



HAL
open science

Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii*: d'une analyse épidémiologique locale à l'introduction d'un nouvel outil moléculaire de diagnostic

Stéphanie Avenel

► To cite this version:

Stéphanie Avenel. Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii*: d'une analyse épidémiologique locale à l'introduction d'un nouvel outil moléculaire de diagnostic. Sciences pharmaceutiques. 2011. hal-01738953

HAL Id: hal-01738953

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01738953>

Submitted on 20 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

2011

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 14 Novembre 2011

par **Stéphanie AVENEL**
née le 15/12/1982

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* :
d'une analyse épidémiologique locale
à l'introduction d'un nouvel outil moléculaire de diagnostic

Membres du Jury

Président / Directeur de thèse : M. le Professeur C. GANTZER, Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges : M. le Professeur A. LOZNIEWSKI PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy
M. le Docteur M. LADRIERE PH, CHU de Nancy
Melle le Docteur A. DEBOURGOGNE (Co-Directeur de thèse) AHU, CHU de Nancy

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2011-2012

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ ✉	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN ✉	<i>Biologie cellulaire</i>
Jean-Michel SIMON	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	<i>Pharmacologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	<i>Microbiologie</i>
Max HENRY	<i>Botanique, Mycologie</i>
Pierre LABRUDE	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>
Béatrice DEMORE	<i>Pharmacie clinique</i>
Nathalie THILLY	<i>Santé publique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	<i>Communication et santé</i>
Isabelle BERTRAND	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	<i>Pharmacie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Florence DUMARCAY	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	<i>Microbiologie</i>
Béatrice FAIVRE	<i>Hématologie</i>
Adil FAIZ	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Luc FERRARI	<i>Toxicologie</i>
Caroline GAUCHER-DI STASIO	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	<i>Chimie organique</i>

Frédéric JORAND
Olivier JOUBERT
Francine KEDZIEREWICZ
Alexandrine LAMBERT
Faten MERHI-SOUSSI
Christophe MERLIN
Blandine MOREAU
Maxime MOURER
Francine PAULUS
Christine PERDICAKIS
Caroline PERRIN-SARRADO
Virginie PICHON
Anne SAPIN-MINET
Marie-Paule SAUDER
Gabriel TROCKLE
Mihayl VARBANOV ☒
Marie-Noëlle VAULTIER
Emilie VELOT ☒
Mohamed ZAIYOU
Colette ZINUTTI

Santé publique
Toxicologie
Pharmacie galénique
Informatique, Biostatistiques
Hématologie
Microbiologie
Pharmacognosie
Chimie organique
Informatique
Chimie organique
Pharmacologie
Biophysique
Pharmacie galénique
Mycologie, Botanique
Pharmacologie
Immuno-Virologie
Mycologie, Botanique
Physiologie-Physiopathologie humaines
Biochimie et Biologie moléculaire
Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER

Sémiologie

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD

Anglais

☒ *En attente de nomination*

Serment des Apothicaires

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

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

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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

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

Remerciements

A mon Président de jury et Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Christophe GANTZER

Professeur des Universités, Microbiologie environnementale

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce sujet.

Que ce travail, que vous me faites l'honneur de juger, témoigne de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A mon Co-Directeur de Thèse

Mademoiselle le Docteur Anne DEBOURGOGNE

AHU, service de Parasitologie Mycologie, CHU de Nancy

Je te remercie sincèrement de m'avoir confié ce travail et de m'avoir guidée avec délicatesse et rigueur tout au long de la rédaction de ce manuscrit. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes précieux conseils.

Que l'aboutissement de ce travail témoigne de toute ma reconnaissance.

A mes juges

Monsieur le Professeur Alain LOZNIEWSKI

PU-PH, département de Microbiologie, CHU de Nancy

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.
Soyez assuré de toute ma gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Marc LADRIERE

PH, service de Néphrologie, CHU de Nancy

Vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury de thèse en qualité de clinicien.
Soyez assuré de ma reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

A tous ceux et celles qui ont participé à la réalisation de ce travail...

Anne, Christine, Mélanie

Techniciennes du secteur de biologie moléculaire, service de Parasitologie-Mycologie

Un immense merci pour votre aide précieuse lors des manipulations.

Marie-Christine

Secrétaire du service de Parasitologie-Mycologie

Pour avoir passé du temps dans les archives et avoir ainsi contribué à l'élaboration des statistiques.

Sibel

Ingénieur, secteur de biologie moléculaire, département de Microbiologie

Un grand merci pour tout le temps que tu as consacré à la recherche et récupération de données...

A tout le service de Parasitologie-Mycologie, techniciens, biologistes...

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir fait partager votre savoir-faire et votre expérience dans un climat de travail et bonne humeur.

A mes parents

Je vous remercie d'être là dans chaque étape de ma vie, d'avoir toujours cru en moi, même lorsque le doute m'envahissait. Votre soutien sans faille et tous vos encouragements m'ont permis d'avancer avec confiance. Que tous vos efforts soient aujourd'hui récompensés, je vous dédie ce travail.

A mes deux rayons de soleil, Auxence et Laurent

Parce qu'un sourire du premier me fait oublier tous mes doutes et que l'Amour du second me permet de gravir des montagnes...

A ma sœur, Charlène, et à Quentin

Pour tous ces instants de bonheur partagés ensemble devenus trop rares à mes yeux...

A Maminou,

Pour ton amour, ta joie de vivre et ton énergie.

A toute ma famille

Pour l'intérêt sincère que vous portez à mon parcours.

A ma belle-famille, Françoise, Jean-Marie, Nadège et Julien

Merci pour votre accueil chaleureux au sein de votre famille.

A tous mes amis, de Nancy, de Lyon et d'ailleurs...

Votre amitié est inestimable et je souhaite qu'elle perdure encore de longues années... Un immense merci pour chaque instant passé en votre compagnie.

A tous ceux et celles qui auraient été heureux d'être présents aujourd'hui, Papitou, Mamie Madeleine, André...

Merci pour tout l'amour que vous m'avez donné. La fierté que je pouvais lire dans vos yeux m'a permis d'entreprendre de belles choses...

Sommaire

Serment des Apothicaires

Remerciements

Sommaire

Liste des abréviations

<i>Introduction</i>	1
<i>Partie 1 : Infection à <u>Pneumocystis jirovecii</u> : données de la littérature</i>	3
I. Agent pathogène : <i>Pneumocystis jirovecii</i>	4
II. Physiopathologie.....	16
III. Epidémiologie.....	19
IV. Présentation clinique	23
V. Diagnostic de la PCP	30
VI. Traitement	38
<i>Partie 2 : Analyse épidémiologique des cas de pneumocystose au CHU de Nancy</i>	43
I. Problématique	44
II. Patients et méthode	45
III. Résultats	47
IV. Discussion	59
<i>Partie 3 : Détection de <u>Pneumocystis jirovecii</u> dans les prélèvements respiratoires par biologie moléculaire</i>	65
I. Problématique	66
II. Matériels et méthodes	67
III. Résultats	76
IV. Discussion	82
<i>Conclusion</i>	93
<i>Annexes</i>	96
<i>Références bibliographiques</i>	107
<i>Index des Figures, Tableaux & Annexes</i>	116
<i>Table des Matières</i>	120
<i>Résumé</i>	126

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
BD : Biodisponibilité
CAV : Centre Alexis Vautrin
CCVT : Chirurgie cardiaque, vasculaire et transplantation
CI : Contre-indication
CMF : Cytométrie en flux
DHFR : Dihydrofolate réductase
DHPS : Dihydroptéroate synthase
dNTP : Désoxynucléotide triphosphate
G6PD : Glucose 6 phosphate déshydrogénase
GVHD : Maladie du greffon contre l'hôte
HAART : Highly active antiretroviral therapy
HGE : Hépto-gastro-entérologie
IFI : Immunofluorescence indirecte
IFN- γ : Interféron gamma
IL-8 : Interleukine-8
ITS : Internal transcribed spacer
IV : Intraveineuse
LAL : Leucémie aiguë lymphoïde
LDH : Lactate deshydrogénase
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LNH : Lymphome non Hodgkinien
MGG : May-Grünwald Giemsa
MSG : Major surface glycoprotein
mtLSU : Mitochondrial large subunit
MTX : Méthotrexate
NR : Non renseigné
ORL : Oto-rhino-laryngologie
PCP : Pneumocystose pulmonaire
PCR : Polymerase chain reaction
Pj : *Pneumocystis jirovecii*
PO : *per os*
RP : Radiographie pulmonaire

qPCR : Quantitative polymerase chain reaction
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise
SRI : Syndrome de reconstruction immunitaire
TFEq : Trophic form equivalents
TMP-SMX : Triméthoprime-sulfaméthoxazole
TNF : Tumor necrosis factor
UHSI : Unité d'hospitalisation sécurisée interrégionale
USCM : Unité de surveillance continue médicale
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VPN : Valeur prédictive négative
VPP : Valeur prédictive positive

Introduction

La pneumocystose (PCP), causée par *Pneumocystis jirovecii* (Pj), est une infection opportuniste responsable de pneumopathie interstitielle grave chez les sujets immunodéprimés. Depuis sa découverte au début des années 1900, les connaissances sur ce pathogène ne cessent d'évoluer. La recrudescence des cas de PCP lors de l'épidémie de VIH dans les années 80 en a fait un fait de santé publique important. De nombreux scientifiques se sont alors intéressés à Pj pour comprendre ce micro-organisme. L'agent de la pneumocystose garde cependant encore de nombreux secrets à découvrir.

Dans un premier temps, le présent travail fait un état des lieux des connaissances actuelles sur *Pneumocystis jirovecii* : la biologie, la physiopathologie, l'épidémiologie ainsi que des avancées en termes de diagnostic, de prévention et de traitement de la pneumocystose (PCP).

Dans la seconde partie, une étude épidémiologique rétrospective a été menée au CHU de Nancy permettant d'apprécier l'évolution sur seize ans (de 1994 à 2010) des cas d'infection à Pj ainsi que de caractériser ces cas sur une période de cinquante-deux mois. Cette analyse met en évidence une modification au cours des dernières années des populations à risque de PCP que nous tenterons de comprendre et d'expliquer. Le terrain d'immunosuppression des patients atteints de PCP a-t-il un impact sur les manifestations clinico-biologiques de la maladie ?

Enfin, devant la nécessité d'améliorer le diagnostic biologique et la prise en charge, il s'avérait indispensable de mettre en place au sein du laboratoire une technique de biologie moléculaire pour le dépistage de Pj dans les prélèvements respiratoires. La troisième partie de ce manuscrit propose ainsi deux analyses comparatives. Tout d'abord, les performances d'une technique de PCR en temps réel « maison » sont évaluées par rapport aux techniques de microscopie utilisées au laboratoire pour le diagnostic de PCP. La seconde analyse consiste en la comparaison de la PCR « maison » avec deux kits de PCR quantitatives (qPCR) développés par Bio-Evolution d'une part et Roche d'autre part. Quels sont les avantages et inconvénients de la biologie moléculaire par rapport aux techniques de microscopie usuelles ? Dans un contexte d'accreditation, l'utilisation de kits standardisés étant préférable, les résultats obtenus avec les différentes PCR sont-ils comparables ? Le laboratoire optera-t'il pour la biologie moléculaire en complément des analyses déjà pratiquées pour la recherche de Pj ? Quelle technique de PCR en temps réel sera choisie ?

Partie 1

*Infection à Pneumocystis jirovecii :
données de la littérature*

I. Agent pathogène : *Pneumocystis jirovecii*

A. Historique

L'agent pathogène, aujourd'hui appelé *Pneumocystis jirovecii* a été découvert pour la première fois en 1909, au Brésil, dans les poumons de cochons d'Inde infectés par *Trypanosoma cruzi*. A cette époque, Carlos Chagas croyait avoir identifié une nouvelle forme (prékyste) de trypanosome. [Chagas 1909]

En 1910, Carini a fait la même observation dans des poumons de rats infectés par *Trypanosoma lewisi*. [Carini 1910]

En 1912, le couple Delanoë, de l'Institut Pasteur de Paris, a observé ce kyste dans des poumons de rats d'égouts parisiens non infectés par le trypanosome et l'a décrit comme étant une entité biologique différente du trypanosome. [Delanoë et Delanoë 1912 ; Catherinot *et al.* 2010] Ils le nommèrent *Pneumocystis carinii* : « *pneumo-* » en raison de son tropisme pulmonaire, « *-cystis* » pour sa forme caractéristique et « *carinii* » en hommage à Antonio Carini. [Aliouat-Denis *et al.* 2008]

En 1913, Aragao a proposé de classer ce pathogène dans l'ordre des Coccidies parce qu'il présente des similarités avec *Cryptosporidium muris*.

Dès lors, commence le débat controversé de l'appartenance de *Pneumocystis* sp. au règne des parasites ou à celui des champignons.

En 1976, Frenkel a suggéré que ces pathogènes rencontrés chez l'humain et chez le rat appartenaient à deux espèces distinctes du fait d'une spécificité d'hôte et de différences antigéniques. Il a alors vainement proposé de nommer *Pneumocystis jirovecii* le micro-organisme infectant l'espèce humaine (*jirovecii* en hommage au Docteur Otto Jirovec).

Il faudra attendre la fin des années 1980 pour que la biologie moléculaire confirme l'existence de plusieurs espèces de *Pneumocystis* sp. ainsi que l'appartenance fongique.

En 1994, lors des troisièmes ateliers internationaux sur les protistes opportunistes (IWOP-3), la nomenclature trinominale préconisée par l'ICBN (International Code of Botanical Nomenclature) a été adoptée temporairement. Les souches, considérées comme des « *formae speciales* » (f.sp.), sont alors nommées en utilisant le nom de genre et d'espèce du champignon suivi du nom de l'hôte. Ainsi l'organisme isolé chez le lapin est appelé *Pneumocystis carinii f.sp. oryctolagi*.

Puis peu à peu, la « *formae speciales* » a substitué le nom d'espèce. Il faudra attendre 2005 pour que la dénomination *Pneumocystis jirovecii* soit définitivement validée pour la forme exclusivement humaine de *Pneumocystis* sp. L'appellation *P. carinii* est conservée pour l'une des deux espèces retrouvée chez le rat (*Rattus norvegicus*).

Actuellement de nombreuses espèces ont été mises en évidence chez divers animaux aussi bien domestiques que sauvages.

De plus, d'après des analyses de séquences d'ADN, il existerait de nombreux génotypes au sein de l'espèce *P. jirovecii*. [Stringer *et al.* 2002]

Le terme « *Pneumocystis* » ne désigne donc plus une seule entité mais un groupe hétérogène de micro-organismes eucaryotes étroitement adaptés aux mammifères et largement répandus dans l'écosystème. [Aliouat-Denis *et al.* 2008 ; Cushion *et al.* 2004]

B. Pneumocystis : parasite ou champignon ?

1. Hypothèse parasitaire

De sa découverte jusqu'à la fin des années 1980, *Pneumocystis* sp. a été considéré comme un protozoaire.

En effet, plusieurs arguments étayent cette hypothèse.

- Un cycle de réplication proche de celui des protozoaires (présence de formes amiboïdes évocatrices de trophozoïtes) ainsi que des caractères morphologiques typiques (présence de prolongements cytoplasmiques).
- Une culture impossible sur milieux habituellement utilisés en mycologie.
- La synthèse *de novo* des folates à partir de l'acide para-aminobenzoïque comme en sont capables les Apicomplexa.
- Une résistance aux molécules antifongiques mais une sensibilité vis-à-vis de certains antiparasitaires comme le cotrimoxazole et la pentamidine.
- Une paroi, dépourvue d'ergostérol mais contenant du cholestérol.

2. Hypothèse fongique

Un certain nombre de caractères orienterait plutôt sa classification vers le règne des champignons :

- D'un point de vue morphologique, une forme kystique évoquant des spores de champignons (asques), des mitochondries possédant des *cristae* et l'absence d'organites très visibles. [Stringer *et al.* 2002]
- D'un point de vue moléculaire (1988), des homologies de structure avec les champignons. En effet, le séquençage révèle que le génome de *Pneumocystis* sp. présente 68% d'homologie avec ceux des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* et des champignons filamenteux *Aspergillus* et *Neurospora crassa*. [Aliouat-Denis *et al.* 2008]
- D'un point de vue ultrastructurel, la présence d'une paroi trilamellaire riche en chitine et en β -(1,3)-glucane visible en microscopie électronique ayant une grande affinité pour les colorations argentiques. [Stringer *et al.* 1996]

C. Cycle biologique

Du fait de l'impossibilité d'avoir durablement des cultures viables de *Pneumocystis* sp., les connaissances sur son cycle biologique (fig. 1) reposent sur des observations en microscopie électronique traditionnelle à partir, principalement, de poumons de mammifères infectés.

Le cycle de *Pneumocystis* sp. fait intervenir différentes formes morphologiques du micro-organisme et semble être constitué d'une phase asexuée et d'une phase sexuée intervenant en alternance *in vivo*. [Cushion. 2004]

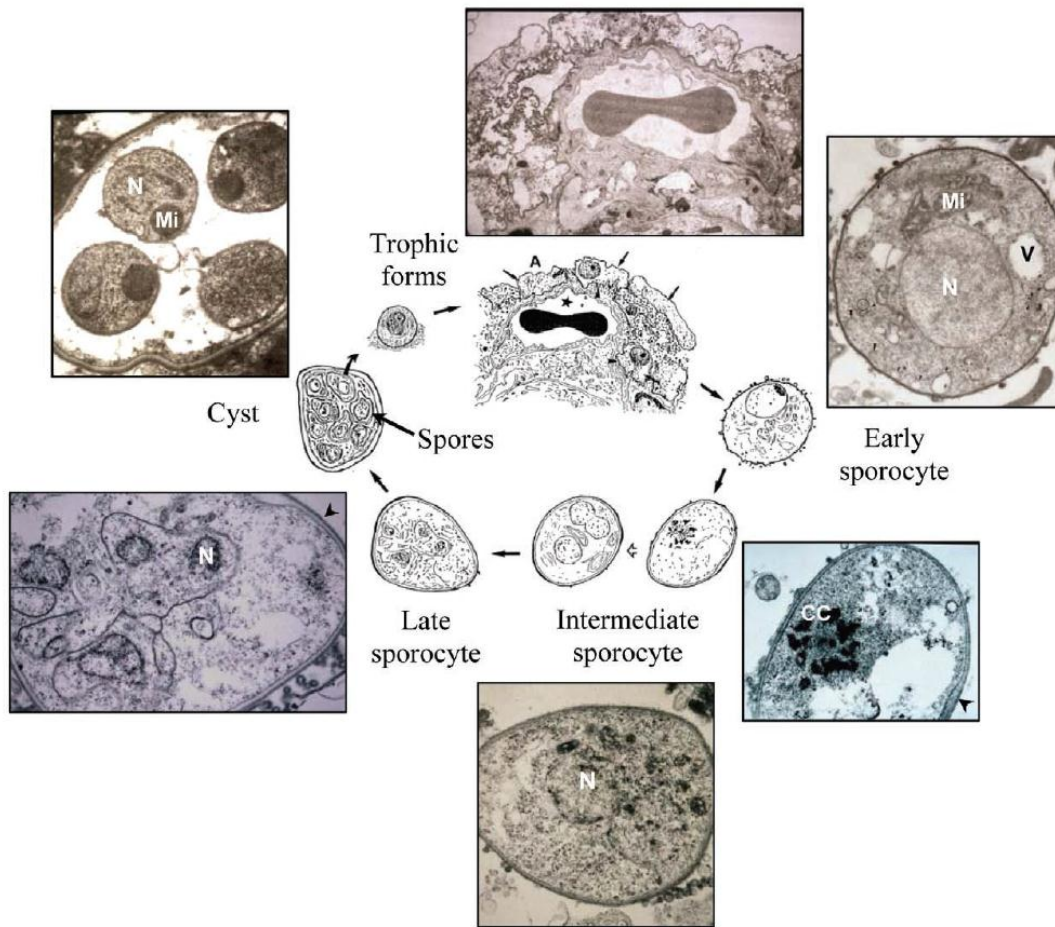


Figure 1 : Cycle biologique de Pj [Aliouat-Denis *et al.* 2009]

1. Différentes formes morphologiques

Pneumocystis sp. étant classé parmi les champignons, il convient désormais d'utiliser la terminologie fongique plutôt que les termes parasitaires (entre parenthèses) encore largement employés dans le monde scientifique.

Les deux formes principales du cycle sont la forme trophique ou végétative (trophozoïte) et l'asque (kyste mature). Il existe une forme intermédiaire, le sporocyste (prékyste) qui comporte trois stades de maturation : précoce, intermédiaire et tardif. [Ruffolo JJ 1994 ; Cushion *et al.* 1997]

a) La forme trophique

Présente dans 90 à 95 % des cas, c'est la forme la plus abondante dans les poumons d'individus atteints de pneumocystose. [Aliouat-Denis *et al.* 2009]

De forme amiboïde, elle est mononucléaire, haploïde, mesure entre 2 et 8 μm de diamètre et est constituée d'une paroi cellulaire mince qui apparaît dense en microscopie électronique. Elle est dotée de nombreuses projections cytoplasmiques appelées filopodes (fig. 2).

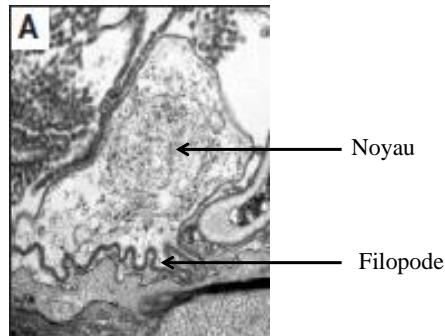


Figure 2 : Forme trophique de Pj en microscopie électronique [Thomas *et al.* 2004]

b) Le sporocyste

(1) Le sporocyste précoce

Le premier stade du sporocyste est rond, mononucléaire, probablement diploïde et mesure en moyenne 4 μm . Sa paroi cellulaire est mince et également dense en microscopie électronique. Les filopodes sont beaucoup moins développés dans cette forme.

C'est l'unique stade où le complexe synaptonémal (appariement des chromosomes homologues) est visible dans le noyau (fig. 3).

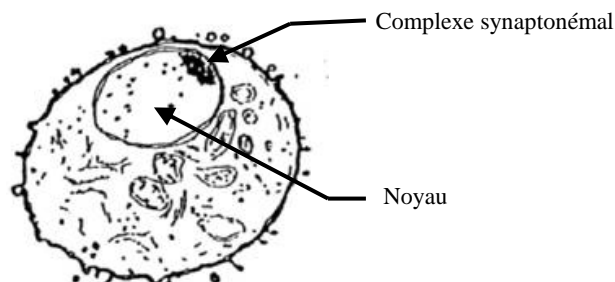


Figure 3 : Sporocyste précoce de Pj [Aliouat-Denis *et al.* 2008]

(2) *Le sporocyste intermédiaire*

Il est à peine plus grand que le sporocyste précoce (environ 5 μm). Il s'en distingue d'une part, par l'apparition d'une couche translucide aux électrons entre la couche dense aux électrons et la membrane plasmique et d'autre part, par son nombre de noyaux haploïdes résultant du début de la réplication nucléaire. Le sporocyste intermédiaire (fig. 4) est constitué d'au moins deux noyaux et peut en contenir jusqu'à huit.

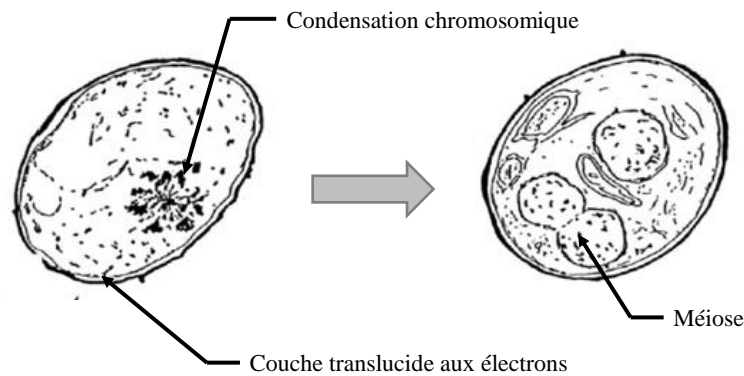


Figure 4 : Sporocystes intermédiaires de Pj [Aliouat-Denis *et al.* 2008]

(3) *Le sporocyste tardif*

Sa paroi cellulaire s'est épaissie par rapport au sporocyste intermédiaire. Cet ultime stade sporocyste est doté de huit noyaux (fig. 5).

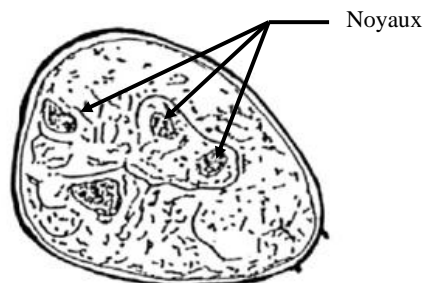


Figure 5 : Sporocyste tardif de Pj [Aliouat-Denis *et al.* 2008]

c) L'asque

Il mesure entre 4 et 7 μm de diamètre. Sa surface est plus lisse et ne possède que de rares filopodes.

Il possède huit spores bien délimitées et protégées par une paroi cellulaire épaisse (fig. 6).

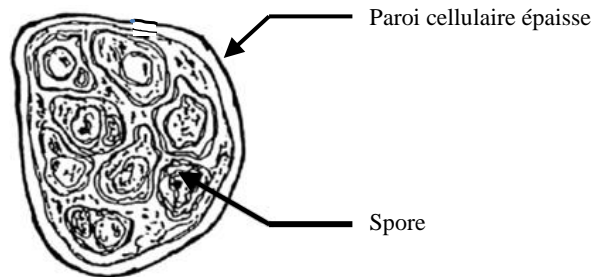


Figure 6 : Asque de Pj [Aliouat-Denis *et al.* 2008]

d) Les spores

Elles sont assez petites (1-2 μm de diamètre) avec une paroi cellulaire fine et sont dépourvues de filopodes. Elles apparaissent sphériques, en forme de banane ou irrégulières. Elles possèdent un seul noyau haploïde, un cytoplasme assez dense contenant une mitochondrie arrondie, un réticulum endoplasmique et de nombreux ribosomes (fig. 6).

Les caractéristiques des différentes formes participant au cycle biologique de *Pneumocystis* sp. sont répertoriées dans le tableau 1.

Tableau 1 Caractéristiques des différentes formes du cycle biologique de *Pneumocystis* sp. [Aliouat-Denis et al. 2009]

TABLE
Life cycle parasite stages of *Pneumocystis* organisms

A: Light microscopy						
	Trophic form	Early sporocyte	Intermediate sporocyte	Late sporocyte	Cyst	
TBO	-	-	+	+	+	
Giemsa	+	+	+	+	+	
TBO: Toluidine Blue O; -: unstained; +: stained (modified from Dei-Cas et al. 2004).						
B: Transmission electron microscopy						
	Trophic form	Early sporocyte	Intermediate sporocyte	Late sporocyte	Cyst	Spore
Shape	Irregular	Ovoid	Ovoid	Ovoid	Ovoid	Ovoid, amoeboid or crescent-shaped
Diameter (μm)	2-8	3.5-4.5	4-6	4-6	4-7	1-2
Number of nucleus	1	1	2-8	8	8 ^a	1
Ploidy ^b	n	2n ^c	n	n	N ^a	n
Synaptonemal complexes	No	Yes	No	No	No	No
NAO ^d	No	No	Yes	Yes	No	No
Nuclear spindle	No	Yes	Yes	No	No	No
Mitochondrion ^e	Elongated, little ramified	Ramified	Dendritic	Split	Ovoid, dense	Ovoid, dense
Cell wall (diameter in nm)	Electron-dense layer (20-25 nm)	Electron-dense layer (35-45 nm)	Electron-dense + inner electron-lucent layers (80-100 nm)	Electron-dense + inner electron-lucent layers (80-120 nm)	Electron-dense + electron-lucent layers (80-120 nm)	Electron-dense layer (20-23 nm)
Filopodia	numerous	poorly developed	scarce	scarce	scarce	none

a: one nucleus in each one of the eight spores; *b*: hypothetical ploidy considering the report by Matsumoto & Yoshida (1984) and our own observations (modified from Dei-Cas et al. 2004); *c*: diploid early sporocyte results probably from conjugation of haploid trophic forms; *d*: nuclear-associated organelles; *e*: these terms refer to detailed computer-aided 3D-ultrastructural reconstruction of *Pneumocystis* mitochondrion as described by Palluault et al. (1991a, b).

2. Deux modes de multiplication

a) Multiplication asexuée

La phase asexuée du cycle biologique de *Pneumocystis* sp. correspond à la fission binaire (fig. 7) de la forme trophique. Haploïde au départ, elle réplique le contenu de son noyau pour devenir diploïde puis se divise en deux pour engendrer deux formes-filles identiques à la forme-mère.

Contrairement à la majorité des levures, le mode de répllication par bourgeonnement n'a jamais, à ce jour, été observé chez aucune espèce de *Pneumocystis* sp.. [Cushion *et al.* 1997 ; Cushion. 2004]

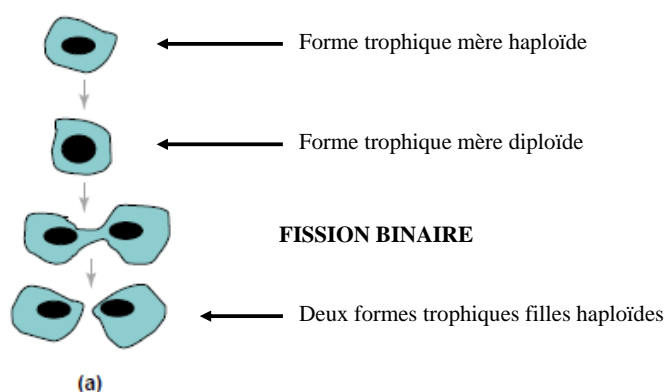


Figure 7 : Fission binaire [D'après Cushion *et al.* 2004]

b) Reproduction sexuée

Dans la phase sexuée, les formes trophiques mononucléaires s'attachent aux cellules épithéliales de type I situées à proximité de vaisseaux capillaires par l'intermédiaire de leurs filopodes. Des étapes d'accouplement (fig. 8) et de conjugaison surviennent ensuite, au cours desquelles la forme trophique se transforme en sporocyste précoce probablement diploïde et contenant le complexe synaptonémal (fig. 9).

Ce sporocyste entre ensuite dans un processus de division méiotique suivi de deux mitoses conduisant à un sporocyste tardif à huit noyaux. Ces huit noyaux sont ensuite séquestrés et subissent une étape de sporogénèse pour être transformés en huit spores matures. A la rupture

de l'asque, les spores sont libérées et constituent les formes trophiques qui participeront à la reproduction sexuée ou au cycle végétatif. [Cushion *et al.* 2004 ; Aliouat-Denis *et al.* 2009]

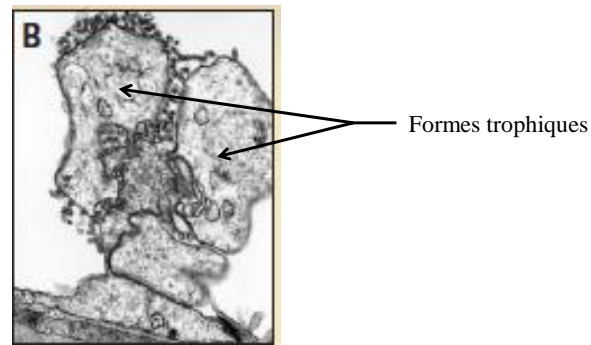


Figure 8 : Accouplement en microscopie électronique [Thomas *et al.* 2004]

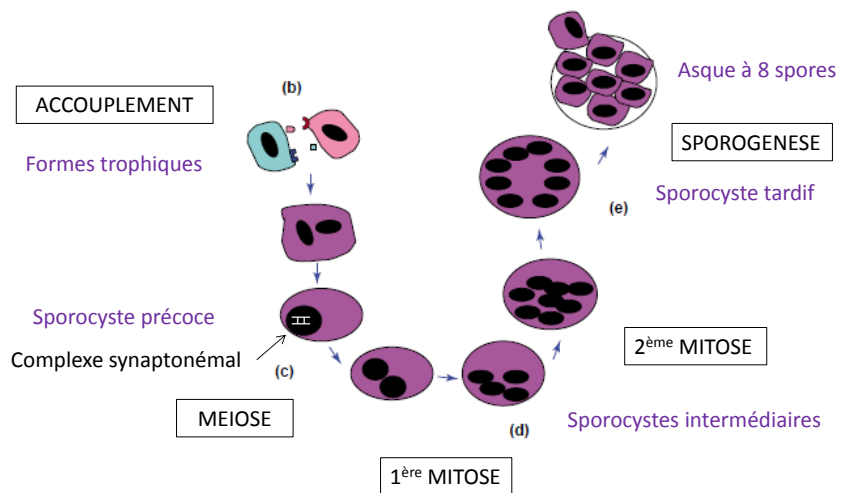


Figure 9 : Multiplication sexuée [D'après Cushion *et al.* 2004]

D. Transmission

1. Réactivation ou contamination *de novo* ?

Afin de mettre en place des mesures préventives adéquates face à cette pathologie, les modalités de transmission de ce champignon doivent être appréhendées en termes de réservoir ou de source de contamination mais aussi en termes de cinétique.

