 119–128. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.04.023

Feghoul, L., Chevret, S., Cuinet, A., Dalle, J.-H., Ouachée, M., Yacouben, K., Fahd, M., Guérin-El Khourouj, V., Roupert-Serzec, J., Sterkers, G., Baruchel, A., Simon, F., LeGoff, J., 2015. Adenovirus infection and disease in paediatric haematopoietic stem cell transplant patients: clues for antiviral pre-emptive treatment. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 701–709. doi:10.1016/j.cmi.2015.03.011

Feghoul, L., Salmona, M., Cherot, J., Fahd, M., Dalle, J.-H., Vachon, C., Perrod, A., Bourgeois, P., Scieux, C., Baruchel, A., Simon, F., LeGoff, J., 2016. Evaluation of a New Device for Simplifying and Standardizing Stool Sample Preparation for Viral Molecular Testing with Limited Hands-On Time. *J. Clin. Microbiol.* 54, 928–933. doi:10.1128/JCM.02816-15

Feld, J.J., Nanda, S., Huang, Y., Chen, W., Cam, M., Pusek, S.N., Schweigler, L.M., Theodore, D., Zacks, S.L., Liang, T.J., Fried, M.W., 2007. Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology* 46, 1548–1563. doi:10.1002/hep.21853

Fernandez-Larsson, R., O'Connell, K., Koumans, E., Patterson, J.L., 1989. Molecular analysis of the inhibitory effect of phosphorylated ribavirin on the vesicular stomatitis virus in vitro polymerase reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1668–1673.

Feucht, J., Opherke, K., Lang, P., Kayser, S., Hartl, L., Bethge, W., Matthes-Martin, S., Bader, P., Albert, M.H., Maecker-Kolhoff, B., Greil, J., Einsele, H., Schlegel, P.-G., Schuster, F.R., Kremens, B., Rossig, C., Gruhn, B., Handgretinger, R., Feuchtinger, T., 2015. Adoptive T-cell therapy with hexon-specific Th1 cells as a treatment of refractory adenovirus infection after HSCT. *Blood* 125, 1986–1994. doi:10.1182/blood-2014-06-573725

Feuchtinger, T., Matthes-Martin, S., Richard, C., Lion, T., Fuhrer, M., Hamprecht, K., Handgretinger, R., Peters, C., Schuster, F.R., Beck, R., Schumm, M., Lotfi, R., Jahn, G., Lang, P., 2006. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 134, 64–76. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06108.x

- Feuchtinger, T., Opherk, K., Bethge, W.A., Topp, M.S., Schuster, F.R., Weissinger, E.M., Mohty, M., Or, R., Maschan, M., Schumm, M., Hamprecht, K., Handgretinger, R., Lang, P., Einsele, H., 2010. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 116, 4360–4367. doi:10.1182/blood-2010-01-262089
- Flomenberg, P., Babbitt, J., Drobyski, W.R., Ash, R.C., Carrigan, D.R., Sedmak, G.V., McAuliffe, T., Camitta, B., Horowitz, M.M., Bunin, N., 1994. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 169, 775–781.
- Florescu, D.F., Pergam, S.A., Neely, M.N., Qiu, F., Johnston, C., Way, S., Sande, J., Lewinsohn, D.A., Guzman-Cottrill, J.A., Graham, M.L., Papanicolaou, G., Kurtzberg, J., Rigdon, J., Painter, W., Mommeja-Marin, H., Lanier, R., Anderson, M., van der Horst, C., 2012. Safety and efficacy of CMX001 as salvage therapy for severe adenovirus infections in immunocompromised patients. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 18, 731–738. doi:10.1016/j.bbmt.2011.09.007
- Forstmeyer, D., Henke-Gendo, C., Bröcker, V., Wildner, O., Heim, A., 2008. Quantitative temporal and spatial distribution of adenovirus type 2 correlates with disease manifestations and organ failure during disseminated infection. *J. Med. Virol.* 80, 294–297. doi:10.1002/jmv.21071
- Foy, H.M., Cooney, M.K., Hatlen, J.B., 1968. Adenovirus type 3 epidemic associated with intermittent chlorination of a swimming pool. *Arch. Environ. Health* 17, 795–802.
- Frange, P., Peffault de Latour, R., Arnaud, C., Boddaert, N., Oualha, M., Avettand-Fenoel, V., Bernaudin, F., Aguilar, C., Barnerias, C., Leruez-Ville, M., Touzot, F., Lortholary, O., Fischer, A., Blanche, S., 2011. Adenoviral infection presenting as an isolated central nervous system disease without detectable viremia in two children after stem cell transplantation. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2361–2364. doi:10.1128/JCM.00080-11
- Franklin, M.C., Wang, J., Steitz, T.A., 2001. Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell* 105, 657–667.
- Ganzenmueller, T., Buchholz, S., Harste, G., Dammann, E., Trenchel, R., Heim, A., 2011. High lethality of human adenovirus disease in adult allogeneic stem cell transplant recipients with high adenoviral blood load. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 52, 55–59. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.005
- Garnett, C.T., Erdman, D., Xu, W., Gooding, L.R., 2002. Prevalence and Quantitation of Species C Adenovirus DNA in Human Mucosal Lymphocytes. *J. Virol.* 76, 10608–10616. doi:10.1128/JVI.76.21.10608-10616.2002
- Garnett, C.T., Talekar, G., Mahr, J.A., Huang, W., Zhang, Y., Ornelles, D.A., Gooding, L.R., 2009. Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J. Virol.* 83, 2417–2428. doi:10.1128/JVI.02392-08
- Gerber, S.I., Erdman, D.D., Pur, S.L., Diaz, P.S., Segreti, J., Kajon, A.E., Belkengren, R.P., Jones, R.C., 2001. Outbreak of adenovirus genome type 7d2 infection in a pediatric chronic-

care facility and tertiary-care hospital. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 694–700. doi:10.1086/319210

Giberson, A.N., Davidson, A.R., Parks, R.J., 2012. Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection. *Nucleic Acids Res.* 40, 2369–2376. doi:10.1093/nar/gkr1076

Gordon, Y.J., Araullo-Cruz, T., Romanowski, E., Myers, B., Santora, D., Lin, M., Kowalski, R., 1991. Replication of ocular isolates of human adenovirus is serotype-dependent in rabbit corneal organ culture. *Curr. Eye Res.* 10, 267–271.

Gray, G.C., Callahan, J.D., Hawksworth, A.W., Fisher, C.A., Gaydos, J.C., 1999. Respiratory diseases among U.S. military personnel: countering emerging threats. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 379–385. doi:10.3201/eid0503.990308

Gray, G.C., McCarthy, T., Lebeck, M.G., Schnurr, D.P., Russell, K.L., Kajon, A.E., Landry, M.L., Leland, D.S., Storch, G.A., Ginocchio, C.C., Robinson, C.C., Demmler, G.J., Saubolle, M.A., Kehl, S.C., Selvarangan, R., Miller, M.B., Chappell, J.D., Zerr, D.M., Kiska, D.L., Halstead, D.C., Capuano, A.W., Setterquist, S.F., Chorazy, M.L., Dawson, J.D., Erdman, D.D., 2007. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004–2006. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 45, 1120–1131. doi:10.1086/522188

Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P., Helenius, A., 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75, 477–486.

Grimley, M.S., Chemaly, R.F., Englund, J.A., Kurtzberg, J., Chittick, G., Brundage, T.M., Bae, A., Morrison, M.E., Prasad, V.K., 2017. Brincidofovir for Asymptomatic Adenovirus Viremia in Pediatric and Adult Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 23, 512–521. doi:10.1016/j.bbmt.2016.12.621

Hadaczek, P., Ozawa, T., Soroceanu, L., Yoshida, Y., Matlaf, L., Singer, E., Fiallos, E., James, C.D., Cobbs, C.S., 2013. Cidofovir: a novel antitumor agent for glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 6473–6483. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1121

Hakim, F.A., Tleyjeh, I.M., 2008. Severe adenovirus pneumonia in immunocompetent adults: a case report and review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 27, 153–158. doi:10.1007/s10096-007-0416-z

Harnett, G.B., Phillips, P.A., Gollow, M.M., 1984. Association of genital adenovirus infection with urethritis in men. *Med. J. Aust.* 141, 337–338.

Harrach, B., Benko, M., 2007. Phylogenetic analysis of adenovirus sequences. *Methods Mol. Med.* 131, 299–334.

Hartline, C.B., Gustin, K.M., Wan, W.B., Ciesla, S.L., Beadle, J.R., Hostetler, K.Y., Kern, E.R., 2005. Ether lipid-ester prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates: activity against adenovirus replication in vitro. *J. Infect. Dis.* 191, 396–399. doi:10.1086/426831

- Hierholzer, J.C., 1992. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 262–274.
- Hierholzer, J.C., Wigand, R., Anderson, L.J., Adrian, T., Gold, J.W., 1988. 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.
- Hilleman, M.R., Werner, J.H., 1954. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 85, 183–188.
- Ho, H.T., Woods, K.L., Bronson, J.J., De Boeck, H., Martin, J.C., Hitchcock, M.J., 1992. Intracellular metabolism of the antiherpes agent (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. *Mol. Pharmacol.* 41, 197–202.
- Hoeben, R.C., Uil, T.G., 2013b. Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a013003. doi:10.1101/cshperspect.a013003
- Hong, J.Y., Lee, H.J., Piedra, P.A., Choi, E.H., Park, K.H., Koh, Y.Y., Kim, W.S., 2001. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 1423–1429. doi:10.1086/320146
- Hong, S.S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D.T., Boulanger, P.A., 1997. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J.* 16, 2294–2306. doi:10.1093/emboj/16.9.2294
- Hostetler, K.Y., Rought, S., Aldern, K.A., Trahan, J., Beadle, J.R., Corbeil, J., 2006. Enhanced antiproliferative effects of alkoxyalkyl esters of cidofovir in human cervical cancer cells in vitro. *Mol. Cancer Ther.* 5, 156–159. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0200
- Hromas, R., Cornetta, K., Srour, E., Blanke, C., Broun, E.R., 1994. Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* 84, 1689–1690.
- Huang, G.-H., Xu, W.-B., 2013. [Recent advance in new types of human adenovirus]. *Bing Xue Bao Chin. J. Virol.* 29, 342–348.
- Hwang, J.Y., Lee, K.M., Kim, Y.H., Shim, H.M., Bae, Y.K., Hwang, J.H., Park, H., 2014. Pregnancy Loss Following Coxsackievirus B3 Infection in Mice during Early Gestation Due to High Expression of Coxsackievirus-Adenovirus Receptor (CAR) in Uterus and Embryo. *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 63, 63–72.
- Icheva, V., Kayser, S., Wolff, D., Tuve, S., Kyzirakos, C., Bethge, W., Greil, J., Albert, M.H., Schwinger, W., Nathrath, M., Schumm, M., Stevanovic, S., Handgretinger, R., Lang, P., Feuchtinger, T., 2013. Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 39–48. doi:10.1200/JCO.2011.39.8495
- Ito, M., Hirabayashi, N., Uno, Y., Nakayama, A., Asai, J., 1991. Necrotizing tubulointerstitial

nephritis associated with adenovirus infection. *Hum. Pathol.* 22, 1225–1231.

Jaffe, B.F., Maassab, H.F., 1967. Sudden deafness associated with adenovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 276, 1406–1409. doi:10.1056/NEJM196706222762504

Jalal, H., Bibby, D.F., Tang, J.W., Bennett, J., Kyriakou, C., Peggs, K., Cubitt, D., Brink, N.S., Ward, K.N., Tedder, R.S., 2005. First reported outbreak of diarrhea due to adenovirus infection in a hematology unit for adults. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2575–2580. doi:10.1128/JCM.43.6.2575-2580.2005

Jeulin, H., Salmon, A., Bordigoni, P., Venard, V., 2011. Diagnostic value of quantitative PCR for adenovirus detection in stool samples as compared with antigen detection and cell culture in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 1674–1680. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03488.x

Jones, M.S., Harrach, B., Ganac, R.D., Gozum, M.M.A., Dela Cruz, W.P., Riedel, B., Pan, C., Delwart, E.L., Schnurr, D.P., 2007. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J. Virol.* 81, 5978–5984. doi:10.1128/JVI.02650-06

Joung, I., Engler, J.A., 1992. Mutations in two cysteine-histidine-rich clusters in adenovirus type 2 DNA polymerase affect DNA binding. *J. Virol.* 66, 5788–5796.

Joung, I., Horwitz, M.S., Engler, J.A., 1991. Mutagenesis of conserved region I in the DNA polymerase from human adenovirus serotype 2. *Virology* 184, 235–241.

Kamel, W., Segerman, B., Öberg, D., Punga, T., Akusjärvi, G., 2013. The adenovirus VA RNA-derived miRNAs are not essential for lytic virus growth in tissue culture cells. *Nucleic Acids Res.* 41, 4802–4812. doi:10.1093/nar/gkt172

Kaneko, H., Aoki, K., Ishida, S., Ohno, S., Kitaichi, N., Ishiko, H., Fujimoto, T., Ikeda, Y., Nakamura, M., Gonzalez, G., Koyanagi, K.O., Watanabe, H., Suzutani, T., 2011. Recombination analysis of intermediate human adenovirus type 53 in Japan by complete genome sequence. *J. Gen. Virol.* 92, 1251–1259. doi:10.1099/vir.0.030361-0

Kaneko, H., Kato, K., Mori, S., Shigeta, S., 2001. Antiviral activity of NMSO3 against adenovirus in vitro. *Antiviral Res.* 52, 281–288.

Khoo, S.H., Bailey, A.S., de Jong, J.C., Mandal, B.K., 1995. Adenovirus infections in human immunodeficiency virus-positive patients: clinical features and molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.* 172, 629–637.

Kinchington, P.R., Araullo-Cruz, T., Vergnes, J.-P., Yates, K., Gordon, Y.J., 2002. Sequence changes in the human adenovirus type 5 DNA polymerase associated with resistance to the broad spectrum antiviral cidofovir. *Antiviral Res.* 56, 73–84. doi:10.1016/S0166-3542(02)00098-0

King, A.J., Teertstra, W.R., Blanco, L., Salas, M., van der Vliet, P.C., 1997. Processive proofreading by the adenovirus DNA polymerase. Association with the priming protein reduces exonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res.* 25, 1745–1752.

- Kirsi, J.J., North, J.A., McKernan, P.A., Murray, B.K., Canonico, P.G., Huggins, J.W., Srivastava, P.C., Robins, R.K., 1983. Broad-spectrum antiviral activity of 2-beta-D-ribofuranosylselenazole-4-carboxamide, a new antiviral agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24, 353–361.
- Knopf, C.W., 1998b. Evolution of viral DNA-dependent DNA polymerases. *Virus Genes* 16, 47–58.
- Kodama, E., Shigeta, S., Suzuki, T., De Clercq, E., 1996. Application of a gastric cancer cell line (MKN-28) for anti-adenovirus screening using the MTT method. *Antiviral Res.* 31, 159–164.
- Koneru, B., Atchison, R., Jaffe, R., Cassavilla, A., Van Thiel, D.H., Starzl, T.E., 1990. Serological studies of adenoviral hepatitis following pediatric liver transplantation. *Transplant. Proc.* 22, 1547–1548.
- Kosulin, K., Berkowitsch, B., Lion, T., 2016. Modified pan-adenovirus real-time PCR assay based on genome analysis of seventy HAdV types. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 80, 60–61. doi:10.1016/j.jcv.2016.05.001
- Kosulin, K., Geiger, E., Vécsei, A., Huber, W.-D., Rauch, M., Brenner, E., Wrba, F., Hammer, K., Innerhofer, A., Pötschger, U., Lawitschka, A., Matthes-Leodolter, S., Fritsch, G., Lion, T., 2016. Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 381.e1–8. doi:10.1016/j.cmi.2015.12.013
- Kovesdi, I., Brough, D.E., Bruder, J.T., Wickham, T.J., 1997. Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 583–589.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054
- La Rosa, A.M., Champlin, R.E., Mirza, N., Gajewski, J., Giralt, S., Rolston, K.V., Raad, I., Jacobson, K., Kontoyiannis, D., Elting, L., Whimbey, E., 2001. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 871–876. doi:10.1086/319352
- Lanier, R., 2015. Dedicated-to-Preventing-and-Treating-Life-Threatening-Viral-Infections, in: Presentation. Presented at the 55th, Interscience Conference on Antimicrobial And Chemotherapy, San diego, California, USA.
- Lee, Y.J., Chung, D., Xiao, K., Papadopoulos, E.B., Barker, J.N., Small, T.N., Giralt, S.A., Zheng, J., Jakubowski, A.A., Papanicolaou, G.A., 2013. Adenovirus viremia and disease: comparison of T cell-depleted and conventional hematopoietic stem cell transplantation recipients from a single institution. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 19, 387–392. doi:10.1016/j.bbmt.2012.10.014

- Lenaerts, L., De Clercq, E., Naesens, L., 2008. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev. Med. Virol.* 18, 357–374. doi:10.1002/rmv.589
- Lenaerts, L., Naesens, L., 2006. Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Res.* 71, 172–180. doi:10.1016/j.antiviral.2006.04.007
- Leopold, P.L., Crystal, R.G., 2007. Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 810–821. doi:10.1016/j.addr.2007.06.007
- Leruez-Ville, M., Chardin-Ouachée, M., Neven, B., Picard, C., Le Guinche, I., Fischer, A., Rouzioux, C., Blanche, S., 2006. Description of an adenovirus A31 outbreak in a paediatric haematology unit. *Bone Marrow Transplant.* 38, 23–28. doi:10.1038/sj.bmt.1705389
- Lichtenstein, D.L., Toth, K., Doronin, K., Tollefson, A.E., Wold, W.S.M., 2004. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int. Rev. Immunol.* 23, 75–111.
- Lindemans, C.A., Leen, A.M., Boelens, J.J., 2010. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 116, 5476–5485. doi:10.1182/blood-2010-04-259291
- Lion, T., 2014. Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 441–462. doi:10.1128/CMR.00116-13
- Lion, T., Baumgartinger, R., Watzinger, F., Matthes-Martin, S., Suda, M., Preuner, S., Futterknecht, B., Lawitschka, A., Peters, C., Potschger, U., Gadner, H., 2003. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 102, 1114–1120. doi:10.1182/blood-2002-07-2152
- Lion, T., Kosulin, K., Landlinger, C., Rauch, M., Preuner, S., Jugovic, D., Pötschger, U., Lawitschka, A., Peters, C., Fritsch, G., Matthes-Martin, S., 2010. Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 24, 706–714. doi:10.1038/leu.2010.4
- Liu, H., Naismith, J.H., Hay, R.T., 2003. Adenovirus DNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 272, 131–164.
- Liu, H., Naismith, J.H., Hay, R.T., 2000. Identification of conserved residues contributing to the activities of adenovirus DNA polymerase. *J. Virol.* 74, 11681–11689.
- Liu, H., Wu, L., Zhou, Z.H., 2011. Model of the trimeric fiber and its interactions with the pentameric penton base of human adenovirus by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 406, 764–774. doi:10.1016/j.jmb.2010.11.043
- Liu, L., Qian, Y., Zhang, Y., Deng, J., Jia, L., Dong, H., 2014. Adenoviruses associated with acute diarrhea in children in Beijing, China. *PloS One* 9, e88791. doi:10.1371/journal.pone.0088791
- Ljungman, P., Ribaud, P., Eyrich, M., Matthes-Martin, S., Einsele, H., Bleakley, M., Machaczka, M., Bierings, M., Bosi, A., Gratecos, N., Cordonnier, C., Infectious Diseases

- Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2003. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 31, 481–486. doi:10.1038/sj.bmt.1703798
- Louie, J.K., Kajon, A.E., Holodniy, M., Guardia-LaBar, L., Lee, B., Petru, A.M., Hacker, J.K., Schnurr, D.P., 2008. Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 46, 421–425. doi:10.1086/525261
- Lugthart, G., Oomen, M.A., Jol-van der Zijde, C.M., Ball, L.M., Bresters, D., Kollen, W.J.W., Smiers, F.J., Vermont, C.L., Bredius, R.G.M., Schilham, M.W., van Tol, M.J.D., Lankester, A.C., 2015. The effect of cidofovir on adenovirus plasma DNA levels in stem cell transplantation recipients without T cell reconstitution. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 21, 293–299. doi:10.1016/j.bbmt.2014.10.012
- Lukashev, A.N., Ivanova, O.E., Ereemeeva, T.P., Iggo, R.D., 2008. Evidence of frequent recombination among human adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 89, 380–388. doi:10.1099/vir.0.83057-0
- Luo, J., Deng, Z.-L., Luo, X., Tang, N., Song, W.-X., Chen, J., Sharff, K.A., Luu, H.H., Haydon, R.C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., He, T.-C., 2007. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat. Protoc.* 2, 1236–1247. doi:10.1038/nprot.2007.135
- Lutchman, G., Danehower, S., Song, B.-C., Liang, T.J., Hoofnagle, J.H., Thomson, M., Ghany, M.G., 2007. Mutation rate of the hepatitis C virus NS5B in patients undergoing treatment with ribavirin monotherapy. *Gastroenterology* 132, 1757–1766. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.035
- Lynch, J.P., Fishbein, M., Echavarria, M., 2011. Adenovirus. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 32, 494–511. doi:10.1055/s-0031-1283287
- Lynch, J.P., Kajon, A.E., 2016. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 37, 586–602. doi:10.1055/s-0036-1584923
- Maag, D., Castro, C., Hong, Z., Cameron, C.E., 2001. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J. Biol. Chem.* 276, 46094–46098. doi:10.1074/jbc.C100349200
- Madisch, I., Harste, G., Pommer, H., Heim, A., 2005. Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy. *J. Virol.* 79, 15265–15276. doi:10.1128/JVI.79.24.15265-15276.2005
- Markel, D., Lam, E., Harste, G., Darr, S., Ramke, M., Heim, A., 2014. Type dependent patterns of human adenovirus persistence in human T-lymphocyte cell lines. *J. Med. Virol.* 86, 785–794. doi:10.1002/jmv.23736
- Mathias, P., Wickham, T., Moore, M., Nemerow, G., 1994. Multiple adenovirus serotypes use

alpha v integrins for infection. *J. Virol.* 68, 6811–6814.