En effet, une forte prévalence d'anticorps anti-*Pneumocystis* dans le sérum d'enfants immunocompétents démontre que l'exposition à Pj est précoce dans la vie. Plus de 90 % des enfants en bas âge développent une primo-infection à *Pneumocystis* sp. plus ou moins symptomatique. Pendant des décennies, la théorie de la réactivation d'une infection latente acquise pendant l'enfance a donc été populaire. Cependant, des études épidémiologiques et génotypiques orienteraient plutôt vers une contamination *de novo*.

Tout d'abord, la guérison biologique, caractérisée par la disparition de la détection de l'ADN de Pj chez des patients guéris de PCP, étaye l'hypothèse de la recontamination. [Chabé *et al.* 2009]

De plus, plusieurs études ont montré que des individus pouvaient être transitoirement porteurs du champignon. [Morris *et al.* 2002]

Enfin, si l'organisme demeurait latent dans les poumons de l'hôte, on devrait trouver le même génotype de Pj lors d'infections récurrentes or, chez un même patient, il a été détecté différents génotypes de Pj lors de PCP successives. [Chabé *et al.* 2009]

2. Transmission horizontale

Actuellement, un modèle de transmission aérienne de la PCP est privilégié. Mais il reste à préciser si cette transmission se fait directement de personne à personne ou s'il existe une source environnementale commune. [Catherinot *et al.* 2010 ; Thomas *et al.* 2004]

a) Transmission interhumaine

La transmission par contact direct entre les hôtes a été évoquée dès la découverte de *Pneumocystis* sp. en 1912. Des cas d'épidémies chez des enfants prématurés ou malnutris et par la suite, en milieu hospitalier (unités de pédiatrie, oncologie, soins intensifs, transplantation rénale et maladies infectieuses) ont étayé la suspicion d'une transmission

interindividuelle. Des études de génotypage sur des cas groupés de PCP confortent cette hypothèse. [De Boer *et al.* 2007 ; Höcker *et al.* 2005]

Bien que la forme infestante de Pj n'ait pas encore été identifiée, ce mode de transmission par des humains infectés ou colonisés reste privilégié. [Chabé *et al.* 2009 ; Dumoulin *et al.* 2000]

b) Source environnementale

Bien que de l'ADN de *Pneumocystis* sp. ait été trouvé dans l'environnement, l'existence d'une niche environnementale reste incertaine, mais rien aujourd'hui ne permet de réfuter complètement ce mode de transmission.

Tout d'abord, du fait de la spécificité d'hôte, le réservoir de la PCP ne peut être animal. La PCP n'est donc pas une anthrozoonose mais plutôt une anthroponose.

De plus, l'ADN de *Pneumocystis* sp. a été détecté dans l'eau et dans l'air (milieu rural, animaleries hébergeant des animaux infectés et chambres de patients atteints de PCP). Ce mode de transmission sous-entendrait une croissance saprophytique du champignon dans l'environnement et la génération de formes infestantes. Or, à ce jour, aucune forme fongique de *Pneumocystis* sp. n'a été identifiée dans l'environnement. [Chabé *et al.* 2009]

3. Transmission verticale

Enfin, la transmission verticale du champignon par voie transplacentaire a été démontrée récemment chez l'homme. L'immunodépression physiologique associée à la grossesse favoriserait la colonisation par Pj [Vargas *et al.* 2003] et la transmission materno-fœtale du champignon par voie hématogène ou *via* le liquide amniotique.

L'ADN de Pj a été détecté par PCR dans les poumons de fœtus et au niveau des placentas lors de fausses-couches. [Montes-Cano *et al.* 2009]

Des études complémentaires sont nécessaires pour étayer ce mode de transmission et la possible responsabilité de Pj dans les avortements spontanés. [Chabé *et al.* 2009]

II. Physiopathologie

A. Invasion du micro-organisme

Chez les hôtes infectés, *Pneumocystis* sp. est localisé pour la majeure partie au niveau des alvéoles pulmonaires. Les formes trophiques s'accrochent aux cellules épithéliales alvéolaires de type-1 par l'intermédiaire de leurs filopodes, ce qui aurait pour effet de favoriser la prolifération du pathogène et de limiter la croissance des cellules épithéliales pulmonaires. Il s'agit d'une simple apposition des surfaces cellulaires sans fusion des membranes (fig. 10).

La seule présence du micro-organisme ne provoque donc pas d'altération de la structure des cellules épithéliales alvéolaires ni de la fonction de barrière de l'épithélium. [Catherinot *et al.* 2010]

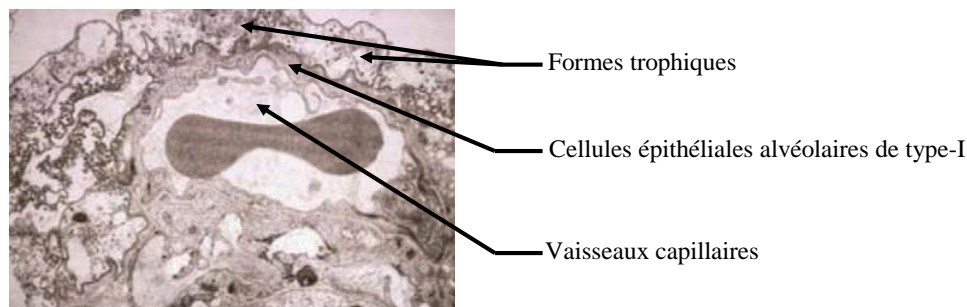


Figure 10 : Attachement de Pj aux cellules alvéolaires en microscopie électronique [Aliouat-Denis *et al.* 2009]

B. Mise en place de la réaction immunitaire

L'adhérence du champignon aux cellules épithéliales provoque le recrutement des macrophages alvéolaires. Les macrophages alvéolaires sont les principaux phagocytes intervenant dans l'élimination pulmonaire de *Pneumocystis* sp..

Ils expriment de nombreux récepteurs qui, lorsqu'ils sont liés aux molécules présentes à la surface du pathogène, provoquent la production d'un grand nombre de molécules pro inflammatoires (TNF α et chemokines notamment).

Les récepteurs mannoses des macrophages reconnaissent la glycoprotéine MSG (Major Surface Glycoproteine ou glycoprotéine A). Cette glycoprotéine de surface est un mélange de plusieurs protéines codées par la famille de gènes MSG. Une seule MSG est exprimée à la surface d'une même sous-population de Pj.

Les gènes codant pour les MSG sont présents à l'extrémité des chromosomes de *Pneumocystis* sp.. Cette localisation favorise les translocations et est ainsi à l'origine de variations antigéniques ou de « switch » d'une protéine MSG à une autre. Chaque sous population de Pj exprime une glycoprotéine de surface différente. Cette variation immunogénique et antigénique est responsable d'échappement immunitaire. [Cushion 2004 ; Thomas *et al.* 2004]

Il existe aussi une interaction entre le récepteur dectin-1 du macrophage et le β -glucane de la paroi du micro-organisme. Les molécules de β -glucane (largement répandues) ont un rôle important dans l'initiation de la réponse inflammatoire lors d'une pneumocystose.

Pneumocystis sp. est ensuite phagocyté par les macrophages où il est incorporé dans des phagolysosomes et finalement détruit.

Il est donc indispensable d'avoir une réponse inflammatoire efficace chez l'hôte pour contrôler une pneumocystose.

Or, chez les patients immunodéprimés (SIDA, maladies malignes), les fonctions des macrophages (phagocytose et activation de l'inflammation) sont altérées ce qui a pour conséquence de diminuer l'élimination du pathogène des poumons. Ceci favoriserait le développement d'une infection dans ces populations à risque. [Catherinot *et al.* 2010 ; Thomas *et al.* 2004]

C. Réponse cytokinique

La réponse inflammatoire est amplifiée par la production de chemokines et de cytokines pro inflammatoires par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales.

Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor) induit la production d'interleukine-8 (IL-8) et d'interféron- γ (IFN- γ). Ces médiateurs stimulent le recrutement et l'activation des lymphocytes, des neutrophiles et des monocytes. [Thomas *et al.* 2004]

Les lymphocytes T-CD4, *via* l'IFN- γ , coordonnent la réponse inflammatoire en recrutant et en activant d'autres cellules immunitaires effectrices (monocytes et macrophages) responsables de l'élimination de l'organisme.

Le rôle des lymphocytes T-CD8 est plus controversé. Ils auraient des effets bénéfiques dans des situations de déplétion chronique en cellules T-CD4.

Les polynucléaires neutrophiles, recrutés par l'IL-8, interviennent aussi dans le contrôle de la pneumocystose. Cependant, la production d'IL-8 est corrélée avec l'infiltration des neutrophiles et la diminution des échanges gazeux lors de pneumocystose sévère humaine. Les taux d'IL-8 dans les LBA pourraient être prédictifs de déficience pulmonaire et de décès dus à la PCP. [Catherinot *et al.* 2010]

Bien que la réponse inflammatoire engendrée par *Pneumocystis* sp. soit indispensable pour l'élimination du pathogène, elle cause néanmoins des effets délétères pour l'hôte (lésions pulmonaires, détresse respiratoire). [Catherinot *et al.* 2010]

III. Epidémiologie

A. *Variation saisonnière*

Bien que les résultats diffèrent en fonction des auteurs, il existerait une variation saisonnière de l'incidence de la pneumocystose à Pj. [Miller *et al.* 2007] En effet, la température et l'humidité extérieure auraient une influence sur la dissémination environnementale des spores du champignon. [Miller *et al.* 1992]

La plupart des études sont purement descriptives, seul un petit nombre fait appel à des données statistiques plus robustes. [Sing *et al.* 2009 ; Varela *et al.* 2004]

Bien que l'association entre les facteurs climatiques (température et humidité) et l'incidence de la PCP ne soit pas clairement établie, l'incidence de la PCP serait globalement corrélée à la hausse des températures. [Miller *et al.* 1992 ; Vanhems *et al.* 1992] Plus récemment, les travaux des équipes allemandes et anglaises vont dans ce sens et décrivent des pics saisonniers plutôt estivaux. [Sing *et al.* 2009 ; Walzer *et al.* 2008]

A contrario, d'autres équipes, espagnoles et anglaises, ont observé une incidence maximale de la PCP en hiver comme pour les autres infections respiratoires. [Calderon *et al.* 2004 ; Varela *et al.* 2004 ; Lubis *et al.* 2003] De plus, selon l'équipe espagnole, la diminution de température aurait une influence sur la survenue de pneumocystose à Pj mais pas l'humidité. [Varela *et al.* 2004] Des études multicentriques américaines et européennes ont même révélé que l'incidence globale était plus élevée dans les villes les plus froides. [Hoover *et al.* 1991 ; Delmas *et al.* 1995]

Enfin, les saisons et les facteurs climatiques pourraient avoir une influence sur la répartition des différents génotypes de Pj. Ainsi le génotype 2 (basé sur le polymorphisme du gène mtLSU) est isolé de manière périodique et sa fréquence d'isolation serait corrélée avec la moyenne des températures (mais aucune corrélation avec l'humidité). [Miller *et al.* 2007]

Ceci suggère que les différents génotypes de Pj pourraient avoir des exigences physiques différentes pour leur survie dans l'environnement et la transmission du micro-organisme. [Miller *et al.* 2007]

B. Facteurs de risque

Comme décrit dans les notions de physiopathologie, une altération du système immunitaire semble nécessaire pour développer une pneumocystose. Plusieurs groupes de populations ont donc été repérés comme étant à risque accru de PCP.

- L'infection par le VIH a été pendant longtemps le principal facteur de risque de PCP. Le risque est accru si le taux de lymphocytes T-CD4 est inférieur à 200 cellules/ μ L.
- Les hémopathies malignes (leucémies lymphoïdes chroniques et lymphomes) sont à risque de PCP. Celle-ci peut se développer lors du traitement (chimiothérapie et stéroïdes à fortes doses ou à durée prolongée) ou être inaugurale de la maladie et survenir avant tout traitement immunosuppresseur. Les patients recevant une greffe de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques sont aussi à risque de PCP. Dans ce cas, l'infection fongique apparaît sous l'effet d'une forte immunosuppression instaurée pour prévenir la réaction du greffon contre l'hôte ou les rechutes d'hémopathies malignes.
- Les tumeurs solides (cerveau surtout mais aussi sein et poumon) sont également un facteur de risque de PCP mais à moindre échelle que les hémopathies malignes. L'explication potentielle de la survenue de pneumocystose dans les tumeurs malignes intracérébrales est l'utilisation de corticothérapie prolongée et à forte dose.
- Les patients souffrant de maladies inflammatoires ou de maladies auto-immunes (maladie de Wegener), traités par corticoïdes et agents cytotoxiques développent rarement une PCP.
- Les transplantations d'organe solide (poumon, rein, cœur, foie) constituent un facteur de risque de PCP notamment dans la première année après la transplantation. Les traitements prescrits aux patients transplantés (immunosuppresseurs, sérum antilymphocytaire) pourraient être responsables de la survenue de PCP.

A côté de ces facteurs de risque liés à des pathologies, une modification de statut immunitaire engendrée par des traitements immunosuppresseurs favorise la survenue de PCP. Il s'agit notamment des corticothérapies au long court mais aussi de l'utilisation d'analogues puriques (fludarabine), de cytotoxiques (cytarabine, vincristine, cyclophosphamide, methotrexate) ou d'anticorps monoclonaux (alemtuzumab, rituximab).
[Roux *et al.* 2010]

C. Prévalence et incidence

Actuellement, l'incidence en France est de 161 cas/an en moyenne répartis comme suit : 61 % de patients infectés par le VIH et 33 % de patients immunodéprimés non VIH. Le nombre total de cas de PCP déclarés demeure stable en France depuis cinq ans. Il tendrait à diminuer chez les patients immunodéprimés par le VIH avec en parallèle une recrudescence chez les patients immunodéprimés par d'autres causes. [Magne *et al.* 2009]

1. Population VIH

La pneumocystose à Pj est une infection opportuniste très fréquente chez les patients infectés par le VIH avec une prévalence de 60 à 80 % dans les pays industrialisés [Lubis *et al.* 2003] et de 13 à 55 % dans les pays en voie de développement. [Morris *et al.* 2004]

Sa survenue a permis de diagnostiquer l'infection à VIH dans 25 à 39 % des cas en France [May *et al.* 2005 ; Magne *et al.* 2009], contre 50 % aux USA [Walzer *et al.* 2008 ; Morris *et al.* 2008]. L'incidence de la PCP a fortement diminué avec l'introduction de la prophylaxie anti-*Pneumocystis* au début des années 1990 (diminution de 3.4 % par an entre 1992 et 1996). La prévalence de la PCP aux USA était de 53 % en 1989 et de 42 % en 1992. [Morris *et al.* 2004]

Une seconde régression est apparue en 1996 avec l'utilisation de la thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) chez les patients VIH+ (réduction de 21.5 % par an entre 1996 et 1998 aux USA). [Kaplan *et al.* 2000]

En Europe, l'incidence de la PCP était de 4.9 % par an avant 1995 pour chuter à 0.3 % par an après mars 1998. [Morris *et al.* 2004]

Cependant, la PCP reste une infection opportuniste importante chez les patients infectés par le VIH.

2. Population non VIH

Le réseau pneumocystose francilien a mis en évidence une augmentation de la proportion de patients non VIH développant une PCP (25 % en 2003 et 2004, 30 % en 2005, 39 % en 2006, 41 % en 2007). [Magne *et al.* 2009]

La recrudescence de cas de PCP dans cette population peut s'expliquer par l'utilisation de corticoïdes et d'immunosuppresseurs en onco-hématologie, lors de transplantations ou de maladies inflammatoires chroniques.

Dans cette population, sans prophylaxie anti-*Pneumocystis*, la prévalence de la PCP est de 5 à 25 % chez les patients transplantés, 2 à 6 % chez les patients atteints de maladies de système et 1 à 25 % chez les patients cancéreux. [Morris *et al.* 2004]

Selon une étude française, la prévalence des cas de PCP chez les patients non VIH en fonction de la maladie sous-jacente est la suivante : 43 % d'hémopathies, 25 % de tumeurs solides, 27 % de maladies de système, 7 % en post-transplantation. Un même patient peut cumuler plusieurs pathologies à risque accru de PCP. Parmi ces patients, 66 % avaient reçu un traitement immunosuppresseur et 71 % une corticothérapie au long court avant le diagnostic de pneumocystose. [Roblot *et al.* 2009]

IV. Présentation clinique

A. Colonisation asymptomatique

La colonisation humaine de Pj semble avoir un rôle majeur dans la transmission. De nombreuses études mentionnent la détection d'ADN de *Pneumocystis* sp. dans des prélèvements respiratoires de patients asymptomatiques et immunocompétents. [Catherinot *et al.* 2010] On parle alors de colonisation ou de portage de Pj. Cette détection a été rendue possible grâce au développement de techniques de biologie moléculaire (PCR) plus sensibles que les méthodes traditionnelles.

La durée du portage asymptomatique de Pj fluctue entre quinze jours et seize mois et demi. [Cushion *et al.* 2004]. Pendant cette période, Pj se multiplie transitoirement dans les poumons de l'hôte. [Aliouat-Denis *et al.* 2008]

La colonisation par Pj commence dès le plus jeune âge. Quinze à 32 % des enfants, entre un mois et deux ans, hospitalisés pour une pathologie respiratoire sont colonisés. [Catherinot *et al.* 2010] De plus, la colonisation par Pj pourrait être associée à des bronchiolites ou au syndrome de mort subite du nourrisson. [Morris *et al.* 2008]

La prévalence chez des adultes sains est faible (0 à 20 % selon les études, résultats dépendants de la technique de détection et du type de prélèvement respiratoire). Certaines populations sont à plus haut risque de colonisation comme les patients infectés par le VIH (31 à 68 %), ceux présentant une maladie pulmonaire chronique obstructive (37 à 55 %), les fumeurs, les patients atteints de diabète, de myélome multiple, de leucémie lymphoïde chronique, ou de sarcoïdose. La colonisation est favorisée par les traitements corticoïdes ou la grossesse (16 % de femmes au troisième trimestre de grossesse). De plus, le personnel soignant en contact avec des patients ayant une PCP serait plus fréquemment colonisé que celui non exposé. Cependant, les souches trouvées chez les patients sont de génotypes différents de celles du personnel hospitalier. [Miller *et al.* 2001]

De nombreuses populations asymptomatiques sont susceptibles d'être colonisées par Pj. Les personnes colonisées peuvent être à risque de développer une pneumocystose mais surtout, elles constituent un réservoir pour la transmission du micro-organisme. [Catherinot *et al.* 2010] Chez les patients recevant une prophylaxie anti-*Pneumocystis* au long court, la colonisation pourrait induire la sélection de mutants résistants au traitement. Enfin, la présence de Pj dans les poumons, même à faible taux, pourrait stimuler la réponse

inflammatoire de l'hôte, induire une détérioration pulmonaire et jouer un rôle dans la progression de maladies pulmonaires. [Morris *et al.* 2008]

B. Pneumocystose (PCP)

La PCP se présente classiquement avec une hyperthermie, une toux non productive et une dyspnée. L'examen clinique est non spécifique à type de tachypnée et l'auscultation pulmonaire est souvent normale, bien que de discrets râles crépitants diffus puissent être entendus. Une dyspnée aiguë associée à une douleur thoracique est évocatrice d'un pneumothorax, décrit chez 2 à 4 % des patients. Une PCP non traitée aura une évolution sévère avec emphysème, pneumothorax ou décès. Dans de rares cas, il peut se produire des disséminations extrapulmonaires. [Catherinot *et al.* 2010]

Cependant, la symptomatologie diffère selon le contexte clinique.

1. Enfants

a) Prématurés et malnutris

Historiquement, les nourrissons prématurés et les enfants dénutris constituent les premiers cas de PCP observés. La survenue de PCP dans cette population (âgée de deux à trois mois) est devenue rare de nos jours. L'incubation est longue. Le début des symptômes est insidieux : une tachypnée et une cyanose périorale apparaissent progressivement et évoluent vers une détresse respiratoire. Il n'y a généralement ni toux, ni hyperthermie. [Abrégés Masson, Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales]

b) Immunodéprimés non VIH

Il s'agit principalement de porteurs de déficits immunitaires congénitaux (immunodéficiences combinées sévères ou hypogammaglobulinémies) d'une part et d'enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique d'autre part.

Lors de déficit immunitaire primaire, la PCP survient au cours de la première année de vie alors qu'elle apparaît entre un et quatre ans chez les leucémiques.

Le début est brutal avec dyspnée, toux sèche et hyperthermie. [Abrégés Masson, Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales]

c) Immunodéprimés VIH

Avec l'apparition des antirétroviraux, on observe peu de nourrissons infectés par le VIH et développant une PCP. Le début est progressif avec tachypnée, hyperthermie et toux. [Abrégés Masson, Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales]

2. Adultes

a) VIH

La PCP se caractérise par une triade d'apparition progressive : hyperthermie, toux non productive et dyspnée d'intensité croissante. Il peut exister des formes fébriles pures.

La PCP survient majoritairement lorsque le taux de lymphocytes T-CD4 est inférieur à $200/\text{mm}^3$. [Thomas *et al.* 2004]

Les patients infectés par le VIH recrutent moins de polynucléaires neutrophiles que les patients non VIH. Ce plus petit nombre de cellules inflammatoires est corrélé avec une meilleure oxygénation et une meilleure survie que pour les patients non infectés par le VIH.

Dans cette population, un plus grand nombre de Pj est observé dans les poumons permettant une meilleure détection biologique dans les prélèvements respiratoires.

b) Non VIH

Dans ce groupe de patients, la PCP est aiguë et sévère. De plus, la durée des symptômes avant le diagnostic est plus courte (1 à 14 jours) que chez les patients infectés par le VIH (14 à 37 jours). [Roux *et al.* 2010 ; Tokuda *et al.* 2008 ; Tasaka *et al.* 2010] La PCP se caractérise par l'apparition brutale d'une insuffisance respiratoire nécessitant souvent le recours à la ventilation mécanique. Au niveau pulmonaire, peu de formes de Pj sont observées (d'où un diagnostic biologique difficile) mais l'importante inflammation (grand nombre de polynucléaires neutrophiles recrutés) est responsable de symptômes exacerbés chez les patients immunodéprimés hors VIH. [Thomas *et al.* 2004 ; Roux *et al.* 2010]

C. Syndrome de reconstruction immunitaire

1. Définition

Le syndrome de reconstruction immunitaire (SRI) survient chez des patients immunodéprimés (VIH, transplantés, femmes enceintes, neutropéniques) lors de la diminution ou de la levée de l'immunosuppression. Il apparaît généralement après l'instauration d'un traitement antirétroviral chez un patient infecté par le VIH ou lors de la réduction de l'immunosuppression dans un contexte de transplantation. [Singh *et al.* 2007] Il surviendrait chez 15 à 25 % des patients débutant un traitement antirétroviral. [Breton. 2009] Dans les deux mois suivant l'instauration de la thérapie antirétrovirale, une augmentation rapide des lymphocytes T-CD4 dans le sang périphérique est alors observée, associée à une forte diminution de la charge virale plasmatique. [Singh *et al.* 2007]

Le SRI est attribué à la reconstitution d'une réponse immunitaire excessive vis-à-vis d'antigènes infectieux ou non infectieux. Il se manifeste soit comme une maladie opportuniste, soit comme des manifestations inflammatoires ou auto-immunes. [Stoll *et al.* 2004 ; Breton. 2007 ; Breton. 2009]

L'équilibre fragile de l'immunité lors de la restauration de l'immunocompétence chez un immunodéprimé est schématisé sur la figure 11.

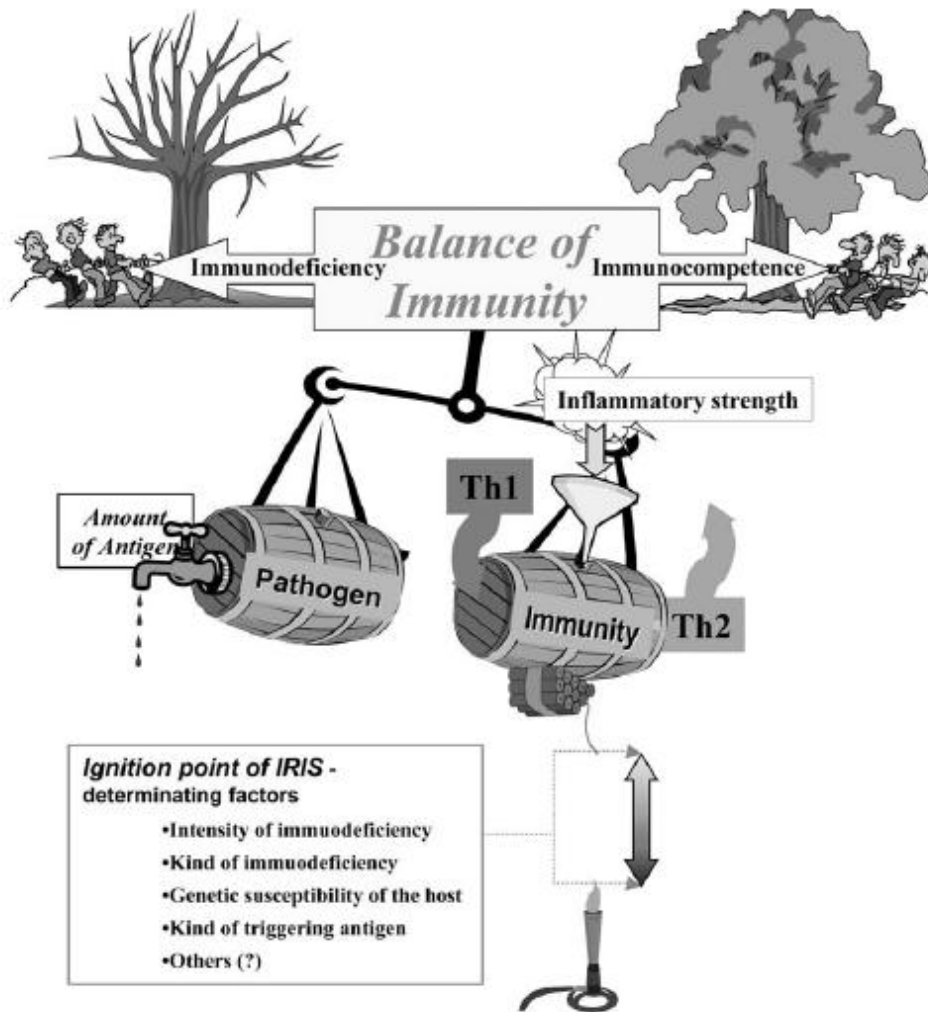


Figure 11 : Modèle illustrant les différentes forces intervenant lors de SRI [Stoll *et al.* 2004]

Dans la majorité des cas, il est révélateur d'une infection latente (mycobactéries, *Pneumocystis jirovecii*, *Cryptococcus neoformans*, CMV, VHB, VHC, virus JC) mais il peut aussi engendrer une poussée évolutive de pathologies inflammatoires (sarcoïdose ou maladie de Basedow) ou simuler une rechute de LNH. [Borie *et al.* 2006] Le tableau 2 récapitule les différentes étiologies des SRI ainsi que leurs principales manifestations au cours de l'infection par le VIH.

Tableau 2 : Etiologie des SRI lors de l'infection par le VIH [Breton *et al.* 2007]

	Agent infectieux, non infectieux	Manifestations cliniques lors du SRI
Mycobactéries	<i>M. tuberculosis</i>	Fièvre, lymphadénite, lésion pulmonaire
Bactérie	<i>M. avium</i> complex	Fièvre, lymphadénite, abcès localisé
	<i>M. leprae</i>	Réaction de réversion
	<i>Bartonella henselae</i>	Encéphalite, lymphadénite
	Chlamydiae trachomatis	Syndrome de Fiessinger Leroy Reiter
Mycose	<i>C. neoformans</i>	Méningite aseptique, lymphadénite, fièvre
	<i>H. capsulatum</i>	Lymphadénite, abcès
	Mycose cutanée ? <i>Pneumocystis jirovecii</i>	Folliculite Pneumopathie
Virus	VZV	Zona extensif
	HSV	Ulcération chronique
	CMV	Uvéite, inflammation du vitré, pneumopathie
	HHV8	Kaposi extensif
	JC virus	Aggravation de LEMP
	hépatite virale C et B	Élévation des transaminases
	Parvovirus B19	Encéphalite
	HPV	Récurrence condylome
	EBV	Lymphome
	BK virus	Cystite hémorragique
	VIH	Encéphalomyélite, vascularite cérébrale
Parasites	<i>Leishmania infantum</i> , major	Uvéite, dermatite post kala azar
	Microsporidie	Kératoconjonctivite
Maladies inflammatoires	Sarcoïdose	} Apparition ou poussée évolutive
	Basedow	
	Guillain Barré	
	Lupus	
	Polymyosite	

Notes : *M.*, *Mycobacterium* ; *C.*, *Cryptococcus* ; *H.*, *Histoplasma* ; VZV, virus varicelle zona ; HSV, herpes simplex virus ; HHV8, herpes virus du groupe 8 ; HPV, papilloma virus ; EBV, virus Epstein-Barr

2. SRI et pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii*

Le SRI dans un contexte de pneumocystose apparaît en moyenne 14 jours (5 à 17 jours) après le début de la thérapie antirétrovirale ou à l'arrêt de la corticothérapie complémentaire pour l'épisode initial de PCP. Il survient dans 5 à 19 % des cas. [Singh *et al.* 2007 ; Breton *et al.* 2009]

Les manifestations sont plus symptomatiques que lors d'une PCP « classique » (fièvre élevée, aggravation des symptômes respiratoires) et évoluent souvent vers un tableau de détresse respiratoire. [Breton *et al.* 2009]

Biologiquement, il est caractérisé par un taux de CD4 élevé (> 200/mm³), de rares kystes de Pj à l'examen direct du LBA et d'une inflammation intense. [Breton *et al.* 2009]

De plus, bien avant la recrudescence de PCP chez les sidéens, 73 % des épisodes de PCP chez des enfants présentant une LAL (leucémie aiguë lymphoïde) avaient lieu au moment de la rémission à l'amélioration de la neutropénie. [Singh *et al.* 2007]

3. Traitement du SRI

Il n'existe pas à ce jour de thérapie conventionnelle pour la prise en charge du SRI.

Empiriquement, sur les SRI symptomatiques, on utilise des molécules anti-inflammatoires. Pour le traitement d'une PCP sévère, la prednisone à 80 mg par jour pendant trois semaines est prescrite en traitement complémentaire. [Singh *et al.* 2007]

D. Evolution

Les patients VIH semblent avoir un meilleur taux de survie (86-92 %) que les immunodéprimés non VIH (taux de survie compris entre 51 et 80 %). [Catherinot *et al.* 2010]

La mortalité de la PCP est forte. Chez les patients VIH, le taux de mortalité est actuellement de l'ordre de 12 % alors qu'il pouvait atteindre 25 % avant l'utilisation d'antirétroviraux. [Calderon *et al.* 2004 ; Radhi *et al.* 2008 ; Morris *et al.* 2008 ; Walzer *et al.* 2008 ; Morris *et al.* 2010]

Le taux de mortalité de la PCP en l'absence de VIH varie de 30 à 60 % en fonction de la pathologie sous-jacente. La mortalité est plus forte lors de cancers que lors de transplantations ou de connectivites. [Thomas *et al.* 2004]

La mortalité est augmentée en cas de recours à la ventilation mécanique, de survenue de pneumothorax, de forts taux de LDH, de faibles taux d'albumine et d'hypoxie hypoxémique (gradient d'oxygène alvéolo-artériolaire élevé). [Radhi *et al.* 2008]

V. Diagnostic de la PCP

A. Présentation en imagerie médicale

Contrairement à la clinique, la présentation radiologique de la PCP est la même quelle que soit la cause de l'immunosuppression. Elle se caractérise classiquement par des infiltrats interstitiels bilatéraux, diffus, assez symétriques, prédominants en périhilaire ou aux bases (fig. 12). La radiologie pulmonaire peut présenter un aspect normal (39 % des cas, surtout aux stades précoces), ou atypique ou encore révéler un aspect de « poumons blancs » lors de stades avancés. [Catherinot *et al.* 2010]

Les différentes caractéristiques radiologiques sont répertoriées dans le tableau 3.

Le scanner, plus sensible, permet le diagnostic de la PCP lorsque la radiologie pulmonaire est négative. Il montre alors des plages en verre dépoli (« crazy paving »).

Tableau 3 : Anomalies radiologiques évocatrices d'une pneumocystose (Germaud *et al.* EMC)

Aspects typiques	Radiographie normale (stade précoce)
	Opacités interstitielles diffuses (aspect le plus fréquent)
	« Poumons blancs »
Aspects atypiques	Opacités localisées aux sommets
	Nodules disséminés ± excavés
	Pseudokystes (patients VIH seulement)
	Adénopathies médiastinales
	Pneumothorax
	Hydropneumothorax



Figure 12 : RP : opacités alvéolo-interstitielles diffuses prédominantes à droite [Thomas *et al.* 2004]

B. Diagnostic biologique

La culture de *Pneumocystis jirovecii* n'étant pas réalisable à ce jour, le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du micro-organisme au sein de prélèvements respiratoires. [Catherinot *et al.* 2010] Il faut cependant toujours garder à l'esprit lors du choix des techniques diagnostiques et lors de l'interprétation des résultats que le nombre de *Pneumocystis* observé chez les patients non VIH est plus faible que chez les VIH. [Roux *et al.* 2010]

1. Mise en évidence de Pj

a) Prélèvement

L'expectoration induite s'effectue après nébulisation de sérum salé hypertonique et kinésithérapie respiratoire (pour accélérer le flux bronchique). La sensibilité de l'examen direct est plus élevée chez les patients VIH (jusqu'à 90 % dans certains centres) que chez les non VIH (50 %). [Roux *et al.* 2010]

Le lavage broncho-alvéolaire réalisé par fibroscopie bronchique est une technique diagnostique plus sensible que l'expectoration induite (80-100 % chez VIH ; 50-70 % chez non VIH).

Le LBA présente cependant des inconvénients puisqu'il est à risque accru d'aggravation de l'état respiratoire et de recours à une ventilation mécanique invasive associée à une mortalité élevée. [Roux *et al.* 2010]

La biopsie pulmonaire chirurgicale peut être envisagée mais elle est peu réalisée. La PCP ne semble pas une bonne indication pour ce prélèvement invasif étant donné le développement de techniques très sensibles comme la PCR. [Roux *et al.* 2010]

b) Examen direct

(1) Colorations traditionnelles

La première étape du diagnostic biologique de PCP est l'observation du micro-organisme à l'examen direct du prélèvement respiratoire grâce à l'utilisation de colorations spécifiques.

Les asques (fig. 13) sont mis en évidence grâce à différentes méthodes comme le Gromori-Grocott, le bleu de toluidine O, le calcofluor white ou le violet de cresyl. [Catherinot *et al.* 2010 ; Thomas *et al.* 2004]

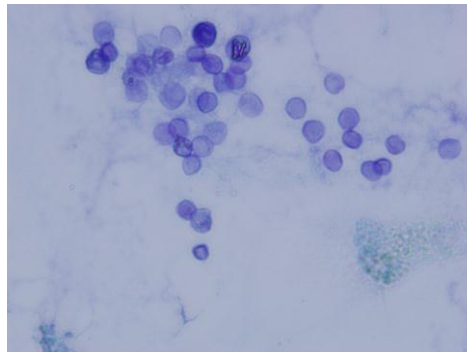


Figure 13 : Asques de Pj colorés au bleu de toluidine (× 100)

Les formes végétatives (fig. 14) sont visibles à l'aide de colorations au Wright-Giemsa, Diff-Quik, Papanicolaou modifié ou Gram-Weigert. [Roux *et al.* 2010 ; Thomas *et al.* 2004]

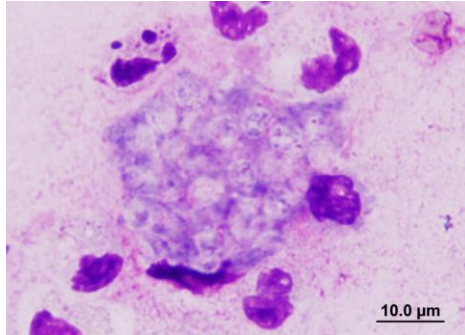


Figure 14 : Formes végétatives de Pj colorées au MGG (× 100)

(2) Méthode immunochimique

Le développement de l'immunofluorescence indirecte a constitué un progrès en termes de rapidité et de sensibilité par rapport aux techniques de colorations traditionnelles. [Kovacs *et al.* 1988]

Cette technique, commercialisée sous forme de kits, repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-*Pneumocystis* marqués à la fluorescéine. Cette technique permet de mettre en évidence les asques de Pj (fig. 15). Elle se révèle être le « gold standard » pour le diagnostic de la pneumocystose à Pj.

Elle permet en outre d'augmenter la sensibilité et la spécificité des expectorations induites par rapport aux techniques de coloration habituelles surtout chez les patients VIH. [Thomas *et al.* 2004]

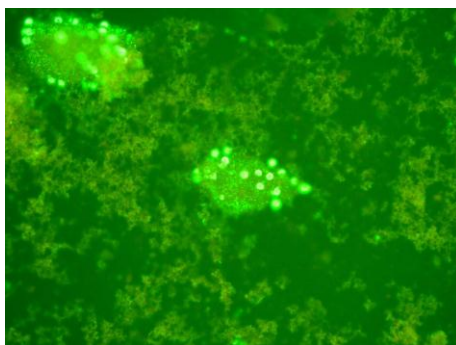


Figure 15 : Asques de Pj en IFI

c) Biologie moléculaire

Une amélioration significative du diagnostic biologique de la PCP a été possible grâce à la mise au point de la PCR (Polymerase Chain Reaction) permettant d'amplifier et ainsi de détecter l'ADN de Pj dans les prélèvements respiratoires. [Wakefield *et al.* 1990 ; Wakefield *et al.* 1991] Ce moyen de détection de Pj dans les LBA et les expectorations induites possède des sensibilités et spécificités supérieures aux méthodes de coloration conventionnelles évitant ainsi le recours à des biopsies pulmonaires. [Thomas *et al.* 2004 ; Azoulay *et al.* 2009] La spécificité de la PCR est forte (85-100 %) et sa sensibilité sur LBA varie de 96 à 100 % selon les études. [Khot *et al.* 2009] Les données de sensibilité, de spécificité, de VPP et VPN des différentes études sont répertoriées dans l'Annexe 1.

Deux types de PCR ont été mis au point : la PCR conventionnelle et la PCR quantitative.

(1) Gènes cibles

Les principales cibles d'ADN à amplifier sont les régions ITS (internal transcribed spacer), 5S et 18S de l'ADN nucléaire, la large sous-unité ribosomale de l'ADN mitochondrial (mtLSU), la DHPS (dihydroptéroate synthase), la DHFR (dihydrofolate reductase), la TS (thymidylate synthase), la β -tubuline, le gène *cdc2* et la glycoprotéine de surface (MSG). [Beard *et al.* 2004 ; Durand-Joly *et al.* 2005 ; Robberts *et al.* 2007]

(2) PCR conventionnelle

Le principal inconvénient de la PCR conventionnelle est la détection d'ADN de Pj chez des patients ne présentant pas de PCP (de par sa grande sensibilité). Il pourrait s'agir de patients colonisés ou ayant une infection subclinique. [Kohju *et al.* 2008] La valeur prédictive positive (VPP) de la PCR conventionnelle est donc médiocre.

Le point fort de la PCR est sa forte valeur prédictive négative (VPN) qui est de l'ordre de 100 %. Cela signifie qu'en cas de résultat négatif, le diagnostic de PCP est écarté et le traitement anti-*Pneumocystis* peut être arrêté. [Roux *et al.* 2010]

(3) PCR en temps réel

La PCR en temps réel a récemment fait son apparition. [Larsen *et al.* 2004] Cette analyse quantitative, plus rapide, semble très prometteuse puisqu'elle permettrait de différencier la simple colonisation à Pj d'une véritable PCP. [Robberts *et al.* 2007] Celle-ci s'appuie sur l'hypothèse que les patients infectés ont un plus grand nombre de micro-organismes donc une plus grande quantité d'ADN de Pj extraite du prélèvement que les patients colonisés. [Kohju *et al.* 2008] Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer un cut-off de signification clinique visant à différencier les deux statuts (colonisation ou maladie) vis-à-vis de Pj. [Catherinot *et al.* 2010]

(4) Intérêts cliniques de la PCR

Les intérêts de la PCR en pratique clinique sont multiples. Tout d'abord, elle peut être utilisée en première intention sur des prélèvements non invasifs (expectoration induite, lavage oropharyngé, aspiration nasopharyngée) et donc limiter le recours à la fibroscopie bronchique pour le recueil du LBA. [Durand-Joly *et al.* 2005] Enfin, elle permet d'étayer le diagnostic de PCP même dans les cas d'infections à faible taux de pathogènes (immunodéprimés non VIH, patients ayant reçu une prophylaxie anti-*Pneumocystis*). Cependant, des résultats discordants entre la PCR et la microscopie dans les prélèvements respiratoires peuvent être observés. [Durand-Joly *et al.* 2005]

Pour le moment, les résultats de détection sanguine d'ADN de Pj ne sont pas convaincants à des fins diagnostiques. [Durand-Joly *et al.* 2005]

La PCR ne constitue qu'un élément du diagnostic c'est pourquoi il est primordial de confronter les résultats biologiques avec la clinique, l'imagerie et le contexte pathologique du patient.

d) Cytométrie en flux

Le développement de techniques de laboratoire de plus en plus complexes, coûteuses et nécessitant un personnel spécialisé est un frein à la réalisation des examens biologiques dans un certain nombre de structures. Il serait donc intéressant de mettre au point des méthodes sensibles, automatisées et permettant une analyse rapide du prélèvement.

La cytométrie en flux (CMF) repose sur l'évaluation de la fluorescence des cellules. [Libertin *et al.* 1984] Cette technique semble spécifique et faire preuve d'une bonne sensibilité (seuil de détection plus bas que les méthodes de microscopie). [Barbosa *et al.* 2010] La CMF reste cependant peu étudiée pour la détection de *Pneumocystis jirovecii*.

L'inconvénient majeur de la CMF est le coût important de l'appareillage. En contrepartie, elle nécessite une quantité moindre d'anticorps monoclonaux spécifiques par rapport à l'immunofluorescence. De ce point de vue, la CMF serait plus économique. [Barbosa *et al.* 2010]

2. Dosages sanguins

a) Lactate deshydrogénase (LDH)

La LDH est élevée en cas de PCP. Cette élévation est plus le reflet de lésions et d'inflammation pulmonaire qu'un véritable marqueur de l'infection à Pj. [Thomas *et al.* 2004]

b) β -glucane

Le β -glucane est un composant de la paroi cellulaire de la plupart des champignons. Il est déjà utilisé comme marqueur d'immunodiagnostic des candidoses et des aspergilloses. Plusieurs études ont montré son utilité comme test complémentaire, notamment en cas de suspicion de PCP chez des patients où le recours aux procédures invasives est impossible. [Tasaka *et al.* 2007 ; Nakamura *et al.* 2009 ; DelBono *et al.* 2009]

Pour un cut-off fixé à 31.1 pg/mL, la sensibilité du dosage du β -glucane est de 92.3 %, la spécificité de 86.1 %, la VPP de 61 % et la VPN de 98 %. [Tasaka *et al.* 2007]

La détection de la PCP par ce dosage est meilleure dans la population de patients VIH que dans celle des patients immunodéprimés non VIH. Le taux de β -glucane n'est pas associé au pronostic. [Nakamura *et al.* 2009]

Le dosage de β -glucane semble, à ce jour, le marqueur sérique de PCP le plus fiable cliniquement. [DelBono *et al.* 2009]

c) S-adénosylméthionine (SAM ou AdoMet)

La S-adénosylméthionine est un intermédiaire biochimique important dans de nombreuses fonctions cellulaires. Tous les organismes - à l'exception de *Pneumocystis jirovecii*, une rickettsie et une espèce d'*Amoeba* - sont capables de synthétiser la SAM à partir d'ATP et de méthionine grâce à la S-adénosylméthionine synthétase. [Skelly *et al.* 2003]

A cause de cette curiosité biologique, la diminution de la teneur plasmatique en SAM pourrait constituer un marqueur diagnostique de la PCP. [Skelly *et al.* 2003 ; Skelly *et al.* 2008]

De plus, les taux de SAM plasmatiques s'élèvent rapidement après le traitement. La quantité de SAM serait donc corrélée à la charge fongique et à la viabilité de Pj. Ce dosage par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) constituerait ainsi un indicateur de bonne réponse au traitement. [Skelly *et al.* 2003 ; Helweg-Larsen *et al.* 2003]

Les inconvénients de ce dosage sont tout d'abord son coût élevé (300 \$ par échantillon) et son appareillage spécifique nécessitant une réalisation en laboratoire référent. [Skelly *et al.* 2008]

De plus, comme pour les autres tests sanguins, il ne faut pas négliger le risque d'interférences causées par des infections pulmonaires concomitantes ou des cancers. En effet, 20 % des cas de PCP chez les VIH sont concomitants avec une pneumonie bactérienne ou une tuberculose. [Helweg-Larsen *et al.* 2003]

Ce dosage est encore au stade de recherche. Aucune étude comparative avec le dosage de β -glucane n'a été réalisée à ce jour.

3. Technique sérologique

La recherche d'anticorps anti-*Pneumocystis* n'est pas utilisée à des fins diagnostiques mais dans un but épidémiologique.

VI. Traitement

A. Curatif

1. Traitement de première intention

Le traitement recommandé dans la pneumocystose est l'association triméthoprimé - sulfaméthoxazole (TMP-SMX) (Bactrim[®]) (tableau 4). Celui-ci est très efficace sur les PCP moyennes à sévères (PaO_2 inférieur à 70 mmHg) des patients VIH et non-VIH. De plus, cette association est administrable par voie orale ou par voie parentérale.

Les principaux inconvénients du TMP-SMX sont les effets indésirables à type de cytopénies, réactions cutanées, hépatites, pancréatites, troubles intestinaux, insuffisance rénale, hyperkaliémie, anaphylaxie, que cette association peut générer (dès la seconde semaine de traitement). [Catherinot *et al.* 2010 ; Cushion *et al.* 2004]

2. Traitements alternatifs

La pentamidine (Pentacarinat[®]) par voie parentérale est une bonne alternative au TMP-SMX pour le traitement des PCP modérées à sévères. Cependant cette molécule a une mauvaise tolérance (néphrotoxicité, dysglycémie, hépatotoxicité, hyperkaliémie, pancréatite). Les effets indésirables apparaissent chez 71 % des patients et conduisent à l'arrêt du traitement dans 18 % des cas. [Catherinot *et al.* 2010]

D'autres molécules peuvent être utilisées pour traiter les PCP légères à modérées lorsque l'association TMP-SMX ne peut l'être. Les associations clindamycine (Dalacine[®]) - primaquine d'une part et, dapsone (Disulone[®]) - TMP d'autre part, ont des efficacités et des toxicités comparables au TMP-SMX. L'atovaquone (Wellvone[®]) est moins efficace mais mieux tolérée que le TMP-SMX et aussi efficace que la pentamidine. Les différentes options curatives sont résumées dans le tableau 4.

Des études sur l'efficacité de la caspofungine (Cancidas[®]) dans cette indication sont en cours, les premiers résultats sont plutôt encourageants.

La durée recommandée du traitement de la PCP est de 21 jours chez les VIH et de 14 jours chez les immunodéprimés non VIH quelle que soit la molécule utilisée. Cette durée peut être

allongée en l'absence d'amélioration clinique satisfaisante (fort taux d'infestation, réponse clinique faible). [Catherinot *et al.* 2010]

Tableau 4 : Traitements de la PCP (D'après Catherinot *et al.* 2010)

Molécule	Dose	Voie	Remarque	EI	
1ère intention Triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SMX)	15-20 mg/kg 75-100 mg/kg/j en 3-4 prises	PO ou IV	CI si allergie aux sulfamides	Cytopénie Réactions cutanées Hépatite, pancréatite Troubles intestinaux Insuffisance rénale, hyperkaliémie Anaphylaxie	
Alternatif PCP légère à modérée	Dapsone + Triméthoprime	100 mg/j 5 mg/kg 3 fois/j	PO	CI si déficit en G6PD Réaction croisée possible avec allergie aux sulfamides	Méthémoglobinémie Prurit Fièvre Troubles intestinaux
	Atovaquone	750 mg 2-3 fois/j	PO	Repas riche en graisses (↗ BD)	Prurit Fièvre Troubles intestinaux Hépatite
	Clindamycine + Primaquine	600 mg 4 fois /j ou 350-400 mg 4 fois/j 30 mg/j	PO ou IV	CI si déficit en G6PD	Prurit Fièvre Neutropénie Troubles intestinaux Méthémoglobinémie
Alternatif PCP modérée à sévère	Pentamidine	4 mg/kg/jour 600 mg/j	IV	Hypotension, arythmie Hyperkaliémie, hypomagnésie, hypocalcémie Insuffisance rénale Pancréatite, hépatite, neutropénie	

3. Corticothérapie complémentaire

Chez les patients infectés par le VIH, l'adjonction de corticostéroïdes dans les soixante-douze premières heures du traitement de la PCP réduirait la morbidité et la mortalité en cas de forte hypoxémie. [Briel *et al.* 2005 ; Briel *et al.* 2006] Les recommandations américaines proposent le schéma suivant : 40 mg de prednisone deux fois par jour pendant cinq jours, puis réduction à 40 mg une fois par jour les cinq jours suivants et enfin, 20 mg par jour les onze derniers jours. [Catherinot *et al.* 2010]

Les données sont plus contradictoires dans le groupe de patients non-VIH. Le bénéfice des corticostéroïdes n'étant pas nettement démontré, aucune recommandation pour la pratique courante n'a été formulée. [Catherinot *et al.* 2010]

B. Prophylaxie

1. Quand instaurer et arrêter une chimioprophylaxie ?

Le taux de T-CD4 permet de cibler les populations à risque accru de PCP chez lesquelles la chimioprophylaxie anti-*Pneumocystis* serait souhaitable. [Roblot *et al.* 2009]

Chez les patients infectés par le VIH, les recommandations préconisent l'administration d'une prophylaxie dès lors que le taux de T-CD4 est inférieur à 200 cellules par microlitre ou en cas de candidose oropharyngée.

Cette chimioprophylaxie peut être interrompue lorsque le taux de T-CD4 est supérieur à 200 cellules par microlitre pendant au moins trois mois. [Catherinot *et al.* 2010]

Ceci est beaucoup moins codifié dans la population d'immunodéprimés non-VIH. Mansharamani *et al.* ont proposé un taux seuil de T-CD4 à 300 cellules par microlitre. [Mansharamani *et al.* 2000] Dès qu'il y a un contexte d'immunosuppression, la prophylaxie anti-*Pneumocystis* doit être envisagée au cas par cas en évaluant le bénéfice par rapport au risque d'effets indésirables parfois importants qu'elle peut générer. Il faut aussi prendre en compte le taux d'attaque de la PCP dans la pathologie considérée. [Catherinot *et al.* 2010 ; Rodriguez *et al.* 2004]

Il existe cependant des recommandations pour un certain nombre de pathologies.

La prophylaxie par TMP-SMX est recommandée :

- dans la population hématologique :
 - pour les patients atteints de LLC,
 - ceux traités par des agents déplétant les cellules T,
 - ceux recevant des cures CHOP-14 ou CHEOP-14 [Kolstad *et al.* 2007]
- dans la population de transplantés :
 - lors de transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (au moins six mois en post-greffe ou pendant toute la période d'immunosuppression si traitement immunosuppresseur ou GVHD chronique) et autologues (sous conditions particulières) [Rodriguez *et al.* 2004]
 - lors de transplantation d'organe solide, notamment rénale (au moins quatre mois en post-greffe et trois à quatre mois supplémentaires en cas de rejet, prophylaxie pendant six à douze mois si le patient reçoit des anticorps monoclonaux déplétant en lymphocyte T ou des globulines antithymocytes) [Rodriguez *et al.* 2004]

Il n'y a pas de guidelines pour les maladies systémiques (granulomatose de Wegener, dermatomyosite, polymyosite, lupus érythémateux disséminé) bien qu'elles soient traitées généralement par de fortes doses de corticoïdes ou par immunosuppresseurs (méthotrexate). [Catherinot *et al.* 2010]

2. Molécules utilisées

La chimioprophylaxie de choix est l'association TMP-SMX quelle que soit la cause de l'immunodépression. [Rodriguez *et al.* 2004] Elle possède un très bon taux de protection vis-à-vis de la PCP (89 à 100 %). En cas d'intolérance au TMP-SMX, des aérosols de pentamidine peuvent être administrés mensuellement. Ils s'avèrent cependant moins efficaces (taux de protection : 60-90 %). [Catherinot *et al.* 2010]

Les différentes options prophylactiques sont répertoriées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Chimioprophylaxie de la PCP (D'après Catherinot *et al.* 2010)

Molécule	Dose	Voie	Commentaires
TMP-SMX	Bactrim® simple : 1 cp/jour Bactrim® fort : 3 cp/semaine	PO	1ère intention Alternatif
Dapsone	50mg 2 fois/j ou 100 mg/jour	PO	CI si déficit en G6PD
Dapsone + pyriméthamine + leucovorine	50 mg/j 50 mg/semaine 25 mg/semaine	PO	CI si déficit en G6PD
Dapsone + pyriméthamine + leucovorine	200 mg/semaine 75 mg/semaine 25 mg/semaine	PO	CI si déficit en G6PD
Pentamidine	300 mg/mois	Aérosols	Administration en décubitus (↗ distribution pulmonaire)
Atovaquone	750 mg 2 fois/j	PO	Repas riches en graisse (↗ BD)

3. Prévention des infections nosocomiales

L'hypothèse d'une transmission interhumaine de *Pneumocystis jirovecii* nécessite la mise en œuvre de procédures préventives afin d'éviter la transmission aérienne dans les structures de soins. Des mesures simples sont à envisager comme par exemple l'isolement de type respiratoire ou la séparation géographique des malades atteints de PCP des patients susceptibles d'être contaminés (immunodéprimés). [Chabé *et al.* 2009]

Aucune recommandation nationale n'existe à ce jour au sujet de l'isolement respiratoire. En pratique courante, les patients présentant une pneumocystose sont hospitalisés dans une chambre seule pour éviter les cas secondaires. [Catherinot *et al.* 2010]

C. Résistances aux traitements

La biologie moléculaire a permis de mettre en évidence des mutations au niveau des gènes de la DHPS, de la DHFR et du cytochrome b de *Pneumocystis jirovecii*. La DHPS et la DHFR sont les cibles du triméthoprime et du sulfaméthoxazole alors que le cytochrome b est le site d'action de l'atovaquone. Des mutations de la DHPS ont été observées chez des patients en échec prophylactique au TMP-SMX. L'imputabilité de ces mutations dans la résistance aux traitements (curatifs ou préventifs) est encore très controversée. Cette notion pourrait s'avérer utile pour guider la prise en charge des pneumocystoses. [Morris *et al.* 2004 ; Rodriguez *et al.* 2004]

Partie 2

*Analyse épidémiologique des cas de pneumocystose
au CHU de Nancy*

I. Problématique

Historiquement, la pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* survenait principalement chez les patients VIH positifs et permettait d'ailleurs la découverte de leur séropositivité (stade SIDA). D'une part, l'arrivée de la trithérapie permettant la restauration du système immunitaire et d'autre part, l'utilisation systématique de chimioprophylaxie anti-*Pneumocystis*, ont permis la régression de l'incidence de la PCP dans cette population. [Kelley *et al.* 2009] Parallèlement, une nouvelle population de patients à risque a émergé dans les services de transplantation et d'hématologie. [Roux *et al.* 2010]

Une analyse épidémiologique des cas de PCP a donc été menée au sein du CHU de Nancy afin de mettre en évidence ou non ces évolutions dans notre région.

Différentes questions ont retenu notre attention :

- Une variation du nombre de cas de PCP est-elle observée entre la fin des années 1990 et aujourd'hui ?
- Une prédominance saisonnière est-elle mise en évidence dans notre région ?
- Les populations à risque de PCP ont-elles changé ?
- Les caractéristiques de la pneumocystose diffèrent-elles en fonction du terrain ?

II. Patients et méthode

A. Etude globale

Une analyse globale permet dans un premier temps d'apprécier l'évolution des demandes de recherche de *Pneumocystis jirovecii* sur une période d'observation de seize ans (de 1994 à 2010).

Le nombre de demandes de recherche de Pj dans les prélèvements respiratoires et leurs résultats ont été obtenus grâce au système d'archivage et au système d'analyses statistiques du logiciel de validation du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHU de Nancy.

Pour visualiser la périodicité des cas de pneumocystose pendant la période considérée, une analyse de la répartition mensuelle cumulée a été effectuée.

B. Caractéristiques des cas de PCP diagnostiqués entre janvier 2007 et avril 2011

Une deuxième étude rétrospective portant sur une période de quatre ans permet de cibler les patients ayant développé une pneumocystose.

Les patients sont recrutés en fonction des résultats de microscopie sur les LBA ou les prélèvements respiratoires profonds obtenus au laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHU de Nancy entre janvier 2007 et avril 2011. Ont été inclus, tous les patients présentant une recherche de Pj positive par au moins une technique de microscopie. Après accord des chefs de service, les dossiers cliniques des patients concernés ont été consultés.

La collecte des données pertinentes au sein des dossiers cliniques a été réalisée grâce à une feuille de renseignements (Annexe 2). La fiche de renseignements regroupe les données épidémiologiques du patient (âge, sexe, service, hospitalisation ou non, prophylaxie primaire, facteurs de risque), les résultats des différents examens biologiques (biochimie, parasitologie mycologie, hématologie, virologie), les données cliniques (symptômes, complications), le traitement (curatif, prophylaxie secondaire) et l'évolution de l'état de santé du patient (guérison, récurrence de PCP ou décès).

Les résultats obtenus sont décrits en pourcentage et en nombre de cas. Pour certains items, le pourcentage de données non renseignées a été mentionné pour mettre en évidence un biais de recrutement pour ces paramètres.

III. Résultats

A. Etude globale

1. Evolution du nombre de demandes de recherche de Pj

Le laboratoire a reçu 6143 prélèvements respiratoires entre janvier 1994 et décembre 2010 parmi lesquels 235 (3,8 %) se révèlent être positifs par au moins une technique de microscopie. L'évolution du nombre annuel de recherches de Pj et du nombre de cas positifs est visualisable sur la figure 16. Les demandes de recherche de l'agent de la pneumocystose semblent diminuer au début des années 2000 : 537 demandes en 1996 contre 261 trois ans plus tard. On observe ensuite une légère recrudescence de la demande des services (406 en 2005) sans jamais égaler le nombre de demandes de 1996. Cette recrudescence des demandes s'accompagne d'une augmentation constante du nombre de cas de pneumocystose à partir de 2007 (5 cas en 2006, 9 en 2007, 10 en 2008, 14 en 2009 et 17 en 2010). Les figures 16 et 17 permettent aussi de mettre en évidence une nette diminution des cas de pneumocystose à partir de 1997.

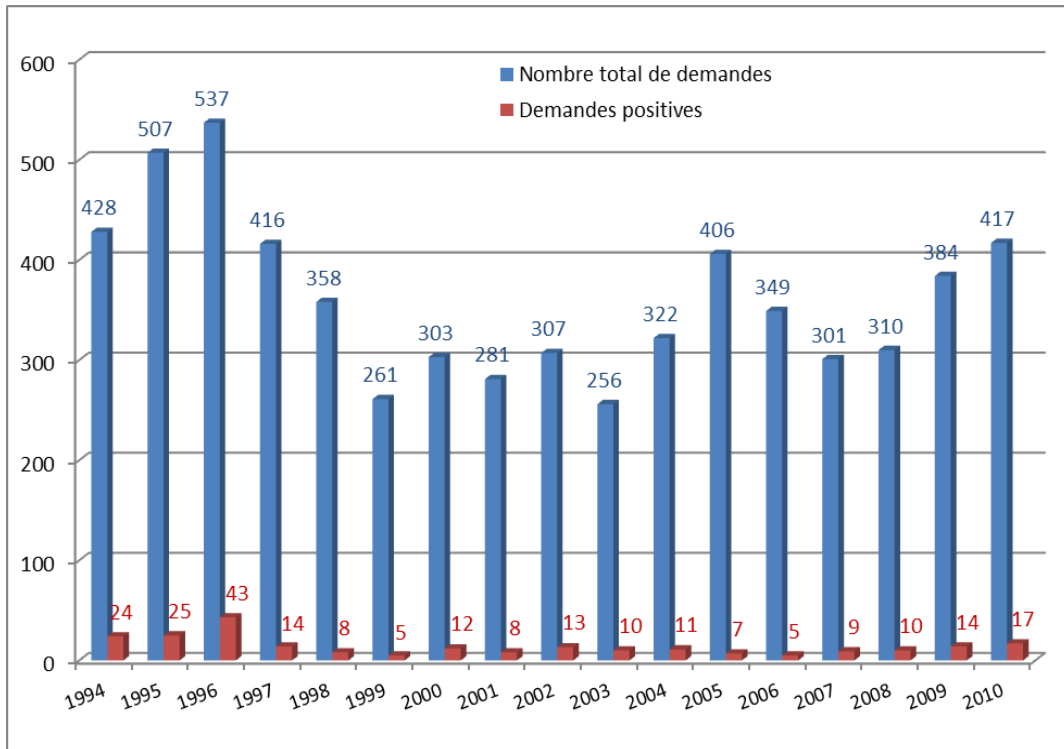


Figure 16 : Evolution des demandes de recherche de Pj et des résultats positifs au CHU de Nancy entre 1994 et 2010

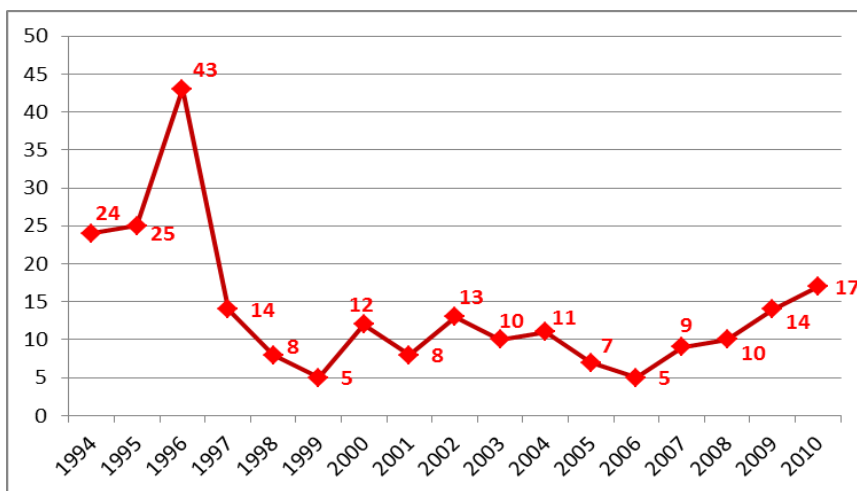


Figure 17 : Evolution des diagnostics biologiques de PCP au CHU de Nancy entre 1994 et 2010

2. Répartition mensuelle des cas de PCP

L'analyse de la répartition cumulée des cas de pneumocystose durant la période d'observation montre une recrudescence des cas de PCP aux mois de janvier (n = 25), mai (n = 31), juin (n = 25) et août (n = 24) (fig. 18). Les cas de PCP sont moins fréquemment observés durant les mois de novembre (n = 11) et de décembre (n = 13).