Matsushima, Y., Shimizu, H., Kano, A., Nakajima, E., Ishimaru, Y., Dey, S.K., Watanabe, Y., Adachi, F., Mitani, K., Fujimoto, T., Phan, T.G., Ushijima, H., 2013. Genome sequence of a novel virus of the species human adenovirus d associated with acute gastroenteritis. *Genome Announc.* 1. doi:10.1128/genomeA.00068-12

Matthes-Martin, S., Feuchtinger, T., Shaw, P.J., Engelhard, D., Hirsch, H.H., Cordonnier, C., Ljungman, P., Fourth European Conference on Infections in Leukemia, 2012. European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 14, 555–563. doi:10.1111/tid.12022

Matthews, D.A., Russell, W.C., 1998. Adenovirus core protein V is delivered by the invading virus to the nucleus of the infected cell and later in infection is associated with nucleoli. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 7), 1671–1675. doi:10.1099/0022-1317-79-7-1671

Matthews, T., Boehme, R., 1988. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev. Infect. Dis.* 10 Suppl 3, S490-494.

McCarthy, T., Lebeck, M.G., Capuano, A.W., Schnurr, D.P., Gray, G.C., 2009. Molecular typing of clinical adenovirus specimens by an algorithm which permits detection of adenovirus coinfections and intermediate adenovirus strains. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 46, 80–84. doi:10.1016/j.jcv.2009.06.008

Meier, O., Greber, U.F., 2004. Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* 6 Suppl 1, S152-163. doi:10.1002/jgm.553

Michaels, M.G., Green, M., Wald, E.R., Starzl, T.E., 1992. Adenovirus infection in pediatric liver transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 165, 170–174.

Miyamura, K., Hamaguchi, M., Taji, H., Kanie, T., Kohno, A., Tanimoto, M., Saito, H., Kojima, S., Matsuyama, T., Kitaori, K., Nagafuji, K., Sato, T., Kodera, Y., 2000. Successful ribavirin therapy for severe adenovirus hemorrhagic cystitis after allogeneic marrow transplant from close HLA donors rather than distant donors. *Bone Marrow Transplant.* 25, 545–548. doi:10.1038/sj.bmt.1702195

Molinier-Frenkel, V., Boulanger, P., 2003. Les adénovirus : de la structure à la vectorisation de gènes et à la vaccinologie. I. *Virologie des adénovirus et des adénovirus recombinants. Virologie* 7, 267–279.

Montessori, V., Scharf, S., Holland, S., Werker, D.H., Roberts, F.J., Bryce, E., 1998. Epidemic keratoconjunctivitis outbreak at a tertiary referral eye care clinic. *Am. J. Infect. Control* 26, 399–405.

Montone, K.T., Furth, E.E., Pietra, G.G., Gupta, P.K., 1995. Neonatal adenovirus infection: a case report with in situ hybridization confirmation of ascending intrauterine infection. *Diagn. Cytopathol.* 12, 341–344.

Moosmann, A., Bigalke, I., Tischer, J., Schirrmann, L., Kasten, J., Tippmer, S., Leeping, M.,

- Prevalsek, D., Jaeger, G., Ledderose, G., Mautner, J., Hammerschmidt, W., Schendel, D.J., Kolb, H.-J., 2010. Effective and long-term control of EBV PTLID after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* 115, 2960–2970. doi:10.1182/blood-2009-08-236356
- Morfin, F., Dupuis-Girod, S., Frobert, E., Mundweiler, S., Carrington, D., Sedlacek, P., Bierings, M., Cetkovsky, P., Kroes, A.C.M., van Tol, M.J.D., Thouvenot, D., 2009. Differential susceptibility of adenovirus clinical isolates to cidofovir and ribavirin is not related to species alone. *Antivir. Ther.* 14, 55–61.
- Morfin, F., Dupuis-Girod, S., Mundweiler, S., Falcon, D., Carrington, D., Sedlacek, P., Bierings, M., Cetkovsky, P., Kroes, A.C.M., van Tol, M.J.D., Thouvenot, D., 2005. In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antivir. Ther.* 10, 225–229.
- Mufson, M.A., Belshe, R.B., 1976. A review of adenoviruses in the etiology of acute hemorrhagic cystitis. *J. Urol.* 115, 191–194.
- Myerowitz, R.L., Stalder, H., Oxman, M.N., Levin, M.J., Moore, M., Leith, J.D., Gantz, N.M., Hierholzer, J.C., Hierholzer, J.C., 1975. Fatal disseminated adenovirus infection in a renal transplant recipient. *Am. J. Med.* 59, 591–598.
- Myers, G.D., Krance, R.A., Weiss, H., Kuehnle, I., Demmler, G., Heslop, H.E., Bollard, C.M., 2005. Adenovirus infection rates in pediatric recipients of alternate donor allogeneic bone marrow transplants receiving either antithymocyte globulin (ATG) or alemtuzumab (Campath). *Bone Marrow Transplant.* 36, 1001–1008. doi:10.1038/sj.bmt.1705164
- Mynarek, M., Ganzenmueller, T., Mueller-Heine, A., Mielke, C., Gonnermann, A., Beier, R., Sauer, M., Eiz-Vesper, B., Kohstall, U., Sykora, K.-W., Heim, A., Maecker-Kolhoff, B., 2014. Patient, virus, and treatment-related risk factors in pediatric adenovirus infection after stem cell transplantation: results of a routine monitoring program. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 20, 250–256. doi:10.1016/j.bbmt.2013.11.009
- Naesens, L., Lenaerts, L., Andrei, G., Snoeck, R., Van Beers, D., Holy, A., Balzarini, J., De Clercq, E., 2005. Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1010–1016. doi:10.1128/AAC.49.3.1010-1016.2005
- Nakamura, M., Hirano, E., Kowada, K., Ishiguro, F., Yamagishi, Z., Adhikary, A.K., Hanaoka, N., Okabe, N., Taniguchi, K., Fujimoto, T., 2012. Surveillance of adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukui Prefecture, Japan, 1995-2010. *J. Med. Virol.* 84, 81–86. doi:10.1002/jmv.22252
- Nauheim, R.C., Romanowski, E.G., Araullo-Cruz, T., Kowalski, R.P., Turgeon, P.W., Stopak, S.S., Gordon, Y.J., 1990. Prolonged recoverability of desiccated adenovirus type 19 from various surfaces. *Ophthalmology* 97, 1450–1453.
- Nemerow, G.R., Stewart, P.L., Reddy, V.S., 2012. Structure of human adenovirus. *Curr. Opin. Virol.* 2, 115–121. doi:10.1016/j.coviro.2011.12.008

Neumann, R., Genersch, E., Eggers, H.J., 1987. Detection of adenovirus nucleic acid sequences in human tonsils in the absence of infectious virus. *Virus Res.* 7, 93–97.

Nilsson, E.C., Storm, R.J., Bauer, J., Johansson, S.M.C., Lookene, A., Ångström, J., Hedenström, M., Eriksson, T.L., Frängsmyr, L., Rinaldi, S., Willison, H.J., Pedrosa Domellöf, F., Stehle, T., Arnberg, N., 2011. The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. *Nat. Med.* 17, 105–109. doi:10.1038/nm.2267

Ning, Q., Brown, D., Parodo, J., Catral, M., Gorczynski, R., Cole, E., Fung, L., Ding, J.W., Liu, M.F., Rotstein, O., Phillips, M.J., Levy, G., 1998. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J. Immunol. Baltim. Md* 160, 3487–3493.

Ohuri, N.P., Michaels, M.G., Jaffe, R., Williams, P., Yousem, S.A., 1995. Adenovirus pneumonia in lung transplant recipients. *Hum. Pathol.* 26, 1073–1079.

Osamura, T., Mizuta, R., Yoshioka, H., Fushiki, S., 1993. Isolation of adenovirus type 11 from the brain of a neonate with pneumonia and encephalitis. *Eur. J. Pediatr.* 152, 496–499.

Pagliara, D., Savoldo, B., 2012. Cytotoxic T lymphocytes for the treatment of viral infections and posttransplant lymphoproliferative disorders in transplant recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 431–437. doi:10.1097/QCO.0b013e3283551dd3

Painter, G.R., Hostetler, K.Y., 2004. Design and development of oral drugs for the prophylaxis and treatment of smallpox infection. *Trends Biotechnol.* 22, 423–427. doi:10.1016/j.tibtech.2004.06.008

Painter, W., Robertson, A., Trost, L.C., Godkin, S., Lampert, B., Painter, G., 2012. First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2726–2734. doi:10.1128/AAC.05983-11

Paolino, K., Sande, J., Perez, E., Loechelt, B., Jantusch, B., Painter, W., Anderson, M., Tippin, T., Lanier, E.R., Fry, T., DeBiasi, R.L., 2011. Eradication of disseminated adenovirus infection in a pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipient using the novel antiviral agent CMX001. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 50, 167–170. doi:10.1016/j.jcv.2010.10.016

Paolino, K., Sande, J., Perez, E., Loechelt, B., Jantusch, B., Painter, W., Anderson, M., Tippin, T., Lanier, E.R., Fry, T., DeBiasi, R.L., 2011. Eradication of disseminated adenovirus infection in a pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipient using the novel antiviral agent CMX001. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 50, 167–170. doi:10.1016/j.jcv.2010.10.016

Parker, S., Handley, L., Buller, R.M., 2008. Therapeutic and prophylactic drugs to treat orthopoxvirus infections. *Future Virol.* 3, 595–612. doi:10.2217/17460794.3.6.595

Pello, O.M., Innes, A.J., Bradshaw, A., Finn, S.-A., Uddin, S., Bray, E., Olavarria, E., Apperley, J.F., Pavlů, J., 2017. BKV-specific T cells in the treatment of severe refractory

haemorrhagic cystitis after HLA-haploidentical haematopoietic cell transplantation. *Eur. J. Haematol.* 98, 632–634. doi:10.1111/ejh.12848

Perez-Romero, P., Gustin, K.E., Imperiale, M.J., 2006. Dependence of the encapsidation function of the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein on its ability to bind the packaging sequence. *J. Virol.* 80, 1965–1971. doi:10.1128/JVI.80.4.1965-1971.2006

Ponterio, E., Gnassi, L., 2015. Adenovirus 36 and Obesity: An Overview. *Viruses* 7, 3719–3740. doi:10.3390/v7072787

Qasim, W., Gilmour, K., Zhan, H., Derniame, S., McNicol, A.M., Ip, W., Hiwarkar, P., Veys, P., Gaspar, H.B., 2013. Interferon- γ capture T cell therapy for persistent Adenoviraemia following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 161, 449–452. doi:10.1111/bjh.12251

Qian, C., Campidelli, A., Wang, Y., Cai, H., Venard, V., Jeulin, H., Dalle, J.H., Pochon, C., D'aveni, M., Bruno, B., Paillard, C., Vigouroux, S., Jubert, C., Ceballos, P., Marie-Cardine, A., Galambrun, C., Cholle, C., Clerc Urmes, I., Petitpain, N., De Carvalho Bittencourt, M., Decot, V., Reppel, L., Salmon, A., Clement, L., Bensoussan, D., 2017. Curative or pre-emptive adenovirus-specific T cell transfer from matched unrelated or third party haploidentical donors after HSCT, including UCB transplantations: a successful phase I/II multicenter clinical trial. *J. Hematol. Oncol.* 10, 102. doi:10.1186/s13045-017-0469-0

Quenelle, D.C., Lampert, B., Collins, D.J., Rice, T.L., Painter, G.R., Kern, E.R., 2010. Efficacy of CMX001 against herpes simplex virus infections in mice and correlations with drug distribution studies. *J. Infect. Dis.* 202, 1492–1499. doi:10.1086/656717

Radin, J.M., Hawksworth, A.W., Kammerer, P.E., Balansay, M., Raman, R., Lindsay, S.P., Brice, G.T., 2014. Epidemiology of pathogen-specific respiratory infections among three US populations. *PloS One* 9, e114871. doi:10.1371/journal.pone.0114871

Robin, M., Marque-Juillet, S., Scieux, C., Peffault de Latour, R., Ferry, C., Rocha, V., Molina, J.-M., Bergeron, A., Devergie, A., Gluckman, E., Ribaud, P., Socié, G., 2007. Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica* 92, 1254–1257.

Robinson, C.M., Rajaiya, J., Zhou, X., Singh, G., Dyer, D.W., Chodosh, J., 2011a. The E3 CR1-gamma gene in human adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *Virus Res.* 160, 120–127. doi:10.1016/j.virusres.2011.05.022

Robinson, C.M., Seto, D., Jones, M.S., Dyer, D.W., Chodosh, J., 2011c. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 11, 1208–1217. doi:10.1016/j.meegid.2011.04.031

Robinson, C.M., Singh, G., Lee, J.Y., Dehghan, S., Rajaiya, J., Liu, E.B., Yousuf, M.A., Betensky, R.A., Jones, M.S., Dyer, D.W., Seto, D., Chodosh, J., 2013. Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci. Rep.* 3, 1812. doi:10.1038/srep01812

Rodríguez, I., Lázaro, J.M., Blanco, L., Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Steitz, T.A., Salas, M., de Vega, M., 2005. A specific subdomain in phi29 DNA polymerase confers both

processivity and strand-displacement capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6407–6412. doi:10.1073/pnas.0500597102

Rothwell, P.J., Waksman, G., 2005. Structure and mechanism of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* 71, 401–440. doi:10.1016/S0065-3233(04)71011-6

Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 84, 570–573.

Roy, S., Calcedo, R., Medina-Jaszek, A., Keough, M., Peng, H., Wilson, J.M., 2011. Adenoviruses in lymphocytes of the human gastro-intestinal tract. *PloS One* 6, e24859. doi:10.1371/journal.pone.0024859

Russell, K.L., Broderick, M.P., Franklin, S.E., Blyn, L.B., Freed, N.E., Moradi, E., Ecker, D.J., Kammerer, P.E., Osuna, M.A., Kajon, A.E., Morn, C.B., Ryan, M.A.K., 2006. Transmission dynamics and prospective environmental sampling of adenovirus in a military recruit setting. *J. Infect. Dis.* 194, 877–885. doi:10.1086/507426

Russell, W.C., 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *J. Gen. Virol.* 90, 1–20. doi:10.1099/vir.0.003087-0

Rutala, W.A., Peacock, J.E., Gergen, M.F., Sobsey, M.D., Weber, D.J., 2006. Efficacy of hospital germicides against adenovirus 8, a common cause of epidemic keratoconjunctivitis in health care facilities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1419–1424. doi:10.1128/AAC.50.4.1419-1424.2006

Sambursky, R.P., Fram, N., Cohen, E.J., 2007. The prevalence of adenoviral conjunctivitis at the Wills Eye Hospital Emergency Room. *Optom. St Louis Mo* 78, 236–239. doi:10.1016/j.optm.2006.11.012

Sarantis, H., Johnson, G., Brown, M., Petric, M., Tellier, R., 2004b. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3963–3969. doi:10.1128/JCM.42.9.3963-3969.2004

Sauerbrei, A., Bohn-Wippert, K., Kaspar, M., Krumbholz, A., Karrasch, M., Zell, R., 2016b. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 6–16. doi:10.1093/jac/dkv285

Scherer, J., Vallee, R.B., 2011. Adenovirus recruits dynein by an evolutionary novel mechanism involving direct binding to pH-primed hexon. *Viruses* 3, 1417–1431. doi:10.3390/v3081417

Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Merkel, O., Jakob, M., Hallas, C., Kruse, M.-L., Groitl, P., Lehn, A., Hildt, E., Held-Feindt, J., Dobner, T., Kabelitz, D., Krönke, M., Schütze, S., 2006. Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *J. Clin. Invest.* 116, 2901–2913. doi:10.1172/JCI23771

Schreiner, S., Wimmer, P., Sirma, H., Everett, R.D., Blanchette, P., Groitl, P., Dobner, T., 2010. Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human

adenovirus-infected cells. *J. Virol.* 84, 7029–7038. doi:10.1128/JVI.00074-10

Sester, M., Koebernick, K., Owen, D., Ao, M., Bromberg, Y., May, E., Stock, E., Andrews, L., Groh, V., Spies, T., Steinle, A., Menz, B., Burgert, H.-G., 2010. Conserved amino acids within the adenovirus 2 E3/19K protein differentially affect downregulation of MHC class I and MICA/B proteins. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 255–267. doi:10.4049/jimmunol.0902343

Sethna, P., Bae, A., Selleseth, D., Lanier, R., 2014. In vitro selection of brincidofovir-resistant and cidofovir-resistant human adenovirus, in: Poster. Presented at the 27th International Conference on Antiviral Research (ICAR), Raleigh, North Carolina, USA.

Sethna, P., Bae, A., Selleseth, D., Lanier, R., 2014. In-Vitro-Selection-of-Brincidofovir-Resistant-and-Cidofovir-Resistant-Human-Adenovirus. Presented at the ICAR, Raleigh, NC.

Shevelev, I.V., Hübscher, U., 2002. The 3' 5' exonucleases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 364–376. doi:10.1038/nrm804

Shirali, G.S., Ni, J., Chinnoek, R.E., Johnston, J.K., Rosenthal, G.L., Bowles, N.E., Towbin, J.A., 2001. Association of viral genome with graft loss in children after cardiac transplantation. *N. Engl. J. Med.* 344, 1498–1503. doi:10.1056/NEJM200105173442002

Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Khare, G.P., Allen, L.B., Witkowski, J.T., Robins, R.K., 1972. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177, 705–706.

Similä, S., Jouppila, R., Salmi, A., Pohjonen, R., 1970. Encephalomyelitis in children associated with an adenovirus type 7 epidemic. *Acta Paediatr. Scand.* 59, 310–316.

Smith, J.G., Wiethoff, C.M., Stewart, P.L., Nemerow, G.R., 2010. Adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 343, 195–224. doi:10.1007/82_2010_16

South, M.A., Dolen, J., Beach, D.K., Mirkovic, R.R., 1982. Fatal adenovirus hepatic necrosis in severe combined immune deficiency. *Pediatr. Infect. Dis.* 1, 416–419.

Stewart, P.L., Fuller, S.D., Burnett, R.M., 1993. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J.* 12, 2589–2599.

Sun, N.-F., Zhong, W.-Y., Lu, S.-A., Tian, Y.-L., Chen, J.-B., Hu, S.-Y., Tian, A.-L., 2013. Coexpression of recombinant adenovirus carrying GDNF and EDNRB genes in neural stem cells in vitro. *Cell Biol. Int.* 37, 458–463. doi:10.1002/cbin.10060

Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R.P., Greber, U.F., 1999. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* 144, 657–672.

Suparno, C., Milligan, D.W., Moss, P.A.H., Mautner, V., 2004. Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis

- and management. *Leuk. Lymphoma* 45, 873–885. doi:10.1080/10428190310001628176
- Swenson, P.D., Lowens, M.S., Celum, C.L., Hierholzer, J.C., 1995. Adenovirus types 2, 8, and 37 associated with genital infections in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2728–2731.
- Tabain, I., Ljubin-Sternak, S., Cepin-Bogović, J., Markovinović, L., Knezović, I., Mlinarić-Galinović, G., 2012. Adenovirus respiratory infections in hospitalized children: clinical findings in relation to species and serotypes. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31, 680–684. doi:10.1097/INF.0b013e318256605e
- Takemori, N., 1972. Genetic studies with tumorigenic adenoviruses. 3. Recombination in adenovirus type 12. *Virology* 47, 157–167.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- Tang, L., Gong, M., Zhang, P., 2016. In vitro CRISPR-Cas9-mediated efficient Ad5 vector modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 474, 395–399. doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.129
- Taniguchi, K., Yoshihara, S., Tamaki, H., Fujimoto, T., Ikegame, K., Kaida, K., Nakata, J., Inoue, T., Kato, R., Fujioka, T., Okada, M., Soma, T., Ogawa, H., 2012. Incidence and treatment strategy for disseminated adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation. *Ann. Hematol.* 91, 1305–1312. doi:10.1007/s00277-012-1440-3
- Thacker, E.E., Timares, L., Matthews, Q.L., 2009. Strategies to overcome host immunity to adenovirus vectors in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 8, 761–777. doi:10.1586/erv.09.29
- Thomas, E., Ghany, M.G., Liang, T.J., 2012. The application and mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antivir. Chem. Chemother.* 23, 1–12. doi:10.3851/IMP2125
- Tippin, T.K., Morrison, M.E., Brundage, T.M., Momméja-Marin, H., 2016. Brincidofovir Is Not A Substrate For The Human Organic Anion Transporter 1 (Oat1): A Mechanistic Explanation For The Lack Of Nephrotoxicity Observed In Clinical Studies. *Ther. Drug Monit.* doi:10.1097/FTD.0000000000000353
- Tollefson, A.E., Ryerse, J.S., Scaria, A., Hermiston, T.W., Wold, W.S., 1996. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 220, 152–162. doi:10.1006/viro.1996.0295
- Tollefson, A.E., Spencer, J.F., Ying, B., Buller, R.M.L., Wold, W.S.M., Toth, K., 2014. Cidofovir and brincidofovir reduce the pathology caused by systemic infection with human type 5 adenovirus in immunosuppressed Syrian hamsters, while ribavirin is largely ineffective in this model. *Antiviral Res.* 112, 38–46. doi:10.1016/j.antiviral.2014.10.005
- Trinh, H.V., Lesage, G., Chennampampil, V., Vollenweider, B., Burckhardt, C.J., Schauer, S., Havenga, M., Greber, U.F., Hemmi, S., 2012. Avidity binding of human adenovirus

serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection. *J. Virol.* 86, 1623–1637. doi:10.1128/JVI.06181-11

Trotman, L.C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R.P., Greber, U.F., 2001. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat. Cell Biol.* 3, 1092–1100. doi:10.1038/ncb1201-1092

Trousdale, M.D., Goldschmidt, P.L., Nóbrega, R., 1994. Activity of ganciclovir against human adenovirus type-5 infection in cell culture and cotton rat eyes. *Cornea* 13, 435–439.

Truniger, V., Blanco, L., Salas, M., 1999. Role of the “YxGG/A” motif of Phi29 DNA polymerase in protein-primed replication. *J. Mol. Biol.* 286, 57–69.

Uhnoo, I., Svensson, L., Wadell, G., 1990. Enteric adenoviruses. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 4, 627–642.

Uil, T.G., Vellinga, J., de Vrij, J., van den Hengel, S.K., Rabelink, M.J.W.E., Cramer, S.J., Eekels, J.J.M., Ariyurek, Y., van Galen, M., Hoebe, R.C., 2011. Directed adenovirus evolution using engineered mutator viral polymerases. *Nucleic Acids Res.* 39, e30. doi:10.1093/nar/gkq1258

Van, R., Wun, C.C., O’Ryan, M.L., Matson, D.O., Jackson, L., Pickering, L.K., 1992. Outbreaks of human enteric adenovirus types 40 and 41 in Houston day care centers. *J. Pediatr.* 120, 516–521.

van Tol, M.J.D., Claas, E.C.J., Heemskerk, B., Veltrop-Duits, L.A., de Brouwer, C.S., van Vreeswijk, T., Sombroek, C.C., Kroes, A.C.M., Beersma, M.F.C., de Klerk, E.P.A., Egeler, R.M., Lankester, A.C., Schilham, M.W., 2005. Adenovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation: diagnosis, treatment and immunity. *Bone Marrow Transplant.* 35 Suppl 1, S73-76. doi:10.1038/sj.bmt.1704852

van Tol, M.J.D., Kroes, A.C.M., Schinkel, J., Dinkelaar, W., Claas, E.C.J., Jol-van der Zijde, C.M., Vossen, J.M., 2005. Adenovirus infection in paediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with a delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant.* 36, 39–50. doi:10.1038/sj.bmt.1705003

Veltrop-Duits, L.A., van Vreeswijk, T., Heemskerk, B., Thijssen, J.C.P., El Seady, R., Jol-van der Zijde, E.M., Claas, E.C.J., Lankester, A.C., van Tol, M.J.D., Schilham, M.W., 2011. High titers of pre-existing adenovirus serotype-specific neutralizing antibodies in the host predict viral reactivation after allogeneic stem cell transplantation in children. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 52, 1405–1413. doi:10.1093/cid/cir231

Verma, I.M., Somia, N., 1997. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239–242. doi:10.1038/38410

Vora, G.J., Lin, B., Gratwick, K., Meador, C., Hansen, C., Tibbetts, C., Stenger, D.A., Irvine, M., Seto, D., Purkayastha, A., Freed, N.E., Gibson, M.G., Russell, K., Metzgar, D., 2006. Co-infections of adenovirus species in previously vaccinated patients. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 921–930.

Votteler, J., Sundquist, W.I., 2013. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host*

Microbe 14, 232–241. doi:10.1016/j.chom.2013.08.012

Wadell, G., Hammarskjöld, M.L., Winberg, G., Varsanyi, T.M., Sundell, G., 1980. Genetic variability of adenoviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 354, 16–42.

Walsh, M.P., Chintakuntlawar, A., Robinson, C.M., Madisch, I., Harrach, B., Hudson, N.R., Schnurr, D., Heim, A., Chodosh, J., Seto, D., Jones, M.S., 2009. Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PloS One* 4, e5635. doi:10.1371/journal.pone.0005635

Walsh, M.P., Seto, J., Liu, E.B., Dehghan, S., Hudson, N.R., Lukashev, A.N., Ivanova, O., Chodosh, J., Dyer, D.W., Jones, M.S., Seto, D., 2011. Computational analysis of two species C human adenoviruses provides evidence of a novel virus. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3482–3490. doi:10.1128/JCM.00156-11

Wang, H., Li, Z., Yumul, R., Lara, S., Hemminki, A., Fender, P., Lieber, A., 2011. Multimerization of adenovirus serotype 3 fiber knob domains is required for efficient binding of virus to desmoglein 2 and subsequent opening of epithelial junctions. *J. Virol.* 85, 6390–6402. doi:10.1128/JVI.00514-11

Wang, Y., Li, Y., Lu, R., Zhao, Y., Xie, Z., Shen, J., Tan, W., 2016. Phylogenetic evidence for intratypic recombinant events in a novel human adenovirus C that causes severe acute respiratory infection in children. *Sci. Rep.* 6, 23014. doi:10.1038/srep23014

Wevers, D., Metzger, S., Babweteera, F., Bieberbach, M., Boesch, C., Cameron, K., Couacy-Hymann, E., Cranfield, M., Gray, M., Harris, L.A., Head, J., Jeffery, K., Knauf, S., Lankester, F., Leendertz, S.A.J., Lonsdorf, E., Mugisha, L., Nitsche, A., Reed, P., Robbins, M., Travis, D.A., Zommers, Z., Leendertz, F.H., Ehlers, B., 2011. Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions. *J. Virol.* 85, 10774–10784. doi:10.1128/JVI.00810-11

Wiethoff, C.M., Wodrich, H., Gerace, L., Nemerow, G.R., 2005. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J. Virol.* 79, 1992–2000. doi:10.1128/JVI.79.4.1992-2000.2005

Wildner, O., Hoffmann, D., Jogler, C., Uberla, K., 2003. Comparison of HSV-1 thymidine kinase-dependent and -independent inhibition of replication-competent adenoviral vectors by a panel of drugs. *Cancer Gene Ther.* 10, 791–802. doi:10.1038/sj.cgt.7700638

Wodrich, H., Cassany, A., D'Angelo, M.A., Guan, T., Nemerow, G., Gerace, L., 2006. Adenovirus core protein pVII is translocated into the nucleus by multiple import receptor pathways. *J. Virol.* 80, 9608–9618. doi:10.1128/JVI.00850-06

Xu, J., Lin, L., Yong, M., Dong, X., Yu, T., Hu, L., 2016. Adenovirus-mediated overexpression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhances invasiveness and motility of serous ovarian cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 13, 265–272. doi:10.3892/mmr.2015.4509

Yabe, Y., Trentin, J.J., Taylor, G., 1962. Cancer induction in hamsters by human type 12

adenovirus. Effect of age and of virus dose. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med.* N. Y. N 111, 343–344.

Yabiku, S.T., Yabiku, M.M., Bottós, K.M., Araújo, A.L., Freitas, D. de, Belfort Jr, R., 2011. [Ganciclovir 0.15% ophthalmic gel in the treatment of adenovirus keratoconjunctivitis]. *Arq. Bras. Oftalmol.* 74, 417–421.

Ying, B., Tollefson, A.E., Spencer, J.F., Balakrishnan, L., Dewhurst, S., Capella, C., Buller, R.M.L., Toth, K., Wold, W.S.M., 2014. Ganciclovir inhibits human adenovirus replication and pathogenicity in permissive immunosuppressed Syrian hamsters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7171–7181. doi:10.1128/AAC.03860-14

Yoon, B.W., Song, Y.G., Lee, S.H., 2017. Severe community-acquired adenovirus pneumonia treated with oral ribavirin: a case report. *BMC Res. Notes* 10, 47. doi:10.1186/s13104-016-2370-2

Yusuf, U., Hale, G.A., Carr, J., Gu, Z., Benaim, E., Woodard, P., Kasow, K.A., Horwitz, E.M., Leung, W., Srivastava, D.K., Handgretinger, R., Hayden, R.T., 2006. Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation* 81, 1398–1404. doi:10.1097/01.tp.0000209195.95115.8

Zahradnik, J.M., 1987. Adenovirus pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* 2, 104–111.

Zhang, W., Low, J.A., Christensen, J.B., Imperiale, M.J., 2001. Role for the adenovirus IVa2 protein in packaging of viral DNA. *J. Virol.* 75, 10446–10454. doi:10.1128/JVI.75.21.10446-10454.2001

Zhao, L.J., Padmanabhan, R., 1988. Nuclear transport of adenovirus DNA polymerase is facilitated by interaction with preterminal protein. *Cell* 55, 1005–1015.

Zhou, S., Liu, R., Baroudy, B.M., Malcolm, B.A., Reyes, G.R., 2003. The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* 310, 333–342.

Zubieta, C., Schoehn, G., Chroboczek, J., Cusack, S., 2005. The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol. Cell* 17, 121–135. doi:10.1016/j.molcel.2004.11

ANNEXE 1

ANNEXE 1 : Publications, communications et enseignements

PUBLICATIONS

Associées à la thèse

Feghoul L, Mercier-Delarue S, Salmona M, N Ntsiba, Fahd M, Dalle JH, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. Genetic diversity of the human adenovirus species C DNA polymerase. *Antiviral Research*, en révision.

Feghoul L, Salmona M, Roques P, Mercier-Delarue S, J cherot, C Scieux, Fahd M, Dalle JH, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. Molecular decryption of an epidemic of group C adenovirus infections in children recipients of hematopoietic stem cells. En préparation.

Sur la thématique Adénovirus

Feghoul L, Salmona M, Cherot J, Fahd M, Dalle JH, Vachon C, Perrod A, Bourgeois P, Scieux C, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. Evaluation of a new device to simplify and standardize stool samples preparation for viral molecular testing with a limited hand-on-time. *J Clin Microbiol*. 2016 Apr;54(4):928-33.`

Feghoul L, Chevret S, Cuinet A, Dalle JH, Ouachée M, Yacouben K, Fahd M, Guérin-El Khourouj V, Roupert-Serzec J, Sterkers G, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. Adenovirus infection and disease in paediatric haematopoietic stem cell transplant patients: clues for antiviral pre-emptive treatment. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Jul;21(7):701-9.

Legoff J, **Feghoul L**, Mercier-Delarue S, Dalle JH, Scieux C, Chérot J, de Fontbrune FS, Baruchel A, Socié G, Simon F. Broad-range PCR-electrospray ionization mass spectrometry for detection and typing of adenovirus and other opportunistic viruses in stem cell transplant patients. *J Clin Microbiol*. 2013 Dec;51(12):4186-92.

Autres publications

Maylin S, **Feghoul L**, Salmona M, Herda A, Mercier-Delarue S, Simon F, Legoff J. Evaluation the Architect EBV VCA IgM, VCA IgG, and EBNA-1 IgG chemiluminescent immunoassays to assess EBV serostatus prior transplantation. *J Med Virol*. 2017 Jun 29. doi: 10.1002/jmv.24889.

Salmona M, Fourati S, **Feghoul L**, Scieux C, Thiriez A, Simon F, Resche-Rigon M, LeGoff J. Automated quantification of Epstein-Barr Virus in whole blood of hematopoietic stem cell transplant patients using the Abbott m2000 system. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Aug;85(4):428-32. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.017.

Schnepf N, Scieux C, Resche-Riggon M, **Feghoul L**, Xhaard A, Gallien S, Molina JM, Socié G, Viglietti D, Simon F, Mazon MC, Legoff J. Fully automated quantification of cytomegalovirus (CMV) in whole blood with the new sensitive Abbott RealTime CMV assay in the era of the CMV international standard. *J Clin Microbiol*. 2013 Jul;51(7):2096-102.

Rousseau C, Poilane I, Diakite F, Feghoul L, Cruaud P, Collignon A. Comparison of three *Clostridium difficile* culture media: interest of enhancing spore germination media. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Feb;58(1):58-61.

Communications orales et affichées

Communications Orales

Feghoul L, Fahd M, Ouachée M, Baruchel A, Simon F, Dalle JH, LeGoff J. Effectiveness of BCV for the treatment of digestive diseases and disseminated adenovirus infections in recipients of pediatric hematopoietic stem cells. RICAI, décembre 2015.

Feghoul L, Fahd M, Ouachée M, Baruchel A, Simon F, Dalle JH, LeGoff J. Effectiveness of BCV for the treatment of digestive diseases and disseminated adenovirus infections in recipients of pediatric hematopoietic stem cells. ESCV, septembre 2015.

Feghoul L, Chérot J, Perrod A, Gicquel S, Vachon C, Rostaing H, Dalle JH., Simon F, Legoff J. Standardisation et simplification du prétraitement des selles pour le dépistage des infections virales. RICAI, décembre 2014.

Feghoul L, Fahd M, Ouachée M, Baruchel A, Simon F, Dalle JH, LeGoff J. Effectiveness of CMX001 for the treatment of digestive diseases and disseminated adenovirus infections in recipients of pediatric hematopoietic stem cells. EuSeV, juin 2014

Feghoul L, Dalle JH, Chevret S, Ouachée M, Baruchel M, Fahd M, Guérin V, Sterkers G, Simon F, LeGoff J. Risk Factors for Adenovirus Infection and Disease in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant patients. ESCV, septembre 2013.

Feghoul L, Dalle JH, Chevret S, Ouachée M, Fahd M, Yacouben K, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. Risk Factors for Adenovirus Infection and Disease in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant patients. RICAI, novembre 2012.

Feghoul L, Roques P, Cherot J, Dalle JH, Rodier M, Ouachée M, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. Molecular decryption of an epidemic of group C adenovirus infections in children recipients of hematopoietic stem cells. EBMT pediatric, juin 2012.

Feghoul L, Dalle JH, Lambert J, Ouachee M, Scieux C, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. Adenovirus load in stool predicts invasive dissemination in pediatric recipients of hematopoietic stem cells. EBMT, avril 2012.

Feghoul L, Roques P, Cherot J, Dalle JH, Rodier M, Ouachée M, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. Décryptage moléculaire d'une épidémie d'infections à Adénovirus du groupe C chez les enfants receveurs de cellules souches hématopoïétiques. Journée Francophone de Virologie, mars 2012.

Feghoul L, Dalle JH, Lambert J, Ouachee M, Scieux C, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. La charge virale adénovirus dans les selles est prédictive de la dissémination sanguine chez les enfants receveurs de cellules souches hématopoïétiques. RICAI, décembre 2011.

Communications Affichées

Feghoul L, Cherot J, Salmona M, Dalle JH, Scieux C, Simon F, LeGoff J. Evaluation of a new device to simplify and standardize stool samples preparation for viral molecular testing. ESCV, septembre 2015.

Feghoul L, Richard Gabriel Wijekulasingham L, Cherot J, Dalle JH, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. Polymorphisme génétique de l'ADN polymérase des Adénovirus. Journée Francophone de Virologie, mars 2014.

Feghoul L, Dalle JH, Chevret S, Ouachée M, Baruchel A, Fahd M, Guérin V, Sterkers G, Simon F, LeGoff J. Risk Factors for Adenovirus Infection and Disease in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant patients. EBMT, avril 2013.

Feghoul L, Dalle JH, Chevret S, Ouachée M, Baruchel A, Fahd M, Guérin V, Sterkers G, Simon F, LeGoff J. Risk Factors for Adenovirus Infection and Disease in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant patients. ICAAC, septembre 2012.

Feghoul L, Roques P, Cherot J, Dalle JH, Rodier M, Ouachée M, Baruchel A, Simon F, LeGoff J. Molecular decryption of an epidemic of group C adenovirus infections in children recipients of hematopoietic stem cells. EBMT, avril 2012.

Diamantis S, Armand-Lefevre L, **Feghoul L**, Ruppé E, Coignard B, Lucet JC, Andremont A, Matheron S. Portage digestif d'entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (EBLSE) après séjour dans les tropiques. RICA, décembre 2010.

Rousseau C, Poilane I, Diakite F, **Feghoul L**, Cruaud P, Collignon A. Comparaison de milieux de culture pour le diagnostic du *Clostridium difficile*. RICA, décembre 2008.

Feghoul L, Bienvenu L, Boulanger MC, Saint-leger S, Maisonneuve L. Recherche d'ADN d'HPV dans les frottis cervico-vaginaux en hôpital général, intérêt et perspectives d'une collaboration anatomo-clinico-biologique ». Congrès des Hôpitaux généraux, octobre 2008.

Sène D., Diemert M.C; **Feghoul L**; Musset L; Caillat-Zucman S; Cacoub P, Piette J.C. Anti-Cyclic Citrullinated Peptide, Anti-Mutated Citrullinated Vimentin Antibodies and HLA-DRB1*04 (DR4) association in Relapsing Polychondritis: from a series of 104 patients». Congrès de l'American College of Rheumatology, 2008

Enseignements

Enseignements universitaire

Faculté de médecine l'université Paris Diderot

ED de Virologie aux étudiants de médecine de DFGSM3 de 2011 à 2015

Cours magistral (infections respiratoires virales) en 2013

Enseignements hospitalier

Encadrement des internes et externes dans le service de microbiologie (Pr F Simon), hôpital Saint-Louis, de 2011 à 2015

Participation aux séances hebdomadaires d'enseignement proposées à l'ensemble des internes, techniciens et biologistes des services de microbiologie et parasitologie.

Enseignements post-universitaire

Groupe pour la recherche et de l'enseignement en pneumo-infectiologie) en 2013. Diagnostic des infections respiratoires Virales.

Encadrement

Tuteur d'un **diplôme d'ingénieur CNAM** Spécialité Génie Biologique en 2013

Tuteur d'un étudiant **M1 de Microbiologie** (Université Paris-Est créteil) en 2014

Co-Tuteur d'un étudiant **M2 de Microbiologie** (faculté de pharmacie Chatenay-Malabry) en 2015

ANNEXE 2

ANNEXE 2 : Publication soumis à Antiviral Research en juin 2016, acceptée, en révision.

Genetic diversity of the human adenovirus species C DNA polymerase

Linda Feghoul¹, Séverine Mercier-Delarue¹, Maud Salmona¹, Nora Ntsiba¹, Jean-Hugues Dalle², André Baruchel², Bernard Klonjkowski³, Jennifer Richardson³, François Simon¹, Jérôme LeGoff¹

¹ Paris Diderot University, Pres Sorbone Paris Cité, Inserm U941, Microbiology laboratory, Hôpital Saint-Louis, APHP, Paris, France

² Paris Diderot University, Pres Sorbone Paris Cité, Hematology Department, Hôpital Robert Debré, APHP, Paris, France

³ UPE, ANSES, INRA, ENVA, UMR 1161 ANSES/INRA/ENVA, Maisons-Alfort, France.

Running title: Human Adenovirus DNA polymerase polymorphism

Corresponding author

Dr Jérôme Le Goff

Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Saint-Louis

1, Avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris

Tel: +33 1 42 49 94 84 Fax: +33 1 42 49 92 00

Email: jerome.legoff@aphp.fr

ABSTRACT

Background: Human Adenovirus (HAdV) are responsible for severe infections in hematopoietic stem cells transplant (HSCT) recipient, species C viruses being the most commonly observed in this population. There is no approved antiviral treatment yet. Cidofovir (CDV), a cytidine analog, is the most frequently used and its lipophilic conjugate, brincidofovir (BCV), is under clinical development. These drugs target the viral DNA polymerase (DNA pol). Little is known about the natural polymorphism of HAdV DNA pol in clinical strains.

Methods: We assessed the inter- and intra-species variability of the whole gene coding for HAdV DNA pol (3597 nucleotides) of HAdV clinical strains of species C and identified the most variable domains. The study included 60 species C HAdV (21 C1, 27 C2 and 12 C5) strains isolated from patients with symptomatic infections who had never experienced CDV or BCV treatments and 20 reference strains.

Results: We identified 356 polymorphic nucleotide positions (9.9% of the whole gene), including 102 positions with nonsynonymous mutations (28.0%) representing 8.7% of all amino acids. The mean numbers of nucleotide and amino acid mutations per strain were 23.1 ($\pm$ 6.2) and 5.2 ($\pm$ 2.4) respectively. Most of the amino acid substitutions (n=63, 60.6%) were observed in one instance only. A minority (n=11, 13.8%) were observed in more than 10% of all strains. The most variable region was the NH2 terminal domain representing 44.2% of amino acid mutations. Mutations in the exonuclease domain accounted for 27.8%. The binding domains for the terminal protein (TPR), TPR1 and TPR2, presented a limited number of mutations, which were nonetheless frequently observed (62.5% and 58.8% of strains for TPR1 and TPR2, respectively). Mutations in highly conserved regions were scarce. None of the mutations associated with CDV or BCV resistance were detected. HAdV DNA pol polymorphisms did not cluster according to HAdV type.

Conclusions: Our study shows a high diversity in HAdV DNA pol sequences in clinical species C HAdV and provides a comprehensive mapping of its natural polymorphism. These data will contribute to the interpretation of HAdV DNA pol mutations selected in patients receiving antiviral treatments.

HIGHLIGHTS

- Nucleotide and amino acids substitutions were observed respectively in 10.3% and 8.7% of HAdV C strains.
- The most variable region was the NH2 terminal domain.
- HAdV DNA pol sequence enabled to distinguish HAdV strains within a type.
- None of the mutations associated with cidofovir or brincidofovir resistance was detected.
- The mapping of HAdV DNA pol polymorphism will help for the interpretation of genotypic assays.

KEYWORDS

Human adenovirus, DNA polymerase, polymorphism, resistance

INTRODUCTION.

Human adenoviruses (HAdV) are ubiquitous DNA non-enveloped viruses belonging to the family *Adenoviridae* and the Mastadenovirus genera. More than sixty types divided into seven species from A to G have been described (Seto et al., 2011). HAdV infections cause various symptoms that usually remain limited in immunocompetent adults. In contrast, in immunocompromised patients, especially in pediatric hematopoietic stem cell transplant HSCT recipients, HAdV are an important cause of morbidity. They can lead to disseminated diseases with a high fatality rate (Feghoul et al., 2015; Lion et al., 2003, 2010; Mynarek et al., 2014). Endogenous reactivation of persistent HAdV appears to be the main cause of HAdV infections in those patients (Feghoul et al., 2015; K. Kosulin et al., 2016; Markel et al., 2014; Veltrop-Duits et al., 2011). HAdV species A (types 12 and 31) and C (types 1, 2, 5 and 6) have the capacity to establish persistent infection in intestinal T lymphocytes of the digestive tract (Karin Kosulin et al., 2016) and are the most commonly observed in HSCT patients (Echavarría, 2008; Feghoul et al., 2015; K. Kosulin et al., 2016; Lion, 2014; Matthes-Martin et al., 2012).

There is currently no formally approved antiviral drug for the treatment of HAdV infections. Cidofovir (CDV) is the most frequently used although it has not been validated with randomized trials (Caroline A. Lindemans et al., 2010). CDV is a cytidine analog that inhibits the viral DNA polymerase (DNA pol). After intracellular phosphorylation, cidofovir diphosphate competitively inhibits the incorporation of deoxycytidine triphosphate into viral DNA by viral DNA pol. Brincidofovir (BCV), a lipid conjugate of CDV that offers an increased tissue distribution and intracellular uptake, is currently under clinical investigation (Painter et al., 2012; Paolino et al., 2011b). Like most direct-acting antivirals, resistance due to mutation in the target gene emerges under selective pressure. Despite a limited intracellular concentration and thus a low selective pressure, some mutations in HAdV DNA pol have been reported in a laboratory strain ATCC HAdV 5 after twenty passages in A549 cells with increasing CDV concentration (Paul R. Kinchington et al., 2002). With a similar experimental design, some mutations have also been selected using BCV in the laboratory strain ATCC HAdV type 5. The combination of T87I and V303I mutations was associated with a fivefold increase in IC50. BCV with its better pharmacokinetics characteristics might select mutations in the viral DNA pol at a higher rate than CDV (Phiroze Sethna et al., 2014). Ongoing clinical trials should unveil phenotypic and genotypic profiles of HAdV strains occurring in therapeutic failures.