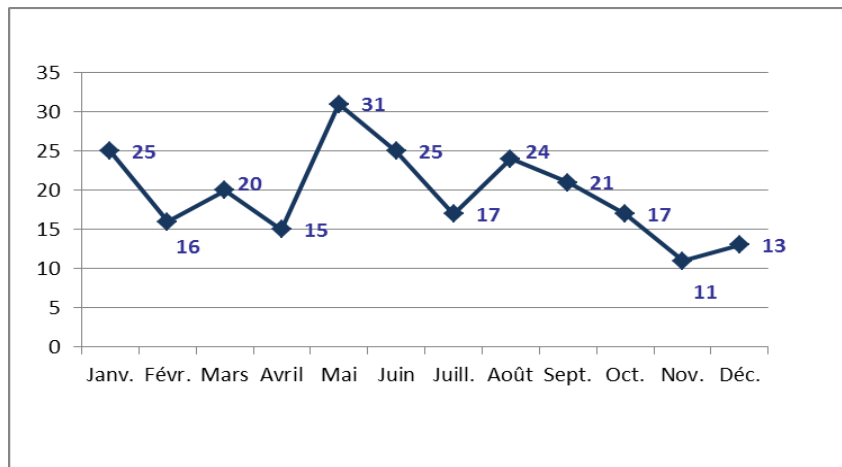


Figure 18 : Répartition cumulée mensuelle des cas de PCP au CHU de Nancy entre 1994 et 2010

Pour mieux appréhender les variations mensuelles, une moyenne théorique (19.6) a été calculée et comparée au nombre de cas effectifs (fig. 19). Les demandes de recherche de Pj sont supérieures d'au moins 20 % à la moyenne théorique pour les mois de janvier (+ 28 %), mai (+ 58 %), juin (+ 28 %) et août (+ 22 %). Les mois où le nombre de demandes est bien en deçà de la moyenne théorique sont les mois d'avril (- 23 %), novembre (- 44 %) et décembre (- 34 %).

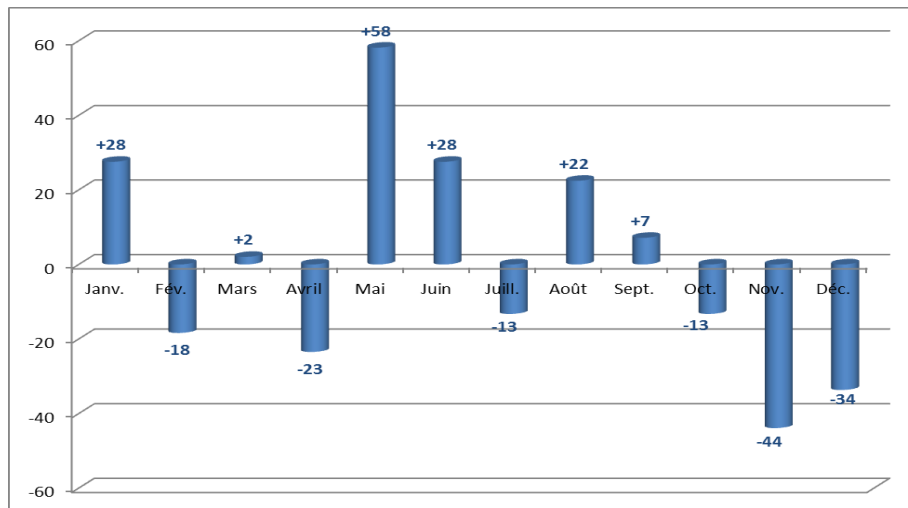


Figure 19 : Pourcentage mensuel de PCP par rapport à la moyenne théorique

B. Caractéristiques des cas de PCP

Une étude approfondie et rétrospective des cas de PCP sur la période de janvier 2007 à avril 2011 est menée. Tout d'abord, une analyse par service (services les plus demandeurs en volume, services hébergeant le plus de cas) est conduite (fig. 20). Ensuite, afin d'étayer la caractérisation de la PCP en fonction du terrain, une étude par patient (durée des symptômes avant le diagnostic, symptomatologie, durée d'hospitalisation, évolution de la maladie, pathologie sous-jacente...) est réalisée.

Entre janvier 2007 et avril 2011, 1577 demandes ont été enregistrées parmi lesquelles 52 ont conduit au diagnostic de pneumocystose.

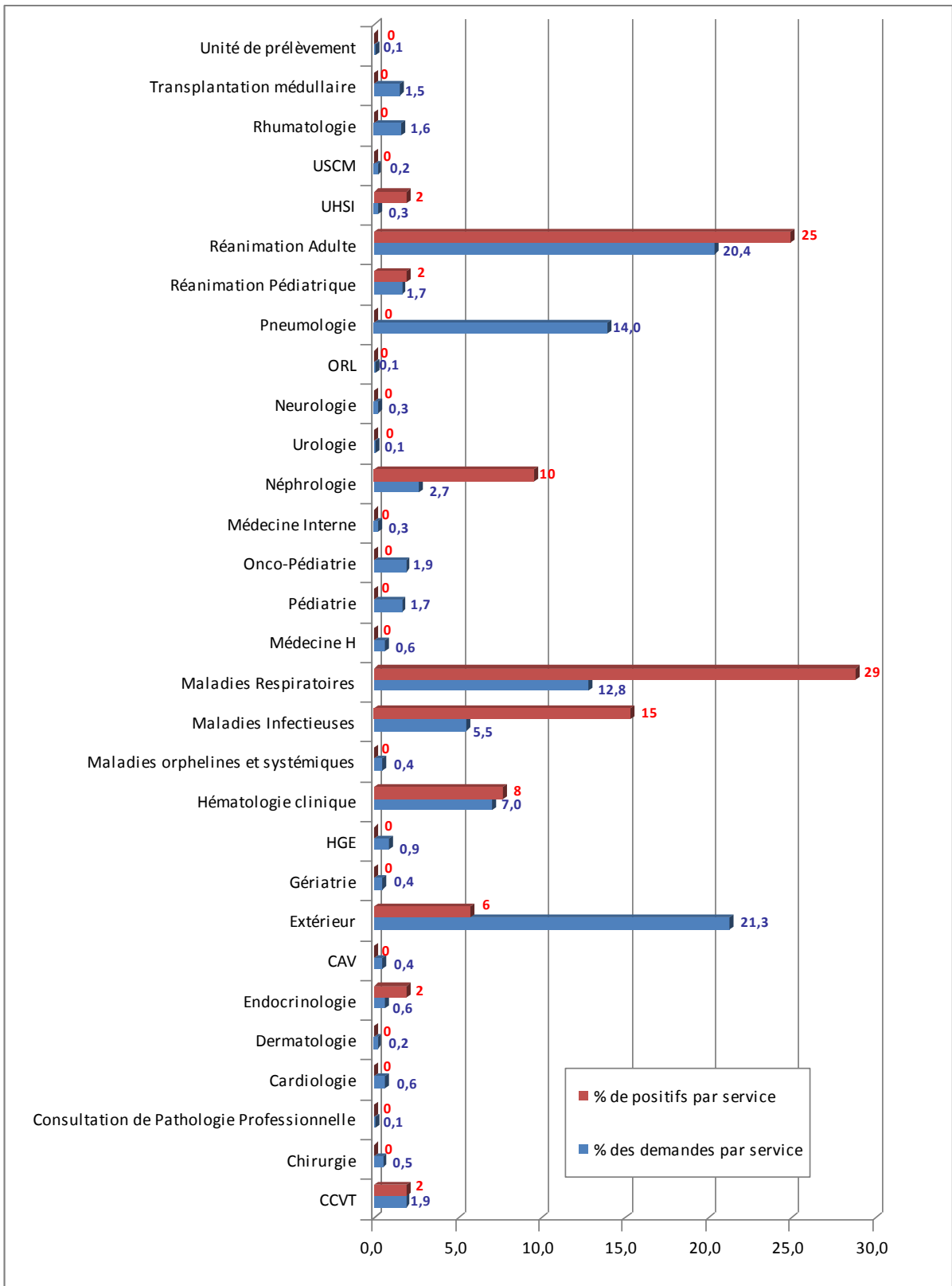


Figure 20 : Proportions de demandes et de résultats positifs par service entre 2007 et avril 2011

1. Services

Les services les plus demandeurs en volume de recherche de *Pneumocystis jirovecii* dans les prélèvements respiratoires (LBA, aspiration bronchique) sont les établissements de santé extérieurs (21.3 %, n = 336), la réanimation adulte (20.4 %, n = 322), la pneumologie (14 %, n = 221), les maladies respiratoires (12.8 %, n = 202), l'hématologie clinique (7 %, n = 111) et les maladies infectieuses (5.5 %, n = 87) (fig. 20).

Les services accueillant le plus de cas de PCP sont les maladies respiratoires (29 %, n = 15), la réanimation adulte (25 %, n = 13), les maladies infectieuses (15 %, n = 8), la néphrologie (10 %, n = 5) et l'hématologie clinique (8 %, n = 4) (fig. 20).

Le ratio du nombre de cas de PCP sur le nombre total de demandes par service permet d'identifier les services qui ciblent le mieux leurs demandes.

Les services ayant la proportion de positifs la plus forte parmi leurs demandes de recherche de Pj sont l'unité d'hospitalisation sécurisée interrégionale (25 %), la néphrologie (11.9 %) et l'endocrinologie (10 %) (fig. 21).

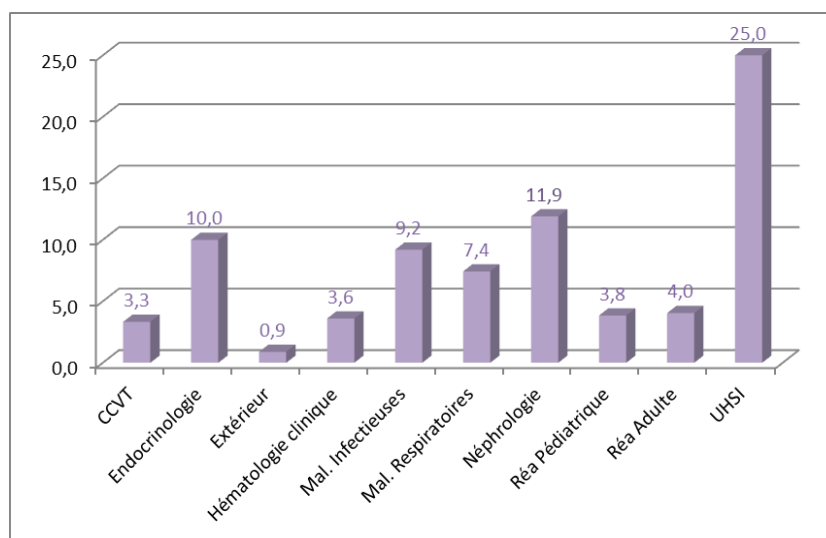


Figure 21 : Pourcentage de résultats positifs parmi les demandes par services

2. Population étudiée

Deux patients ont été exclus de l'étude rétrospective : pour le premier, le diagnostic de PCP n'a pas été retenu, et pour le second, nous n'avons pu obtenir d'informations cliniques. L'étude inclut au total trente-neuf patients. Ces patients ont été répartis en deux catégories en fonction de leur terrain : les patients VIH positifs et les patients VIH négatifs. En fonction de ces deux populations, différents critères ont été étudiés. Les différentes données sont récapitulées dans le tableau 6.

a) Données démographiques

- Sexe

Tout terrain d'immunosuppression confondu, l'étude comptabilise 29 hommes et 10 femmes correspondant à un sex-ratio (H / F) de 2.9.

Dans la population de patients contaminés par le VIH (n = 14), la répartition en fonction du sexe s'effectue comme suit : 9 hommes et 5 femmes (sex-ratio H / F de 1.8).

La prédominance masculine est aussi observée dans le groupe de patients non infectés par le VIH avec un sex-ratio (H / F) de 4 (20 hommes et 5 femmes).

- Age

L'âge moyen au moment de l'épisode de pneumocystose est de 41 ans (25 à 68 ans) pour les patients VIH et de 53 ans (5 mois à 73 ans) pour les non VIH.

b) Service d'hospitalisation

Parmi les patients étudiés, plus de 79 % (n = 31) ont été hospitalisés dans l'un des services suivants : maladies respiratoires (23.1 %, n = 9), réanimation médicale (23.1 %, n = 9), maladies infectieuses (20.5 %, n = 8) et néphrologie (12.8 %, n = 5). Les autres patients proviennent d'hématologie (7.7 %, n = 3), de réanimation chirurgicale des greffes et de chirurgie cardiaque, vasculaire et transplantation (CCVT) (2.6 %, n = 1), de médecine interne orientée vers les maladies orphelines et systémiques (2.6 %, n = 1), de réanimation médicale pédiatrique (2.6 %, n = 1) et des établissements de santé extérieurs (5.1 %, n = 2) (CH Jean Monnet d'Epinal, HIA Legouest de Metz) (fig. 22).

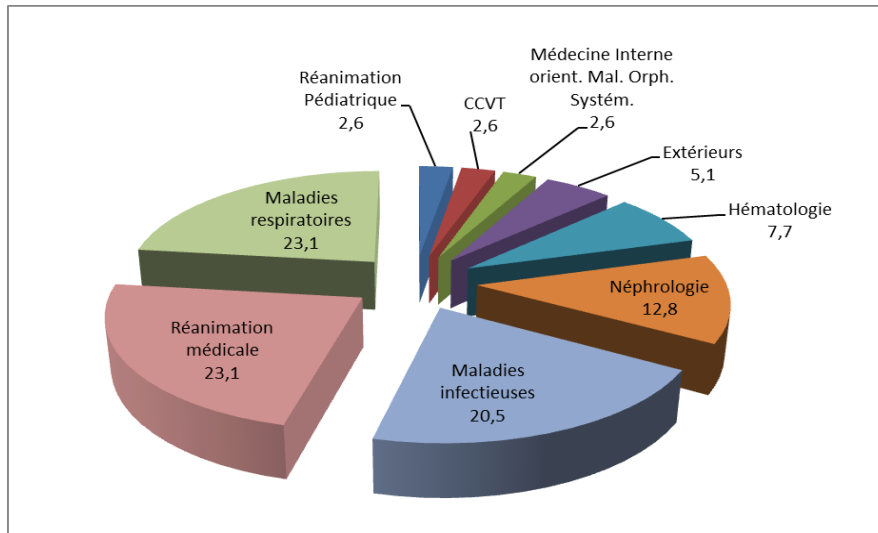


Figure 22 : Répartition des cas de PCP au CHU de Nancy entre 2007 et 2011 (en %)

Des services comme la réanimation médicale peuvent aussi bien accueillir des patients atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise, que des transplantés ou des patients présentant une pathologie tumorale. Il s'avère donc intéressant d'envisager la pathologie sous-jacente à la pneumocystose (fig. 23) plutôt que le service d'hospitalisation. De plus un même malade peut être hébergé successivement par plusieurs services.

c) Pathologie sous-jacente

L'étude comporte un tiers de patients VIH (n = 14) et deux tiers (n = 25) de patients immunodéprimés par d'autres causes que le virus du SIDA.

La pneumocystose se développe majoritairement chez les patients immunodéprimés par le virus du VIH (36 %, n = 14), les patients greffés (26 %, n = 10) (neuf greffes rénales et une cardiaque) et les patients atteints d'hémopathies malignes (18 %, n = 7).

Les hémopathies malignes se répartissent de la manière suivante : trois LNH B diffus à grandes cellules, deux lymphomes du manteau, une LLC évolutive et une aplasie médullaire idiopathique.

Huit pour cent des cas de pneumocystose ont lieu sur un terrain de tumeurs solides (deux tumeurs cérébrales et une pulmonaire évolutive). Dans huit autres pour cent des cas, la PCP se déclare dans un contexte de maladies respiratoires (un asthme ancien non traité, un asthme cortico-dépendant traité par corticoïdes et méthotrexate et une bronchite obstructive chronique)

Les autres cas de PCP surviennent lors de déficit immunitaire (2 %, n = 1) ou de maladie de système (non étiquetée) (2 %, n = 1).

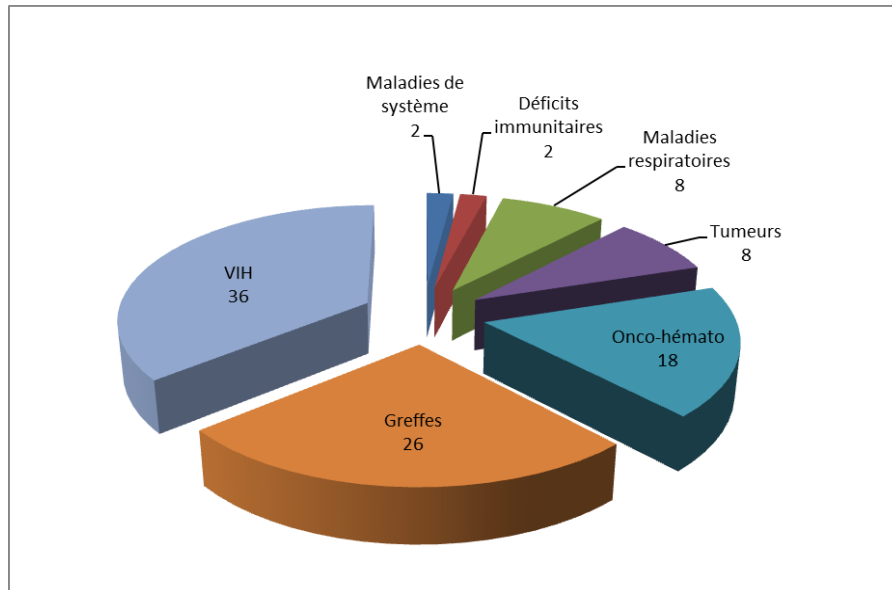


Figure 23 : Pathologies sous-jacentes à la PCP (en %)

d) Traitements

- Prophylaxie primaire

Une grande majorité des patients n'ont pas de prophylaxie primaire anti-*Pneumocystis* au moment du diagnostic : 79 % de séropositifs pour le VIH (n = 11) et 96 % de séronégatifs pour le VIH (n = 24). Dans chacun des deux groupes, un patient (7 %) a arrêté la chimioprophylaxie trois mois avant l'épisode de PCP. Un seul patient infecté par le VIH (7 %) reçoit un traitement préventif. Dans le groupe de patients VIH, un dossier (7 %) ne renseigne pas la prise ou non de traitement préventif contre *Pneumocystis jirovecii*.

- Traitement sous-jacent

Parmi les patients infectés par le VIH, une minorité (29 %, n = 4) est sous trithérapie alors que 64 % (n = 9) ne reçoivent aucun traitement. Le traitement n'est pas renseigné dans un dossier (7 %) du groupe VIH.

Plus de la moitié des cas de PCP de la population non VIH est sous corticothérapie (52 %, n = 13) dont 44 % (n = 11) ont un traitement immunosuppresseur concomitant. Plus d'un tiers

de ces patients (36 %, n = 9) reçoit une chimiothérapie. Seulement 16 % (n = 4) des patients de ce groupe n'ont aucun traitement sous-jacent.

3. Caractérisation de la pneumocystose

a) Clinique

Cliniquement, la pneumocystose à Pj se manifeste fréquemment par une pneumopathie quel que soit le terrain d'immunosuppression (VIH : 72 %, n = 10 ; non VIH : 84 %, n = 21). Une hypoxémie s'observe aussi dans la majorité des cas (VIH : 57 %, n = 8 ; non VIH : 80 %, n = 20).

Le délai entre l'apparition des symptômes et le diagnostic de la PCP est en moyenne de 31 jours (9 à 90 jours) chez les patients VIH alors qu'il est de 18 jours (2 à 90 jours) chez les non VIH. Un cas de pneumocystose chez un patient non infecté par le VIH s'est révélé être asymptomatique (4 %).

La complication par un pneumothorax a été rare (VIH : 21 %, n = 3 ; non VIH : 4 %, n = 1) dans les deux populations étudiées. Peu de patients VIH ont nécessité le recours à une ventilation mécanique (14 %, n = 2) alors que celle-ci a été nécessaire dans un tiers des cas de PCP (36 %, n = 9) survenant chez les patients non VIH.

La durée d'hospitalisation moyenne pour les patients séropositifs pour le VIH est de 25 jours (1 à 60 jours). Elle s'allonge à 41 jours (2 à 195 jours) pour les malades non contaminés par le virus du SIDA.

L'évolution n'a été fatale que pour un patient (7 %) contaminé par le virus de l'immunodéficience acquise alors que sept décès (28 %) sont survenus dans la population de non VIH.

b) Diagnostic biologique

- Nombre de techniques de microscopie positives

D'un point de vue biologique, les trois techniques de diagnostic (MGG, Bleu de Toluidine, IF) sont positives dans presque la moitié des cas (VIH : 57 %, n = 8 ; non VIH : 40 %, n = 10).

La mise en évidence de Pj est réalisée à partir de deux techniques dans 29 % (n = 4) des cas de VIH et dans 36 % (n = 9) des cas dans la population d'immunodéprimés par d'autres causes.

Dans de rares cas, une seule technique a permis d'évoquer le diagnostic de PCP (VIH : 14 %, n = 2 ; non VIH : 20 %, n = 5). Pour un patient non contaminé par le VIH (4 %), le diagnostic de PCP n'a pu être envisagé qu'à partir d'une seule technique douteuse (bleu de toluidine).

- Immunofluorescence indirecte

Dans la population de VIH, l'immunofluorescence indirecte révèle de nombreux kystes dans plus d'un tiers des cas (36 %, n = 5), quelques kystes dans plus de la moitié des cas (57 %, n = 8) et de rares kystes beaucoup moins fréquemment (7 %, n = 1).

Dans le groupe de patients non VIH, la répartition du nombre de kystes est un peu différente : nombreux (32 %, n = 8), assez nombreux (4 %, n = 1), quelques (24 %, n = 6), rares (24 %, n = 6) et très rares (12 %, n = 3). Le patient de cette population n'ayant qu'une technique de microscopie douteuse (bleu de toluidine), est négatif en IFI (4 %).

- Taux de lymphocytes T-CD4

Le taux moyen de lymphocytes T-CD4 lors du diagnostic de la PCP est de 46 cellules par microlitre (3 à 121 cellules/ μ L) pour les patients VIH alors qu'il s'élève à 341 cellules par microlitre (75 à 643 cellules/ μ L) pour les patients non VIH. Il faut cependant souligner que n'étant disponible que pour quatre patients (16 %), ce paramètre est peu représentatif dans la population de patients non contaminés par le virus du SIDA.

- Charge virale VIH

La recherche d'ARN viral est renseignée dans la plupart des dossiers de patients VIH (93 %, n = 13) à l'exception d'un (7 %). Lors du diagnostic de PCP, le virus du VIH est répliatif pour tous les patients. La quantification de la charge virale varie alors de $1,74.10^3$ à $1,45.10^6$ copies par millilitre (soit de 3.24 log à 6.15 log).

Tableau 6 : Caractéristiques des cas de PCP survenus entre 2007 et 2011 au CHU de Nancy

		VIH (n = 14)	Non-VIH (n = 25)
Âge (ans)		41 [25-68 ans]	53 [5 mois-73 ans]
Sexe		M : 64 % (n = 9) F : 36 % (n = 5)	M : 80 % (n = 20) F : 20 % (n = 5)
Durée d'hospitalisation (jours)		25 [1-60]	41 [2-195]
Prophylaxie primaire		Oui : 7 % (n = 1) Non : 79 % (n = 11) Arrêt : 7 % (n = 1) NR : 7 % (n = 1)	Oui : 0 % (n = 0) Non : 96 % (n = 24) Arrêt : 4 % (n = 1)
Traitement sous-jacent		Trithérapie : 29 % (n = 4) Aucun : 64 % (n = 9) NR : 7 % (n = 1)	Corticothérapie : 52 % (n = 13) Immunosuppresseur : 44 % (n = 11) Chimiothérapie : 36 % (n = 9) Aucun : 16 % (n = 4)
Taux CD4 (/µl)		46 [3-121]	341 [75-643] seulement 4 patients
Parasitologie	Nombre de techniques positives	1 : 14 % (n = 2) 2 : 29 % (n = 4) 3 : 57 % (n = 8)	1 : 20 % (n = 5) 2 : 36 % (n = 9) 3 : 40 % (n = 10) 1 douteuse : 4 % (n = 1)
	Appréciation du nombre de kystes en IFI	Nombreux : 36 % (n = 5) Quelques : 57 % (n = 8) Très rares : 7 % (n = 1)	Nombreux : 32 % (n = 8) Assez nombreux : 4 % (n = 1) Quelques : 24 % (n = 6) Rares : 24 % (n = 6) Très rares : 12 % (n = 3) Négatif : 4 % (n = 1)
Clinique	Pneumopathie	Oui : 72 % (n = 10) Non : 14 % (n = 2) NR : 14 % (n = 2)	Oui : 84 % (n = 21) Non : 16 % (n = 4)
	Hypoxémie	Oui : 57 % (n = 8) Non : 7 % (n = 1) NR : 36 % (n = 5)	Oui : 80 % (n = 20) Non : 20 % (n = 5)
	Pneumothorax	Oui : 21 % (n = 3) Non : 72 % (n = 10) NR : 7 % (n = 1)	Oui : 4 % (n = 1) Non : 96 % (n = 24)
	Ventilation mécanique	Oui : 14 % (n = 2) Non : 79 % (n = 11) NR : 7 % (n = 1)	Oui : 36 % (n = 9) Non : 64 % (n = 16)
	Durée des symptômes avant le diagnostic	31 jours [9-90]	18 jours [2-90]
Evolution		7 % décès (n = 1)	28 % décès (n = 7)

IV. Discussion

A. Historique de la PCP

Plusieurs grands évènements ont influencé la survenue de cas de pneumocystose. Initialement rare, cette infection se manifestait principalement chez des enfants prématurés ou dénutris ainsi que chez des patients atteints de leucémies (notamment LAL chez les enfants) ou de lymphomes. Des cas ont été également décrits dans des contextes de tumeurs solides, de connectivites ou de transplantations d'organes. [Roblot *et al.* 2002]

En 1980, suite à la survenue de l'épidémie de SIDA, le nombre de cas de pneumocystose s'enflamme. Dès 1989, l'utilisation de traitements anti-*Pneumocystis* a permis de limiter la progression de l'incidence de la maladie. A partir de 1992, le taux de PCP commence à décroître lentement (3.4 % par an jusqu'en 1995 aux USA) grâce à l'administration de combinaisons d'antirétroviraux. [Kaplan *et al.* 2000]

L'étude nancéenne met en évidence un déclin des cas de PCP à partir de 1997. Au total, entre 1996 et 1999, une régression de 88 % de l'incidence de la PCP est constatée (décroissance de 67 % entre 1996 et 1997 puis de 43 % et 38 % les deux années suivantes). Cette forte diminution des cas de PCP après 1996 (21.5 % par an entre 1996 et 1998 aux USA) s'explique par l'utilisation de thérapie antivirale hautement réactive (HAART) chez les patients infectés par le VIH. [Kaplan *et al.* 2000] En Europe, l'étude EuroSIDA observe également une diminution de 4.9 cas de PCP pour 100 personnes années avant mars 1995 et de 0.3 cas pour 100 personnes années après mars 1998. [Morris *et al.* 2004] De même, les conséquences des modifications de prescription sont visualisables dans une étude française qui reporte une incidence à 20 pour 1000 patients années les six premiers mois de 1996 avec une forte décroissance (49 %) dans la seconde partie de l'année. [Roux *et al.* 1998]

Parallèlement à cette diminution des cas de PCP dans la population VIH (de 82 % en 1998 à 55 % en 2007), d'autres populations à risque ont émergé (18 % de PCP chez les patients non VIH en 1998 contre 41 % en 2007) pouvant expliquer la légère recrudescence de l'incidence de la maladie pendant les années 2000. [Magne *et al.* 2009]

Schématiquement, l'analyse locale des cas de PCP comptabilise un tiers de patients contaminés par le VIH pour deux tiers de non VIH. La tendance est inversée par rapport à l'analyse du réseau pneumocystose francilien (VIH : 61 %, non VIH : 33 %). [Magne *et al.* 2009] La recrudescence des cas de pneumocystose dans la population non VIH pourrait s'expliquer par

l'utilisation de plus en plus fréquente de fortes doses de corticostéroïdes (immunosuppression plus forte) et la non prescription systématique de prophylaxie anti-*Pneumocystis* dans les populations connues à risque. [Torres *et al.* 2006]

B. Variations saisonnières

Les données scientifiques sur la corrélation entre les facteurs climatiques (température, humidité) et la survenue de pneumocystose sont assez contradictoires. Certains auteurs constatent une augmentation de l'incidence pendant la période hivernale. [Calderon *et al.* 2004 ; Varela *et al.* 2004 ; Lubis *et al.* 2003] D'autres, en revanche, observent une recrudescence des cas au printemps et en été [Sing *et al.* 2009 ; Walzer *et al.* 2008 ; Miller *et al.* 1992 ; Vanhems *et al.* 1992].

L'étude de la répartition cumulée mensuelle des cas de PCP au CHU de Nancy ne permet pas de dégager de véritables variations saisonnières. En effet, des pics d'incidence sont constatés en périodes printanières et estivales (mai, juin et août) mais également en hiver (janvier). Les données lorraines font ainsi écho aux observations d'une équipe française ne mettant en évidence aucune variation saisonnière. [Roblot *et al.* 2002]

C. Caractéristiques des cas de pneumocystose

Les caractéristiques cliniques diffèrent selon les facteurs responsables de l'immunodépression. Les observations réalisées à partir de l'analyse de cas locaux de PCP sont globalement comparables à celles constatées par ailleurs.