Little is known about the natural polymorphism of HAdV DNA pol, and more particularly in clinical strains. A better characterization of polymorphism is needed for better understanding and interpretation of mutations detected in patients receiving antiviral treatment. Indeed, deciphering the

variability in each functional domain would allow prediction of the likely impact of any novel mutation reported in HAdV DNA pol. (Hoeben and Uil, 2013b)

The aim of the present work was to sequence the entire gene coding for the DNA pol of clinical HAdV strains of species C, the most frequent species observed in HSCT patients, to determine inter- and intraspecies variability and to map the different domains involved. The study included 60 species C HAdV strains isolated from pediatric and adult patients with symptomatic infections and who had never experienced CDV or BCV treatments.

MATERIALS AND METHODS.

Patients and viral strains.

Between 2010 and 2015, a total of 60 HAdV clinical strains including 21 HAdV C1, 27 HAdV C2 and 12 HAdV C5 were obtained from respiratory and stool samples of 60 patients (26 females and 34 males) with respiratory digestive or disseminated infections. The age of the patients ranged between 3 months and 66 years (mean $\pm$ SD age 21.5 ± 22.0 years). The main clinical characteristics are summarized in supplementary table 1. Forty patients were HSCT recipients (66.7%) (21 children and 19 adults), 11 patients were hospitalized in the infection disease department, seven patients in the general pediatric department and two in the clinical immunology department. Viral strains were obtained from 41 stool and 19 respiratory samples. No patients had received CDV, BCV or ribavirin before or at the time of sample collection.

HAdV were isolated in A549 cells in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 U/ml penicillin (Gibco, ThermoFisher Scientifics, Auckland, NZ), and 100 μ g/ml streptomycin sulfate (Gibco, ThermoFisher Scientifics, Auckland, NZ). Cells were incubated at 5% CO₂ and 37 °C. For viral propagation, 300 μ l of specimen and 700 μ l of media were inoculated in a 25 cm² corning cell culture flask. Twenty-four hours later, the inoculum was removed and replaced with 7 ml of DMEM with 2% FCS. Cell suspension was harvested when a cytopathic effect was observed.

Sample pretreatment and extraction.

Before inoculation in A549 cells or nucleic acid extraction, stool and respiratory samples were pre-treated. Stool specimens were prepared by dilution of 1 g or 1 ml of stool in 9 ml of phosphate buffered saline (PBS). The resulting suspension was subjected to three -20°C freeze-thaw cycles followed by a centrifugation step. The supernatant was passed through a 0.45 μ m filter (Minisart Plus syringe filters; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany). The respiratory samples were fluidized by the use of the digest-EUR® (EuroBio, Courtaboeuf, France) and filtered through a 0.2 μ m filter (Minisart Plus syringe filters; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany).

Nucleic acids were purified from 200 μ l pre-treated samples or viral isolate and eluted in 100 μ l using the QIA Symphony system with the Qiasymphony Virus/DSP pathogen kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Adenovirus real time PCR and typing.

Adenoviruses were detected and quantified with the Adenovirus Rgene kit (bioMérieux/Argene, Varhilles, France) according to the manufacturer's instructions (Feghoul et al., 2016b). Identification of HAdV species A to F was performed using six individual real-time PCR assays as previously described (Feghoul et al., 2015). These assays were carried out on an ABI 7500 thermocycler (Life Technologies, Carlsbad, CA). Adenovirus type identification was performed by sequencing hypervariable region 7 (HVR7) of the *hexon* gene as previously described (Sarantis et al., 2004b).

HAdV DNA polymerase gene amplification and sequencing.

HAdV DNA pol was amplified in two fragments (F1 and F2) of 2393 base pairs (bp) and 1810 bp, respectively, using two pairs of primers (F1F, F1R, F2F, F2R) (Table 1). The PCR mix for amplification of both fragments consisted of AmpliTaq Gold 360 Mastermix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10 µM of forward and reverse primers and 5 µl of template DNA. Amplification conditions included an initial denaturation step of 5 min at 95°C followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 57°C for F1 and 64°C for F2, 2 min at 72°C and a final extension step for 5 min at 72°C. After purification using the ExoSAPIT® kit (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), F1 and F2 PCR products were sequenced using F1 and F2 PCR primers and four additional inner primers (Table 1) on a ABI 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Sixty DNA pol sequences from clinical samples and 20 from NCBI published sequences were analyzed. Alignment and sequence comparison were carried out using the software Geneious 8.0.5 (Biomatters, Auckland, NZ) and MEGA version 7 (CEMI, Tempe, AZ, USA). A consensus sequence of HAdV DNA pol was defined as the result of the alignment of the 80 HAdV DNA pol sequences included in the study. All nucleotide sequence accession numbers of clinical strains analyzed in this study and previous NCBI published sequences (MF358546 to MF358605) are given in supplementary table 2.

RESULTS.

HAdV C DNA polymerase polymorphism

We first investigated frequencies and locations of polymorphisms in the DNA pol including all types of species C viruses. The comparison of HAdV C DNA pol genes from 60 clinical strains and 20 reference strains showed 356 polymorphic nucleotide positions throughout the coding sequence (3597 nt) (9.9 %). Of these nucleotide substitutions, 102 positions gave rise to nonsynonymous mutations (28.0%) representing 8.7% of the total codons of the protein (1198 amino acids).

Nucleotide polymorphism

Out of 356 polymorphic nucleotide positions, a total of 371 different mutations were identified in all HAdV C species strains (10.3% of the whole nucleotide sequence); 225 mutations for C1 (6.3%), 227 for C2 (6.3%) and 101 for C5 (2.8%) (Table S3). The number of nucleotide substitution per HAdV strain ranged from 7 to 51 (mean = 23.1 ± 6.2) (Figure 1A); 12 to 51 (mean = 23.3 ± 7.0) for HAdV C1, 10 to 41 (mean = 22.5 ± 5.9) for HAdV C2, 7 to 32 (mean = 23.9 ± 5.4) for HAdV C5 (Figure 1B).

Using HAdV DNA pol nucleotide sequences, we built a phylogenetic tree including all clinical strains and reference strains (Figure 2). None of the clinical strains tested in the study had an identical sequence with another. However, a few clinical C5 strains were closely related. C5-5 and C5-11 differed by only a single synonymous mutation, C5-10 and C5-2 differed by 11 synonymous mutations and 1 nonsynonymous mutation. Furthermore, some reference sequences were identical: C1 AC0000171 and C1 AF53490, five C5 sequences (AY339865, AY601635, KF268127, KF429754, AC000008). Strains of different types were shuffled randomly without any cluster related to HAdV type. This results highlights that the polymorphism of HAdV DNA polymerase is independent of the type, in contrast to the diversity in genes coding for structural proteins.

Amino acid polymorphism

A total of 104 different amino acid mutations were identified in the 102 polymorphic positions (8.7% of the whole amino acid sequence); 51 mutations for C1 (4.3%), 56 for C2 (4.7%) and 22 for C5 (1.8%). The number of nonsynonymous mutations per HAdV species C strain ranged 0 to 15 positions with (mean = 5.2 ± 2.4); (Table 2), 0 to 13 (mean = 4.9 ± 2.4) for HAdV C1, 0 to 15 (mean = 5.3 ± 2.5) for HAdV C2, 0 to 10 (mean = 5.7 ± 2.0) for HAdV C5. Most of the amino acid substitutions (n=63, 60.6%) were observed in one instance only. A minority of amino acid substitutions (n=11, 13.8%) were observed in more than 10% of all strains (P33T, G56R, P64S, V176I, V321A, D322N, T405I, V738I, H793R, Q897E, S926T) (Table 2).

Location of amino acid substitutions in DNA polymerase functional domains

The distribution of nucleotide substitutions according to functional domains is summarized in Table 3. Most of the amino acid substitutions were detected in NH2 terminal and exonuclease domains (Figure 3). Forty-six different amino acid mutations (44 positions) were identified in the NH2 terminal region, representing 44.2% of all amino acid mutations identified in the DNA pol of HAdV C species strains. Twenty percent (n=9) of NH2 terminal mutations were localized in the NLS sequence. Mutations in the exonuclease domain represented 27.8% of total mutations.

The most frequent mutations were identified in TPR1 (I738V, 47.5%), TPR2 (S926T, 46.3%), NH2 terminal (G56R, 50.0%) and exonuclease (V321A, 33.8%) (Table 3).

Amino acid substitutions present in more than 10% of all strains were located in NH2 terminal (G56R, P64S and V176I), NLS (P33T), exonuclease (V321A, D322N and T405I) and TPR1 (V738I and H793R) and TPR2 (Q897E and S926T) domains.

Even though mutations in the exonuclease domain were frequent, only one was identified in conserved regions: I413M in exo II. Two mutations (E1002K and O1003Y), each detected once in two different HAdV C2 strains, were found in the active site (region 3) of the palm domain. One mutation (A865V), detected in one HAdV C2 strain, in the TPR2 domain was located in motif B that is involved in base pair recognition (Delarue et al., 1990b; Knopf, 1998b).

The proportion of mutations differed between domains (Chi square test, $p < 0.0001$). Mutations in NH2 terminal (36.4%), exonuclease (26.0%) and TPR (30.0%) domains were significantly more frequent than in other domains. TPR domains presented a limited number of polymorphic positions (5.4% and 5.0% for TPR1 and TPR2 respectively). Conversely, the frequency of strains with a polymorphism in TPR domains was high (62.5 and 58.8 in TPR1 and TPR2 respectively) (Table 3). Rare mutations were observed in highly conserved regions (Exo I, II, II, regions 1-5, and motifs A, B, C) (Supplementary table 3).

Differences between types and domains.

In HAdV C1 strains, 20 amino acid substitutions were located in the NH2 terminal region of the protein (39.2%), 4 of them being in the NLS (7.8%). Nineteen were located in the exonuclease domain (37.2%). Five mutations were located in the TPR1 domain (9.8%), 3 in the TPR2 domain (5.9%), 1 in the finger domain (2.0%), 2 in the palm domain (3.9%) and 1 in the thumb domain (2.0%), and none were located in the most conserved regions (Dufour et al., 2000).

In HAdV C2 strains, 31 amino acid substitutions were located in the NH2 terminal region of the protein (47.0%), 7 of them being in the NLS (13.6%). Thirteen were located in the exonuclease

domain (19.7%). Three were located in the TPR1 domain (4.5%), 4 in the TPR2 domain (6.0%), 13 in the palm domain (19.7%) of which two— E1002K and O1003Y—concern the active site. One mutation was in the thumb domain (1.5%), and one in the finger domain (1.5%).

For the adenovirus C5, 12 amino acid substitutions were located in NH2 terminal region of the protein (54.5%), 3 of them are in the NLS (12.00%). Four were located in the exonuclease domain (18.2%) and no mutation was located in the conserved domains of the exonuclease: exo I, exo II and exo III. Two were located in the TPR1 domain (9.0%), 43 in the TPR2 domain (13.6%) and 1 in the palm domain (4.5%). No mutation was detected in the thumb and finger domain.

No difference in the proportion of amino acid positions with a substitution according to each DNA pol functional domain was observed between C1, C2 and C5 strains, except for the Palm2 domain with mutations observed only in C2 strains (Table 3).

HAdV C DNA pol mutations associated with cidofovir or brincidofovir resistance.

Some mutations in the DNA polymerase have been associated with resistance to DNA pol inhibitors, brincidofovir (V303I and T87I) and cidofovir (A501E, L677F, F882L, T1151I, S1183R). None of them were detected in strains analyzed in the study. In addition, we report no polymorphism at those positions. Other mutations (H81N, V89I, A117T, R138W, R1024Q, S1093F, L319P/L, Q618Q/STP, I670T, M698M/V, V935V/L, L1172L/F) have been described in HAdV strains isolated from patients with BCV treatment failure in clinical trials, but their impact on DNA polymerase activity or susceptibility to DNA pol inhibitors has not been investigated yet (Lanier, 2015). None of these mutations were detected in our analysis.

DISCUSSION

As new antiviral treatments targeting HAdV DNA polymerase are in clinical development, the identification of natural polymorphisms will help to interpret mutations detected in HAdV isolated from patients receiving HAdV DNA pol inhibitors. To our knowledge this is the first study to provide a wide analysis of HAdV DNA pol variability of species C human adenoviruses, including 60 clinical strains. We focused our analysis on species C viruses as they are the most frequent HAdV detected in HSCT recipients (Feghoul et al., 2015; Lion, 2014).

The polymorphism at the nucleotide level involved 9.9% of the nucleotides of the DNA pol sequence. Our results showed a much higher variability than that previously estimated by Lukhashev et al (Lukashev et al., 2008b), who found less than 1.7% of variation. The smaller size of the region analyzed in their study (1127 nucleotides (nt) encompassing a region of the NH2 terminal (328 nt) and exonuclease (1452 nt) domains and the lower number of clinical isolates (16) tested may explain this difference.

The amino acid polymorphism accounted for 8.7% of the DNA pol protein. In comparison with other human DNA viruses harboring a DNA polymerase, HAdV polymorphism in C species was lower than that reported for HSV1 involving 16.3% different positions (202/1240) (Sauerbrei et al., 2016b) but higher than HSV2 (6.3%) (75/1236) (Sauerbrei et al., 2016b).

It is noteworthy that nucleotide polymorphism was associated with the absence of clusters according to HAdV types, contrary to structural genes such as those coding for hexon and fiber (Lukashev et al., 2008b). Strains seemed to shuffle randomly regardless of serotype. Some clinical isolates of different serotypes analyzed in this work clustered together. Our results are in agreement with those reported by Lukhashev et al who showed that the genetic polymorphism was not related to the type of species C viruses and hypothesized that diversity in HAdV DNA pol might be due to inter-type recombination between viruses belonging to the same species (Lukashev et al., 2008b). Despite a lower variability than that observed in structural genes such as hexon or fiber, this intra-type polymorphism in HAdV DNA pol sequences may be used for distinguishing strains belonging to the same type and thus may be used to investigate hospital outbreaks to determine epidemiological links.

In this series of patients who did not receive any antiviral drugs to treat HAdV infections, we found neither mutations associated with resistance to brincidofovir or cidofovir, nor mutations reported in HAdV clinical isolates from patients under brincidofovir treatment and with persistent HAdV replication (Lanier, 2015; Phiroze Sethna et al., 2014). These data thus support strongly that former identified mutations emerged under drug pressure and confirm that selection *in vivo* of HAdV strains that are resistant to DNA pol inhibitors is highly probable. Sequencing of DNA pol gene would

therefore help to detect the emergence of resistant HAdV populations and anticipate potential therapeutic failure. Our mapping of HAdV DNA pol polymorphisms will help to interpret HAdV DNA pol sequencing data.

Most of the amino acid mutations identified were localized in the NH2 terminal region, which includes the nuclear localization signal (NLS). Whether one of those mutations may be involved in differential rates of nuclear import of DNA pol is unknown. However, the pre-terminal protein enables nuclear import of DNA pol irrespective of the presence of NLS (Zhao, Cell 1998), so mutations in the NLS may have little impact on nuclear import. Only one mutation was identified in exonuclease domains (I413M, ExoII), but concerned an amino acid not conserved across other DNA pol sequences of the DNA pol alpha family (Liu et al., 2000b). Few mutations were identified in TPR domains, either in TPR1 or TPR2. The roles of these domains in HAdV DNA pol remain unknown. None of the mutations found in the TPR1 region were located in the conserved motifs described by Dufour *et al* (Dufour et al., 2000). A mutation in TPR2 (F882L) has been previously selected in HAdV C5 resistant to CDV in association with other mutations, suggesting a likely role either in resistance or compensation for a loss of DNA pol activity of resistant virus (Paul R. Kinchington et al., 2002). A few mutations were also reported in the polymerase motifs in the C terminal region (L785M in pol VI, S1084N in pol VII), but at different positions from those conserved between DNA polymerase of bacteriophages RB69 and Phi29 and HAdV (Liu et al., 2000b).

In conclusion, our study shows a high diversity in HAdV DNA pol sequences in clinical HAdV isolates of species C and provides a comprehensive mapping of its natural polymorphism. These data will contribute to the interpretation of HAdV DNA pol mutations selected in patients receiving antiviral treatments and confirm that cidofovir and brincidofovir select specific mutations in the HAdV DNA pol.

References

- Aïssi-Rothé, L., Decot, V., Venard, V., Jeulin, H., Salmon, A., Clement, L., Kennel, A., Mathieu, C., Dalle, J.H., Rauser, G., Cambouris, C., de Carvalho, M., Stoltz, J.F., Bordigoni, P., Bensoussan, D., 2010. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J. Immunother.* Hagerstown Md 1997 33, 414–424. doi:10.1097/CJI.0b013e3181cc263b
- Akiyama, H., Kurosu, T., Sakashita, C., Inoue, T., Mori Si, null, Ohashi, K., Tanikawa, S., Sakamaki, H., Onozawa, Y., Chen, Q., Zheng, H., Kitamura, T., 2001. Adenovirus is a key pathogen in hemorrhagic cystitis associated with bone marrow transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 1325–1330. doi:10.1086/319992
- Al Qurashi, Y.M.A., Guiver, M., Cooper, R.J., 2011. Sequence typing of adenovirus from samples from hematological stem cell transplant recipients. *J. Med. Virol.* 83, 1951–1958. doi:10.1002/jmv.22204
- Aldern, K.A., Ciesla, S.L., Winegarden, K.L., Hostetler, K.Y., 2003. Increased antiviral activity of 1-O-hexadecyloxypropyl-[2-(14)C]cidofovir in MRC-5 human lung fibroblasts is explained by unique cellular uptake and metabolism. *Mol. Pharmacol.* 63, 678–681.
- Allen, L.B., Boswell, K.H., Khwaja, T.A., Meyer, R.B., Sidwell, R.W., Witkowski, J.T., Christensen, L.F., Robins, R.K., 1978. Synthesis and antiviral activity of some phosphates of the broad-spectrum antiviral nucleoside, 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (ribavirin). *J. Med. Chem.* 21, 742–746.
- Andrei, G., Snoeck, R., Piette, J., Delvenne, P., De Clercq, E., 1998. Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cell lines. *Oncol. Res.* 10, 523–531.
- Arav-Boger, R., Echavarria, M., Forman, M., Charache, P., Persaud, D., 2000. Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19, 1097–1100.
- Arnberg, N., 2009. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev. Med. Virol.* 19, 165–178. doi:10.1002/rmv.612
- Arnberg, N., Edlund, K., Kidd, A.H., Wadell, G., 2000. Adenovirus Type 37 Uses Sialic Acid as a Cellular Receptor. *J. Virol.* 74, 42.
- Avivi, I., Chakrabarti, S., Milligan, D.W., Waldmann, H., Hale, G., Osman, H., Ward, K.N., Fegan, C.D., Yong, K., Goldstone, A.H., Linch, D.C., Mackinnon, S., 2004. Incidence and outcome of adenovirus disease in transplant recipients after reduced-intensity conditioning with alemtuzumab. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 10, 186–194. doi:10.1016/j.bbmt.2003.11.001
- Bailey, C.J., Crystal, R.G., Leopold, P.L., 2003. Association of adenovirus with the microtubule organizing center. *J. Virol.* 77, 13275–13287.
- Barrero, P.R., Valinotto, L.E., Tittarelli, E., Mistchenko, A.S., 2012. Molecular typing of adenoviruses in pediatric respiratory infections in Buenos Aires, Argentina (1999-2010). *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 53, 145–150. doi:10.1016/j.jcv.2011.11.001
- Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A., 2000. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. 1977. *Rev. Med. Virol.* 10, 356-362; discussion 355–356.
- Berk, A.J., 2005. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* 24, 7673–7685. doi:10.1038/sj.onc.1209040

- Berman, A.J., Kamtekar, S., Goodman, J.L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M., Steitz, T.A., 2007. Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. *EMBO J.* 26, 3494–3505. doi:10.1038/sj.emboj.7601780
- Bernad, A., Blanco, L., Lázaro, J.M., Martín, G., Salas, M., 1989. A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* 59, 219–228.
- Bhadri, V.A., Lee-Horn, L., Shaw, P.J., 2009. Safety and tolerability of cidofovir in high-risk pediatric patients. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 11, 373–379. doi:10.1111/j.1399-3062.2009.00391.x
- Bordigoni, P., Carret, A.S., Venard, V., Witz, F., Le Faou, A., 2001. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 1290–1297. doi:10.1086/319984
- Braithwaite, D.K., Ito, J., 1993. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 21, 787–802.
- Bremner, K.H., Scherer, J., Yi, J., Vershinin, M., Gross, S.P., Vallee, R.B., 2009. Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell Host Microbe* 6, 523–535. doi:10.1016/j.chom.2009.11.006
- Brenkman, A.B., Breure, E.C., van der Vliet, P.C., 2002. Molecular architecture of adenovirus DNA polymerase and location of the protein primer. *J. Virol.* 76, 8200–8207.
- Brenkman, A.B., Heideman, M.R., Truniger, V., Salas, M., van der Vliet, P.C., 2001. The (I/Y)XGG motif of adenovirus DNA polymerase affects template DNA binding and the transition from initiation to elongation. *J. Biol. Chem.* 276, 29846–29853. doi:10.1074/jbc.M103159200
- Bruno, B., Gooley, T., Hackman, R.C., Davis, C., Corey, L., Boeckh, M., 2003. Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 9, 341–352.
- Buckwalter, S.P., Teo, R., Espy, M.J., Sloan, L.M., Smith, T.F., Pritt, B.S., 2012. Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources. *J. Clin. Microbiol.* 50, 766–771. doi:10.1128/JCM.05629-11
- Burgert, H.G., Blusch, J.H., 2000. Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes* 21, 13–25.
- Cassano, W.F., 1991. Intravenous ribavirin therapy for adenovirus cystitis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 7, 247–248.
- Chakrabarti, S., Collingham, K.E., Fegan, C.D., Pillay, D., Milligan, D.W., 2000. Adenovirus infections following haematopoietic cell transplantation: is there a role for adoptive immunotherapy? *Bone Marrow Transplant.* 26, 305–307. doi:10.1038/sj.bmt.1702508
- Chakrabarti, S., Mautner, V., Osman, H., Collingham, K.E., Fegan, C.D., Klapper, P.E., Moss, P.A.H., Milligan, D.W., 2002. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 100, 1619–1627. doi:10.1182/blood-2002-02-0377
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., Mehtali, M., 1996. Efficient generation of

- recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 70, 4805–4810.
- Chen, F.E., Liang, R.H., Lo, J.Y., Yuen, K.Y., Chan, T.K., Peiris, M., 1997. Treatment of adenovirus-associated haemorrhagic cystitis with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant.* 20, 997–999. doi:10.1038/sj.bmt.1700997
- Choudhry, A., Mathena, J., Albano, J.D., Yacovone, M., Collins, L., 2016. Safety evaluation of adenovirus type 4 and type 7 vaccine live, oral in military recruits. *Vaccine* 34, 4558–4564. doi:10.1016/j.vaccine.2016.07.033
- Chow, L.C., Gelinas, R.E., Broker, T.R., Roberts, R.J., 2000. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. 1977. *Rev. Med. Virol.* 10, 362–371; discussion 355–356.
- Cihlar, T., Chen, M.S., 1996. Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol. Pharmacol.* 50, 1502–1510.
- Corjon, S., Gonzalez, G., Henning, P., Grichine, A., Lindholm, L., Boulanger, P., Fender, P., Hong, S.-S., 2011. Cell entry and trafficking of human adenovirus bound to blood factor X is determined by the fiber serotype and not hexon:heparan sulfate interaction. *PloS One* 6, e18205. doi:10.1371/journal.pone.0018205
- Creidy, R., Moshous, D., Touzot, F., Elie, C., Neven, B., Gabrion, A., Leruez-Ville, M., Maury, S., Ternaux, B., Nisoy, J., Luby, J.-M., Héritier, S., Dalle, J.-H., Ouachée-Chardin, M., Xhaard, A., Thomas, X., Chevallier, P., Souchet, L., Treluyer, J.-M., Picard, C., Hacein-Bey-Abina, S., Dal Cortivo, L., Blanche, S., Cavazzana, M., 2016. Specific T cells for the treatment of cytomegalovirus and/or adenovirus in the context of hematopoietic stem cell transplantation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 920–924.e3. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.032
- Cundy, K.C., 1999. Clinical pharmacokinetics of the antiviral nucleotide analogues cidofovir and adefovir. *Clin. Pharmacokinet.* 36, 127–143. doi:10.2165/00003088-199936020-00004
- Curlin, M.E., Huang, M.-L., Lu, X., Celum, C.L., Sanchez, J., Selke, S., Baeten, J.M., Zuckerman, R.A., Erdman, D.D., Corey, L., 2010. Frequent detection of human adenovirus from the lower gastrointestinal tract in men who have sex with men. *PloS One* 5, e11321. doi:10.1371/journal.pone.0011321
- Davison, A.J., Benko, M., Harrach, B., 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 84, 2895–2908. doi:10.1099/vir.0.19497-0
- De Clercq, E., 1996. Therapeutic potential of Cidofovir (HPMPC, Vistide) for the treatment of DNA virus (i.e. herpes-, papova-, pox- and adenovirus) infections. *Verh. - K. Acad. Voor Geneesk. Van Belg.* 58, 19–47; discussion 47–49.
- De Jong, J.C., Wermenbol, A.G., Verweij-Uijterwaal, M.W., Slaterus, K.W., Wertheim-Van Dillen, P., Van Doornum, G.J., Khoo, S.H., Hierholzer, J.C., 1999. 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.
- de Oliveira, C.B., Stevenson, D., LaBree, L., McDonnell, P.J., Trousdale, M.D., 1996. Evaluation of Cidofovir (HPMPC, GS-504) against adenovirus type 5 infection in vitro and in a New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res.* 31, 165–172.
- Dehghan, S., Seto, J., Jones, M.S., Dyer, D.W., Chodosh, J., Seto, D., 2013. Simian adenovirus type 35 has a recombinant genome comprising human and simian adenovirus sequences, which predicts its potential

emergence as a human respiratory pathogen. *Virology* 447, 265–273. doi:10.1016/j.virol.2013.09.009

Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., Argos, P., 1990a. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng.* 3, 461–467.

Dominguez, O., Rojo, P., de Las Heras, S., Folgueira, D., Contreras, J.R., 2005. Clinical presentation and characteristics of pharyngeal adenovirus infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, 733–734.

Dubberke, E.R., Tu, B., Rivet, D.J., Storch, G.A., Apisarnthanarak, A., Schmidt, R.E., Weiss, S., Polish, L.B., 2006. Acute meningoencephalitis caused by adenovirus serotype 26. *J. Neurovirol.* 12, 235–240. doi:10.1080/13550280600846633

Dudding, B.A., Wagner, S.C., Zeller, J.A., Gmelich, J.T., French, G.R., Top, F.H., 1972. Fatal pneumonia associated with adenovirus type 7 in three military trainees. *N. Engl. J. Med.* 286, 1289–1292. doi:10.1056/NEJM197206152862403

Dufour, E., Méndez, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M., 2000. An aspartic acid residue in TPR-1, a specific region of protein-priming DNA polymerases, is required for the functional interaction with primer terminal protein. *J. Mol. Biol.* 304, 289–300. doi:10.1006/jmbi.2000.4216

Duggan, J.M., Farrehi, J., Duderstadt, S., Turner, N.J., Fekety, R., 1997. Treatment with ganciclovir of adenovirus pneumonia in a cardiac transplant patient. *Am. J. Med.* 103, 439–440.

Dupuis, M., Hull, R., Wang, H., Nattanmai, S., Glasheen, B., Fusco, H., Dzigua, L., Markey, K., Tavakoli, N.P., 2011. Molecular detection of viral causes of encephalitis and meningitis in New York State. *J. Med. Virol.* 83, 2172–2181. doi:10.1002/jmv.22169

Durepaire, N., Ranger-Rogez, S., Gandji, J.A., Weinbreck, P., Rogez, J.P., Denis, F., 1995. Enteric prevalence of adenovirus in human immunodeficiency virus seropositive patients. *J. Med. Virol.* 45, 56–60.

Echavarría, M., 2008. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 704–715. doi:10.1128/CMR.00052-07

Eiz-Vesper, B., Maecker-Kolhoff, B., Blasczyk, R., 2012. Adoptive T-cell immunotherapy from third-party donors: characterization of donors and set up of a T-cell donor registry. *Front. Immunol.* 3, 410. doi:10.3389/fimmu.2012.00410

Enders, J.F., Bell, J.A., Dingle, J.H., Francis, T., Hilleman, M.R., Huebner, R.J., Payne, A.M., 1956. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* 124, 119–120.

Evans, C.M., Kudesia, G., McKendrick, M., 2013. Management of herpesvirus infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 119–128. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.04.023

Feghoul, L., Chevret, S., Cuinet, A., Dalle, J.-H., Ouachée, M., Yacouben, K., Fahd, M., Guérin-El Khourouj, V., Roupert-Serzec, J., Sterkers, G., Baruchel, A., Simon, F., LeGoff, J., 2015a. Adenovirus infection and disease in paediatric haematopoietic stem cell transplant patients: clues for antiviral pre-emptive treatment. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 701–709. doi:10.1016/j.cmi.2015.03.011

Feghoul, L., Chevret, S., Cuinet, A., Dalle, J.-H., Ouachée, M., Yacouben, K., Fahd, M., Guérin-El Khourouj, V., Roupert-Serzec, J., Sterkers, G., Baruchel, A., Simon, F., LeGoff, J., 2015b. Adenovirus infection and disease in paediatric haematopoietic stem cell transplant patients: clues for antiviral pre-

emptive treatment. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 701–709. doi:10.1016/j.cmi.2015.03.011

Feghoul, L., Salmona, M., Cherot, J., Fahd, M., Dalle, J.-H., Vachon, C., Perrod, A., Bourgeois, P., Scieux, C., Baruchel, A., Simon, F., LeGoff, J., 2016b. Evaluation of a New Device for Simplifying and Standardizing Stool Sample Preparation for Viral Molecular Testing with Limited Hands-On Time. *J. Clin. Microbiol.* 54, 928–933. doi:10.1128/JCM.02816-15

Feld, J.J., Nanda, S., Huang, Y., Chen, W., Cam, M., Pusek, S.N., Schweigler, L.M., Theodore, D., Zacks, S.L., Liang, T.J., Fried, M.W., 2007. Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology*. Baltimore, Md 46, 1548–1563. doi:10.1002/hep.21853

Fernandez-Larsson, R., O’Connell, K., Koumans, E., Patterson, J.L., 1989. Molecular analysis of the inhibitory effect of phosphorylated ribavirin on the vesicular stomatitis virus in vitro polymerase reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1668–1673.

Feucht, J., Opher, K., Lang, P., Kayser, S., Hartl, L., Bethge, W., Matthes-Martin, S., Bader, P., Albert, M.H., Maecker-Kolhoff, B., Greil, J., Einsele, H., Schlegel, P.-G., Schuster, F.R., Kremens, B., Rossig, C., Gruhn, B., Handgretinger, R., Feuchtinger, T., 2015. Adoptive T-cell therapy with hexon-specific Th1 cells as a treatment of refractory adenovirus infection after HSCT. *Blood* 125, 1986–1994. doi:10.1182/blood-2014-06-573725

Feuchtinger, T., Matthes-Martin, S., Richard, C., Lion, T., Fuhrer, M., Hamprecht, K., Handgretinger, R., Peters, C., Schuster, F.R., Beck, R., Schumm, M., Lotfi, R., Jahn, G., Lang, P., 2006. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 134, 64–76. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06108.x

Feuchtinger, T., Opher, K., Bethge, W.A., Topp, M.S., Schuster, F.R., Weissinger, E.M., Mohty, M., Or, R., Maschan, M., Schumm, M., Hamprecht, K., Handgretinger, R., Lang, P., Einsele, H., 2010. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 116, 4360–4367. doi:10.1182/blood-2010-01-262089

Flomenberg, P., Babbitt, J., Drobyski, W.R., Ash, R.C., Carrigan, D.R., Sedmak, G.V., McAuliffe, T., Camitta, B., Horowitz, M.M., Bunin, N., 1994. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 169, 775–781.

Florescu, D.F., Pergam, S.A., Neely, M.N., Qiu, F., Johnston, C., Way, S., Sande, J., Lewinsohn, D.A., Guzman-Cottrill, J.A., Graham, M.L., Papanicolaou, G., Kurtzberg, J., Rigdon, J., Painter, W., Mommeja-Marin, H., Lanier, R., Anderson, M., van der Horst, C., 2012. Safety and efficacy of CMX001 as salvage therapy for severe adenovirus infections in immunocompromised patients. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 18, 731–738. doi:10.1016/j.bbmt.2011.09.007

Forstmeyer, D., Henke-Gendo, C., Bröcker, V., Wildner, O., Heim, A., 2008. Quantitative temporal and spatial distribution of adenovirus type 2 correlates with disease manifestations and organ failure during disseminated infection. *J. Med. Virol.* 80, 294–297. doi:10.1002/jmv.21071

Foy, H.M., Cooney, M.K., Hatlen, J.B., 1968. Adenovirus type 3 epidemic associated with intermittent chlorination of a swimming pool. *Arch. Environ. Health* 17, 795–802.

Frange, P., Peffault de Latour, R., Arnaud, C., Boddaert, N., Oualha, M., Avettand-Fenoel, V., Bernaudin,

- F., Aguilar, C., Barnerias, C., Leruez-Ville, M., Touzot, F., Lortholary, O., Fischer, A., Blanche, S., 2011. Adenoviral infection presenting as an isolated central nervous system disease without detectable viremia in two children after stem cell transplantation. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2361–2364. doi:10.1128/JCM.00080-11
- Franklin, M.C., Wang, J., Steitz, T.A., 2001. Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell* 105, 657–667.
- Ganzenmueller, T., Buchholz, S., Harste, G., Dammann, E., Trenchel, R., Heim, A., 2011. High lethality of human adenovirus disease in adult allogeneic stem cell transplant recipients with high adenoviral blood load. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 52, 55–59. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.005
- Garnett, C.T., Erdman, D., Xu, W., Gooding, L.R., 2002. Prevalence and Quantitation of Species C Adenovirus DNA in Human Mucosal Lymphocytes. *J. Virol.* 76, 10608–10616. doi:10.1128/JVI.76.21.10608-10616.2002
- Garnett, C.T., Talekar, G., Mahr, J.A., Huang, W., Zhang, Y., Ornelles, D.A., Gooding, L.R., 2009. Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J. Virol.* 83, 2417–2428. doi:10.1128/JVI.02392-08
- Gerber, S.I., Erdman, D.D., Pur, S.L., Diaz, P.S., Segreti, J., Kajon, A.E., Belkengren, R.P., Jones, R.C., 2001. Outbreak of adenovirus genome type 7d2 infection in a pediatric chronic-care facility and tertiary-care hospital. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 694–700. doi:10.1086/319210
- Giberson, A.N., Davidson, A.R., Parks, R.J., 2012. Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection. *Nucleic Acids Res.* 40, 2369–2376. doi:10.1093/nar/gkr1076
- Gordon, Y.J., Araullo-Cruz, T., Romanowski, E., Myers, B., Santora, D., Lin, M., Kowalski, R., 1991. Replication of ocular isolates of human adenovirus is serotype-dependent in rabbit corneal organ culture. *Curr. Eye Res.* 10, 267–271.
- Gray, G.C., Callahan, J.D., Hawksworth, A.W., Fisher, C.A., Gaydos, J.C., 1999. Respiratory diseases among U.S. military personnel: countering emerging threats. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 379–385. doi:10.3201/eid0503.990308
- Gray, G.C., McCarthy, T., Lebeck, M.G., Schnurr, D.P., Russell, K.L., Kajon, A.E., Landry, M.L., Leland, D.S., Storch, G.A., Ginocchio, C.C., Robinson, C.C., Demmler, G.J., Saubolle, M.A., Kehl, S.C., Selvarangan, R., Miller, M.B., Chappell, J.D., Zerr, D.M., Kiska, D.L., Halstead, D.C., Capuano, A.W., Setterquist, S.F., Chorazy, M.L., Dawson, J.D., Erdman, D.D., 2007. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 45, 1120–1131. doi:10.1086/522188
- Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P., Helenius, A., 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75, 477–486.
- Grimley, M.S., Chemaly, R.F., Englund, J.A., Kurtzberg, J., Chittick, G., Brundage, T.M., Bae, A., Morrison, M.E., Prasad, V.K., 2017. Brincidofovir for Asymptomatic Adenovirus Viremia in Pediatric and Adult Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 23, 512–521. doi:10.1016/j.bbmt.2016.12.621
- Hadaczek, P., Ozawa, T., Soroceanu, L., Yoshida, Y., Matlaf, L., Singer, E., Fiallos, E., James, C.D., Cobbs, C.S., 2013. Cidofovir: a novel antitumor agent for glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 6473–6483. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1121

- Hakim, F.A., Tleyjeh, I.M., 2008. Severe adenovirus pneumonia in immunocompetent adults: a case report and review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 27, 153–158. doi:10.1007/s10096-007-0416-z
- Harnett, G.B., Phillips, P.A., Gollow, M.M., 1984. Association of genital adenovirus infection with urethritis in men. *Med. J. Aust.* 141, 337–338.
- Harrach, B., Benko, M., 2007. Phylogenetic analysis of adenovirus sequences. *Methods Mol. Med.* 131, 299–334.
- Hartline, C.B., Gustin, K.M., Wan, W.B., Ciesla, S.L., Beadle, J.R., Hostetler, K.Y., Kern, E.R., 2005. Ether lipid-ester prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates: activity against adenovirus replication in vitro. *J. Infect. Dis.* 191, 396–399. doi:10.1086/426831
- Hierholzer, J.C., 1992. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 262–274.
- Hierholzer, J.C., Wigand, R., Anderson, L.J., Adrian, T., Gold, J.W., 1988. 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.
- Hilleman, M.R., Werner, J.H., 1954. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 85, 183–188.
- Ho, H.T., Woods, K.L., Bronson, J.J., De Boeck, H., Martin, J.C., Hitchcock, M.J., 1992. Intracellular metabolism of the antiherpes agent (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. *Mol. Pharmacol.* 41, 197–202.
- Hoeben, R.C., Uil, T.G., 2013a. Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a013003. doi:10.1101/cshperspect.a013003
- Hong, J.Y., Lee, H.J., Piedra, P.A., Choi, E.H., Park, K.H., Koh, Y.Y., Kim, W.S., 2001. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 1423–1429. doi:10.1086/320146
- Hong, S.S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D.T., Boulanger, P.A., 1997. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J.* 16, 2294–2306. doi:10.1093/emboj/16.9.2294
- Hostetler, K.Y., Rought, S., Aldern, K.A., Trahan, J., Beadle, J.R., Corbeil, J., 2006. Enhanced antiproliferative effects of alkoxyalkyl esters of cidofovir in human cervical cancer cells in vitro. *Mol. Cancer Ther.* 5, 156–159. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0200
- Hromas, R., Cornetta, K., Srour, E., Blanke, C., Broun, E.R., 1994. Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* 84, 1689–1690.
- Huang, G.-H., Xu, W.-B., 2013. [Recent advance in new types of human adenovirus]. *Bing Xue Bao Chin. J. Virol.* 29, 342–348.
- Hwang, J.Y., Lee, K.M., Kim, Y.H., Shim, H.M., Bae, Y.K., Hwang, J.H., Park, H., 2014. Pregnancy Loss Following Coxsackievirus B3 Infection in Mice during Early Gestation Due to High Expression of Coxsackievirus-Adenovirus Receptor (CAR) in Uterus and Embryo. *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim.*

Sci. 63, 63–72.

Icheva, V., Kayser, S., Wolff, D., Tuve, S., Kyzirakos, C., Bethge, W., Greil, J., Albert, M.H., Schwinger, W., Nathrath, M., Schumm, M., Stevanovic, S., Handgretinger, R., Lang, P., Feuchtinger, T., 2013. Adoptive transfer of epstein-barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific t cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 39–48. doi:10.1200/JCO.2011.39.8495

Ito, M., Hirabayashi, N., Uno, Y., Nakayama, A., Asai, J., 1991. Necrotizing tubulointerstitial nephritis associated with adenovirus infection. *Hum. Pathol.* 22, 1225–1231.

Jaffe, B.F., Maassab, H.F., 1967. Sudden deafness associated with adenovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 276, 1406–1409. doi:10.1056/NEJM196706222762504

Jalal, H., Bibby, D.F., Tang, J.W., Bennett, J., Kyriakou, C., Peggs, K., Cubitt, D., Brink, N.S., Ward, K.N., Tedder, R.S., 2005. First reported outbreak of diarrhea due to adenovirus infection in a hematology unit for adults. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2575–2580. doi:10.1128/JCM.43.6.2575-2580.2005

Jeulin, H., Salmon, A., Bordigoni, P., Venard, V., 2011. Diagnostic value of quantitative PCR for adenovirus detection in stool samples as compared with antigen detection and cell culture in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 1674–1680. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03488.x

Jones, M.S., Harrach, B., Ganac, R.D., Gozum, M.M.A., Dela Cruz, W.P., Riedel, B., Pan, C., Delwart, E.L., Schnurr, D.P., 2007. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J. Virol.* 81, 5978–5984. doi:10.1128/JVI.02650-06

Joung, I., Engler, J.A., 1992. Mutations in two cysteine-histidine-rich clusters in adenovirus type 2 DNA polymerase affect DNA binding. *J. Virol.* 66, 5788–5796.

Joung, I., Horwitz, M.S., Engler, J.A., 1991. Mutagenesis of conserved region I in the DNA polymerase from human adenovirus serotype 2. *Virology* 184, 235–241.

Kamel, W., Segerman, B., Öberg, D., Punga, T., Akusjärvi, G., 2013. The adenovirus VA RNA-derived miRNAs are not essential for lytic virus growth in tissue culture cells. *Nucleic Acids Res.* 41, 4802–4812. doi:10.1093/nar/gkt172

Kaneko, H., Aoki, K., Ishida, S., Ohno, S., Kitaichi, N., Ishiko, H., Fujimoto, T., Ikeda, Y., Nakamura, M., Gonzalez, G., Koyanagi, K.O., Watanabe, H., Suzutani, T., 2011. Recombination analysis of intermediate human adenovirus type 53 in Japan by complete genome sequence. *J. Gen. Virol.* 92, 1251–1259. doi:10.1099/vir.0.030361-0

Kaneko, H., Kato, K., Mori, S., Shigeta, S., 2001. Antiviral activity of NMSO3 against adenovirus in vitro. *Antiviral Res.* 52, 281–288.

Khoo, S.H., Bailey, A.S., de Jong, J.C., Mandal, B.K., 1995. Adenovirus infections in human immunodeficiency virus-positive patients: clinical features and molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.* 172, 629–637.

Kinchington, P.R., Araullo-Cruz, T., Vergnes, J.-P., Yates, K., Gordon, Y.J., 2002. Sequence changes in the human adenovirus type 5 DNA polymerase associated with resistance to the broad spectrum antiviral cidofovir. *Antiviral Res.* 56, 73–84.

- King, A.J., Teertstra, W.R., Blanco, L., Salas, M., van der Vliet, P.C., 1997. Processive proofreading by the adenovirus DNA polymerase. Association with the priming protein reduces exonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res.* 25, 1745–1752.
- Kirsi, J.J., North, J.A., McKernan, P.A., Murray, B.K., Canonico, P.G., Huggins, J.W., Srivastava, P.C., Robins, R.K., 1983. Broad-spectrum antiviral activity of 2-beta-D-ribofuranosylselenazole-4-carboxamide, a new antiviral agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24, 353–361
- Knopf, C.W., 1998a. Evolution of viral DNA-dependent DNA polymerases. *Virus Genes* 16, 47–58.
- Kodama, E., Shigeta, S., Suzuki, T., De Clercq, E., 1996. Application of a gastric cancer cell line (MKN-28) for anti-adenovirus screening using the MTT method. *Antiviral Res.* 31, 159–164.
- Koneru, B., Atchison, R., Jaffe, R., Cassavilla, A., Van Thiel, D.H., Starzl, T.E., 1990. Serological studies of adenoviral hepatitis following pediatric liver transplantation. *Transplant. Proc.* 22, 1547–1548.
- Kosulin, K., Berkowitsch, B., Lion, T., 2016. Modified pan-adenovirus real-time PCR assay based on genome analysis of seventy HAdV types. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 80, 60–61. doi:10.1016/j.jcv.2016.05.001
- Kosulin, K., Geiger, E., Vécsei, A., Huber, W.-D., Rauch, M., Brenner, E., Wrba, F., Hammer, K., Innerhofer, A., Pötschger, U., Lawitschka, A., Matthes-Leodolter, S., Fritsch, G., Lion, T., 2016. Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 381.e1-8. doi:10.1016/j.cmi.2015.12.013
- Kovesdi, I., Brough, D.E., Bruder, J.T., Wickham, T.J., 1997. Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 583–589.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054
- La Rosa, A.M., Champlin, R.E., Mirza, N., Gajewski, J., Giralt, S., Rolston, K.V., Raad, I., Jacobson, K., Kontoyiannis, D., Elting, L., Whimbey, E., 2001. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 871–876. doi:10.1086/319352
- Lanier, R., 2015. Dedicated-to-Preventing-and-Treating-Life-Threatening-Viral-Infections, in: Presentation. Presented at the 55th, Interscience Conference on Antimicrobial And Chemotherapy, San diego, California, USA.
- Lee, Y.J., Chung, D., Xiao, K., Papadopoulos, E.B., Barker, J.N., Small, T.N., Giralt, S.A., Zheng, J., Jakubowski, A.A., Papanicolaou, G.A., 2013. Adenovirus viremia and disease: comparison of T cell-depleted and conventional hematopoietic stem cell transplantation recipients from a single institution. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 19, 387–392. doi:10.1016/j.bbmt.2012.10.014
- Lenaerts, L., De Clercq, E., Naesens, L., 2008. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev. Med. Virol.* 18, 357–374. doi:10.1002/rmv.589
- Lenaerts, L., Naesens, L., 2006. Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Res.* 71, 172–180. doi:10.1016/j.antiviral.2006.04.007
- Leopold, P.L., Crystal, R.G., 2007. Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv.*

Drug Deliv. Rev. 59, 810–821. doi:10.1016/j.addr.2007.06.007

Leruez-Ville, M., Chardin-Ouachée, M., Neven, B., Picard, C., Le Guinche, I., Fischer, A., Rouzioux, C., Blanche, S., 2006. Description of an adenovirus A31 outbreak in a paediatric haematology unit. *Bone Marrow Transplant.* 38, 23–28. doi:10.1038/sj.bmt.1705389

Lichtenstein, D.L., Toth, K., Doronin, K., Tollefson, A.E., Wold, W.S.M., 2004. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int. Rev. Immunol.* 23, 75–111.

Lindemans, C.A., Leen, A.M., Boelens, J.J., 2010. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 116, 5476–5485. doi:10.1182/blood-2010-04-259291

Lion, T., 2014. Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 441–462. doi:10.1128/CMR.00116-13

Lion, T., Baumgartinger, R., Watzinger, F., Matthes-Martin, S., Suda, M., Preuner, S., Futterknecht, B., Lawitschka, A., Peters, C., Potschger, U., Gadner, H., 2003. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 102, 1114–1120. doi:10.1182/blood-2002-07-2152

Lion, T., Kosulin, K., Landlinger, C., Rauch, M., Preuner, S., Jugovic, D., Pötschger, U., Lawitschka, A., Peters, C., Fritsch, G., Matthes-Martin, S., 2010. Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 24, 706–714. doi:10.1038/leu.2010.4

Liu, H., Naismith, J.H., Hay, R.T., 2003. Adenovirus DNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 272, 131–164.

Liu, H., Naismith, J.H., Hay, R.T., 2000a. Identification of conserved residues contributing to the activities of adenovirus DNA polymerase. *J. Virol.* 74, 11681–11689.

Liu, H., Wu, L., Zhou, Z.H., 2011. Model of the trimeric fiber and its interactions with the pentameric penton base of human adenovirus by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 406, 764–774. doi:10.1016/j.jmb.2010.11.043

Liu, L., Qian, Y., Zhang, Y., Deng, J., Jia, L., Dong, H., 2014. Adenoviruses associated with acute diarrhea in children in Beijing, China. *PloS One* 9, e88791. doi:10.1371/journal.pone.0088791

Ljungman, P., Ribaud, P., Eyrich, M., Matthes-Martin, S., Einsele, H., Bleakley, M., Machaczka, M., Bierings, M., Bosi, A., Gratecos, N., Cordonnier, C., Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2003. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 31, 481–486. doi:10.1038/sj.bmt.1703798

Louie, J.K., Kajon, A.E., Holodniy, M., Guardia-LaBar, L., Lee, B., Petru, A.M., Hacker, J.K., Schnurr, D.P., 2008. Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 46, 421–425. doi:10.1086/525261

Lugthart, G., Oomen, M.A., Jol-van der Zijde, C.M., Ball, L.M., Bresters, D., Kollen, W.J.W., Smiers, F.J., Vermont, C.L., Bredius, R.G.M., Schilham, M.W., van Tol, M.J.D., Lankester, A.C., 2015. The effect of cidofovir on adenovirus plasma DNA levels in stem cell transplantation recipients without T cell reconstitution. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 21, 293–299.

doi:10.1016/j.bbmt.2014.10.012

Lukashev, A.N., Ivanova, O.E., Ereemeeva, T.P., Iggo, R.D., 2008. Evidence of frequent recombination among human adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 89, 380–388. doi:10.1099/vir.0.83057-0

Luo, J., Deng, Z.-L., Luo, X., Tang, N., Song, W.-X., Chen, J., Sharff, K.A., Luu, H.H., Haydon, R.C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., He, T.-C., 2007. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat. Protoc.* 2, 1236–1247. doi:10.1038/nprot.2007.135

Lutchman, G., Danehower, S., Song, B.-C., Liang, T.J., Hoofnagle, J.H., Thomson, M., Ghany, M.G., 2007. Mutation rate of the hepatitis C virus NS5B in patients undergoing treatment with ribavirin monotherapy. *Gastroenterology* 132, 1757–1766. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.035

Lynch, J.P., Fishbein, M., Echavarria, M., 2011. Adenovirus. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 32, 494–511. doi:10.1055/s-0031-1283287

Lynch, J.P., Kajon, A.E., 2016. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 37, 586–602. doi:10.1055/s-0036-1584923

Maag, D., Castro, C., Hong, Z., Cameron, C.E., 2001. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J. Biol. Chem.* 276, 46094–46098. doi:10.1074/jbc.C100349200

Madisch, I., Harste, G., Pommer, H., Heim, A., 2005. Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy. *J. Virol.* 79, 15265–15276. doi:10.1128/JVI.79.24.15265-15276.2005

Markel, D., Lam, E., Harste, G., Darr, S., Ramke, M., Heim, A., 2014. Type dependent patterns of human adenovirus persistence in human T-lymphocyte cell lines. *J. Med. Virol.* 86, 785–794. doi:10.1002/jmv.23736

Mathias, P., Wickham, T., Moore, M., Nemerow, G., 1994. Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J. Virol.* 68, 6811–6814.

Matsushima, Y., Shimizu, H., Kano, A., Nakajima, E., Ishimaru, Y., Dey, S.K., Watanabe, Y., Adachi, F., Mitani, K., Fujimoto, T., Phan, T.G., Ushijima, H., 2013. Genome sequence of a novel virus of the species human adenovirus d associated with acute gastroenteritis. *Genome Announc.* 1. doi:10.1128/genomeA.00068-12

Matthes-Martin, S., Feuchtinger, T., Shaw, P.J., Engelhard, D., Hirsch, H.H., Cordonnier, C., Ljungman, P., Fourth European Conference on Infections in Leukemia, 2012. European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 14, 555–563. doi:10.1111/tid.12022

Matthews, D.A., Russell, W.C., 1998. Adenovirus core protein V is delivered by the invading virus to the nucleus of the infected cell and later in infection is associated with nucleoli. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 7), 1671–1675. doi:10.1099/0022-1317-79-7-1671

Matthews, T., Boehme, R., 1988. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev. Infect. Dis.* 10 Suppl 3, S490-494.

McCarthy, T., Lebeck, M.G., Capuano, A.W., Schnurr, D.P., Gray, G.C., 2009. Molecular typing of clinical

adenovirus specimens by an algorithm which permits detection of adenovirus coinfections and intermediate adenovirus strains. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 46, 80–84. doi:10.1016/j.jcv.2009.06.008

Meier, O., Greber, U.F., 2004. Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* 6 Suppl 1, S152–163. doi:10.1002/jgm.553

Michaels, M.G., Green, M., Wald, E.R., Starzl, T.E., 1992. Adenovirus infection in pediatric liver transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 165, 170–174.

Miyamura, K., Hamaguchi, M., Taji, H., Kanie, T., Kohno, A., Tanimoto, M., Saito, H., Kojima, S., Matsuyama, T., Kitaori, K., Nagafuji, K., Sato, T., Kodera, Y., 2000. Successful ribavirin therapy for severe adenovirus hemorrhagic cystitis after allogeneic marrow transplant from close HLA donors rather than distant donors. *Bone Marrow Transplant.* 25, 545–548. doi:10.1038/sj.bmt.1702195

Molinier-Frenkel, V., Boulanger, P., 2003. Les adénovirus : de la structure à la vectorisation de gènes et à la vaccinologie. I. Virologie des adénovirus et des adénovirus recombinants. *Virologie* 7, 267–279.

Montessori, V., Scharf, S., Holland, S., Werker, D.H., Roberts, F.J., Bryce, E., 1998. Epidemic keratoconjunctivitis outbreak at a tertiary referral eye care clinic. *Am. J. Infect. Control* 26, 399–405.

Montone, K.T., Furth, E.E., Pietra, G.G., Gupta, P.K., 1995. Neonatal adenovirus infection: a case report with in situ hybridization confirmation of ascending intrauterine infection. *Diagn. Cytopathol.* 12, 341–344.

Moosmann, A., Bigalke, I., Tischer, J., Schirrmann, L., Kasten, J., Tippmer, S., Leeping, M., Prevalsek, D., Jaeger, G., Ledderose, G., Mautner, J., Hammerschmidt, W., Schendel, D.J., Kolb, H.-J., 2010. Effective and long-term control of EBV PTLTD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* 115, 2960–2970. doi:10.1182/blood-2009-08-236356

Morfin, F., Dupuis-Girod, S., Frobert, E., Mundweiler, S., Carrington, D., Sedlacek, P., Bierings, M., Cetkovsky, P., Kroes, A.C.M., van Tol, M.J.D., Thouvenot, D., 2009. Differential susceptibility of adenovirus clinical isolates to cidofovir and ribavirin is not related to species alone. *Antivir. Ther.* 14, 55–61.

Morfin, F., Dupuis-Girod, S., Mundweiler, S., Falcon, D., Carrington, D., Sedlacek, P., Bierings, M., Cetkovsky, P., Kroes, A.C.M., van Tol, M.J.D., Thouvenot, D., 2005. In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antivir. Ther.* 10, 225–229.

Mufson, M.A., Belshe, R.B., 1976. A review of adenoviruses in the etiology of acute hemorrhagic cystitis. *J. Urol.* 115, 191–194.

Myerowitz, R.L., Stalder, H., Oxman, M.N., Levin, M.J., Moore, M., Leith, J.D., Gantz, N.M., Hierholzer, J.C., Hierholzer, J.C., 1975. Fatal disseminated adenovirus infection in a renal transplant recipient. *Am. J. Med.* 59, 591–598.

Myers, G.D., Krance, R.A., Weiss, H., Kuehnle, I., Demmler, G., Heslop, H.E., Bollard, C.M., 2005. Adenovirus infection rates in pediatric recipients of alternate donor allogeneic bone marrow transplants receiving either antithymocyte globulin (ATG) or alemtuzumab (Campath). *Bone Marrow Transplant.* 36, 1001–1008. doi:10.1038/sj.bmt.1705164

Mynarek, M., Ganzenmueller, T., Mueller-Heine, A., Mielke, C., Gonnermann, A., Beier, R., Sauer, M., Eiz-Vesper, B., Kohstall, U., Sykora, K.-W., Heim, A., Maecker-Kolhoff, B., 2014. Patient, virus, and treatment-related risk factors in pediatric adenovirus infection after stem cell transplantation: results of a

- routine monitoring program. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 20, 250–256. doi:10.1016/j.bbmt.2013.11.009
- Naesens, L., Lenaerts, L., Andrei, G., Snoeck, R., Van Beers, D., Holy, A., Balzarini, J., De Clercq, E., 2005a. Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1010–1016. doi:10.1128/AAC.49.3.1010-1016.2005
- Nakamura, M., Hirano, E., Kowada, K., Ishiguro, F., Yamagishi, Z., Adhikary, A.K., Hanaoka, N., Okabe, N., Taniguchi, K., Fujimoto, T., 2012. Surveillance of adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukui Prefecture, Japan, 1995–2010. *J. Med. Virol.* 84, 81–86. doi:10.1002/jmv.22252
- Nauheim, R.C., Romanowski, E.G., Araullo-Cruz, T., Kowalski, R.P., Turgeon, P.W., Stopak, S.S., Gordon, Y.J., 1990. Prolonged recoverability of desiccated adenovirus type 19 from various surfaces. *Ophthalmology* 97, 1450–1453.
- Nemerow, G.R., Stewart, P.L., Reddy, V.S., 2012. Structure of human adenovirus. *Curr. Opin. Virol.* 2, 115–121. doi:10.1016/j.coviro.2011.12.008
- Neumann, R., Genersch, E., Eggers, H.J., 1987. Detection of adenovirus nucleic acid sequences in human tonsils in the absence of infectious virus. *Virus Res.* 7, 93–97.
- Nilsson, E.C., Storm, R.J., Bauer, J., Johansson, S.M.C., Lookene, A., Ångström, J., Hedenström, M., Eriksson, T.L., Frängsmyr, L., Rinaldi, S., Willison, H.J., Pedrosa Domellöf, F., Stehle, T., Arnberg, N., 2011. The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. *Nat. Med.* 17, 105–109. doi:10.1038/nm.2267
- Ning, Q., Brown, D., Parodo, J., Catral, M., Gorczynski, R., Cole, E., Fung, L., Ding, J.W., Liu, M.F., Rotstein, O., Phillips, M.J., Levy, G., 1998. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 160, 3487–3493.
- Ohuri, N.P., Michaels, M.G., Jaffe, R., Williams, P., Yousem, S.A., 1995. Adenovirus pneumonia in lung transplant recipients. *Hum. Pathol.* 26, 1073–1079.
- Osamura, T., Mizuta, R., Yoshioka, H., Fushiki, S., 1993. Isolation of adenovirus type 11 from the brain of a neonate with pneumonia and encephalitis. *Eur. J. Pediatr.* 152, 496–499.
- Pagliara, D., Savoldo, B., 2012. Cytotoxic T lymphocytes for the treatment of viral infections and posttransplant lymphoproliferative disorders in transplant recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 431–437. doi:10.1097/QCO.0b013e3283551dd3
- Painter, G.R., Hostetler, K.Y., 2004. Design and development of oral drugs for the prophylaxis and treatment of smallpox infection. *Trends Biotechnol.* 22, 423–427. doi:10.1016/j.tibtech.2004.06.008
- Painter, W., Robertson, A., Trost, L.C., Godkin, S., Lampert, B., Painter, G., 2012. First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2726–2734. doi:10.1128/AAC.05983-11
- Paolino, K., Sande, J., Perez, E., Loechele, B., Jantusch, B., Painter, W., Anderson, M., Tippin, T., Lanier, E.R., Fry, T., DeBiasi, R.L., 2011b. Eradication of disseminated adenovirus infection in a pediatric

- hematopoietic stem cell transplantation recipient using the novel antiviral agent CMX001. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 50, 167–170. doi:10.1016/j.jcv.2010.10.016
- Parker, S., Handley, L., Buller, R.M., 2008. Therapeutic and prophylactic drugs to treat orthopoxvirus infections. *Future Virol.* 3, 595–612. doi:10.2217/17460794.3.6.595
- Pello, O.M., Innes, A.J., Bradshaw, A., Finn, S.-A., Uddin, S., Bray, E., Olavarria, E., Apperley, J.F., Pavlů, J., 2017. BKV-specific T cells in the treatment of severe refractory haemorrhagic cystitis after HLA-haploidentical haematopoietic cell transplantation. *Eur. J. Haematol.* 98, 632–634. doi:10.1111/ejh.12848
- Perez-Romero, P., Gustin, K.E., Imperiale, M.J., 2006. Dependence of the encapsidation function of the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein on its ability to bind the packaging sequence. *J. Virol.* 80, 1965–1971. doi:10.1128/JVI.80.4.1965-1971.2006
- Ponterio, E., Gnessi, L., 2015. Adenovirus 36 and Obesity: An Overview. *Viruses* 7, 3719–3740. doi:10.3390/v7072787
- Qasim, W., Gilmour, K., Zhan, H., Derniame, S., McNicol, A.M., Ip, W., Hiwarkar, P., Veys, P., Gaspar, H.B., 2013. Interferon- γ capture T cell therapy for persistent Adenoviraemia following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 161, 449–452. doi:10.1111/bjh.12251
- Qian, C., Campidelli, A., Wang, Y., Cai, H., Venard, V., Jeulin, H., Dalle, J.H., Pochon, C., D’aveni, M., Bruno, B., Paillard, C., Vigouroux, S., Jubert, C., Ceballos, P., Marie-Cardine, A., Galambrun, C., Cholle, C., Clerc Urmes, I., Petitpain, N., De Carvalho Bittencourt, M., Decot, V., Reppel, L., Salmon, A., Clement, L., Bensoussan, D., 2017. Curative or pre-emptive adenovirus-specific T cell transfer from matched unrelated or third party haploidentical donors after HSCT, including UCB transplantations: a successful phase I/II multicenter clinical trial. *J. Hematol. Oncol.* 10, 102. doi:10.1186/s13045-017-0469-0
- Quenelle, D.C., Lampert, B., Collins, D.J., Rice, T.L., Painter, G.R., Kern, E.R., 2010. Efficacy of CMX001 against herpes simplex virus infections in mice and correlations with drug distribution studies. *J. Infect. Dis.* 202, 1492–1499. doi:10.1086/656717
- Radin, J.M., Hawksworth, A.W., Kammerer, P.E., Balansay, M., Raman, R., Lindsay, S.P., Brice, G.T., 2014. Epidemiology of pathogen-specific respiratory infections among three US populations. *PloS One* 9, e114871. doi:10.1371/journal.pone.0114871
- Robin, M., Marque-Juillet, S., Scieux, C., Peffault de Latour, R., Ferry, C., Rocha, V., Molina, J.-M., Bergeron, A., Devergie, A., Gluckman, E., Ribaud, P., Socié, G., 2007. Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica* 92, 1254–1257.
- Robinson, C.M., Rajaiya, J., Zhou, X., Singh, G., Dyer, D.W., Chodosh, J., 2011a. The E3 CR1-gamma gene in human adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *Virus Res.* 160, 120–127. doi:10.1016/j.virusres.2011.05.022
- Robinson, C.M., Seto, D., Jones, M.S., Dyer, D.W., Chodosh, J., 2011b. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 11, 1208–1217. doi:10.1016/j.meegid.2011.04.031
- Robinson, C.M., Seto, D., Jones, M.S., Dyer, D.W., Chodosh, J., 2011c. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 11, 1208–1217. doi:10.1016/j.meegid.2011.04.031

- Robinson, C.M., Singh, G., Lee, J.Y., Dehghan, S., Rajaiya, J., Liu, E.B., Yousuf, M.A., Betensky, R.A., Jones, M.S., Dyer, D.W., Seto, D., Chodosh, J., 2013. Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci. Rep.* 3, 1812. doi:10.1038/srep01812
- Rodríguez, I., Lázaro, J.M., Blanco, L., Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Steitz, T.A., Salas, M., de Vega, M., 2005. A specific subdomain in phi29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6407–6412. doi:10.1073/pnas.0500597102
- Rothwell, P.J., Waksman, G., 2005. Structure and mechanism of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* 71, 401–440. doi:10.1016/S0065-3233(04)71011-6
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 84, 570–573.
- Roy, S., Calcedo, R., Medina-Jaszek, A., Keough, M., Peng, H., Wilson, J.M., 2011. Adenoviruses in lymphocytes of the human gastro-intestinal tract. *PloS One* 6, e24859. doi:10.1371/journal.pone.0024859
- Russell, K.L., Broderick, M.P., Franklin, S.E., Blyn, L.B., Freed, N.E., Moradi, E., Ecker, D.J., Kammerer, P.E., Osuna, M.A., Kajon, A.E., Morn, C.B., Ryan, M.A.K., 2006. Transmission dynamics and prospective environmental sampling of adenovirus in a military recruit setting. *J. Infect. Dis.* 194, 877–885. doi:10.1086/507426
- Russell, W.C., 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *J. Gen. Virol.* 90, 1–20. doi:10.1099/vir.0.003087-0
- Rutala, W.A., Peacock, J.E., Gergen, M.F., Sobsey, M.D., Weber, D.J., 2006. Efficacy of hospital germicides against adenovirus 8, a common cause of epidemic keratoconjunctivitis in health care facilities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1419–1424. doi:10.1128/AAC.50.4.1419-1424.2006
- Sambursky, R.P., Fram, N., Cohen, E.J., 2007. The prevalence of adenoviral conjunctivitis at the Wills Eye Hospital Emergency Room. *Optom. St Louis Mo* 78, 236–239. doi:10.1016/j.optm.2006.11.012
- Sarantis, H., Johnson, G., Brown, M., Petric, M., Tellier, R., 2004a. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3963–3969. doi:10.1128/JCM.42.9.3963-3969.2004
- Sarantis, H., Johnson, G., Brown, M., Petric, M., Tellier, R., 2004b. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3963–3969. doi:10.1128/JCM.42.9.3963-3969.2004
- Sauerbrei, A., Bohn-Wippert, K., Kaspar, M., Krumbholz, A., Karrasch, M., Zell, R., 2016a. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 6–16. doi:10.1093/jac/dkv285
- Scherer, J., Vallee, R.B., 2011. Adenovirus recruits dynein by an evolutionary novel mechanism involving direct binding to pH-primed hexon. *Viruses* 3, 1417–1431. doi:10.3390/v3081417
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Merkel, O., Jakob, M., Hallas, C., Kruse, M.-L., Groitl, P., Lehn, A., Hildt, E., Held-Feindt, J., Dobner, T., Kabelitz, D., Krönke, M., Schütze, S., 2006. Inhibition of TNF

- receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *J. Clin. Invest.* 116, 2901–2913. doi:10.1172/JCI23771
- Schreiner, S., Wimmer, P., Sirma, H., Everett, R.D., Blanchette, P., Groitl, P., Dobner, T., 2010. Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells. *J. Virol.* 84, 7029–7038. doi:10.1128/JVI.00074-10
- Sester, M., Koebernick, K., Owen, D., Ao, M., Bromberg, Y., May, E., Stock, E., Andrews, L., Groh, V., Spies, T., Steinle, A., Menz, B., Burgert, H.-G., 2010. Conserved amino acids within the adenovirus 2 E3/19K protein differentially affect downregulation of MHC class I and MICA/B proteins. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 184, 255–267. doi:10.4049/jimmunol.0902343
- Sethna, P., Bae, A., Selleseth, D., Lanier, R., 2014. In vitro selection of brincidofovir-resistant and cidofovir-resistant human adenovirus, in: Poster. Presented at the 27th International Conference on Antiviral Research (ICAR), Raleigh, North Carolina, USA.
- Sethna, P., Bae, A., Selleseth, D., Lanier, R., 2014. In-Vitro-Selection-of-Brincidofovir-Resistant-and-Cidofovir-Resistant-Human-Adenovirus. Presented at the ICAR, Raleigh, NC.
- Shevelev, I.V., Hübscher, U., 2002. The 3' 5' exonucleases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 364–376. doi:10.1038/nrm804
- Shirali, G.S., Ni, J., Chinnock, R.E., Johnston, J.K., Rosenthal, G.L., Bowles, N.E., Towbin, J.A., 2001. Association of viral genome with graft loss in children after cardiac transplantation. *N. Engl. J. Med.* 344, 1498–1503. doi:10.1056/NEJM200105173442002
- Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Khare, G.P., Allen, L.B., Witkowski, J.T., Robins, R.K., 1972. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177, 705–706.
- Similä, S., Jouppila, R., Salmi, A., Pohjonen, R., 1970. Encephalomyelitis in children associated with an adenovirus type 7 epidemic. *Acta Paediatr. Scand.* 59, 310–316.
- Smith, J.G., Wiethoff, C.M., Stewart, P.L., Nemerow, G.R., 2010. Adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 343, 195–224. doi:10.1007/82_2010_16
- South, M.A., Dolen, J., Beach, D.K., Mirkovic, R.R., 1982. Fatal adenovirus hepatic necrosis in severe combined immune deficiency. *Pediatr. Infect. Dis.* 1, 416–419.
- Stewart, P.L., Fuller, S.D., Burnett, R.M., 1993. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J.* 12, 2589–2599.
- Sun, N.-F., Zhong, W.-Y., Lu, S.-A., Tian, Y.-L., Chen, J.-B., Hu, S.-Y., Tian, A.-L., 2013. Coexpression of recombinant adenovirus carrying GDNF and EDNRB genes in neural stem cells in vitro. *Cell Biol. Int.* 37, 458–463. doi:10.1002/cbin.10060
- Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R.P., Greber, U.F., 1999. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* 144, 657–672.
- Suparno, C., Milligan, D.W., Moss, P.A.H., Mautner, V., 2004. Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis and management. *Leuk. Lymphoma* 45, 873–885. doi:10.1080/10428190310001628176

- Swenson, P.D., Lowens, M.S., Celum, C.L., Hierholzer, J.C., 1995. Adenovirus types 2, 8, and 37 associated with genital infections in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2728–2731.
- Tabain, I., Ljubin-Sternak, S., Cepin-Bogović, J., Markovinović, L., Knezović, I., Mlinarić-Galinović, G., 2012. Adenovirus respiratory infections in hospitalized children: clinical findings in relation to species and serotypes. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31, 680–684. doi:10.1097/INF.0b013e318256605e
- Takemori, N., 1972. Genetic studies with tumorigenic adenoviruses. 3. Recombination in adenovirus type 12. *Virology* 47, 157–167.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- Tang, L., Gong, M., Zhang, P., 2016. In vitro CRISPR-Cas9-mediated efficient Ad5 vector modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 474, 395–399. doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.129
- Taniguchi, K., Yoshihara, S., Tamaki, H., Fujimoto, T., Ikegame, K., Kaida, K., Nakata, J., Inoue, T., Kato, R., Fujioka, T., Okada, M., Soma, T., Ogawa, H., 2012. Incidence and treatment strategy for disseminated adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation. *Ann. Hematol.* 91, 1305–1312. doi:10.1007/s00277-012-1440-3
- Thacker, E.E., Timares, L., Matthews, Q.L., 2009. Strategies to overcome host immunity to adenovirus vectors in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 8, 761–777. doi:10.1586/erv.09.29
- Thomas, E., Ghany, M.G., Liang, T.J., 2012. The application and mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antivir. Chem. Chemother.* 23, 1–12. doi:10.3851/IMP2125
- Tippin, T.K., Morrison, M.E., Brundage, T.M., Momméja-Marin, H., 2016. Brincidofovir Is Not A Substrate For The Human Organic Anion Transporter 1 (Oat1): A Mechanistic Explanation For The Lack Of Nephrotoxicity Observed In Clinical Studies. *Ther. Drug Monit.* doi:10.1097/FTD.0000000000000353
- Tollefson, A.E., Ryerse, J.S., Scaria, A., Hermiston, T.W., Wold, W.S., 1996. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 220, 152–162. doi:10.1006/viro.1996.0295
- Tollefson, A.E., Spencer, J.F., Ying, B., Buller, R.M.L., Wold, W.S.M., Toth, K., 2014. Cidofovir and brincidofovir reduce the pathology caused by systemic infection with human type 5 adenovirus in immunosuppressed Syrian hamsters, while ribavirin is largely ineffective in this model. *Antiviral Res.* 112, 38–46. doi:10.1016/j.antiviral.2014.10.005
- Trinh, H.V., Lesage, G., Chennampampil, V., Vollenweider, B., Burckhardt, C.J., Schauer, S., Havenga, M., Greber, U.F., Hemmi, S., 2012. Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection. *J. Virol.* 86, 1623–1637. doi:10.1128/JVI.06181-11
- Trotman, L.C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R.P., Greber, U.F., 2001. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat. Cell Biol.* 3, 1092–1100. doi:10.1038/ncb1201-1092
- Trousdale, M.D., Goldschmidt, P.L., Nóbrega, R., 1994. Activity of ganciclovir against human adenovirus type-5 infection in cell culture and cotton rat eyes. *Cornea* 13, 435–439.
- Truniger, V., Blanco, L., Salas, M., 1999. Role of the “YxGG/A” motif of Phi29 DNA polymerase in

protein-primed replication. *J. Mol. Biol.* 286, 57–69.

Uhnoo, I., Svensson, L., Wadell, G., 1990. Enteric adenoviruses. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 4, 627–642.

Uil, T.G., Vellinga, J., de Vrij, J., van den Hengel, S.K., Rabelink, M.J.W.E., Cramer, S.J., Eekels, J.J.M., Ariyurek, Y., van Galen, M., Hoeben, R.C., 2011. Directed adenovirus evolution using engineered mutator viral polymerases. *Nucleic Acids Res.* 39, e30. doi:10.1093/nar/gkq1258

Van, R., Wun, C.C., O’Ryan, M.L., Matson, D.O., Jackson, L., Pickering, L.K., 1992. Outbreaks of human enteric adenovirus types 40 and 41 in Houston day care centers. *J. Pediatr.* 120, 516–521.

van Tol, M.J.D., Claas, E.C.J., Heemskerk, B., Veltrop-Duits, L.A., de Brouwer, C.S., van Vreeswijk, T., Sombroek, C.C., Kroes, A.C.M., Beersma, M.F.C., de Klerk, E.P.A., Egeler, R.M., Lankester, A.C., Schilham, M.W., 2005. Adenovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation: diagnosis, treatment and immunity. *Bone Marrow Transplant.* 35 Suppl 1, S73-76. doi:10.1038/sj.bmt.1704852

van Tol, M.J.D., Kroes, A.C.M., Schinkel, J., Dinkelaar, W., Claas, E.C.J., Jol-van der Zijde, C.M., Vossen, J.M., 2005. Adenovirus infection in paediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with a delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant.* 36, 39–50. doi:10.1038/sj.bmt.1705003

Veltrop-Duits, L.A., van Vreeswijk, T., Heemskerk, B., Thijssen, J.C.P., El Seady, R., Jol-van der Zijde, E.M., Claas, E.C.J., Lankester, A.C., van Tol, M.J.D., Schilham, M.W., 2011. High titers of pre-existing adenovirus serotype-specific neutralizing antibodies in the host predict viral reactivation after allogeneic stem cell transplantation in children. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 52, 1405–1413. doi:10.1093/cid/cir231

Verma, I.M., Somia, N., 1997. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239–242. doi:10.1038/38410

Vora, G.J., Lin, B., Gratwick, K., Meador, C., Hansen, C., Tibbetts, C., Stenger, D.A., Irvine, M., Seto, D., Purkayastha, A., Freed, N.E., Gibson, M.G., Russell, K., Metzgar, D., 2006. Co-infections of adenovirus species in previously vaccinated patients. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 921–930.

Votteler, J., Sundquist, W.I., 2013. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe* 14, 232–241. doi:10.1016/j.chom.2013.08.012

Wadell, G., Hammarskjöld, M.L., Winberg, G., Varsanyi, T.M., Sundell, G., 1980. Genetic variability of adenoviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 354, 16–42.

Walsh, M.P., Chintakuntlawar, A., Robinson, C.M., Madisch, I., Harrach, B., Hudson, N.R., Schnurr, D., Heim, A., Chodosh, J., Seto, D., Jones, M.S., 2009. Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PloS One* 4, e5635. doi:10.1371/journal.pone.0005635

Walsh, M.P., Seto, J., Liu, E.B., Dehghan, S., Hudson, N.R., Lukashev, A.N., Ivanova, O., Chodosh, J., Dyer, D.W., Jones, M.S., Seto, D., 2011. Computational analysis of two species C human adenoviruses provides evidence of a novel virus. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3482–3490. doi:10.1128/JCM.00156-11

Wang, H., Li, Z., Yumul, R., Lara, S., Hemminki, A., Fender, P., Lieber, A., 2011. Multimerization of adenovirus serotype 3 fiber knob domains is required for efficient binding of virus to desmoglein 2 and subsequent opening of epithelial junctions. *J. Virol.* 85, 6390–6402. doi:10.1128/JVI.00514-11

- Wang, Y., Li, Y., Lu, R., Zhao, Y., Xie, Z., Shen, J., Tan, W., 2016. Phylogenetic evidence for intratypic recombinant events in a novel human adenovirus C that causes severe acute respiratory infection in children. *Sci. Rep.* 6, 23014. doi:10.1038/srep23014
- Wevers, D., Metzger, S., Babweteera, F., Bieberbach, M., Boesch, C., Cameron, K., Couacy-Hymann, E., Cranfield, M., Gray, M., Harris, L.A., Head, J., Jeffery, K., Knauf, S., Lankester, F., Leendertz, S.A.J., Lonsdorf, E., Mugisha, L., Nitsche, A., Reed, P., Robbins, M., Travis, D.A., Zommers, Z., Leendertz, F.H., Ehlers, B., 2011. Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions. *J. Virol.* 85, 10774–10784. doi:10.1128/JVI.00810-11
- Wiethoff, C.M., Wodrich, H., Gerace, L., Nemerow, G.R., 2005. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J. Virol.* 79, 1992–2000. doi:10.1128/JVI.79.4.1992-2000.2005
- Wildner, O., Hoffmann, D., Jogler, C., Uberla, K., 2003. Comparison of HSV-1 thymidine kinase-dependent and -independent inhibition of replication-competent adenoviral vectors by a panel of drugs. *Cancer Gene Ther.* 10, 791–802. doi:10.1038/sj.cgt.7700638
- Wodrich, H., Cassany, A., D'Angelo, M.A., Guan, T., Nemerow, G., Gerace, L., 2006. Adenovirus core protein pVII is translocated into the nucleus by multiple import receptor pathways. *J. Virol.* 80, 9608–9618. doi:10.1128/JVI.00850-06
- Xu, J., Lin, L., Yong, M., Dong, X., Yu, T., Hu, L., 2016. Adenovirus-mediated overexpression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhances invasiveness and motility of serous ovarian cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 13, 265–272. doi:10.3892/mmr.2015.4509
- Yabe, Y., Trentin, J.J., Taylor, G., 1962. Cancer induction in hamsters by human type 12 adenovirus. Effect of age and of virus dose. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 111, 343–344.
- Yabiku, S.T., Yabiku, M.M., Bottós, K.M., Araújo, A.L., Freitas, D. de, Belfort Jr, R., 2011. [Ganciclovir 0.15% ophthalmic gel in the treatment of adenovirus keratoconjunctivitis]. *Arq. Bras. Oftalmol.* 74, 417–421.
- Ying, B., Tollefson, A.E., Spencer, J.F., Balakrishnan, L., Dewhurst, S., Capella, C., Buller, R.M.L., Toth, K., Wold, W.S.M., 2014a. Ganciclovir inhibits human adenovirus replication and pathogenicity in permissive immunosuppressed Syrian hamsters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7171–7181. doi:10.1128/AAC.03860-14
- Ying, B., Tollefson, A.E., Spencer, J.F., Balakrishnan, L., Dewhurst, S., Capella, C., Buller, R.M.L., Toth, K., Wold, W.S.M., 2014b. Ganciclovir inhibits human adenovirus replication and pathogenicity in permissive immunosuppressed Syrian hamsters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7171–7181. doi:10.1128/AAC.03860-14
- Yoon, B.W., Song, Y.G., Lee, S.H., 2017. Severe community-acquired adenovirus pneumonia treated with oral ribavirin: a case report. *BMC Res. Notes* 10, 47. doi:10.1186/s13104-016-2370-2
- Yusuf, U., Hale, G.A., Carr, J., Gu, Z., Benaim, E., Woodard, P., Kasow, K.A., Horwitz, E.M., Leung, W., Srivastava, D.K., Handgretinger, R., Hayden, R.T., 2006. Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation* 81, 1398–1404. doi:10.1097/01.tp.0000209195.95115.8e
- Zahradnik, J.M., 1987. Adenovirus pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* 2, 104–111.
- Zhang, W., Low, J.A., Christensen, J.B., Imperiale, M.J., 2001. Role for the adenovirus IVa2 protein in

packaging of viral DNA. *J. Virol.* 75, 10446–10454. doi:10.1128/JVI.75.21.10446-10454.2001

Zhao, L.J., Padmanabhan, R., 1988. Nuclear transport of adenovirus DNA polymerase is facilitated by interaction with preterminal protein. *Cell* 55, 1005–1015.

Zhou, S., Liu, R., Baroudy, B.M., Malcolm, B.A., Reyes, G.R., 2003. The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* 310, 333–342.

Zubieta, C., Schoehn, G., Chroboczek, J., Cusack, S., 2005. The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol. Cell* 17, 121–135. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.041

Tables

Table 1. Primers used for amplification and sequencing of species C HAdV DNA polymerase.

PCR primers F1 ¹	HAdVC F1 F ²	5' TTCTCGCAGCTCATGGCCCG 3'
	HAdVC F1 R	5' CAGGCGCGCGTCGAAGTAGT 3'
PCR primers F2 ¹	HAdVC F2 R	5' CCAGCATCCGCGGTGGAAGA 3'
	HAdVC F2 F ²	5' GGGGGCCACTTCGTTAAGCAT 3'
Inner primers F1 ¹	HAdVC F1.1 F	5' TTCTCGCAGCTCATGGCCCG 3'
	HAdVC F1.1 R	5' TTGCGTGTGATGCGGAAGGGT 3'
	HAdVC F1.2 F	5' CCCGCGCTTCTTGGAACCTTACAT 3'
	HAdVC F1.2 R	5' CAGGCGCGCGTCGAAGTAGT 3'
Inner primers F2 ¹	HAdVC F2.1 F	5' TCGGCATGTACGCCTCCG 3'
	HAdVC F2.1 R	5' GGGTAGCGGTCGTTGTCCACT 3'
	HAdVC F2.2 F	5' GCGCCCCACCCCTTTTAT 3'
	HAdVC F2.2 R	5' GGGGGCCACTTCGTTAAGCAT 3'

¹The primers were designed using the reference sequence of C5 ATCC Adv complete genome (NCBI: AY339865). The DNA pol gene starts at the nucleotide 5197 and ends at nucleotide 8793. ²The primers for F1F and F2F flank the DNA pol gene, F2F starts at nucleotide 5000 and F1F ends at nucleotide 8985.

Table 2. Amino acid polymorphism in the DNA polymerase of 80 HAdV C species

Mutation ²	C ¹ n (%)	C1 n (%)	C2 n (%)	C5 n (%)	Mutation ²	C ¹ n (%)	C1 n (%)	C2 n (%)	C5 n (%)
V4A	2 (2.5)			2 (11.1)	D322E	4 (5.0)	4 (14.3)		
A16T	1 (1.3)	1 (3.6)			Q330K	1 (1.3)		1 (2.9)	
A16V	1 (1.3)		1 (2.9)		P332T	2 (2.5)	2 (7.1)		
P17S	1 (1.3)	1 (3.6)			I345V	5 (6;3)	5 (17.9)		
V28I	1 (1.3)	1 (3.6)			M358T	4 (5.0)	4 (14.3)		
P33T	8 (10.0)		2 (5.9)	6 (33.3)	V369I	4 (5.0)	4 (14.3)		
R34C	7 (8.8)	4 (14.3)	3 (8.8)		A370T	1 (1.3)		1 (2.9)	
R34H	1 (1.3)		1 (2.9)		L375I	2 (7.1)	2 (7.1)		
A35T	2 (2.5)	1 (3.6)		1 (5.6)	A376T	2 (2.5)	2 (7.1)		
A36T	1 (1.3)		1 (2.9)		A379T	1 (1.3)	1 (3.6)		
A42T	1 (1.3)		1 (2.9)		L380Q	2 (2.5)		2 (5.9)	
R44C	1 (1.3)	1 (3.6)			E382A	1 (1.3)		1 (2.9)	
R45Q	3 (3.8)	1 (3.6)	1 (2.9)	1 (5.6)	S386N	4 (5.0)	3 (10.7)		1 (5.6)
G53S	5 (6.3)	2 (7.1)		3 (16.7)	T405I	21 (26.3)	2 (7.1)	10 (29.4)	9 (50.0)
G53C	1 (1.3)		1 (2.9)		I413M	1 (1.3)	1 (3.6)		
G56R	41 (50.0)	17 (60.7)	17 (50.0)	7 (38.9)	R467H	1 (1.3)		1 (2.9)	
A57T	1 (1.3)		1 (2.9)		D483N	1 (1.3)		1 (2.9)	
P64S	13 (16.3)	1 (3.6)	3 (8.8)	9 (50.0)	D542N	1 (1.3)	1 (3.6)		
S67T	1 (1.3)		1 (2.9)		E548Q	1 (1.3)	1 (3.6)		
S74F	1 (1.3)	1 (3.6)			N593H	1 (1.3)	1 (3.6)		
K75Q	2 (2.5)	2 (7.1)			A600T	1 (1.3)	1 (3.6)		
D76N	1 (1.3)		1 (2.9)		D611N	1 (1.3)		1 (2.9)	
P78S	1 (1.3)		1 (2.9)		E638Q	1 (1.3)		1 (2.9)	
A80T	3 (3.8)	1 (3.6)	2 (5.9)		P647H	1 (1.3)	1 (3.6)		
H81N	1 (1.3)		1 (2.9)		D648E	7 (8.8)	4 (14.3)	2 (5.9)	1 (5.6)
A99V	2 (2.5)	1 (3.6)	1(3.2)		H654Y	1 (1.3)		1 (2.9)	
D101N	1 (1.3)	1 (3.6)			R678K	1 (1.3)		1 (2.9)	
A103T	3 (3.8)		3 (8.8)		A715T	1 (1.3)	1 (3.6)		
H113Y	1 (1.3)		1 (2.9)		Q723K	2 (2.5)	2 (7.1)		
A117T	1 (1.3)		1 (2.9)		I738V	40 (50.0)	10 (35.7)	17 (72.2)	13 (72.2)
T121P	1 (1.3)	1 (3.6)			L785M	1 (1.3)		1 (2.9)	
E130K	1 (1.3)		1 (2.9)		H793R	10 (12.5)	6 (21.4)	3 (8.8)	1 (5.6)
T136S	4 (5.0)	1 (3.6)	1 (2.9)	2 (11.1)	T800A	1 (1.3)	1 (3.6)		
R138W	1 (1.3)		1 (2.9)		A819V	1 (1.3)		1 (2.9)	
V151I	1 (1.3)		1 (1.3)		D825N	1 (1.3)	1 (3.6)		
R156Q	2 (2.5)	2 (7.1)			A865V	1 (1.3)		1 (2.9)	
D161E	1 (1.3)			1 (5.6)	S889C	1 (1.3)	1 (3.6)		
V171L	1 (1.3)	1 (3.6)			Q897E	27 (33.8)	7 (25.0)	16 (47.1)	4 (22.2)
V176I	18 (22.5)	7 (25.0)	9 (26.5)	2 (11.1)	P921R	1 (1.3)			1 (5.6)
E180K	1 (1.3)			1 (5.6)	S926T	39 (48.8)	9 (32.1)	17 (50.0)	13 (72.2)
E190K	2 (2.5)		2 (5.9)		D961N	1 (1.3)		1 (2.9)	
E192K	1 (1.3)	1 (3.6)			S989T	1 (1.3)		1 (2.9)	
E201K	2 (2.5)	1 (3.6)		1 (5.6)	E1002K	1 (1.3)		1 (2.9)	
H226Q	1 (1.3)		1 (2.9)		D1003Y	1 (1.3)		1 (2.9)	
G270S	1 (1.3)		1 (2.9)		R1024Q	1 (1.3)		1 (2.9)	
E310D	1 (1.3)	1 (3.6)			E1046K	6 (7.5)		6 (17.6)	
P311S	1 (1.3)		1 (2.9)		G1061R	2 (2.5)		2 (5.9)	
P311L	1 (1.3)	1 (3.6)			A1062D	1 (1.3)		1 (2.9)	
R317Q	2 (2.5)		2 (5.9)		S1084N	1 (1.3)		1 (2.9)	
V321L	3 (3.8)	2 (7.1)	1 (2.9)		S1093F	1 (1.3)		1 (2.9)	
V321A	27 (33.8)	3 (10.7)	13 (38.3)	11 (61.1)	T1134I	3 (3.8)	1 (3.6)	2 (5.9)	
D322N	9 (11.3)	1 (3.6)	2 (5.9)	6 (33.3)					

¹ Amino acid polymorphism detected in all HAdV C species clinical strains are given. The percentage indicates the number of clinical strains bearing the mutation in relation to the total number of clinical strains.

² The first letter indicates the most common amino acid (defined as the consensus using Geneious) over all species C sequences. The number indicates amino acid position in the DNA pol coding sequence. The second letter indicates amino acids that differ from the consensus and are considered to be polymorphisms.

Table 3. Amino acid substitutions according to the different functional domains of HAdV DNA polymerase.

Domain ¹	Sequence region	Mutations				Strains ⁴ (n, %)		Amino acids substitution rate (%) ⁵	Pvalue ⁶
		C ² (n, %)	C1 ³ (n, %)	C2 ³ (n, %)	C5 ³ (n, %)				
NH2 terminal	1 to 272	46 (44.2)	20 (39.2)	31 (55.3)	12 (54.5)	40	50.0	16.9	0.0003
NLS	25 to 46	9 (8.7)	4 (7.8)	7 (12.5)	3 (13.6)	13	16.3	42.9	0.1454
Exonuclease	273 to 621	29 (27.9)	19 (37.3)	13 (23.2)	4 (18.2)	33	41.3	8.3	0.0003
Exo I	276 to 293	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0.0	0.0	NA
Exo II	413 to 427	1 (1.0)	1 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	4.3	7.1	0.2231
Exo III	575 to 588	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0.0	0.0	NA
Palm1	622 to 695	5 (4.8)	2 (3.9)	4 (7.1)	1 (4.5)	7	8.9	6.8	0,1534
Palm2	971 to 1109	9 (8.7)	0 (0.0)	9 (16.1)	0 (0.0)	9	11.3	6.5	<0.0001
Fingers	809 to 848	2 (1.9)	1 (2.0)	1 (1.8)	0 (0.0)	2	2.5	5.1	0.4724
TPR1	696 to 808	6 (5.8)	5 (9.8)	3 (5.4)	2 (9.1)	50	62.5	5.4	0.2070
TPR2	849 to 970	6 (5.8)	3 (5.9)	4 (7.1)	3 (13.6)	47	58.8	5.0	0.7985
Thumb	1110 to 1198	1 (1.0)	1 (2.0)	1 (1.8)	0 (0.0)	3	3.8	1.1	0.2231

¹ Functional domain as predicted by comparison with DNA polymerase of bacteriophage Phi 29 (Hoeben and Uil, 2013a; Uil et al., 2011).

² Number of different mutations identified in each domain over all C species strains sequenced are given. Each mutation is counted once whatever the number of strains with the mutation. The percentage (%) indicates the number of mutations in each domain on the total of mutations identified in the whole DNA polymerase (n=104) for all C species HAdV strains sequenced in the study. Some mutations may be considered twice when they are present in overlapping domains. Out of 104 mutations, 14 are present in different domains. The total percentage is therefore higher than 100%.

³ The percentage (%) indicates the number of amino acid positions with a substitution in each domain on the total of mutations identified in the whole DNA polymerase C1 species (n=51), C2 species (n=56) and C5 species (n=22) HAdV strains sequenced in the study.

⁴ The number (n) of strains with at least one mutation in each domain is given. The percentage indicates the number of strains with at least one mutation in each domain on the total of HAdV C strains included in the study (80). Some mutations may be considered twice when they are present in overlapping domains. Out of 87 mutations, 10 are present in different domains. The total percentage is therefore higher than 100%.

⁵ The rate of amino acids substitution per domain indicates the number of mutations on the total of amino acids in each domain.

⁶ Pvalues calculated by chi-square test.

Legends for figures.

Figure 1. Phylogeny tree of DNA pol gene of clinical strains.

Full circles represent clinical samples tested in the study and open circles previous NCBI published sequences. HAdV C1 are shown in blue, C2 in red and C5 in green. The molecular phylogenetic analysis was conducted by Maximum Likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993). The tree with the highest log likelihood (-8689.2651) is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The proportion of sites where at least 1 unambiguous base is present in at least 1 sequence for each descendent clade is shown next to each internal node in the tree. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 3548 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar et al., 2016).

Figure 2. Nucleotide polymorphism map of HAdV DNA polymerase. A) Polymorphisms for all HAdV C species strains. **B)** Polymorphisms within each type. Nucleotide positions in the HAdV DNA pol coding sequence are given on the x axis. Frequencies of strains with each mutation are represented in black lines. Corresponding percentages are given on the y axis. The organization of putative functional domains is based on the description of Hoeben et al, (Hoeben and Uil, 2013a). The different domains are depicted in blue boxes.

Figure 3. Amino acid polymorphism map of HAdV DNA polymerase. Amino acid positions in the HAdV DNA polcoding sequence are given on the x axis. Frequencies of strains with each mutation are represented in red. Corresponding percentages are given on the y axis. Most frequent mutations, detected in more than 10 % of strains, are indicated in bold. Mutations associated with brincidofovir resistance (T87I, V303I) or cidofovir resistance (A501E, L677F, F882i, F882L, T1151I and S1183R) are indicated in green. The organization of putative functional domains is based on the description of Hoeben et al, (Hoeben and Uil, 2013a). The different domains are depicted in blue boxes.

Figure 1.

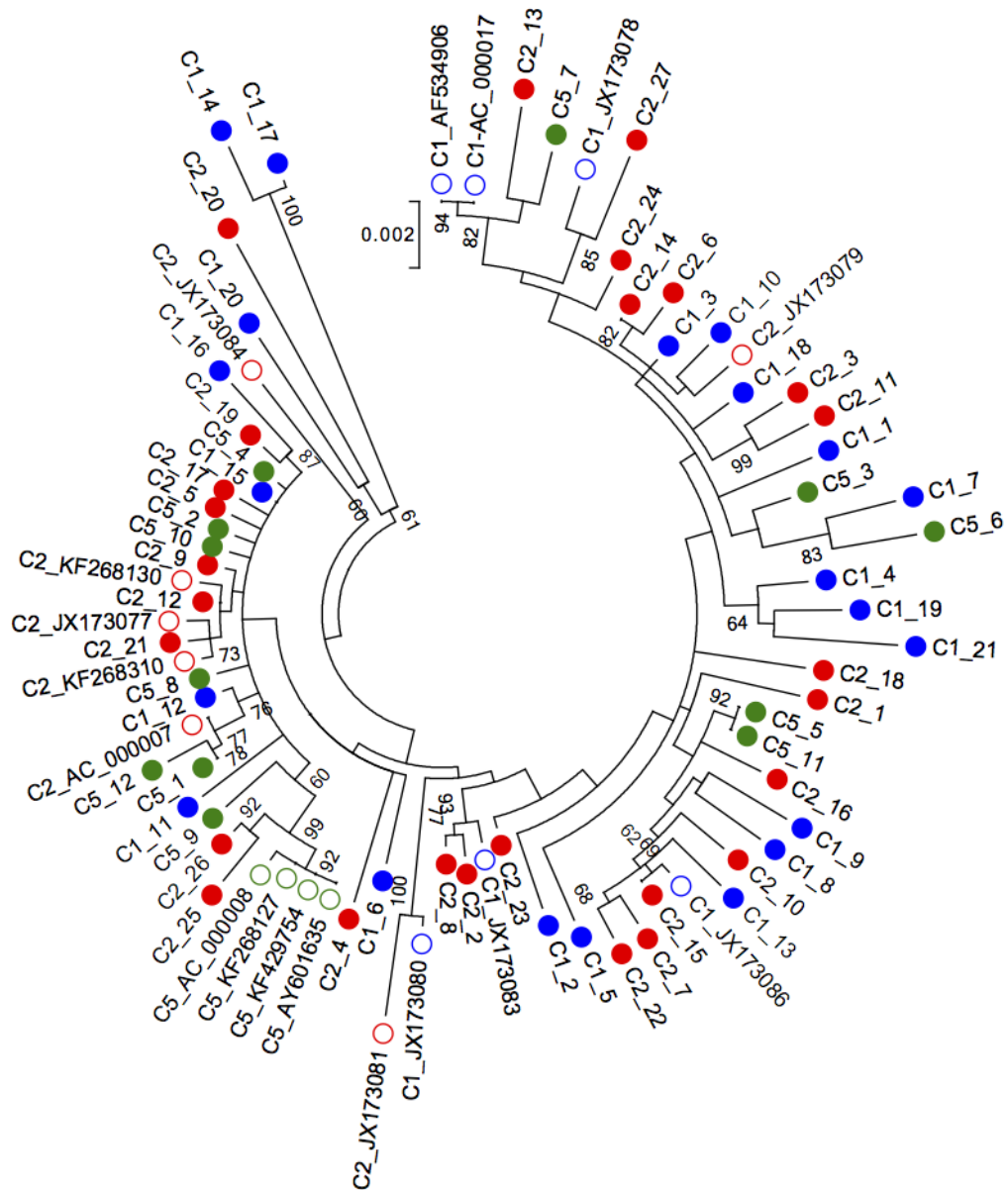
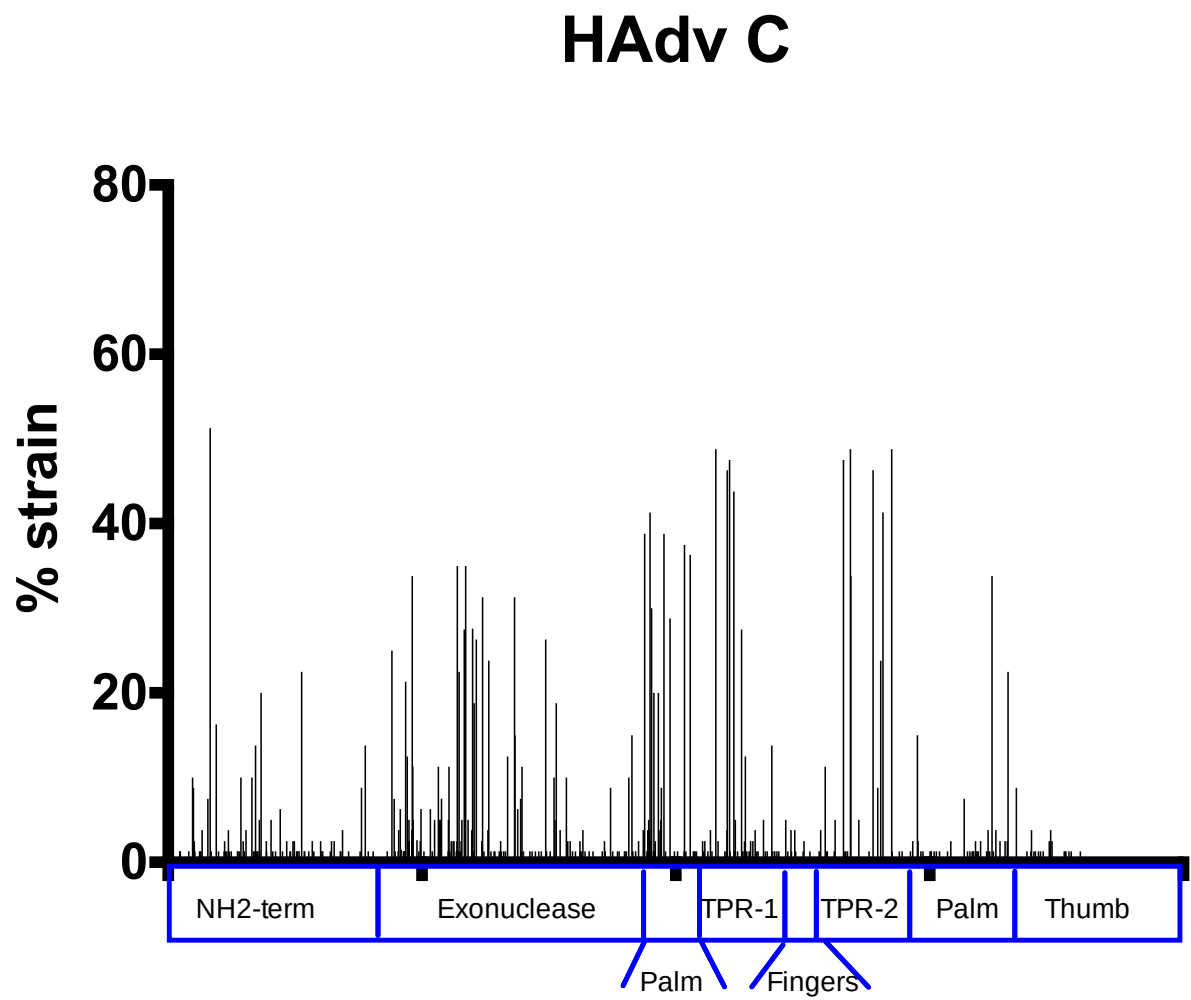
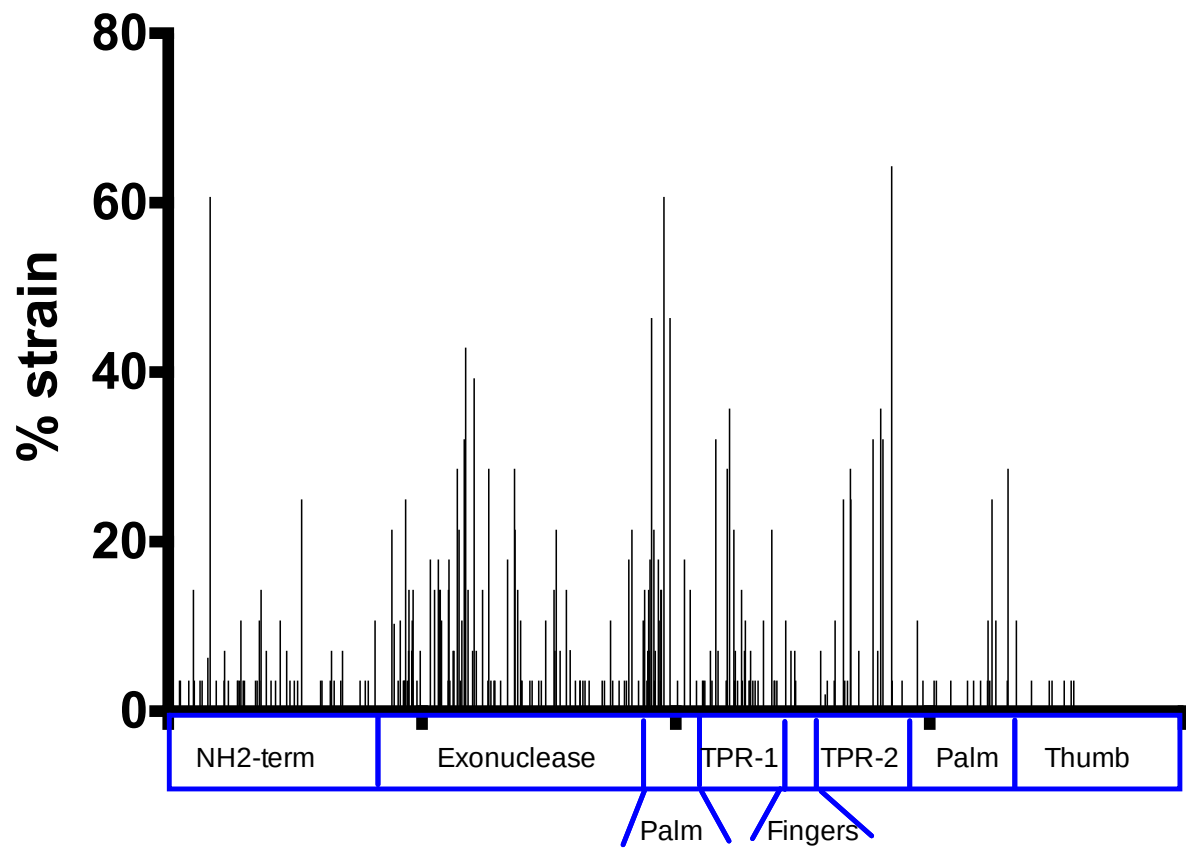


Figure 2.
A



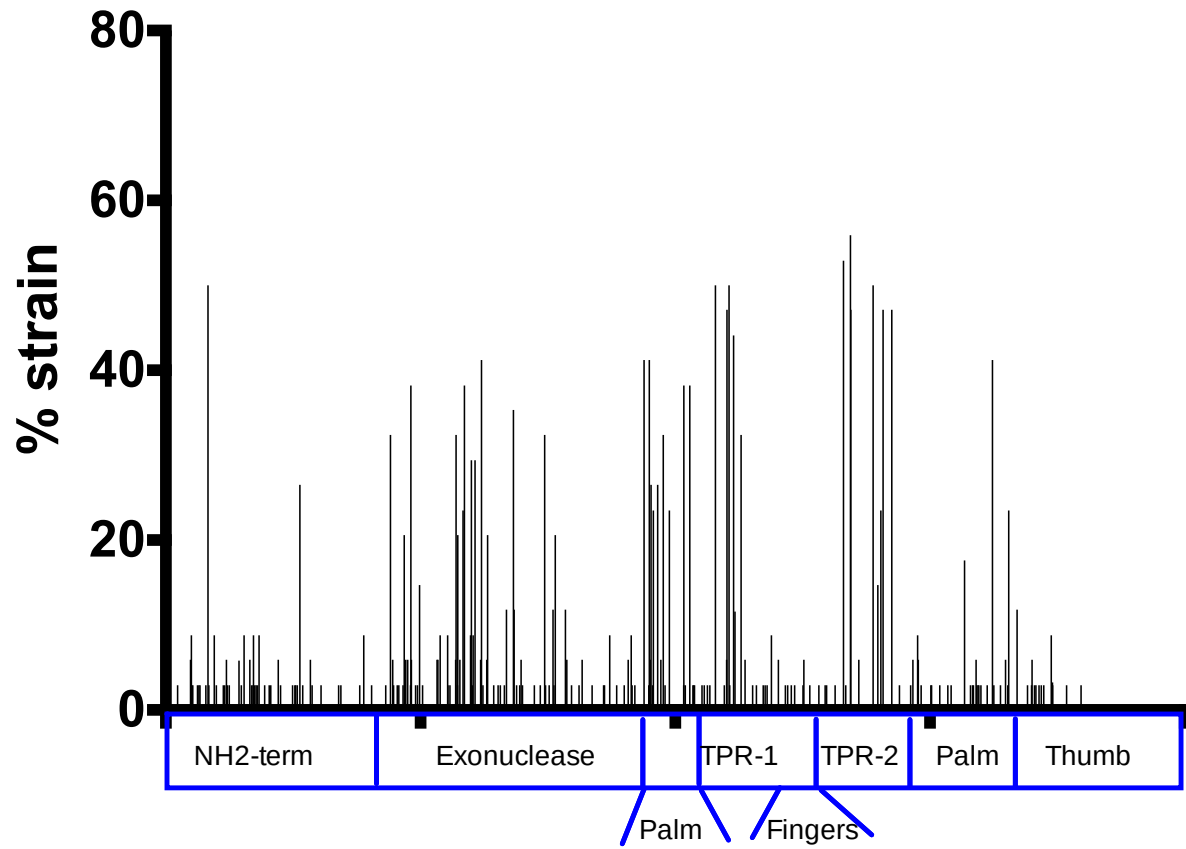
B

HAdv C1



c.

HAdv C2



D.

HAdv C5

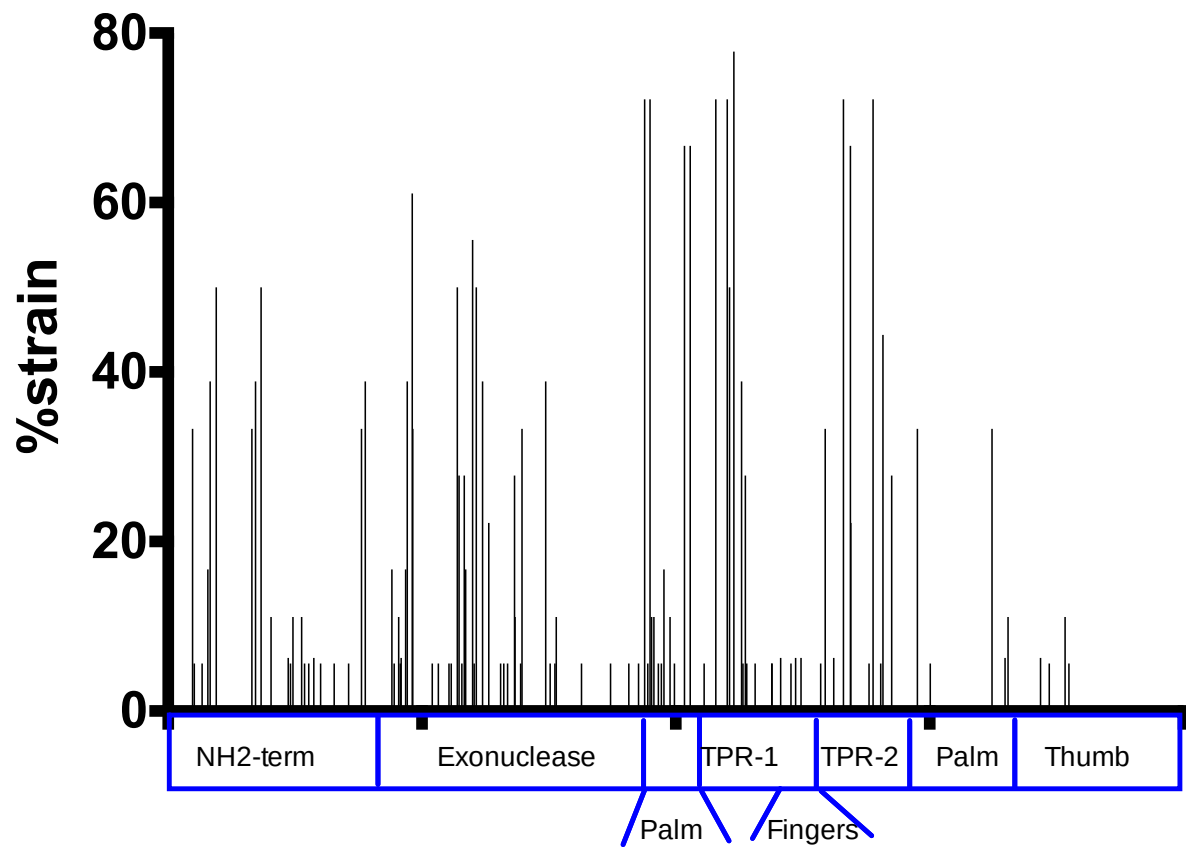


Figure 3.