1. Population étudiée

a) Données démographiques

- Age

L'analyse lorraine révèle une moyenne d'âge de 47 ans pour les cas de PCP toutes causes d'immunosuppression confondues. L'âge moyen de PCP semble un peu plus élevé dans la population de patients non infectés par le VIH (53 ans *versus* 41 ans). Le réseau pneumocystose francilien observe des chiffres similaires avec un âge moyen de 43 ans pour les VIH et de 53 ans pour les non VIH (âge moyen global à 47 ans). [Magne *et al.* 2009]

Il a, par ailleurs, été démontré que les cas de PCP de la population non VIH survenaient chez des patients plus âgés (64 ans) que dans la population de VIH (42 ans en moyenne). [Roblot *et al.* 2009 ; Sowden *et al.* 2004 ; Fujii *et al.* 2007]

- Sexe

Avec un sex-ratio (H / F) de 2.9 (VIH+ : 4 et VIH- : 1.8), nos données sont comparables à celles de la littérature. Magne *et al.* obtiennent un sex-ratio de 2.7 pour les VIH et de 1.6 pour les non infectés par le virus. [Magne *et al.* 2009] De manière générale, les hommes semblent donc plus susceptibles de développer une PCP que les femmes. [Sowden *et al.* 2004]

b) Pathologie sous-jacente

Les cas de PCP nancéens surviennent principalement chez les patients infectés par le VIH, les greffés d'organes (rein, coeur), lors d'hémopathies malignes (LNH, lymphomes, LLC) ou de tumeurs solides (cérébrale ou pulmonaire évolutive). Notre analyse met en évidence, dans l'ensemble, les mêmes facteurs de risques que ceux décrits dans les publications scientifiques. [Roux *et al.* 2010] Cependant, contrairement à la littérature, notre analyse dénombre peu de maladies de système (connectivites, vascularites...). Plusieurs publications décrivent des cas de pneumocystose chez des patients atteints de maladie de Wegener, de périartérite noueuse, de dermatopolymyosite, de lupus érythémateux disséminé et de polyarthrite rhumatoïde. [Khellaf *et al.* 2009 ; Roblot *et al.* 2002]

La médecine interne orientée vers les maladies orphelines et systémiques du CHU de Nancy ne se révèle pas être un service très demandeur de recherche de Pj (0.4 % du nombre total de

demandes). On peut alors supposer que ce service méconnaissant la pneumocystose, a tendance à moins rechercher cette infection.

c) Traitements

- Traitement sous-jacent

Dans le groupe de patients non infectés par le VIH du CHU de Nancy, la majorité des PCP survient lors d'un traitement immunosuppresseur et/ou d'une corticothérapie et/ou d'une chimiothérapie. Chez ces immunodéprimés, il semblerait que le véritable facteur de risque soit plus le traitement sous-jacent (corticoïdes, MTX, cytotoxiques, immunosuppresseurs) que la pathologie elle-même. [Dessauze *et al.* 2007 ; Pestre *et al.* 2010 ; De Castro *et al.* 2007]

Dans la population de patients contaminés par le virus du SIDA, la PCP permet souvent la découverte de la séropositivité de ces patients (37 % des PCP diagnostiquées à Nancy chez les VIH+) et les classe ainsi au stade SIDA. C'est pourquoi peu de patients de notre étude sont sous trithérapie et/ou sous prophylaxie lors du diagnostic de la PCP. Une étude japonaise rapporte que 63 % des cas de pneumocystose sur un terrain de VIH surviennent chez des patients ignorant leur infection virale. [Fujii *et al.* 2007]

- Prophylaxie primaire

De plus en plus de patients atteints d'hémopathies malignes et notamment ceux recevant une allo- ou autogreffe de moëlle osseuse se voient prescrire un traitement prophylactique anti-*Pneumocystis* en systématique. [De Castro *et al.* 2007] Dans notre groupe de malades non VIH, aucun ne recevait de molécule préventive. Il pourrait être intéressant d'envisager cette pratique dès lors qu'il existe un facteur de risque important. Les principaux freins de la prophylaxie systématique résident dans les effets indésirables générés par le TMP-SMX (cytopénies fortement préjudiciables en cas d'hémopathies) et la crainte d'apparition de souches résistantes à cette molécule. [Roblot *et al.* 2002] Des mutations de Pj au niveau de la DHPS apparaîtraient chez 11 à 47.7 % des patients sous prophylaxie. Elles sont supposées être à l'origine d'échecs de prophylaxie. [De Castro *et al.* 2007]

Actuellement, chez les patients non infectés par le VIH, il existe peu de recommandations concernant la prescription d'une prophylaxie anti-*Pneumocystis*. [Catherinot *et al.* 2010]

A contrario, dans la population de VIH positif, les recommandations concernant la mise en place d'un traitement préventif sont bien codifiées. Dès lors que le taux de lymphocytes CD4 est inférieur à 200 cellules par microlitre, un traitement par TMP-SMX est instauré. [Roux *et*

al. 1998] Un certain nombre de patients, ignorant leur séropositivité au moment du diagnostic de la PCP, ne bénéficie donc pas de prophylaxie anti-Pj. Dans l'étude nancéenne, seulement un patient reçoit un traitement prophylactique (CD4 à 53/ μ L). Chez ce patient, il existe un contexte de multirésistances aux antirétroviraux, permettant d'émettre quelques réserves quant à l'observance des traitements. Les cas de PCP décrits chez les patients VIH sous prophylaxie anti-Pj font souvent mention de problèmes de tolérance et surtout de non observance du traitement. [Magne *et al.* 2009]

2. Caractérisation de la pneumocystose

a) Clinique

La pneumocystose est d'apparition brutale chez les patients non VIH alors qu'elle présente un début beaucoup plus insidieux et progressif chez les VIH positifs comme en témoignent les données concernant le délai entre les premiers symptômes et le diagnostic (quasiment deux fois plus long chez les patients infectés par le VIH dans notre analyse). En moyenne, ce délai est porté à 28 jours chez les patients VIH et se réduit à 5 jours chez les immunodéprimés non VIH. [Kovacs *et al.* 1984]

Les manifestations cliniques sont beaucoup plus bruyantes dans la population de non VIH (durée d'hospitalisation plus longue, recours à la ventilation mécanique plus fréquent) et le pronostic est plus sombre dans ce groupe de patients. Une moindre inflammation chez les patients contaminés par le VIH est corrélée avec une meilleure oxygénation et par conséquent un recours à la ventilation mécanique moins fréquent. Cette complication étant un facteur de mauvais pronostic, la survie est ainsi meilleure dans la population de patients VIH. [Thomas *et al.* 2004 ; Roblot *et al.* 2002] Il apparaît donc important de réduire le délai entre les premiers symptômes et le diagnostic pour une prise en charge de la PCP plus rapide afin de limiter les complications. Ceci souligne donc l'intérêt de mettre en place un traitement empirique dans l'attente des résultats de laboratoire.

L'évolution apparaît plus favorable dans le groupe de VIH avec une mortalité moins importante (VIH : 7 %, non VIH : 28 %). Le taux de mortalité est très variable en fonction du terrain d'immunodépression : entre 10 et 20 % chez les VIH contre 30 à 60 % chez les non VIH. [Fujii *et al.* 2007] Cependant, il n'est pas toujours aisé de déterminer l'imputabilité de la PCP lors de décès. En effet, le décès peut être la conséquence de l'évolution de la pathologie sous-jacente ou être causé par l'accumulation de plusieurs pathologies.

b) Diagnostic biologique

La charge fongique est plus importante chez les patients contaminés par le VIH ce qui permet un meilleur diagnostic biologique dans cette population. [Tasaka *et al.* 2010] Ceci se vérifie dans l'étude nancéenne avec un diagnostic biologique posé à partir d'un nombre plus restreint de techniques de microscopie positives (charge fongique faible) dans le groupe de non VIH. De plus, un nombre moins important de kystes est visualisable en IFI dans ce groupe de patients.

Le taux de lymphocytes T-CD4 semble plus élevé dans la population de patients non infectés par le VIH (non VIH : 341/ μ L ; VIH : 46/ μ L) bien que cette donnée soit peu disponible pour ces patients. Magne *et al.* dénombrent quant à eux, 30 lymphocytes CD4 par microlitre pour les patients VIH positifs et 158 par microlitre pour les VIH négatifs. [Magne *et al.* 2009] Contrairement aux patients infectés par le VIH pour lesquels un taux de CD4 inférieur à 200 cellules par microlitre est un facteur de risque de PCP, il n'existe pas de valeur équivalente pour les immunodéprimés non VIH. Une étude a cependant démontré que le taux de CD4 diminue significativement au cours d'un épisode de PCP dans une population d'immunodéprimés non VIH par rapport à des individus sains (61/ μ L *versus* 834/ μ L). Elle constate aussi que 91 % des patients non VIH avaient un taux de CD4 inférieur à 300 cellules par microlitre au moment du diagnostic de la PCP. [Mansharamani *et al.* 2000]

La séropositivité des patients étant souvent découverte au moment du diagnostic de la PCP, les immunodéprimés par le VIH présentent donc une forte charge virale VIH et un très faible taux de lymphocytes T-CD4.

Dans l'ensemble, malgré un effectif moyen, l'analyse lorraine sur la pneumocystose met en évidence les mêmes aspects épidémio-clinico-biologiques que les autres études mondiales. Pour résumer, les cas de PCP dans la population infectée par le VIH tendent à régresser au détriment des patients immunodéprimés non VIH pour lesquels la survenue de PCP est en nette recrudescence.

Comparée aux patients contaminés par le VIH, la PCP chez les patients non VIH est de manifestation plus brutale, plus bruyante et de moins bon pronostic, malgré une charge fongique plus faible.

Partie 3

*Détection de Pneumocystis jirovecii dans les
prélèvements respiratoires par biologie moléculaire*

I. Problématique

Devant des suspicions cliniques et/ou radiologiques de pneumocystose, la confirmation du diagnostic repose sur la détection de Pj dans les prélèvements respiratoires. Cependant, les techniques de microscopie habituellement utilisées sont de sensibilité limitée même l'immunofluorescence qui est apparue comme une avancée pour le diagnostic biologique de la PCP. De plus, l'émergence de nouvelles populations à risque d'infection à Pj présentant une charge fongique faible fait craindre un résultat microscopique faussement négatif. Cette difficulté diagnostique est préjudiciable puisqu'elle induit une prise en charge plus tardive et donc un risque accru de complications assombrissant alors le pronostic du patient.

Devant ces limites analytiques, il semblait intéressant de mettre en place au sein du laboratoire une technique de biologie moléculaire pour mettre en évidence le génome de *Pneumocystis jirovecii* dans les prélèvements respiratoires. Idéalement, cette technique, sensible et rapide, pourrait dépister le micro-organisme même lors de faibles charges fongiques. De ce fait, nous avons été amenés à nous poser les questions suivantes. La PCR en temps réel apporte-t-elle réellement un gain par rapport à une technique d'immunofluorescence indirecte ? Comment s'effectue le choix d'une technique de biologie moléculaire ? Quels éléments entrent en ligne de compte ?

Deux études tenteront de répondre à ces interrogations. Dans un premier temps, une confrontation des résultats obtenus par la technique de PCR « maison » et par microscopie permet d'évaluer l'apport de la biologie moléculaire. Dans un second temps, une comparaison des kits commerciaux de qPCR avec la technique « maison » est réalisée en vue du choix de l'outil moléculaire à instaurer pour le diagnostic de PCP.

II. Matériels et méthodes

A. Microscopie versus PCR en temps réel « maison »

1. Prélèvements respiratoires

Les échantillons de notre étude proviennent de patients du CHU de Nancy (ou demandes de recherche de Pj des établissements extérieurs) qui présentaient des manifestations cliniques et/ou radiologiques justifiant la recherche de *Pneumocystis jirovecii* dans les LBA ou aspirations bronchiques par les techniques traditionnelles de microscopie. Les prélèvements respiratoires ont été récoltés pendant un an à partir du mois d'août 2010.

2. Techniques microscopiques

Pour la recherche de Pj dans les prélèvements respiratoires, le laboratoire réalise plusieurs techniques : une coloration MGG pour visualiser les trophozoïtes (formes végétatives), une coloration au bleu de toluidine et une technique d'immunofluorescence indirecte (Monofluo™ kit *P. jirovecii*, Bio-Rad) pour mettre en évidence les kystes (asques).

3. Extraction d'ADN

Selon l'aspect de l'échantillon, l'extraction s'effectue soit de manière automatisée par la technique MagNa® Pure (Roche Diagnostics) (prélèvement fluide), soit à l'aide d'un kit d'extraction manuelle High Pure Template Preparation Kit® (Roche) (prélèvement épais) selon les recommandations fournisseurs. Quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, 50 µL d'extraits d'ADN sont obtenus à partir de 200 µL de prélèvement. Les extraits ainsi récoltés sont soit directement amplifiés soit conservés au congélateur à – 80°C en vue d'une PCR ultérieure.

4. PCR en temps réel « maison »

a) Principe

La PCR en temps réel « maison » permet l'amplification spécifique du gène codant pour la grande sous-unité ribosomale de l'ADN mitochondrial (mtLSU).

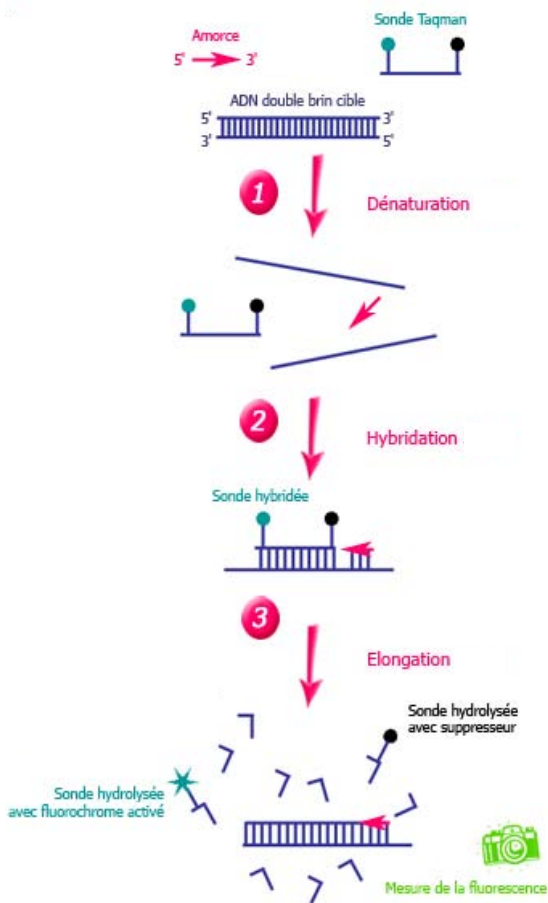
Simultanément à la PCR *Pneumocystis jirovecii*, une PCR albumine est réalisée sur les échantillons, celle-ci sert de témoin d'inhibition et de témoin cellulaire pour contrôler l'extraction. Cette PCR pourra aussi permettre de réaliser une quantification relative de la charge fongique, palliant ainsi les rendements variés des prélèvements respiratoires.

Les deux PCR sont réalisées sur le thermocycleur LightCycler[®] commercialisé par Roche Diagnostics.

La technologie utilisée fait appel aux sondes Taqman. Celles-ci possèdent un émetteur (reporter) à l'une de leurs extrémités et un suppresseur (quencher) à l'autre. Lorsque la sonde est intacte, le suppresseur inhibe le signal de l'émetteur. Au moment de l'élongation, l'ADN polymérase hydrolyse la sonde, mettant ainsi l'émetteur à distance du suppresseur. Un signal de fluorescence est alors observé (fig. 24).

Pour vérifier le bon fonctionnement de la réaction, les extraits d'ADN des patients diagnostiqués fortement infectés par les techniques de microscopie sont utilisés comme contrôles positifs des deux PCR. L'eau est employée comme témoin négatif.

L'amplification est appréciée en nombre de cycles (Ct).



Sonde Taqman
5' fluorochrome émetteur (reporter)
3' fluorochrome suppresseur (quencher)

Si quencher et reporter à proximité
 Inhibition de l'émission du reporter

Hybridation amorce + sonde

Hydrolyse par l'ADN polymérase
 Séparation reporter et quencher
 Emission de fluorescence par reporter

Figure 24 : Principe de la sonde Taqman (d'après <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>)

b) Mélange réactionnel

La réaction se produit sous un volume total de 20 μL (15 μL de mélange réactionnel et 5 μL d'ADN à tester). Le mélange réactionnel se compose des amorces Pj (10 μM) « sens » et « anti-sens », de la sonde Taqman Pj (4 μM), du LightCycler[®] FastStart enzyme (1a), du LightCycler[®] FastStart reaction mix hybprobe (1b), du MgCl_2 et de la solution tampon (kit LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe - Roche) (tableau 7).

La PCR albumine utilise une sonde Taqman albumine (4 μM), des amorces albumine (10 μM) « sens » et « anti-sens » ainsi que le même mélange réactionnel que la PCR Pj (LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe - Roche). Les séquences des amorces et des sondes Taqman des deux PCR sont mentionnées dans les tableaux 8 et 9.

Les échantillons additionnés au mélange réactionnel sont déposés dans les capillaires du LightCycler[®] (Roche Diagnostics) qui sont ensuite bouchés, centrifugés 10 secondes à 3000 tours par minute (centrifugeuse MIKRO20) et placés dans le carrousel du LightCycler[®].

Tableau 7 : Mélange réactionnel pour un échantillon (PCR « maison »)

Réactifs	Pour 1 capillaire (μL)
Eau (kit)	4,6
MgCl_2 (kit)	2,4
Mélange 1 (60 μL de 1b dans 1a)	2
Amorce "sens" [10 μM]	2
Amorce "anti-sens" [10 μM]	2
Sonde Taqman [4 μM]	2

Tableau 8 : Séquences des amorces (PCR « maison »)

	Amorces « sens »	Amorces « anti-sens »
PCR Pj	5'-CTT AAA ATA AAT AAT CAG ACT ATG TGC GAT AAG-3'	5'-GGA GCT TTA ATT ACT GTT CTG GGC-3'
PCR albumine	5'-TGT TGC ATG AGA AAA CGC CA-3'	5'-GTC GCC TGT TCA CCA AGG AT-3'

Tableau 9 : Séquences des sondes Taqman (PCR « maison »)

	Sondes Taqman
PCR Pj	5'-[FAM]TAG ATA GTC GAA AGG GAA AC[NFQ/MGB]-3'
PCR albumine	5'-[FAM]AAG TGA CAG AGT CAC CAA ATG CTG CCA CAG[TAM]-3'

c) Programme PCR

La phase de dénaturation se fait en un cycle sous une température de 95°C pendant 15 minutes.

Elle est suivie de la phase d'amplification composée de 45 cycles. Chaque cycle comprend deux étapes : la dénaturation de 15 secondes à 95°C suivie de l'hybridation - élongation d'une minute à 59°C. L'acquisition du signal de fluorescence se fait à chaque cycle pendant la phase à 59°C. Pour terminer, la phase de refroidissement s'effectue pendant 30 secondes à 40°C.

B. Kits commerciaux versus PCR « maison »

1. Choix des échantillons testés

Quatorze LBA ont été soigneusement choisis parmi notre collection afin d'en tester deux négatifs (microscopie et PCR « maison »), deux positifs (microscopie et PCR « maison ») et dix dont les résultats microscopie / PCR sont discordants. L'extraction d'ADN a été réalisée de la même manière que précédemment.

2. PCR Bio-Evolution

a) Principe

Le kit PCR en temps réel *Pneumocystis jirovecii*[®] de Bio-Evolution permet une amplification spécifique d'un fragment du gène mtLSU de Pj et d'une région de la β -actine humaine (contrôle cellulaire d'inhibition). La technologie utilisée fait également appel aux sondes Taqman. Les deux sondes spécifiques (de Pj et du contrôle cellulaire) sont marquées par un fluorochrome différent (FAM pour Pj et HEX pour le contrôle cellulaire) émettant ainsi une fluorescence spécifique.

L'analyse est réalisée sur un thermocycleur de type ABI[®]Prism (Applied BioSystem).

La trousse est dotée d'un contrôle positif qui peut être dilué pour réaliser une gamme en quatre points. Les résultats sont rendus en nombre de cycles (Ct) et en nombre de copies par microlitre quand la gamme de quantification est réalisée.

b) Mélange réactionnel

Le coffret contient deux mélanges réactionnels prêts à l'emploi. Le mélange réactionnel enzymatique contient le tampon, le chlorure de magnésium, les nucléotides triphosphates et la Taq polymérase thermoactivable. Celui de réaction contient les différentes amorces et sondes. Ces deux mélanges réactionnels additionnés selon les proportions mentionnées dans la figure 25 constituent alors le Master Mix.

La réaction s'effectue sous un volume total de 25 μ L (20 μ L de Master Mix et 5 μ L d'ADN à tester).

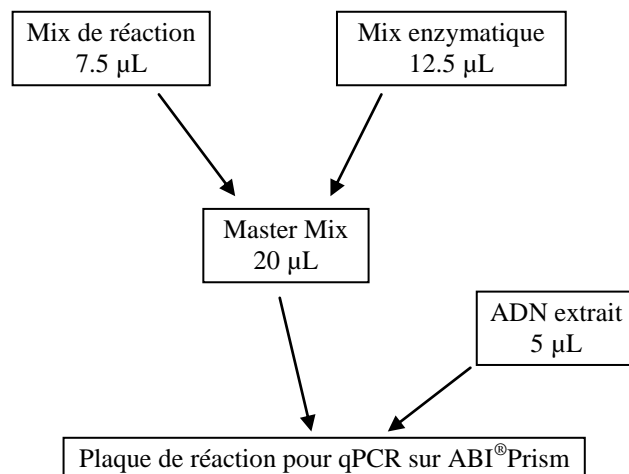


Figure 25 : Mélange réactionnel de la PCR Bio-Evolution pour un échantillon

c) Programme PCR

La phase d'activation de la Taq polymérase et de dénaturation se fait en un cycle sous une température de 95°C pendant 30 secondes.

Elle est suivie de la phase d'amplification composée de 40 cycles. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de 10 secondes à 95°C suivie d'une étape d'hybridation-élongation de 45 secondes à 58°C. L'acquisition du signal de fluorescence se fait à chaque cycle pendant l'élongation. Pour terminer, la phase de refroidissement s'effectue durant un cycle d'une seconde à 37°C.

3. PCR Roche

a) Principe

Le kit LightMix® *Pneumocystis jirovecii* est commercialisé par Roche. Il permet l'amplification du gène MSG de Pj par la technologie FRET (fig. 26) sur LightCycler®. La détection se fait grâce à des sondes d'hybridation marquées au LightCycler® Red 640.

Le bon déroulement de la réaction se vérifie grâce à l'amplification d'un autre fragment d'ADN situé au niveau d'un contrôle interne. Les sondes d'hybridation sont alors marquées avec le LightCycler® Red 690.

Le test comprend un contrôle interne, un contrôle positif et une gamme de quantification constituée de 6 points.

Les résultats sont rendus en nombre de cycles (Ct) et en nombre de copies par microlitre quand la gamme est réalisée.

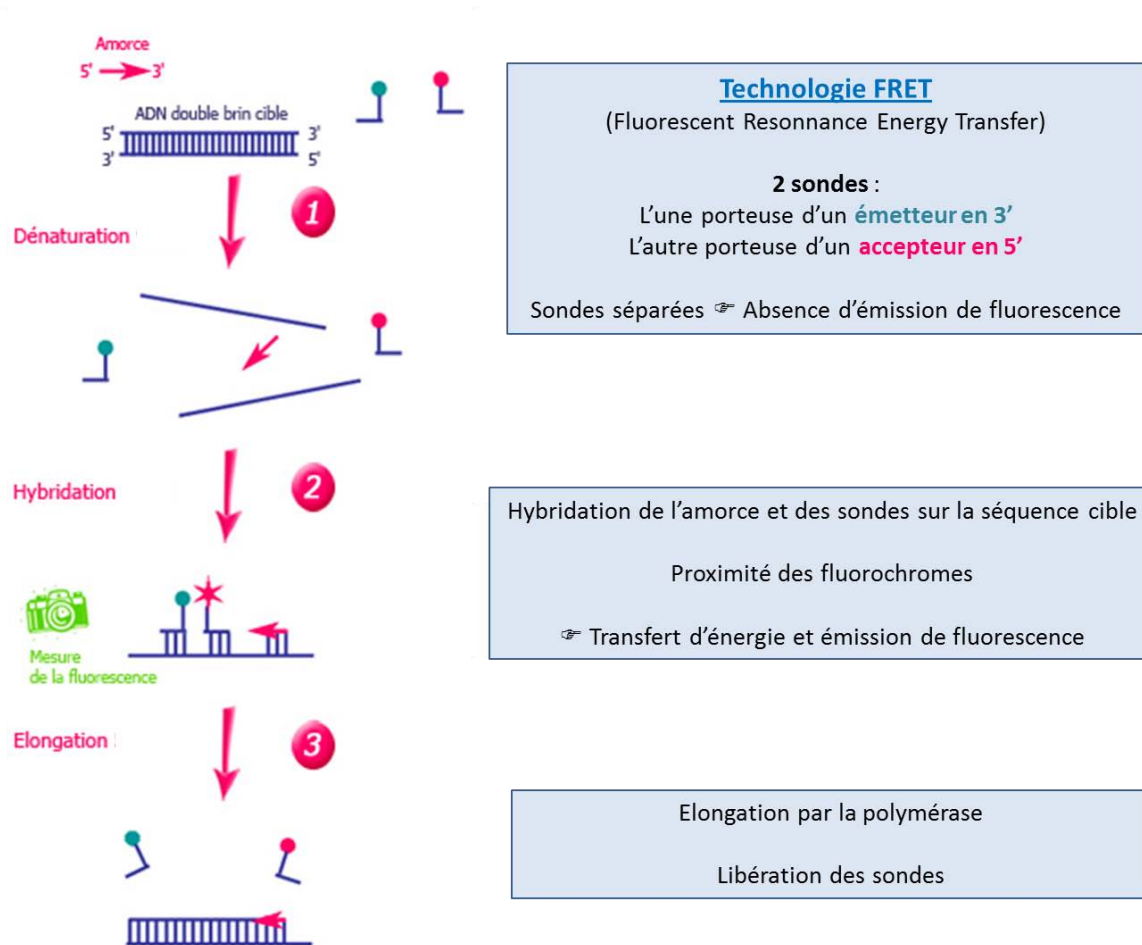


Figure 26 : Technologie FRET (d'après <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>)

b) Mélange réactionnel

La réaction s'effectue sous un volume total de 20 μL (15 μL de mélange réactionnel et 5 μL d'ADN à tester). La reconstitution des réactifs s'effectue selon les recommandations du fournisseur. Le mélange réactionnel se compose du mélange réactionnel réactif et du mélange réactionnel du contrôle interne (IC) contenus dans le kit LightMix[®] *Pneumocystis jirovecii* (Roche), ainsi que du Roche Master, du MgCl_2 et de l'eau PCR contenus dans le kit LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (Roche) (tableau 10).

Dans un souci de clarté du tableau, le kit LightMix[®] *Pneumocystis jirovecii* (Roche) est appelé kit n°1 et le kit LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (Roche), kit n°2.

Tableau 10 : Constitution du mélange réactionnel pour un échantillon (PCR Roche)

Réactifs	Pour un capillaire (μL)
Eau PCR (kit n°2)	6,6
Mg^{2+} (kit n°2)	2,4
Mélange réactionnel Réactif (kit n°1)	2
Mélange réactionnel IC (kit n°1)	2
Roche Master (kit n°2)	2

c) Programme PCR

La phase de dénaturation se fait en un cycle sous une température de 95°C pendant 10 minutes.

Elle est suivie de la phase d'amplification composée de 50 cycles. Chaque cycle comprend trois étapes : la dénaturation (5 secondes à 95°C), l'hybridation (5 secondes à 62°C) et l'élongation (15 secondes à 72°C). L'acquisition du signal de fluorescence se fait à chaque cycle pendant l'étape d'hybridation.

Pour terminer, la phase de refroidissement s'effectue pendant 30 secondes à 40°C (un cycle).

III. Résultats

A. Comparaison de la PCR en temps réel « maison » aux techniques de microscopie

Pour apprécier le bénéfice apporté par la biologie moléculaire, une étude comparative entre la PCR « maison » et les techniques habituelles de microscopie a été mise en œuvre sur une période d'une année.

1. Résultats bruts

L'analyse comparative porte sur un total de 261 prélèvements respiratoires. Trois pour cent des échantillons (n = 9) sont à la fois positifs en microscopie (par au moins une technique) et en PCR. Quatre-vingt-quatre pour cent des prélèvements (n = 218) ont été diagnostiqués négatifs quel que soit le mode de dépistage utilisé. Enfin, dans 13 % des cas (n = 34), les résultats de microscopie et de biologie moléculaire sont discordants. Le tableau 11 récapitule l'ensemble de ces données.

Tableau 11 : Comparaison de la PCR « maison » aux techniques microscopiques

Microscopie PCR	Négatif	Positif
Négatif	84 % (n = 218)	0 % (n = 0)
Positif	13 % (n = 34)	3 % (n = 9)

2. Résultats concordants positifs

Parmi les prélèvements positifs en biologie moléculaire et en microscopie, 11.1 % (n = 1) n'ont qu'une seule technique de microscopie douteuse (bleu de toluidine). L'amplification de l'ADN de Pj est alors visible à 32 cycles de PCR.

Deux techniques de microscopie (IFI et bleu de toluidine) mettent en évidence le micro-organisme dans 44.4 % (n = 4) des cas concordants. Le nombre de cycles oscille alors entre 27 et 34.

Enfin, dans 44.4 autres pour cent (n = 4) de ces prélèvements, les trois techniques de microscopie (IFI, bleu de toluidine et MGG) apparaissent positives. L'amplification est constatée entre 22 et 26 cycles. Le détail des résultats concordants est visualisable dans le tableau 12.

Lorsque les méthodes sont concordantes, le nombre moyen de cycles est évalué à 27.

Tableau 12 : Analyse des résultats positifs en microscopie et en biologie moléculaire

N° patient	Microscopie			PCR « maison »
	MGG	Bleu de Toluidine	IF	Nombre de cycles (Ct)
31	Négatif	Positif	Très rares kystes	34,31
47	Négatif	Positif	Nombreux kystes	28,19
48	Positif	Positif	Quelques kystes	25,74
56	Positif	Positif	Nombreux kystes	22,31
73	Négatif	Douteux	Négatif	32,24
113	Positif	Positif	Nombreux kystes	24,41
218	Négatif	Positif	Quelques kystes	28
248	Positif	Positif	Nombreux kystes	22,9
256	Négatif	Positif	Nombreux kystes	26,66

De manière générale, l'analyse des résultats concordants révèle que le nombre de cycles augmente lorsque le nombre de techniques de microscopie positives diminue (tableau 13).

D'après l'étude nancéenne, pour un nombre de cycles inférieur à 30, au moins une technique de microscopie est positive dans la majorité des cas.

Tableau 13 : Evolution des Ct en fonction du nombre de techniques de microscopie positives

Nombre de techniques de microscopie positives	IFI (kystes)	PCR Ct
3	Quelques à nombreux	Entre 22 et 26
2	Quelques à nombreux	Entre 27 et 28
	Très rares kystes	34
1 douteuse	Négative	32

3. Résultats discordants

Lorsqu'il existe une discordance entre la biologie moléculaire et les techniques de microscopie, dans tous les cas, la mise en évidence de *Pneumocystis* sp. est réalisée grâce à la PCR. Les colorations MGG ou bleu de toluidine et l'immunofluorescence indirecte s'avèrent alors négatives. La PCR révèle un nombre de cycles moyen de 36 (Ct entre 24 et 46) (tableau 14). Le nombre moyen de cycles est donc plus élevé en cas de discordances que lorsque les résultats microscopie/biologie moléculaire sont concordants (Ct à 27) (tableau 12). Il faut souligner la particularité des patients n^{os} 88, 184 et 210, négatifs en microscopie, mais fortement positifs en biologie moléculaire. Les Ct sont alors respectivement de 26.75, 24.3 et 27.73 (tableau 14).

Tableau 14 : Analyse des résultats discordants entre la PCR et la microscopie

N° patient	Microscopie			PCR « maison »
	MGG	Bleu de Toluidine	IFI	Nombre de cycles (Ct)
7	Négatif	Négatif	Négatif	45,72
8	Négatif	Négatif	Négatif	43,89
23	Négatif	Négatif	Négatif	33,19
27	Négatif	Négatif	Négatif	39,07
36	Négatif	Négatif	Négatif	40,1
39	Négatif	Négatif	Négatif	38,12
70	Négatif	Négatif	Négatif	37,15
72	Négatif	Négatif	Négatif	33,31
78	Négatif	Négatif	Négatif	43,1
86	Négatif	Négatif	Négatif	35,79
88	Négatif	Négatif	Négatif	26,75
95	Négatif	Négatif	Négatif	37,8
97	Négatif	Négatif	Négatif	34,56
131	Négatif	Négatif	Négatif	33,33
137	Négatif	Négatif	Négatif	34,28
138	Négatif	Négatif	Négatif	36,64
149	Négatif	Négatif	Négatif	38,98
151	Négatif	Négatif	Négatif	36,18
162	Négatif	Négatif	Négatif	32,89
166	Négatif	Négatif	Négatif	32,49
169	Négatif	Négatif	Négatif	37,46
172	Négatif	Négatif	Négatif	33,35
177	Négatif	Négatif	Négatif	37,28
184	Négatif	Négatif	Négatif	24,3
192	Négatif	Négatif	Négatif	38,59
195	Négatif	Négatif	Négatif	35,48
197	Négatif	Négatif	Négatif	42,53
205	Négatif	Négatif	Négatif	38,75
209	Négatif	Négatif	Négatif	40,15
210	Négatif	Négatif	Négatif	27,73
217	Négatif	Négatif	Négatif	40
224	Négatif	Négatif	Négatif	40,86
246	Négatif	Négatif	Négatif	34,65
252	Négatif	Négatif	Négatif	33,88

B. Comparaison de la PCR « maison » à des kits commerciaux

Dans le cadre de la mise en évidence du génome de *Pneumocystis jirovecii* dans les prélèvements respiratoires, deux kits commerciaux (Roche et Bio-Evolution) ont été comparés à la PCR « maison » afin de choisir la technique de biologie moléculaire la plus adaptée.

Le tableau 15 récapitule les résultats de l'étude comparative.

1. Echantillons positifs

Pour les patients atteints de PCP (patients n^{os} 48 et 113), l'ADN de Pj est amplifié quelle que soit la technique de PCR en temps réel utilisée. Le nombre de cycles est comparable entre la PCR « maison » et le kit Roche (25 cycles en moyenne). Le Ct est un peu plus faible pour le kit Bio-Evolution (environ 21 cycles).

La quantification varie d'une puissance de 10 entre les deux kits commerciaux avec un nombre de copies par microlitre plus élevé pour la PCR Bio-Evolution.

2. Echantillons négatifs

Concernant les prélèvements respiratoires exempts de Pj (patients n^{os} 105 et 120), les résultats de biologie moléculaire sont concordants (absence d'amplification avec les trois techniques).

3. Echantillons avec détection de Pj uniquement par biologie moléculaire

Parmi les 10 prélèvements respiratoires sélectionnés avec une détection de Pj uniquement par biologie moléculaire, les résultats varient en fonction de la technique employée.

En termes de nombre de cycles, les PCR Bio-Evolution et « maison » rendent des résultats similaires dans la mesure où une amplification est observée pour tous les échantillons. Il faut toutefois noter que la détection de l'amplification est souvent plus précoce de quelques cycles (2.4 en moyenne) (de 0.08 à 5 cycles) pour le kit Bio-Evolution (à l'exception des patients n^{os} 95 et 97).

Le kit commercialisé par Roche ne détecte pas Pj pour cinq échantillons alors que de l'ADN est amplifié par les autres PCR en temps réel (patients n^{os} 23, 27, 36, 78 et 95). Les LBA négatifs avec Roche ont des Ct compris entre 33 et 39 avec le kit Bio-Evolution.

De plus, les cinq prélèvements pour lesquels la technique Roche amplifie de l'ADN présentent des Ct beaucoup plus élevés que ceux obtenus par les deux autres méthodes : en moyenne plus de deux cycles (2.2) après la PCR « maison » (0.02 à 5) et quatre cycles et demi après la PCR Bio-Evolution (2 à 7).

La quantification du kit Roche est dans la majorité des cas plus faible que celle évaluée par le kit Bio-Evolution (à l'exception du patient n^o 97). Le nombre de copies par microlitre peut différer jusqu'à 100 fois pour un même prélèvement (patient n^o 88) selon le kit employé.

Tableau 15 : Comparaison de la technique PCR « maison » avec deux kits commerciaux

Echantillons sélectionnés	N ^o patient	PCR « maison »	PCR Bio-Evolution		PCR Roche	
		Nombre de cycles (Ct)	Nombre de cycles (Ct)	Quantification (copies/μL)	Nombre de cycles (Ct)	Quantification (copies/μL)
Positifs	48	25,74	21,98	1,02.10 ⁵	25,57	8,507.10 ³
	113	24,41	20,75	2,75.10 ⁵	24,32	1,997.10 ⁴
Négatifs	105	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
	120	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Détection de Pj uniquement en biologie moléculaire	23	33,19	33,11	12,38	Négatif	Négatif
	27	39,07	38,45	1,64.10 ⁻¹	Négatif	Négatif
	36	40,1	38,77	1,25.10 ⁻¹	Négatif	Négatif
	39	38,12	35,31	2,08	41,6	2,77.10 ⁻¹
	70	37,15	34,51	3,96	37,71	2,111
	78	43,1	37,78	2,80.10 ⁻¹	Négatif	Négatif
	86	35,79	31,88	33,55	35,81	7,754
	88	26,75	24,15	1,76.10 ⁴	31,33	1,655.10 ²
	95	37,8	38,9	1,13.10 ⁻¹	Négatif	Négatif
	97	34,56	34,74	3,31	36,83	3,848

IV. Discussion

A. Comparaison de la PCR en temps réel « maison » aux techniques de microscopie

La PCR en temps réel met en évidence la présence du génome de Pj dans 13 % des prélèvements respiratoires du CHU de Nancy pour lesquels l'IFI est négative. Ceci peut traduire soit une meilleure sensibilité de la PCR (présence de faux négatifs en microscopie), soit une meilleure spécificité des techniques microscopiques (présence de faux positifs en biologie moléculaire).

1. Sensibilité

La sensibilité se définit comme la probabilité d'obtenir un test positif chez les malades. La sensibilité est le rapport des vrais positifs sur la somme des vrais positifs et des faux négatifs. Dans l'étude comparative lorraine, si la microscopie est prise comme référence, la sensibilité de la PCR « maison » est de 100 %. La supériorité de la biologie moléculaire en termes de sensibilité a déjà été démontrée par ailleurs. [Brancart *et al.* 2005] En considérant le diagnostic clinique comme référence, la sensibilité de la PCR quantitative atteint 100 % alors qu'elle n'est que de 60 % pour les techniques de microscopie. [Flori *et al.* 2004]

La moindre sensibilité des techniques de microscopie (présence de faux négatifs) peut s'expliquer par une lecture difficile des prélèvements pauci infectés.

Selon une équipe française, les résultats de la semi quantification par microscopie ne sont pas corrélés à la sévérité de la maladie mais dépendent fortement des facteurs d'hôte du patient. [Flori *et al.* 2004] Le terrain d'immunosuppression est donc très important à prendre en compte. En effet, les faux négatifs en microscopie sont plus fréquemment observés chez des patients non infectés par le VIH (charge fongique faible) que chez les patients séropositifs pour le VIH (charge fongique élevée). [Flori *et al.* 2004] Cette différence en fonction de la pathologie sous-jacente engendre une difficulté pour la confirmation biologique du diagnostic de PCP chez les patients non VIH.

Une charge fongique faible peut aussi s'observer dans les prélèvements respiratoires plus superficiels comme les aspirations bronchiques ou les crachats induits. La littérature rapporte des sensibilités pour les techniques microscopiques variant de 48 % à 92 % pour les liquides

broncho-alvéolaires mais plus faibles, 35 à 78 % pour les aspirations bronchiques et les crachats induits. [Rohner *et al.* 2009 ; Flori *et al.* 2004]

De plus, la répartition du champignon n'étant pas forcément homogène au sein du prélèvement, l'échantillon prélevé pour les analyses microscopiques peut parfois contenir que de très rares formes de Pj. Enfin, dans certains cas, le prélèvement adhère mal à la lame porte-objet, le dépôt peut ainsi être partiellement retiré lors de la coloration. Cela a déjà été constaté par ailleurs. [Rohner *et al.* 2009]

La lecture laborieuse et difficile en présence d'artéfacts (mucus, germes, levures ou hématies) peut également être à l'origine du manque de sensibilité des techniques de microscopie. [Kaouech *et al.* 2009]

Par ailleurs, le gain de sensibilité en PCR en temps réel pourrait s'expliquer par la concentration de l'échantillon lors des étapes d'extraction et de purification préalables. [Kaouech *et al.* 2009]

Enfin, la quantité de prélèvement utilisée pour l'examen est différente qu'il s'agisse de techniques de microscopie ou de biologie moléculaire. La probabilité de mettre en évidence le micro-organisme s'amointrit avec la réduction du volume de prélèvement analysé, d'autant plus si celui-ci est pauci infecté.

Pour la PCR, l'extraction est réalisée à partir de 200 μL de prélèvement puis un dixième (5 μL) de l'extrait obtenu (50 μL) est utilisé pour la réaction d'amplification. Ceci correspond donc à 20 μL du prélèvement de départ analysé en biologie moléculaire.

Comparativement, pour les techniques de microscopie, la quantité de prélèvement analysée est supérieure. Une goutte de prélèvement (soit environ 20 μL) est utilisée pour chaque dépôt. Au final, un volume total de 120 μL (une goutte pour le MGG, une pour le bleu de toluidine et quatre pour l'IFI) est analysé en microscopie.

La biologie moléculaire permet ainsi une analyse plus sensible sur un volume réduit de prélèvement.

2. Spécificité

La spécificité se définit comme la probabilité d'obtenir un test négatif chez les non malades. La spécificité est le rapport des vrais négatifs sur la somme des vrais négatifs et des faux positifs.

Dans l'analyse lorraine, la spécificité de la PCR « maison » est de 86.5 % en considérant la microscopie comme référence.

Il faut cependant garder à l'esprit qu'avec le diagnostic clinique pour référence, la spécificité est meilleure en microscopie qu'en biologie moléculaire (100 % en microscopie, 87 % en PCR conventionnelle et 85 % en PCR en temps réel). [Flori *et al.* 2004]

La PCR en temps réel, du fait de sa très grande sensibilité, permet la détection du génome de Pj dans les prélèvements respiratoires alors que ni kystes ni trophozoïtes ne sont observés en microscopie. Se pose alors la question de savoir s'il s'agit de véritables faux positifs ou de prélèvements avec des charges fongiques faibles détectées, à cause de la grande sensibilité des techniques de biologie moléculaire. Dans cette dernière situation, la corrélation entre la charge fongique et le tableau clinique (colonisation asymptomatique ou pneumocystose-infection) peut faire débat.

Flori et ses collaborateurs rapportent une PCR positive chez 2 à 21 % des patients asymptomatiques. [Flori *et al.* 2004] Une étude plus récente observe un taux de colonisation s'élevant à 15 % chez les non VIH et à 13 % chez les patients infectés par le VIH. [Alanio *et al.* 2011]

3. Objectivité

La PCR apparaît plus objective que les techniques de microscopie qui reposent essentiellement sur un personnel compétent et expérimenté. Comme vu précédemment, certains prélèvements peuvent présenter un certain nombre de difficultés. Il peut parfois être compliqué, même pour un lecteur chevronné, de trancher en faveur de la présence ou non du micro-organisme. De plus, la semi quantification par les techniques de microscopie apparaît subjective et s'avère être opérateur dépendante.

4. Détermination des cut-off

Devant la proportion importante de patients colonisés par Pj, il semblait indispensable de déterminer des cut-off afin de différencier la pneumocystose d'une simple colonisation.

Cependant, la comparaison des différents travaux s'avère être une tâche difficile en l'absence de standardisation de l'expression des résultats de biologie moléculaire.

a) PCP ou colonisation ?

Dans l'étude lorraine, la confrontation des nombres de cycles des échantillons positifs (microscopie et PCR) avec ceux des échantillons discordants, suggère qu'un Ct inférieur à 30 cycles serait plutôt en faveur d'une pneumocystose (charge fongique élevée).

D'après nos données, on peut supposer que la microscopie est négative pour des prélèvements avec des Ct supérieurs à 35. Cette observation est compatible avec les résultats d'une étude de qPCR (ciblant le gène *Kex-1*) réalisée sur le système ABI®Prism (Applied Biosystems). Rohner *et al.* montrent alors que la recherche de Pj par microscopie (bleu de toluidine, calcofluor white) est toujours infructueuse pour un nombre de cycles supérieur à 33 en biologie moléculaire. En effet, dans cette étude, les échantillons positifs uniquement en PCR possèdent un Ct entre 33 et 36 (correspondant à une quantification comprise entre 20 et 160 copies/mL de LBA). [Rohner *et al.* 2009]

Récemment, le travail de Alanio *et al.* met en évidence une charge fongique variant entre 134 et $1.73.10^6$ TFEq/mL lors de PCP fortement probable et entre 0.1 et 1840 TFEq/mL chez des patients à faible probabilité de PCP. Ils utilisent pour cela une qPCR ciblant le gène mtLSU réalisée sur un système PCR 7500 (Applied Biosystems). En confrontant les données cliniques, radiologiques et biologiques, deux valeurs de cut-off (120 et 1900 TFEq/mL) ont été proposées par cette équipe pour discriminer une PCP d'une colonisation (tableau 16). [Alanio *et al.* 2011]

Tableau 16 : Performances des cut-off proposés par Alanio *et al.* 2011

Performances Cut-off	Sensibilité	Spécificité
120 TFEq/mL	100 %	96.9 %
1900 TFEq/mL	85.7 %	100 %

La VPP est alors de 100 % pour les échantillons dont la quantification est supérieure à 1900 TFEq/mL et la VPN de 100 % pour les quantifications inférieures à 120 TFEq/mL.

Des études complémentaires seraient à entreprendre afin d'affiner les valeurs de cut-off proposées et de vérifier leur pertinence clinique.

b) Zone grise

L'étude, précédemment citée, propose une zone grise, définie entre 120 et 1900 TFEq/mL, pour laquelle le statut vis-à-vis de Pj est indéterminé. [Alanio *et al.* 2011]

Une autre publication propose, quant à elle, une zone grise pour des quantifications entre 10^3 et 10^4 copies par capillaire (technologie LightCycler[®], amplification du gène MSG). [Flori *et al.* 2004]

Le problème réside dans la signification clinique des Ct (ou quantifications) compris dans la zone grise. La prise en charge du patient sera différente qu'il s'agisse d'une simple colonisation (surveillance, mesures préventives éventuelles) ou d'une faible charge fongique chez un patient non VIH (prise en charge rapide de la PCP). Pour les statuts fongiques indéterminés, le suivi du patient est préconisé afin de s'assurer que ce dernier ne soit pas en phase précoce (infra-clinique) d'une pneumocystose-infection.

La biologie moléculaire présente donc l'avantage de détecter la présence de Pj même lors de faibles charges fongiques, là où la microscopie échoue. Confrontée aux données cliniques et radiologiques, elle permet une confirmation rapide du diagnostic et ainsi une meilleure prise en charge de la pneumocystose notamment chez les patients non contaminés par le virus du SIDA.

B. Comparaison de la PCR « maison » à des kits commerciaux

Avant toute comparaison et au vu de la conjoncture actuelle, il est important de garder à l'esprit que l'accréditation d'une technique commercialisée est plus simple que celle d'une technique « maison ». Il est donc aisé de comprendre l'intérêt porté aux kits développés par les fabricants.

Le comparatif des deux techniques commerciales est récapitulé dans le tableau 17.

Tableau 17 : Comparatif des kits commerciaux

	Avantages	Inconvénients
PCR Roche	<ul style="list-style-type: none">• Automate : LightCycler®• Durée : 35 minutes• Gamme prête à l'emploi• 6 points de gamme	<ul style="list-style-type: none">• Mélange réactionnel compliqué• Support : capillaires• Absence d'amplification des échantillons de faible charge fongique• Problèmes de fiabilité• Absence de marquage « CE »
PCR Bio-Evolution	<ul style="list-style-type: none">• Mélange réactionnel simple• Support : plaques• Durée : 40 minutes• Amplification des échantillons pauci infectés• Bonne performance (amplification précoce)• Marquage « CE » prévu pour octobre 2011	<ul style="list-style-type: none">• Automate : ABI®Prism• Gamme obtenue par dilutions successives du témoin positif• 4 points de gammes

1. Aspects pratiques

a) Facilité d'utilisation du kit

La mise en œuvre de la qPCR est plus facile avec les kits commerciaux. En effet, le kit contient déjà tous les réactifs ainsi que les contrôles vérifiant le bon fonctionnement de la réaction d'amplification. La constitution d'une collection de patients positifs (servant de témoins positifs) n'est donc pas nécessaire. Ce point peut rapidement devenir limitant car comme nous avons pu le constater lors de l'étude épidémiologique, le nombre de prélèvements positifs est nettement inférieur au nombre total de demandes de recherche de Pj. Les témoins positifs des kits disposent en outre d'une quantification bien déterminée.

Pour la qPCR Bio-Evolution, les mélanges réactionnels sont prêts à l'emploi. Il suffit de mélanger les deux mélanges réactionnels puis d'ajouter l'ADN de l'échantillon à tester. De plus, la réaction de polymérisation en chaîne s'effectue en plaque. Ce support est beaucoup moins fragile que les capillaires employés lors des PCR sur LightCycler® (PCR « maison » et Roche).

L'intérêt de la qPCR Roche réside dans l'utilisation du même thermocycleur que celui employé avec la PCR en temps réel « maison », donc connu par le personnel technique.

La réalisation du mélange réactionnel de la qPCR Roche s'apparente à celle de la technique « maison ». La technique du kit Roche est donc plus compliquée à mettre en œuvre que celle développée par Bio-Evolution. Le gain pratique est plus limité si le choix porte sur la technique Roche.

b) Durée de la réaction d'amplification

Le temps de réaction est réduit de moitié avec les kits commerciaux (40 minutes pour PCR Bio-Evolution et 35 minutes pour PCR Roche) par rapport à la technique « maison » (75 minutes).

Ce gain de temps ajouté à une réalisation de mélange réactionnel simplifiée, donc plus rapide, sont des atouts majeurs en faveur des kits commerciaux.

c) Gamme de quantification

Un des inconvénients notoire du kit Bio-Evolution est la réalisation de la gamme de quantification par dilutions successives du contrôle positif. Cette manipulation peut générer

des erreurs de dilution ainsi que des contaminations à l'origine d'une gamme de quantification erronée.

A contrario, ces risques sont limités avec l'autre kit puisque les points de gamme de la qPCR Roche sont contenus dans une barrette où il suffit d'ajouter le diluant dans chaque puits.

De plus, cette dernière qPCR présente l'avantage de posséder six points de gamme alors que le kit Bio-Evolution n'en dénombre que quatre. Un plus grand nombre de points de gamme permet, en théorie, une quantification plus précise de l'échantillon.

2. Aspects analytiques

a) Choix de la technique PCR

Il existe deux types de PCR pour la mise en évidence du génome de *Pneumocystis jirovecii* : la PCR conventionnelle et la PCR en temps réel.

(1) PCR conventionnelle

Actuellement, avec le développement de techniques en temps réel, l'utilisation de PCR conventionnelle pour la recherche de Pj en routine ne semble pas représenter la meilleure stratégie. En effet, bien que très sensible, la PCR conventionnelle possède une spécificité moyenne et une valeur prédictive positive médiocre. [Flori *et al.* 2004 ; Catherinot *et al.* 2010] C'est une technique qualitative longue qui nécessite deux étapes successives : l'amplification du fragment d'intérêt puis l'analyse des amplicons (par électrophorèse, hybridation ou séquençage). La manipulation des produits d'amplification peut être à l'origine de contaminations. Ces inconvénients limitent l'utilisation de la PCR conventionnelle en pratique clinique. [Mathys *et al.* 2007]

(2) PCR en temps réel

La stratégie analytique serait plutôt d'opter pour une technique en temps réel. Cette technique quantitative permet de déterminer le nombre de copies du gène d'intérêt dans le prélèvement. Le principal avantage de la PCR en temps réel est la réalisation simultanée des étapes d'amplification et de détection dans un système clos, d'où des risques de contamination réduits. Le délai de rendu des résultats est relativement court pour une technique de biologie moléculaire. A partir d'un échantillon extrait, les résultats sont obtenus en deux heures en

moyenne. De surcroît, un seuil de signification clinique pourrait être déterminé dans le futur pour différencier la colonisation de la pneumocystose. [Catherinot *et al.* 2010 ; Arcenas *et al.* 2006 ; Rohner *et al.* 2009] Comme nous l'avons mentionné précédemment, une étude récente propose des valeurs de cut-off à 120 et 1900 TFEq/mL permettant d'obtenir une VPP et une VPN de 100 %. [Alanio *et al.* 2011] D'autres travaux doivent être entrepris afin de confirmer ces seuils ainsi que leur signification clinique.

b) ADN cible

(1) De nombreuses cibles potentielles...

Le choix de la séquence à amplifier joue un rôle important dans le diagnostic de pneumocystose. La stratégie analytique est soit de choisir un gène présent en une seule copie ou, au contraire, de cibler un fragment d'ADN possédant plusieurs copies au sein du micro-organisme. De nombreuses combinaisons gène d'intérêt / technique de PCR ont été publiées. Les principales cibles d'ADN à amplifier sont les régions ITS (internal transcribed spacer), 5S et 18S de l'ADN nucléaire, la large sous-unité ribosomale de l'ADN mitochondrial (mtLSU), la DHPS (dihydroptéroate synthase), la DHFR (dihydrofolate reductase), la TS (thymidylate synthase), la β -tubuline, le gène *cdc2* et la glycoprotéine de surface (MSG). [Beard *et al.* 2004 ; Durand-Joly *et al.* 2005 ; Robberts *et al.* 2007]

Une étude sud-africaine comparant 9 stratégies différentes révèle que les PCR ciblant les gènes des enzymes DHPS et DHFR, de l'ITS ou de la région 18S obtiennent des résultats médiocres. *A contrario*, la PCR nichée ciblant la mtLSU de l'ADN mitochondrial et la qPCR ciblant la région 5S possèdent de bons taux de détection. De plus, les sensibilités de ces deux PCR apparaissent satisfaisantes (100 % et 88 % respectivement). [Robberts *et al.* 2007]

Avec les avancées actuelles en biologie moléculaire et pour les raisons déjà détaillées, l'utilisation d'une PCR conventionnelle paraît peu judicieuse bien que la cible mtLSU semble intéressante.

(2) Gène *mtLSU*

La PCR développée par Bio-Evolution, comme la technique « maison », a pour cible la large sous-unité ribosomale de l'ADN mitochondrial (*mtLSU*). Comme dans les travaux de Robberts *et al.*, les résultats obtenus avec ce fragment d'intérêt semblent concluants. [Robberts *et al.* 2007]

La qPCR du kit Bio-Evolution amplifie les mêmes échantillons que la technique « maison » (positifs en biologie moléculaire et négatifs en microscopie). Elle semble même être plus performante que la technique « maison » puisque l'amplification y est plus précoce de quelques cycles.

Une explication plausible des défaillances de certaines PCR (notamment celles ciblant DHPS ou DHFR) est la présence d'une seule copie du gène au niveau nucléaire alors que l'ADN mitochondrial (*mtLSU*) peut être présent en une multitude de copies au sein du pathogène. [Beard *et al.* 2004 ; Robberts *et al.* 2007]

Ainsi, l'utilisation du gène d'intérêt *mtLSU* apparaît être une bonne stratégie analytique.

(3) Gène *MSG*

Les résultats de l'expérience nancéenne avec cette cible (kit Roche) vérifient ceux constatés par l'équipe de Robberts. [Robberts *et al.* 2007]

Tout d'abord, le kit ciblant la *MSG* ne permet pas d'amplifier les échantillons ayant une charge fongique faible.

De plus, lorsque l'amplification a lieu, elle s'avère plus tardive qu'avec les deux autres techniques en temps réel.

Enfin, la fiabilité du kit Roche est mise en cause avec les résultats obtenus. En effet, l'absence d'amplification d'un échantillon ayant un Ct de 33 avec les deux autres techniques est surprenante (patient n° 23). Par ailleurs, d'autres prélèvements possédant des Ct plus élevés sont amplifiés (patient n° 97 par exemple, Ct à 35). De plus, pour deux échantillons similaires (Ct à 38 en PCR « maison »), l'un n'est pas amplifié par la technique Roche alors que l'autre sort à 42 cycles par cette même technique (patients n° 95 et 39, respectivement).

3. Aspects financiers

Si seul le coût des réactifs est pris en compte, la PCR en temps réel « maison » est la technique qui revient le moins cher. En effet, le prix de revient de la recherche de génome de Pj avec la technique « maison » s'élève à 6 euros (PCR albumine comprise).

Le prix de revient par échantillon ne diffère pas significativement entre les deux kits commerciaux (Roche et Bio-Evolution). La qPCR coûte une dizaine d'euros hors taxe par patient quel que soit le kit employé.

Cependant, un certain nombre d'autres éléments doit être pris en compte pour la détermination du coût global de l'analyse.

Tout d'abord, le prix d'achat et l'amortissement de l'automate utilisé pour le test représentent une dépense non négligeable. Dans le cas de techniques « maison », l'appareil doit être acheté alors que celui-ci peut faire l'objet d'une mise à disposition par le fournisseur du kit.

De plus, un kit commercialisé peut posséder le marquage « CE ». Bien que ce ne soit pas une marque de certification, le marquage « CE » est un gage de respect de la législation européenne. Il matérialise la conformité des produits commercialisés aux exigences de qualité, de sécurité et de performance des produits. Il représente donc un atout majeur pour l'accréditation de la technique.

L'utilisation de la biologie moléculaire en complément des techniques de microscopie présente un réel intérêt pour le dépistage de Pj dans certaines populations à risque et pauci infectées. De plus, le développement de la PCR en temps réel est apparu comme une avancée majeure en biologie moléculaire. Elle offre de nombreux avantages (rapidité, efficacité, élimination des risques de contamination et possibilité de quantification) ce qui en fait une technique de choix pour une utilisation en routine au sein du laboratoire. Les tests réalisés sur des kits commerciaux montrent que la qPCR développée par Bio-Evolution semble être la technique qui répond le mieux à nos exigences (sensibilité, commodité d'utilisation, délais de rendu des résultats, coût).

Conclusion

La pneumocystose (PCP), causée par *Pneumocystis jirovecii* (Pj), est une infection opportuniste responsable de pneumopathie interstitielle grave chez les sujets immunodéprimés. La pneumocystose, initialement très rare, a vu son incidence exploser dans les années 80 avec la survenue de l'épidémie causée par le VIH. Dès lors, les études sur son agent pathogène - *Pneumocystis jirovecii* - se sont multipliées pour dévoiler les secrets de cette infection.

Actuellement, les cas de pneumocystose chez les patients infectés par le VIH tendent à diminuer grâce à l'utilisation de chimioprophylaxie anti-*Pneumocystis jirovecii* d'une part, et aux traitements antirétroviraux permettant un meilleur contrôle de l'immunodépression d'autre part. [Kelley *et al.* 2009] Parallèlement à cette décroissance, de nouvelles populations à risque ont émergé. Il s'agit principalement de patients dont l'état immunitaire est altéré. Cette immunodépression peut être causée soit par une pathologie sous-jacente soit par un traitement immunosuppresseur. [Roux *et al.* 2010]

La première partie de ce travail permet de faire un état des lieux des connaissances sur la PCP et son agent pathogène. Les différentes recherches ont permis de mieux appréhender le champignon (biologie, physiopathologie) ainsi que les aspects épidémiologiques de la maladie qu'il provoque. Les avancées en termes de diagnostic et de prise en charge sont considérables bien que des améliorations soient encore à envisager.

La seconde partie du manuscrit concerne l'étude épidémiologique rétrospective menée au CHU de Nancy. Elle permet d'apprécier l'évolution des cas d'infection à Pj sur une période de seize ans (de 1994 à 2010) et caractérise ces cas sur cinquante-deux mois. Ainsi, l'analyse locale confirme la recrudescence des cas de PCP au sein d'une population de patients non infectés par le virus du SIDA. Les manifestations clinico-biologiques de la pneumocystose diffèrent en fonction de la pathologie sous-jacente. Ainsi, un patient immunodéprimé par le VIH aura une symptomatologie moins bruyante et d'instauration plus progressive qu'un patient non infecté par le VIH. De plus, une PCP chez un séropositif vis-à-vis du VIH est de meilleur pronostic que chez un patient non VIH. D'un point de vue biologique, la recherche de Pj est plus aisée dans un prélèvement respiratoire d'un patient VIH du fait d'une charge fongique élevée.

L'analyse lorraine vérifie ainsi localement les aspects épidémioclinico-biologiques de la pneumocystose reportés dans les publications scientifiques.

L'émergence d'une nouvelle population à risque présentant une faible charge fongique oblige à améliorer la sensibilité des techniques de recherche de Pj dans les prélèvements respiratoires. L'aspect d'optimisation du diagnostic biologique est traité dans un troisième

temps. La biologie moléculaire apparaît comme étant un bon outil d'amélioration en termes de sensibilité de technique. Une première étude permet d'évaluer l'apport de la biologie moléculaire par rapport aux techniques de microscopie utilisées au laboratoire pour le diagnostic de PCP. Une seconde étude consiste en la comparaison de la PCR « maison » avec deux kits de PCR quantitatives (qPCR) développés par Bio-Evolution d'une part et Roche d'autre part. L'analyse des résultats obtenus a permis d'étayer un argumentaire en vue du choix final de la technique de biologie moléculaire à introduire en routine au sein du laboratoire.

Annexes

Annexe 1 : Diagnostic moléculaire de la pneumocystose [Khot *et al.* 2009]

Diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*.

Study (year), Ref.	Clinical specimen ¹	Study design ²	Extraction (kit or fungal cell wall lysis)	Extraction (DNA purification)	PCR format	PCR target gene	# ⁴	Prv ⁵ (%)	Sensitivity ⁶	Specificity ⁷	PPV ⁸	NPV ⁹
Sing (2000) [49]	BAL/pellet	Prospective/blinded	Proteinase K, Qiagen	Tissue kit (Qiagen, Germany)	End point (single)	<i>LSU mt rRNA</i> ²¹	334	7.8	100 ²²	100	96	100
Tones (2000) [50]	BAL and lung biopsies	Prospective/blinded	X		End point (nested)	<i>ITS</i>	47	38.3	72.2 ²³	100	81.8	100
Fischer (2001) [58]	Oral washes/pellet	Prospective/blinded	Insta Gene Matrix (Bio-rad) and NucliSens kit (Organon Teknika, Ireland)		End point	<i>MSG</i> ²⁴	175	18.3	91	94	76	98
Olson (2001) [51]	BAL and sputum	Retrospective	Wizard DNA Clean-up (Promega, WI, USA)		End point (nested)	<i>mt LSU rRNA</i>	91	27.5	96	59	48	97
Flori (2004) [52]	BAL/pellet	X	QIAamp DNA minikit (Qiagen)		End point	<i>LSU mt rRNA</i>	150	7.3	100	87	X	X
Pmlaar (2004) [53]	BAL/pellet	X	Proteinase K	Phenolchloroform	Real-time	<i>MSG</i>			100	98.6		
Larsen (2004) [59]	Oral washes/pellet	Prospective/blinded	NucliSens kit (Organon Teknika)		Quantitative touch-down	<i>MSG</i>	113	82.3	88	85	- ²⁵	- ²⁵
Nymanck (2005) [60]	Oropharyngeal washings	Prospective	Anionic surfactant, proteinase K	Phenolchloroform, alcohol precipitation	Phenolchloroform, alcohol precipitation	<i>mt LSU rRNA</i>	35 ^{26a}	45.7	44	79	64	63
Bandt (2007) [56]	BAL/whole	Retrospective	QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) ^{27a} and QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) ^{27b}		Real-time quantitative	<i>5.8S rRNA</i>	88	31.8	79	100	X	X
Nuchprayoon (2007) [57]	BAL/pellet	X	FTA-filter paper-based DNA extraction (Whatman Bioscience, Kent, UK)		End point	<i>DHFR2</i> ²⁸			82	97		
Fillaux (2008) [54]	Sputum/pellet	Prospective	High Pure PCR template preparation kit (Roche Diagnostics, France)		Real-time, semi-quantitative	<i>MSG</i>	400	7.8	100	90.5	47	100

Annexe 2 : Fiche de renseignements Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii*

Fiche de renseignements : Pneumocystose

Données épidémiologiques

Nom _ _ _ Prénom _ _ Âge : Sexe : F M

Service :

Hospitalisation oui, durée..... non

Prophylaxie avant le diagnostic oui, laquelle non

Facteurs de risque

♦ Maladies sous-jacentes

VIH Transplantation, organe.....date.....

Hémopathies Tumeur solide.....

Maladie de système.....

♦ Traitements sous-jacents

Cyclophosphamide Vincristine Cytarabine

Méthotrexate Etoposide Rituximab

Infliximab Corticothérapie, durée.....

Biologie

Biochimie Albumine :g/L LDH :UI/L

CRP :mg/L PCT :ng/mL

Hématologie Hb :g/dL

GB :G/L.

PN :G/L (.....%) Lympho :G/L (.....%)

Thrombocytes :

Virologie Compte lymphocytes CD4+ au moment du diagnostic :

Typage :

Si patient VIH+ : charge virale.....

Parasitologie Recherche de *Pneumocystis jirovecii* dans le LBA, le

MGG positif négatif douteux NR

Bleu Toluidine positif négatif douteux NR

IF positif négatif douteux NR

Clinique

Pneumopathie Hypoxémie Pneumothorax Ventilation mécanique

Durée des symptômes avant le diagnostic :

Antécédents de PCP : oui, date..... non

Radiologie

Aspect

Date.....

Traitement

Prophylaxie oui, laquelle non

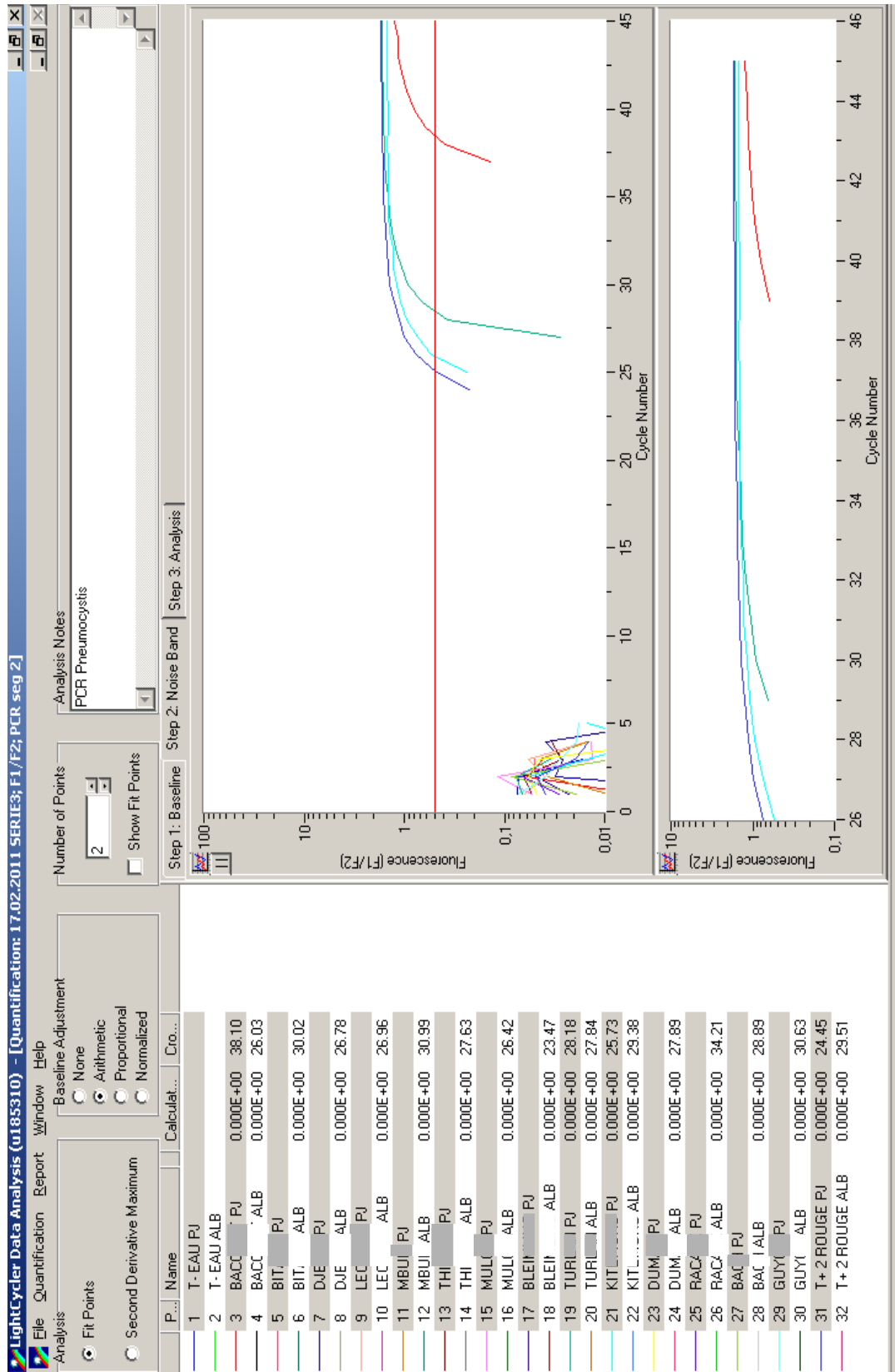
Traitement curatif Bactrim Pentacarinat

Mesures d'isolement oui non

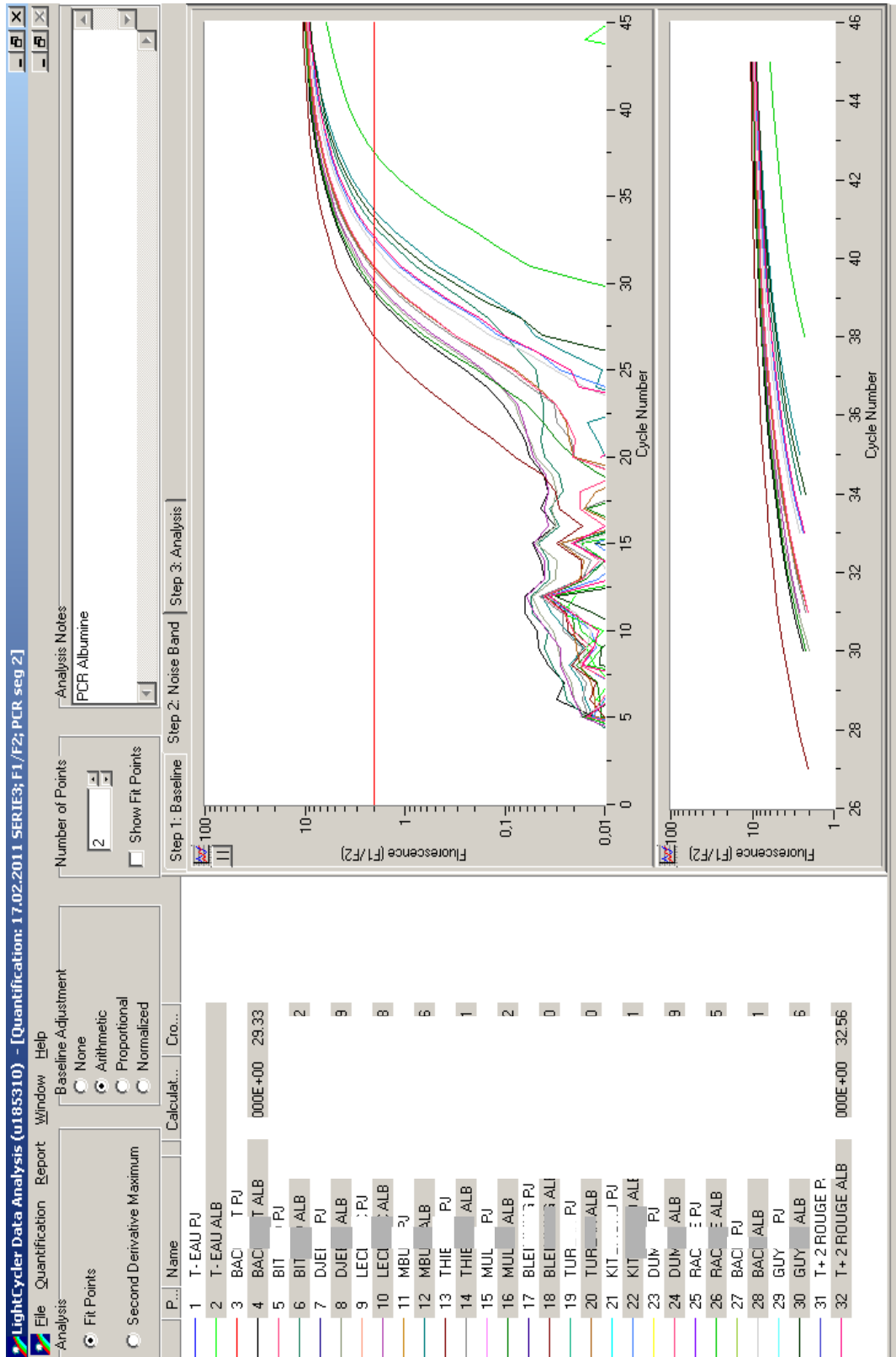
Evolution

guérison récurrence PCP décès perdu de vue

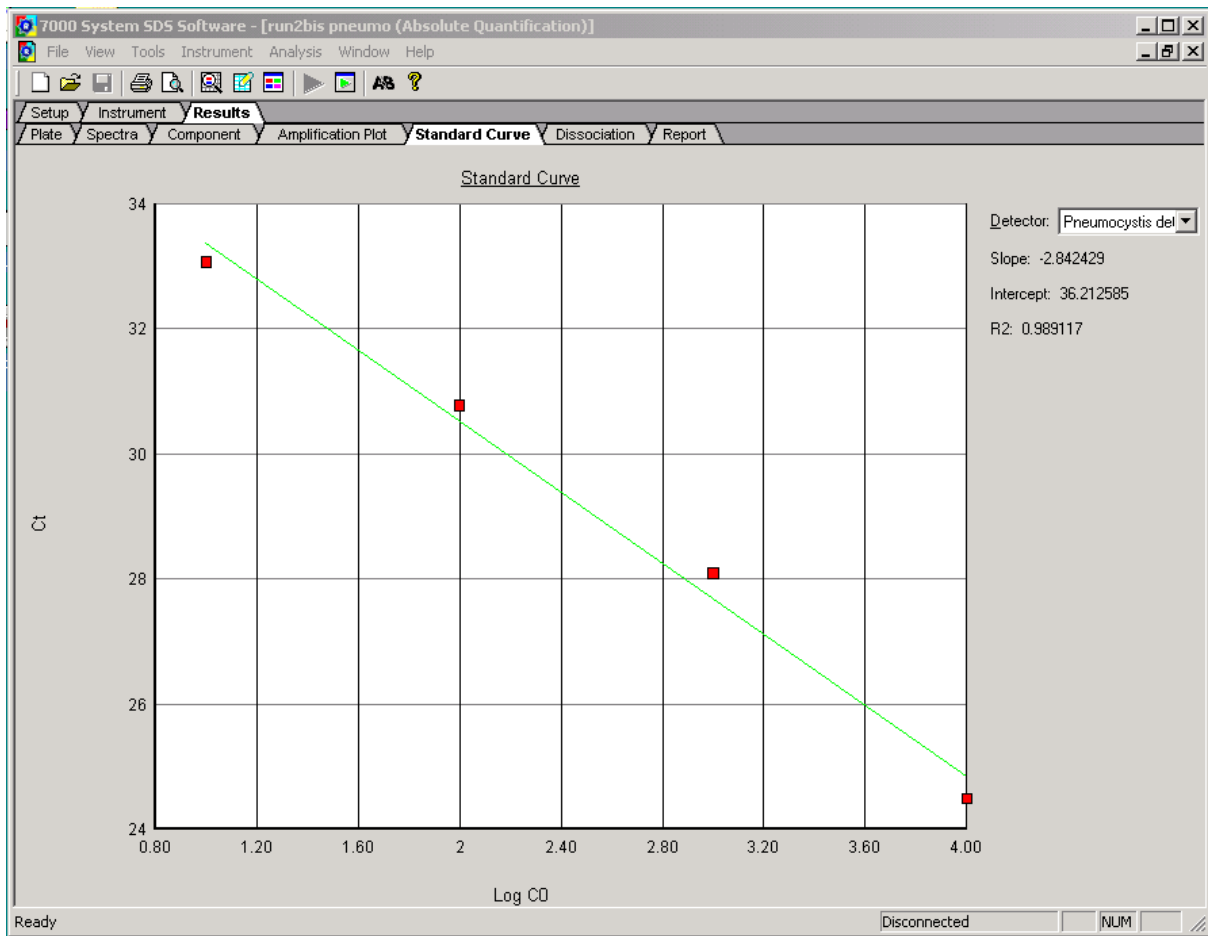
Annexe 3: PCR Pj sur LightCycler (technique « maison »)



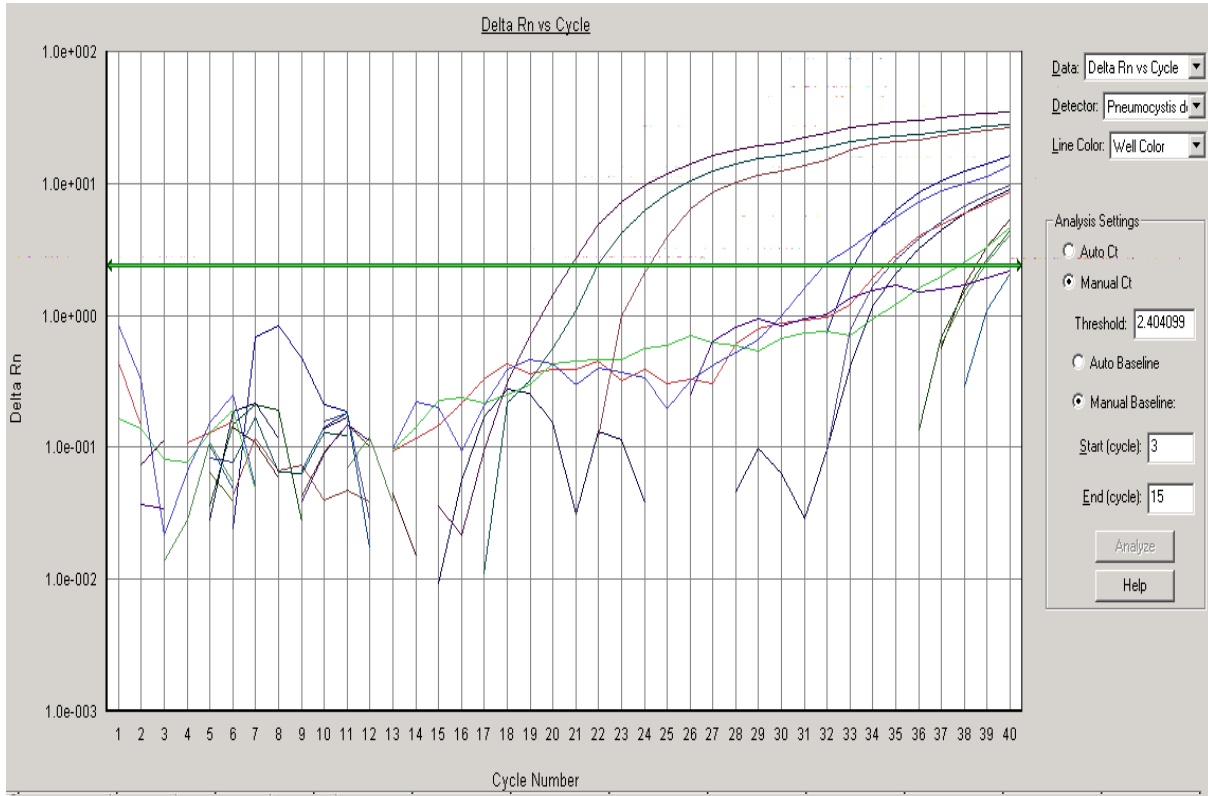
Annexe 4 : PCR albumine sur LightCycler (technique « maison »)



Annexe 5 : Gamme de quantification (PCR Bio-Evolution)



Annexe 6 : Patients en PCR Bio-Evolution



Data: Delta Rn vs Cycle

Detector: Pneumocystis d

Line Color: Well Color

Analysis Settings:

Auto Ct

Manual Ct

Threshold: 2.404099

Auto Baseline

Manual Baseline:

Start (cycle): 3

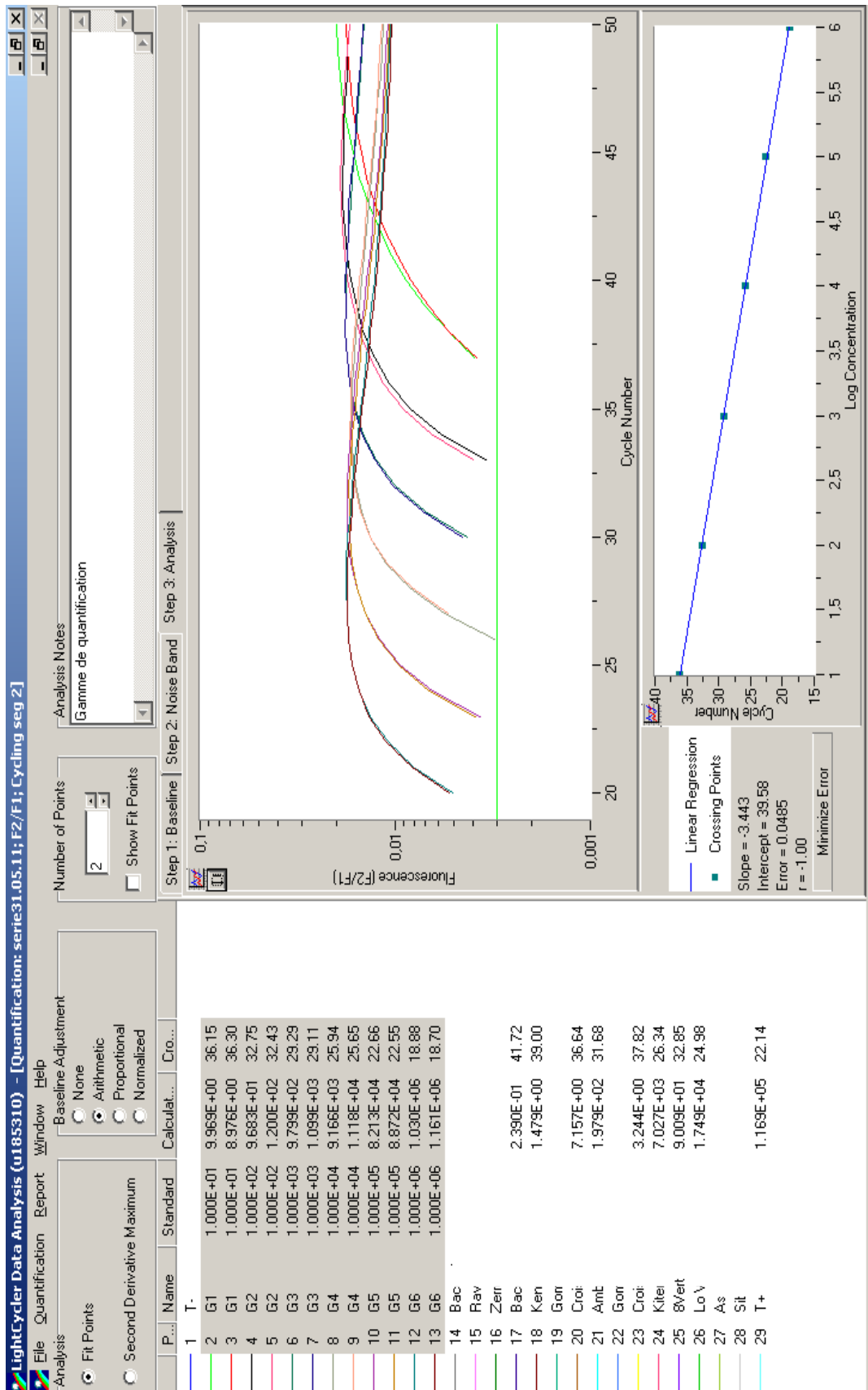
End (cycle): 15

Analyze

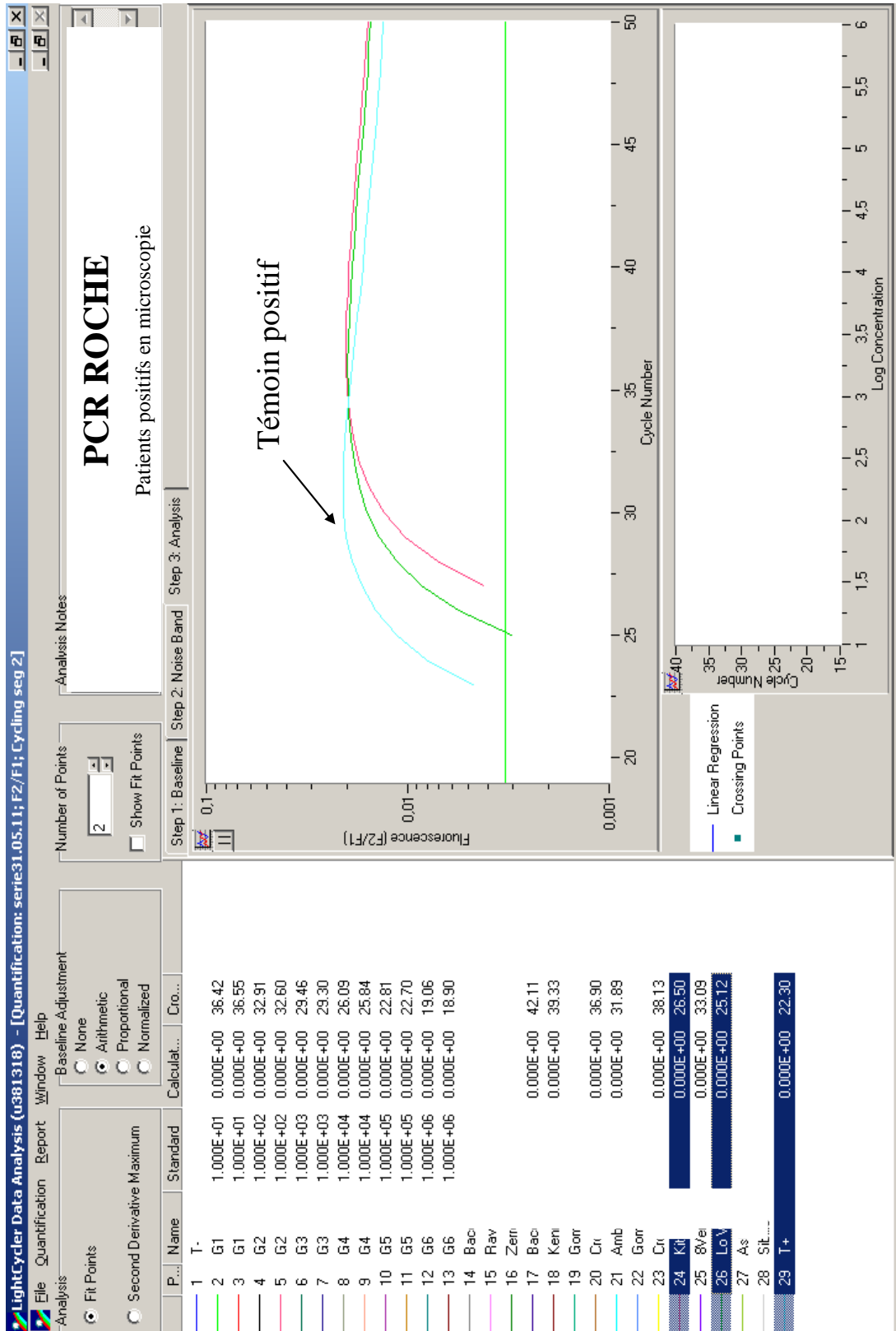
Help

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty
A6	Bac	Pneumocystis cellu	Unknown	15.60	2.782			
		Pneumocystis detecteur	Unknown	33.11	1.556	12.38	7.23	7.283
A7	Rav	Pneumocystis cellu	Unknown	24.28				
		Pneumocystis detecteur	Unknown	38.45		1.64e-001		
A8	Zer	Pneumocystis cellu	Unknown	18.17				
		Pneumocystis detecteur	Unknown	38.77		1.25e-001		
A9	Bac	Pneumocystis cellu	Unknown	19.53	2.782			
		Pneumocystis detecteur	Unknown	35.31	1.556	2.08	7.23	7.283
A10	Ker	Pneumocystis cellu	Unknown	26.15				
		Pneumocystis detecteur	Unknown	34.51		3.96		
A11	Goi	Pneumocystis cellu	Unknown	21.08	2.419			
		Pneumocystis detecteur	Unknown	37.78	0.791	2.80e-001	1.97e-001	1.18e-001
A12	Cro	Pneumocystis cellu	Unknown	21.54	0.879			
		Pneumocystis detecteur	Unknown	31.88	2.022	33.55	18.43	21.385
B1	Am	Pneumocystis cellu	Unknown	24.32				
		Pneumocystis detecteur	Unknown	24.15		17595.36		
B2	Goi	Pneumocystis cellu	Unknown	24.50	2.419			
		Pneumocystis detecteur	Unknown	38.90	0.791	1.13e-001	1.97e-001	1.18e-001
B3	Cro	Pneumocystis cellu	Unknown	22.79	0.879			
		Pneumocystis detecteur	Unknown	34.74	2.022	3.31	18.43	21.385
B4	Kite	Pneumocystis cellu	Unknown	23.69				
		Pneumocystis detecteur	Unknown	21.98		101840.33		
B5	Lo	Pneumocystis cellu	Unknown	22.24				
		Pneumocystis detecteur	Unknown	20.75		274541.19		
B6	Ast	Pneumocystis cellu	Unknown	26.04				
		Pneumocystis detecteur	Unknown	Undet.				
B7	Sibi	Pneumocystis cellu	Unknown	19.78				
		Pneumocystis detecteur	Unknown	Undet.				
B8	8ve	Pneumocystis cellu	Unknown	22.97				
		Pneumocystis detecteur	Unknown	Undet.				

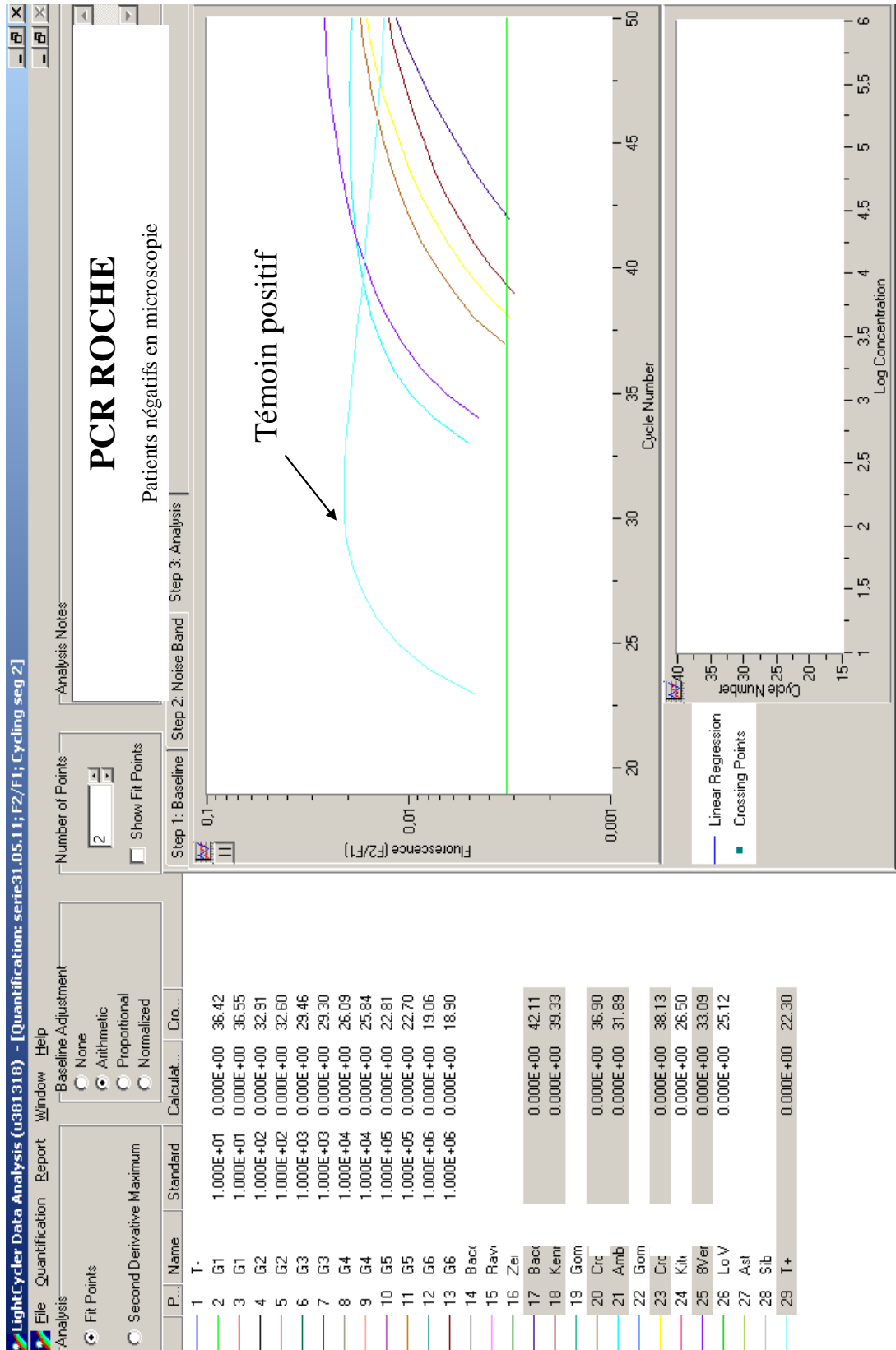
Annexe 7 : Gamme de quantification (PCR Roche)



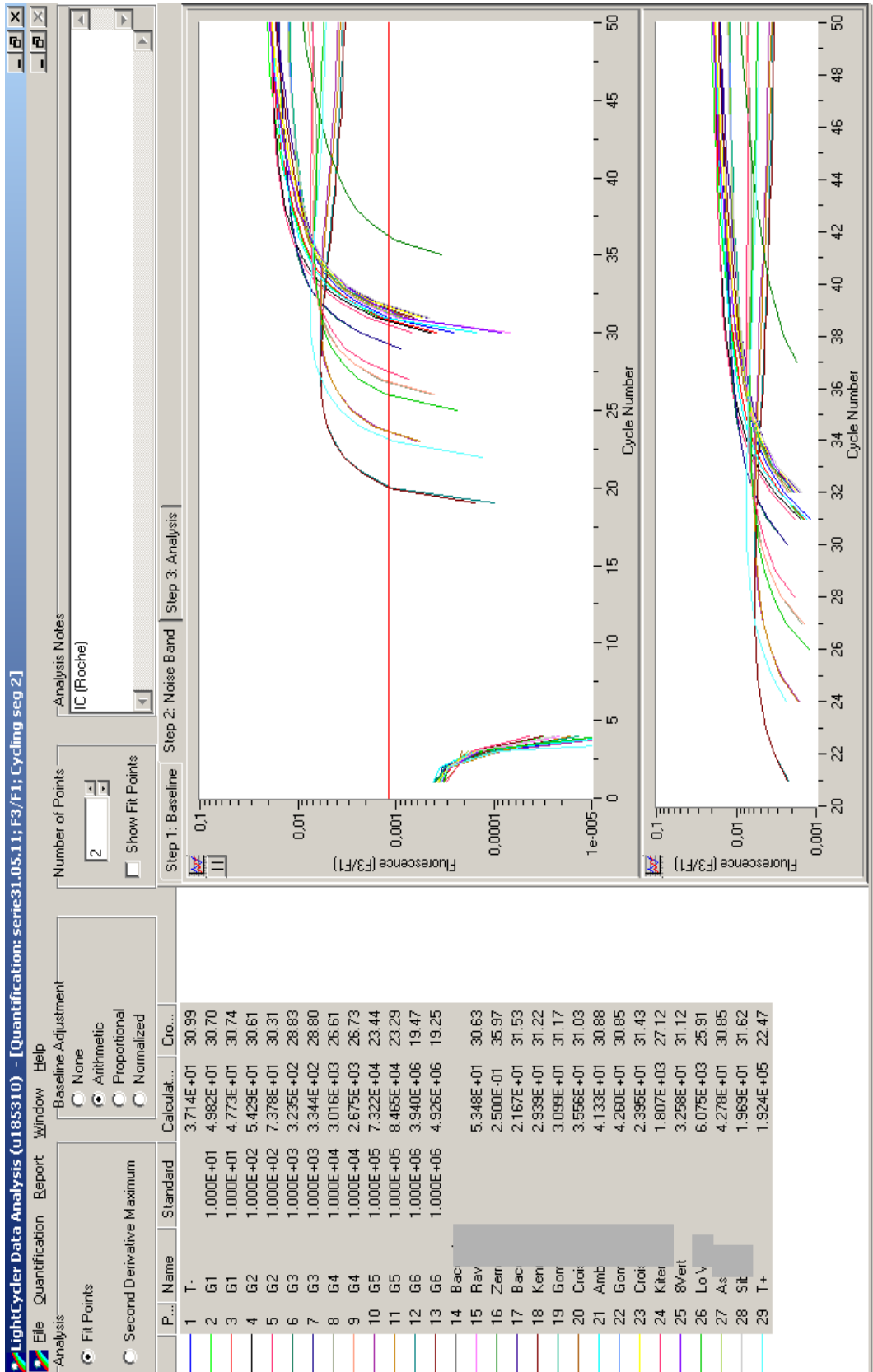
Annexe 8 : PCR Pj, patients positifs en microscopie (Roche)



Annexe 9 : PCR Pj, patients négatifs en microscopie (Roche)



Annexe 10 : PCR Contrôle Interne (Roche)



Références bibliographiques

- Alanio A., Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, Molina JM, Derouin F, Menotti J. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect (2011) 17, 1531-1537
- Aliouat-Denis MC, Chabé M, Demanche C, Aliouat EM, Viscogliosi E, Guillot J, Delhaes L, Dei-Cas E. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. Infect Genet Evol (2008) 8, 708-726
- Aliouat-Denis CM, Martinez A, Aliouat EM, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas E. The *Pneumocystis* life cycle. Mem Inst Oswaldo Cruz. (2009) 104(3), 419-426
- Arcenas RC, Uhl JR, Buckwalter SP, Limper AH, Crino D, Roberts GD, Wengenack NL. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. Diagn Microbiol Infect Dis (2006) 54, 169-175
- Association française des enseignants de parasitologie médicale. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Abrégés connaissances pratiques. Elsevier Masson. 2^{ème} édition (2010)
- Azoulay E, Bergeron A, Chevret S, Bele N, Schlemmer B, Menotti J. Polymerase Chain Reaction for diagnosing *Pneumocystis* pneumonia in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. Chest (2009) 135, 655-661
- Barbosa J, Bragada C, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. A new method for the detection of *Pneumocystis jirovecii* using flow cytometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2010) 29, 1147-1152
- Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PH, Kovacs JA, Unnasch TR, Lundgren B. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. Emerg Infect Dis (2004) 10, 1729-1735
- Brancart F, Rodriguez-Villalobos H, Fonteyne PA, Peres-Bota D, Liesnard C. Quantitative TaqMan PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. J Microbiol Methods (2005) 61, 381-387
- Breton G. Syndromes de reconstitution immune. Réanimation (2009) 18, 294-300
- Breton G. Syndromes de reconstitution immune : aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques. Med Mal Infect (2007) 37, S2-S5
- Briel M, Boscacci R, Furrer H, Bucher HC. Adjunctive corticosteroids for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with HIV infection: a meta-analysis of randomised controlled trials. BMC Infect Dis (2005) 5, 101-108

- Briel M, Bucher HC, Boscacci R, Furrer H. Adjunctive corticosteroids for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in patients with HIV-infection. Cochrane Database Syst Rev (2006) 3, CD006150
- Borie R, Camuset J, Bodart L, Cadranet J. Aggravation d'une pneumocystose latente après mise en route d'une trithérapie anti-VIH. Rev Mal Respir (2006) 23, 69-72
- Calderon EJ, Varela JM, Medrano FJ *et al.* Epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia in southern Spain. Clin Microbiol Infect (2004) 10, 673-676
- Carinii A. Formas de eschizogonia do *Trypanozoma lewisi*. Commun Soc Med Sao Paolo (1910) 16, 204
- Catherinot E, Lanternier F, Bougnoux ME, Lecuit M, Couderc LJ, Lortholary O. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. Infect Dis Clin N Am (2010) 24, 107-138
- Chabé M, Nevez G, Totet A, Fréalle E, Delhaes L, Aliouat EM, Dei-Cas E. Transmission de *Pneumocystis*. J Mycol Med (2009) 19, 276-284
- Chagas C. Nova tripanozomíaze humana : estudo sobre a morfologia e o evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz (1909) 1, 159-218
- Cushion MT. Review *Pneumocystis* : unraveling the cloak of obscurity. Trends Microbiol (2004) 12(5), 243-249
- Cushion MT, Walzer PD, Smulian AG, Linke MJ, Ruffolo JJ, Kaneshiro ES, Stringer JR. Letters to the editor terminology for the life cycle of *Pneumocystis carinii*. Infect Immun (1997) 65(10), 4365
- De Boer MGJ, Bruijnesteijn van Coppenraet LES, Andre Gaasbeek A, Berger SP, Gelinck LBS, Van Houwelingen HC, Van Den Broek P, Kuijper EJ, Kroon FP, Vandenbroucke JP. An outbreak of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia with 1 predominant genotype among renal transplant recipients: interhuman transmission or a common environmental source? Clin Infect Dis (2007) 44, 1143-114
- De Castro N, Pavie J, Lagange-Xélot M, Molina JM. Pneumocystose chez les patients d'onco-hématologie : est-ce inévitable ? Rev Mal Respir (2007) 24, 741-750
- Delanoë P, Delanoë M. Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. C.R. Acad. Sci. (Paris) (1912) 155, 658-660
- Del Bono V, Mularoni A, Furfaro E, Delfino E, Rosasco L, Miletich F, Viscoli C. Clinical evaluation of a (1,3)- β -D-Glucan assay for presumptive diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in immunocompromised patients. Clinical and Vaccine Immunology (2009) 16 (10), 1524-1526

- Delmas MC, Schwoebel V, Heisterkamp SH, Downs AM, Ancelle-Park RA, Brunet JB. Recent trends in *Pneumocystis carinii* pneumonia as AIDS-defining disease in nine European countries. J AIDS (1995) 9, 74-80
- Dessauze H, Bourgault I, Doleris LM, Prinseau J, Baglin A, Hanslik T. Corticothérapie systémique et risque infectieux. Rev Med Interne (2007) 28, 841-851
- Dumoulin A, Mazars E, Seguy N, Gargallo-Viola D, Vargas S, Cailliez JC, Aliouat EM, Wakefield AE, Dei-Cas E. Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2000) 19, 671-678
- Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. FEMS Immunol Med Microbiol (2005) 45, 405-410
- Flori P, Belleste B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, Lucht F, Tran Manh Sung R. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol (2004) 53, 603-607
- Fujii T, Nakamura T, Iwamoto A. *Pneumocystis* pneumonia in patients with HIV infection: clinical manifestations, laboratory findings, and radiological features. J Infect Chemother (2007) 13, 1-7
- Germaud P, Boutoille D, Gay-Andrieu F. Mycoses bronchopulmonaires (aspects immunoallergiques exclus). EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Pneumologie, (2010) 6-003-J-10
- Helweg-Larsen J. S-adenosylmethionine in plasma to test for *Pneumocystis carinii* pneumonia. Lancet (2003) 361, 1237
- Höcker B, Wendt C, Nahimana A, Tönshoff B, Hauser PM. Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. Emerg Infect Dis. (2005) 11(2), 330-332
- Hoover DR, Graham NM, Bacellar H *et al.* Epidemiologic patterns of upper respiratory illness and *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men. Am Rev Respir Dis (1991) 144, 756-759
- Institut Louis Malardé. La PCR en temps réel. [En ligne]. In : Institut Louis Malardé, Polynésie Française. Site disponible sur : <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>. (Page consultée le 02/09/2011)

- Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, Lindegren ML. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* (2000) 30(Suppl 1), S5-S14
- Kaouech E, Kallel K, Anane S, Belhadj S, Abdellatif S, Mnif K, Ben Othmane T, Ben Lakhal S, Kilani B, Ben Châabane T, Chaker E. Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* : étude comparée de la PCR et des techniques de coloration. *Pathol Biol* (2009) 57, 373-377
- Kelley CF, Checkley W, Mannino DM, Franco-Paredes C, Del Rio C, Holguin F. Trends in hospitalizations for AIDS-associated *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in the United States (1986 to 2005). *Chest* (2009) 136, 190-197
- Khellaf M, Godeau B. Pneumocystose au cours des maladies systémiques. *Presse Med* (2009) 38, 251-259
- Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* (2009) 7(10), 1201-1221
- Kohju E. Evaluation of a Real-Time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Kurume Med J* (2008) 55, 55-62
- Kolstad A, Holte H, Fossa A, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in B-cell lymphoma patients treated with the rituximab-CHOEP-14 regimen. *Haematologica* (2007) 92(1), 139-140
- Kovacs JA, Hiemenz JW, Macher AM, Stover D, Murray HW, Shelhamer J. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. *Ann Intern Med* (1984) 100, 663-671
- Kovacs JA, Ng VL, Masur H, Leoung G, Hadley WK, Evans G, Lane HC, Ognibene FP, Shelhamer J, Parrillo JE. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* (1988) 318(10), 589-593
- Larsen HH, Huang L, Kovacs JA, Crothers K, Silcott VA, Morris A, Turner JR, Beard CB, Masur H, Fischer SH. A prospective, blinded study of quantitative touch-down Polymerase Chain Reaction using oral-wash samples for diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in HIV-infected patients. *J Infect Dis* (2004) 189, 1679-83
- Libertin C, Woloschak G, Wilson WR, Smith TF. Analysis of *Pneumocystis carinii* cysts with a fluorescence-activated cell sorter. *J Clin Microbiol* (1984) 20(5), 877-880
- Lubis N, Baylis D, Short A, Stebbing J, Teague A, Portsmouth S, Bower M, Nelson M, Gazzard B. Prospective cohort study showing changes in the monthly incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Postgrad Med J* (2003) 79, 164-166

- Magne D, Angoulvant A, Botterel F, Bouges-Michel C, Bougnoux ME, Bouree P, Brun S, Chochillon C, Cornet M, Dannaoui E, Datry A, Dunand J, Galeazzi G, Lebuissou A, Sarfati C, Roux P. Réseau pneumocystose francilien : bilan de cinq années de surveillance (2003-2007). *J Mycol Med* (2009) 19, 290-293
- Mansharamani NG, Balachandran D, Vernovsky I, Garland R, Koziel H. Peripheral blood CD4 + T-lymphocyte counts during *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Chest* (2000) 118, 712-720
- Mathys V, Lefèvre P, Fontaine V, Dehem M, Donnio PY, Février F, Le Coustumier A, Bifani P. La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. *Antibiotiques* (2007) 9, 205-211
- May T, Salmon D, Bonnet F, Cacoub P, Lewden C, Chene G. Mortalité 2005. *Med Mal Infect* (2005) 35(suppl2), S28-S30
- Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* (2001) 39(11), 3877-3882
- Miller RF, Evans HER, Copas AJ, Cassell JA. Climate and genotypes of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Microbiol Infect* (2007) 13(4), 445-448
- Miller RF, Grant AD, Foley NM. Seasonal variation in presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* (1992) 339, 747-748
- Montes-Cano MA, Chabe M, Fontillon-Alberdi M, De la Horra C, Respaldiza N, Medrano FJ, Varela JM, Dei-Cas E, Calderon EJ. Letters to the editor. Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. *Emerg Infect Dis* (2009) 15(1), 125-127
- Morris A. Is there anything new in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia? Changes in *P. jirovecii* pneumonia over the course of the AIDS epidemic. *Clin Infect Dis* (2008) 46, 634-636
- Morris A, Beard CB, Huang L. Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*. *Microbes Infect* (2002) 4, 95-103
- Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, Huang L, Beard CB, Kaplan JE. Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg Infect Dis* (2004) 10(10), 1713-1720
- Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *J Infect Dis* (2008) 197, 10-17

- Nakamura H, Tateyama M, Tasato D, Haranaga S, Yara S, Higa F, Ohtsuki Y, Fujita J. Clinical utility of serum β -D-Glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Intern Med (2009) 48, 195-202
- Pestre V, Mouthon L. Manifestations pulmonaires associées aux immunosuppresseurs utilisés dans les transplantations et les maladies auto-immunes. Presse Med (2010) 39, 378-386
- Radhi S, Travis A, Ukwu1 M, Saleh S, Morris A. Outcome of HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia in hospitalized patients from 2000 through 2003. BMC Infect Dis (2008) 8, 118-127
- Robberts FJL, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii* : evaluation of 9 assays. Diagn Microbiol Infect Dis (2007) 58, 385-392
- Roblot F, Godet C, Kauffmann C, Tattevin P, Boutoille D, Besnier JM, Hauet T, le GERICCO. Facteurs favorisant de la pneumocystose (PPC) chez les malades immunodéprimés non infectés par le VIH. J Mycol Med (2009) 19, 285-289
- Roblot F, Godet C, Le Moal G, Garo B, Faouzi Souala M, Dary M, De Gentile L, Gandji JA, Guimard Y, Lacroix C, Roblot P, Becq-Giraudon B. Analysis of underlying diseases and prognosis factors associated with *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised HIV-negative patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2002) 21, 523-531
- Rodriguez M, Fishman JA. Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev (2004) 17(4), 770-782
- Rohner P, Jacomo V, Studer R, Schrenzel J, Graf JD. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. Infection (2009) 37, 261-265
- Roux A, Lemiale V, Kouatchet A, Vincent F, Bollee G, Roux P, Azoulay E. Pneumocystose pulmonaire en dehors de l'infection à VIH. Réanimation (2010) 19, 327-338
- Roux P, Ha MC, Brucker G, Costagliola D. *Pneumocystis* and pneumocystosis in Europe at the end of the 20th century. FEMS Immunol Med Microbiol (1998) 22, 87-91
- Ruffolo J.J., 1994. *Pneumocystis carinii* cell structure. In: Walzer, P.D. (Ed.), *Pneumocystis carinii*
- Sing A, Schmoldt S, Laubender RP, Heesemann J, Sing D, Wildner M. Seasonal variation of *Pneumocystis jirovecii* infection: analysis of underlying climatic factors. Clin Microbiol Infect (2009) 15, 957-960

- Singh N, Perfect JR. Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses. *Lancet Infect Dis* (2007) 7, 395-401
- Skelly MJ, Hoffman J, Fabbri M, Holzman RS, Clarkson AB Jr, Merali S. S-adenosylmethionine concentrations in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* (2003) 361, 1267-1268
- Skelly MJ, Holzman RS, Merali S. S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Clin Infect Dis* (2008) 46, 467-471
- Sowden E, Carmichael AJ. Autoimmune inflammatory disorders, systemic corticosteroids and *pneumocystis* pneumonia: A strategy for prevention. *BMC Infect Dis* (2004) 4, 42-47
- Stoll M, Schmidt RE. Adverse events of desirable gain in immunocompetence: the immune restoration inflammatory syndromes. *Autoimmun Rev* (2004) 3, 243-249
- Stringer JR. *Pneumocystis carinii*: What is it, exactly? *Clin Microbiol Rev* (1996) 9(4), 489-498
- Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* (2002) 8(9), 891-896
- Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, Yamada W, Nishimura T, Takeuchi T, Ishizaka A. Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *Chest* (2007) 131, 1173-1180
- Tasaka S, Tokuda H, Sakai F, Fujii T, Tateda K, Johkoh T, Ohmagari N, Ohta H, Araoka H, Kikuchi Y, Yasui M, Inuzuka K, Goto H. Comparison of clinical and radiological features of *Pneumocystis* pneumonia between malignancy cases and acquired immunodeficiency syndrome cases : a multicenter study. *Inter Med* (2010) 49, 273-281
- Thomas CF Jr, Limper AH, M.D. Review article Medical progress *Pneumocystis* Pneumonia. *N Engl J Med* (2004) 350, 2487-2498
- Tokuda H, Sakai F, Yamada H, Johkoh T, Imamura A, Dohi M, Hirakata M, Yamada T, Kamatani N, Kikuchi Y, Sugii S, Takeuchi T, Tateda K, Goto H. Clinical and radiological features of *Pneumocystis* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis, in comparison with methotrexate pneumonitis and *Pneumocystis* pneumonia in acquired immunodeficiency syndrome : a multicenter study. *Inter Med* (2008) 47, 915-923
- Torres HA, Chemaly RF, Storey R, Aguilera EA, Noguera QM, Safdar A, Rolston KVI, Raad II, Kontoyiannis DP. Influence of type of cancer and hematopoietic stem cell transplantation on clinical presentation of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2006) 25, 382-388

- Vanhems P, Hirschel B, Morabia A. Seasonal incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* (1992) 339, 1182
- Varela JM, Regordan C, Medrano FJ, Respaldiza N, De la Horra C, Montes-Cano MA, Calderon EJ. Climatic factors and *Pneumocystis jirovecii* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect* (2004) 10, 770-772
- Vargas SL, Ponce CA, Sanchez CA, Ulloa AV, Bustamante R, Juarez G. Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis* (2003) 9, 605-606
- Wakefield EA, Guiver L, Miller RF, Hopkin JM. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* (1991) 337, 1378-1379
- Wakefield EA, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, Hopkin JM. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* (1990) 336, 451-453
- Walzer PD, Evans HE, Copas AJ, Edwards SG, Grant AD, Miller RF. Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985–2006. *Clin Infect Dis* (2008) 46, 625-633

Index des Figures, Tableaux & Annexes

Figures

Figure 1 : Cycle biologique de Pj	7
Figure 2 : Forme trophique de Pj en microscopie électronique	8
Figure 3 : Sporocyste précoce de Pj	8
Figure 4 : Sporocystes intermédiaires de Pj	9
Figure 5 : Sporocyste tardif de Pj	9
Figure 6 : Asque de Pj	10
Figure 7 : Fission binaire.....	12
Figure 8 : Accouplement en microscopie électronique	Erreur ! Signet non défini.
Figure 9 : Multiplication sexuée.....	13
Figure 10 : Attachement de Pj aux cellules alvéolaires en microscopie électronique	16
Figure 11 : Modèle illustrant les différentes forces intervenant lors de SRI.....	27
Figure 12 : RP : opacités alvéolo-interstitielles diffuses prédominantes à droite	31
Figure 13 : Asques de Pj colorés au bleu de toluidine (× 100)	32
Figure 14 : Formes végétatives de Pj colorées au MGG (× 100).....	33
Figure 15 : Asques de Pj en IFI.....	33
Figure 16 : Evolution des demandes de recherche de Pj au CHU de Nancy entre 1994 et 2010	48
Figure 17 : Evolution des diagnostics biologiques de PCP au CHU de Nancy entre 1994 et 2010.....	48
Figure 18 : Répartition cumulée mensuelle des cas de PCP au CHU de Nancy entre 1994 et 2010.....	49
Figure 19 : Pourcentage mensuel de PCP par rapport à la moyenne théorique	50
Figure 20 : Proportions de demandes et de résultats positifs par service entre 2007 et avril 2011	51
Figure 21 : Pourcentage de résultats positifs parmi les demandes par services.....	52
Figure 22 : Répartition des cas de PCP au CHU de Nancy entre 2007 et 2011.....	54
Figure 23 : Pathologies sous-jacentes à la PCP.....	55
Figure 24 : Principe de la sonde Taqman	69
Figure 25 : Mélange réactionnel de la PCR Bio-Evolution pour un échantillon	73
Figure 26 : Technologie FRET.....	74

Tableaux

Tableau 1	Caractéristiques des différentes formes du cycle biologique de <i>Pneumocystis</i> sp..	11
Tableau 2	: Etiologie des SRI lors de l'infection par le VIH.....	28
Tableau 3	: Anomalies radiologiques évocatrices d'une pneumocystose.....	30
Tableau 4	: Traitements de la PCP.....	39
Tableau 5	: Chimio prophylaxie de la PCP.....	41
Tableau 6	: Caractéristiques des cas de PCP survenus entre 2007 et 2011 au CHU de Nancy	58
Tableau 7	: Mélange réactionnel pour un échantillon (PCR « maison »).....	70
Tableau 8	: Séquences des amorces (PCR « maison »).....	71
Tableau 9	: Séquences des sondes Taqman (PCR « maison »).....	71
Tableau 10	: Constitution du mélange réactionnel pour un échantillon (PCR Roche).....	75
Tableau 11	: Comparaison de la PCR « maison » aux techniques microscopiques.....	76
Tableau 12	: Analyse des résultats positifs en microscopie et en biologie moléculaire.....	77
Tableau 13	: Evolution des Ct en fonction du nombre de techniques de microscopie positives	78
Tableau 14	: Analyse des résultats discordants entre la PCR et la microscopie.....	79
Tableau 15	: Comparaison de la technique PCR « maison » avec deux kits commerciaux.....	81
Tableau 16	: Performances des cut-off proposés par Alanio <i>et al.</i> 2011.....	85
Tableau 17	: Comparatif des kits commerciaux.....	87

Index des Annexes

Annexe 1 : Diagnostic moléculaire de la pneumocystose [Khot <i>et al.</i> 2009]	97
Annexe 2 : Fiche de renseignements Pneumocystose à <i>Pneumocystis jirovecii</i>	98
Annexe 3: PCR Pj sur LightCycler (technique « maison »).....	99
Annexe 4 : PCR albumine sur LightCycler (technique « maison »).....	100
Annexe 5 : Gamme de quantification (PCR Bio-Evolution).....	101
Annexe 6 : Patients en PCR Bio-Evolution	102
Annexe 7 : Gamme de quantification (PCR Roche)	103
Annexe 8 : PCR Pj, patients positifs en microscopie (Roche)	104
Annexe 9 : PCR Pj, patients négatifs en microscopie (Roche)	105
Annexe 10 : PCR Contrôle Interne (Roche).....	106

Table des Matières

Serment des Apothicaires

Remerciements

Sommaire

Liste des abréviations

<i>Introduction</i>	1
<i>Partie I Infection à <u>Pneumocystis jirovecii</u> : données de la littérature</i>	3
I. Agent pathogène : <i>Pneumocystis jirovecii</i>	4
A. Historique	4
B. <i>Pneumocystis</i> : parasite ou champignon ?.....	5
1. Hypothèse protozoaire.....	5
2. Hypothèse fongique.....	6
C. Cycle biologique	6
1. Différentes formes morphologiques	7
a) La forme trophique	8
b) Le sporocyste.....	8
(1) Le sporocyste précoce	8
(2) Le sporocyste intermédiaire.....	9
(3) Le sporocyste tardif	9
c) L'asque	10
d) Les spores	10
2. Deux modes de multiplication.....	12
a) Multiplication asexuée	12
b) Reproduction sexuée	12
D. Transmission	14
1. Réactivation ou contamination <i>de novo</i> ?	14
2. Transmission horizontale	14
a) Transmission interhumaine	14
b) Source environnementale	15
3. Transmission verticale.....	15
II. Physiopathologie	16
A. Invasion du micro-organisme.....	16
B. Mise en place de la réaction immunitaire.....	16
C. Réponse cytokinique	17
III. Epidémiologie	19
A. Variation saisonnière.....	19
B. Facteurs de risque	20
C. Prévalence et incidence	21

1.	Population VIH	21
2.	Population non VIH	21
IV.	Présentation clinique	23
A.	Colonisation asymptomatique	23
B.	Pneumocystose (PCP)	24
1.	Enfants.....	24
a)	Prématurés et malnutris	24
b)	Immunodéprimés non VIH.....	24
c)	Immunodéprimés VIH.....	25
2.	Adultes	25
a)	VIH.....	25
b)	Non VIH.....	25
C.	Syndrome de reconstruction immunitaire	26
1.	Définition	26
2.	SRI et pneumocystose à <i>Pneumocystis jirovecii</i>	28
3.	Traitement du SRI	29
D.	Evolution	29
V.	Diagnostic de la PCP	30
A.	Présentation en imagerie médicale	30
B.	Diagnostic biologique	31
1.	Mise en évidence de Pj.....	31
a)	Prélèvement.....	31
b)	Examen direct.....	32
(1)	Colorations traditionnelles.....	32
(2)	Méthode immunochimique.....	33
c)	Biologie moléculaire	34
(1)	Gènes cibles	34
(2)	PCR conventionnelle	34
(3)	PCR en temps réel	35
(4)	Intérêts cliniques de la PCR.....	35
d)	Cytométrie en flux.....	35
2.	Dosages sanguins	36
a)	Lactate deshydrogénase (LDH).....	36
b)	β -glucane	36
c)	S-adosylméthionine (SAM ou AdoMet)	37
3.	Technique sérologique	37
VI.	Traitement	38
A.	Curatif.....	38
1.	Traitement de première intention	38
2.	Traitements alternatifs.....	38
3.	Corticothérapie complémentaire	39
B.	Prophylaxie.....	40
1.	Quand instaurer et arrêter une chimioprophylaxie ?	40
2.	Molécules utilisées	41
3.	Prévention des infections nosocomiales.....	42
C.	Résistances aux traitements.....	42

<i>Partie 2 Analyse épidémiologique des cas de pneumocystose au CHU de Nancy</i>	43
I. Problématique.....	44
II. Patients et méthode.....	45
A. Etude globale.....	45
B. Caractéristiques des cas de PCP diagnostiqués entre janvier 2007 et avril 2011	45
III. Résultats	47
A. Etude globale.....	47
1. Evolution du nombre de demandes de recherche de Pj.....	47
2. Répartition mensuelle des cas de PCP	49
B. Caractéristiques des cas de PCP.....	50
1. Services	52
2. Population étudiée	53
a) Données démographiques	53
b) Service d'hospitalisation	53
c) Pathologie sous-jacente	54
d) Traitements.....	55
3. Caractérisation de la pneumocystose	56
a) Clinique	56
b) Diagnostic biologique	56
IV. Discussion	59
A. Historique de la PCP	59
B. Variations saisonnières.....	60
C. Caractéristiques des cas de pneumocystose	60
1. Population étudiée	61
a) Données démographiques	61
b) Pathologie sous-jacente	61
c) Traitements.....	62
2. Caractérisation de la pneumocystose	63
a) Clinique	63
b) Diagnostic biologique	64

<i>Partie 3 Détection de <u>Pneumocystis jirovecii</u> dans les prélèvements respiratoires par biologie moléculaire</i>	65
I. Problématique.....	66
II. Matériels et méthodes.....	67
A. Microscopie versus PCR en temps réel « maison »	67
1. Prélèvements respiratoires.....	67
2. Techniques microscopiques	67
3. Extraction d'ADN	67
4. PCR en temps réel « maison »	68
a) Principe.....	68
b) Mélange réactionnel	70
c) Programme PCR.....	71
B. Kits commerciaux versus PCR « maison »	72
1. Choix des échantillons testés.....	72
2. PCR Bio-Evolution	72
a) Principe.....	72
b) Mélange réactionnel	72
c) Programme PCR.....	73
3. PCR Roche	73
a) Principe.....	73
b) Mélange réactionnel	75
c) Programme PCR.....	75
III. Résultats	76
A. Comparaison de la PCR en temps réel « maison » aux techniques de microscopie	76
1. Résultats bruts	76
2. Résultats concordants positifs	77
3. Résultats discordants	78
B. Comparaison de la PCR « maison » à des kits commerciaux	80
1. Echantillons positifs	80
2. Echantillons négatifs	80
3. Echantillons avec détection de Pj uniquement par biologie moléculaire.....	80
IV. Discussion	82
A. Comparaison de la PCR en temps réel « maison » aux techniques de microscopie	82
1. Sensibilité.....	82
2. Spécificité.....	83
3. Objectivité	84
4. Détermination des cut-off.....	84
a) PCP ou colonisation ?	85
b) Zone grise	86
B. Comparaison de la PCR « maison » à des kits commerciaux	87
1. Aspects pratiques.....	88
a) Facilité d'utilisation du kit	88
b) Durée de la réaction d'amplification	88
c) Gamme de quantification	88

2.	Aspects analytiques	89
a)	Choix de la technique PCR	89
(1)	PCR conventionnelle	89
(2)	PCR en temps réel	89
b)	ADN cible	90
(1)	De nombreuses cibles potentielles.....	90
(2)	Gène mtLSU	91
(3)	Gène MSG	91
3.	Aspects financiers	92
	<i>Conclusion</i>	93
	<i>Annexes</i>	96
	<i>Références bibliographiques</i>	107
	<i>Index des Figures, Tableaux & Annexes</i>	116
	<i>Table des Matières</i>	120
	<i>Résumé</i>	126

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 14/11/2011

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par Stéphanie AVENEL

Sujet : Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* : d'une analyse épidémiologique locale à l'introduction d'un nouvel outil moléculaire de diagnosticJury :Président : M. Christophe GANTZER
Directeurs : M. Christophe GANTZER
Mlle Anne DEBOURGOGNEJuges : M. Alain LOZNIOWSKI
M. Marc LADRIERE

Vu, 24 octobre 2011

Nancy, le

Le Président du Jury

Directeurs de Thèse

M. Christophe GANTZER

M. Christophe GANTZER

Mlle Anne DEBOURGOGNE

Vu et approuvé,

Nancy, le 25/10/2011

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 27/10/2011

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement : 3821

N° d'identification :

TITRE

**Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* :
d'une analyse épidémiologique locale
à l'introduction d'un nouvel outil moléculaire de diagnostic**

Thèse soutenue le 14 Novembre 2011

Par Stéphanie AVENEL

RESUME :

La pneumocystose (PCP), causée par *Pneumocystis jirovecii* (Pj), est une infection opportuniste responsable de pneumopathie interstitielle grave chez les sujets immunodéprimés. Depuis sa découverte au début des années 1900, les connaissances sur ce pathogène ne cessent d'évoluer. La recrudescence des cas de PCP lors de l'épidémie de VIH dans les années 80 en a un fait un point de santé publique important. De nombreux scientifiques se sont alors intéressés à Pj pour comprendre ce micro-organisme. L'agent de la pneumocystose garde cependant encore de nombreux secrets à découvrir.

Dans un premier temps, le présent travail fait un état des lieux des connaissances actuelles sur *Pneumocystis jirovecii*.

La seconde partie décrit l'étude épidémiologique rétrospective menée au CHU de Nancy sur une période de seize ans (de 1994 à 2010). L'analyse des données permet d'apprécier l'évolution des cas de PCP ainsi que de caractériser ces cas sur une période de cinquante-deux mois (de janvier 2007 à avril 2011). Les aspects épidémio-clinico-biologiques de la pneumocystose reportés dans les publications scientifiques sont ainsi vérifiés localement.

Enfin, devant la nécessité de toujours améliorer le diagnostic biologique, il s'avérait indispensable de mettre en place au sein du laboratoire une technique de biologie moléculaire pour le dépistage de Pj dans les prélèvements respiratoires. La troisième partie de ce manuscrit propose ainsi deux études comparatives. La première, PCR « maison » *versus* techniques de microscopie, permet d'évaluer l'apport de la biologie moléculaire. La seconde, comparant la technique « maison » à des kits commerciaux, est réalisée en vue du choix de l'outil moléculaire à instaurer pour le diagnostic de PCP.

MOTS CLES : *Pneumocystis jirovecii*, pneumocystose, épidémiologie, diagnostic, PCR quantitative

Directeurs de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr C. GANTZER	Laboratoire de Microbiologie environnementale Faculté de Pharmacie, Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
Dr A. DEBOURGOGNE	Service de Parasitologie-Mycologie CHU de Nancy	Thème 5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle