

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu devant le Jury interrégional
le 25 septembre 2007**

par Mlle GUILLOUZOUIC Aurélie

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 23 janvier 2003 tient lieu de :

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

**Intérêts et limites de la PCR quantitative en temps réel
pour le diagnostic de la pneumocystose
au C.H.U de Nantes.**

Etude rétrospective allant de décembre 2006 à juin 2007.

Président : M. Patrice LE PAPE, Professeur de Parasitologie – Mycologie - Pharmacie

Membres du Jury :

M. Philippe MOREAU, Professeur d'Hématologie Clinique – Médecine

M. François RAFFI, Pr. de Maladies Infectieuses et Tropicales -Médecine

Mme Anne ESPERN, Assistante Hospitalo-Universitaire – Médecine

M. Michel MIEGEVILLE, Maître de Conférence de Parasitologie- Mycologie
(Directeur de Thèse)

TABLE DES MATIERES

<i>Introduction</i>	8
Partie 1 : Généralités	10
I Historique	11
II Agent pathogène	13
II.1 Taxonomie.....	13
II.1.1 Appartenance au règne des Protozoaires.....	13
II.1.2 Appartenance au règne des Fungi	13
II.2 Spécificité d'hôte / Biodiversité.....	15
II.2.1 Spécificité d'hôte.....	15
II.2.2 Biodiversité au sein de <i>P. jiroveci</i>	16
II.3 Morphologie et cycle biologique.....	17
III Physiopathologie et immunité	20
III.1 Interactions de <i>Pneumocystis</i> avec les cellules épithéliales, les macrophages alvéolaires et le surfactant	20
III.1.1 Interaction avec les cellules épithéliales	20
III.1.2 Les macrophages alvéolaires.....	21
III.1.3 Le surfactant pulmonaire.....	21
III.2 Facteurs de virulence.....	22
III.3 Réponse immunitaire.....	22
III.3.1 Réponse à médiation cellulaire	22
III.3.2 Réponse à médiation humorale	23
IV Epidémiologie	24
IV.1 Théories de la contamination	24
IV.1.1 Réactivation d'une infection latente.....	24
IV.1.2 Contamination <i>de novo</i>	24
IV.2 Réservoir	25
IV.2.1 Réservoir environnemental	25
IV.2.2 Réservoir humain et transmission interhumaine	25
V Aspects cliniques de la pneumocystose	28
V.1 Tableaux cliniques.....	28
V.1.1 Infections chez le nourrisson.....	28
V.1.2 Infections chez le patient immunodéprimé	28
V.1.3 Pneumocystoses extra-pulmonaires	30
V.2 Facteurs de risque prédisposant à la pneumocystose	31
V.2.1 Patients VIH+	31
V.2.2 Patients immunodéprimés non VIH	31
VI Diagnostic	33
VI.1 Les prélèvements.....	33
VI.1.1 Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA)	33
VI.1.2 Expectoration induite	33
VI.1.3 Les Biopsies pulmonaires.....	34
VI.1.4 Liquide de Rinçage Oropharyngé (LROP).....	34
VI.2 Techniques diagnostiques	35
VI.2.1 Les colorations	35

VI.2.1.1	Le Gomori-Grocott.....	35
VI.2.1.2	May-Grünwald-Giemsa (MGG)	36
VI.2.1.3	Bleu de toluidine	36
VI.2.1.4	Autres colorations.....	37
VI.2.1.4.1	Gram Weigert.....	37
VI.2.1.4.2	PAS (Acide périodique de Schiff).....	37
VI.2.2	Immunofluorescence Directe	37
VI.2.3	Sérologie.....	38
VI.2.4	Biologie moléculaire	38
VI.2.5	Microscopie électronique	38
VI.2.6	Cultures	38
VII	Traitements	39
VII.1	Traitement spécifique	39
VII.1.1	Molécules anti- <i>Pneumocystis</i>	39
VII.1.2	L'émergence de résistance	41
VII.1.3	Perspectives	42
VII.2	Traitements adjuvants	43
VII.2.1	Corticothérapie	43
VII.2.2	Ventilation assistée.....	43
VIII	Prophylaxie	44
VIII.1	Prévention de l'exposition.....	44
VIII.2	Prophylaxie primaire	44
VIII.3	Prophylaxie secondaire	46
Partie 2 : Matériels et méthodes.....		47
I	Recueil et traitement des échantillons	48
II	Extraction de l'ADN.....	49
III	PCR quantitative en temps réel	50
III.1	Technologie utilisée	50
III.2	Appareillage	52
III.3	Conditions réactionnelles de la PCR.....	54
III.3.1	Composants du mélange réactionnel.....	54
III.3.1.1	Amorces, sondes et gène cible	54
III.3.1.2	MgCl ₂	55
III.3.1.3	Désoxyribonucléotides triphosphate : dNTP.....	55
III.3.1.4	<i>Taq</i> Polymérase	55
III.3.1.5	Solution tampon 10X	55
III.3.1.6	Contrôle interne.....	55
III.3.2	Préparation du mix	56
III.4	Quantification.....	56
III.4.1	Stratégie de quantification.....	56
III.4.2	Obtention d'ADN de <i>P. jiroveci</i> par clonage.....	56
III.4.2.1	Principe.....	56
III.4.2.2	Les étapes	56
III.4.3	Préparation de la gamme d'étalonnage	58
III.4.3.1	Les étapes	58
III.4.3.1.1	Quantification de l'ADN contenu dans le plasmide.....	58
III.4.3.1.2	Calcul du nombre de copies de <i>P. jiroveci</i> contenues dans l'extrait.....	58
III.4.3.1.3	Dilutions de l'ADN plasmidique.....	59

IV	Techniques complémentaires	60
IV.1	Immunofluorescence directe	60
IV.2	Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 9%	60
V	Résumé du protocole utilisé dans l'étude	61
Partie 3 : Résultats		62
I	Optimisation des conditions de PCR	64
I.1	Volume de la prise d'essai d'ADN	64
I.2	Gamme de MgCl ₂	64
I.3	Gamme de température	65
I.4	Composition du mix utilisé	65
II	Validation de la PCR quantitative en temps réel	66
II.1	Limite de détection et seuil de positivité	66
II.2	Répétabilité	67
II.3	Reproductibilité	67
II.4	Critères de validation de la gamme d'étalonnage	70
II.5	Expression des résultats	71
II.6	Limite de quantification	71
III	Application de la PCR en temps réel quantitative pour le diagnostic de pneumocystose	73
III.1	Caractéristiques de la population étudiée	73
III.2	Résultats	74
III.2.1	Techniques complémentaires réalisées sur les 38 échantillons discordants	74
III.2.2	Analyse des données cliniques	76
III.3	Analyse des 4 catégories de patients	79
III.3.1	Patients ayant une pneumocystose prouvée (n=10) (annexe 13 et 14)	79
III.3.2	Cas de pneumocystoses probables (n=5) (Annexe 15)	82
III.3.3	Patients colonisés (n=32) (Annexe 16)	83
III.3.4	Absence de <i>Pneumocystis</i> dans le LBA (n=142)	85
Discussion		86
Abréviations		98
Annexes		100
Revue de la littérature		135

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle hypothétique de <i>P. jiroveci</i> d'après Yoshida (1989).	18
Figure 2 : Interactions entre <i>Pneumocystis</i> et son hôte (Pop, Kolls <i>et al.</i> 2006).	20
Figure 3 : Radiographie pulmonaire chez un patient de 68 ans atteint de pneumocystose.	29
Figure 4 : Amas de kystes de <i>P. jiroveci</i> colorés au Musto (grossissement x40) collection personnelle.	35
Figure 5 : Amas de kystes de <i>P. jiroveci</i> colorés au MGG (grossissement x40) collection personnelle.	36
Figure 6 : Kystes de <i>P. jiroveci</i> (en vert) et débris cellulaires (en rouge) observés au microscope à fluorescence kit Monofluo [®] , Biorad.	37
Figure 7 : Prise en charge des LBA au laboratoire de Mycologie/Parasitologie du C.H.U de Nantes.	49
Figure 8 : Représentation schématique de la sonde TaqMan [®] MGB.	51
Figure 9 : Principe de la PCR en temps réel utilisant une sonde TaqMan [®] MGB.	51
Figure 10 : Courbe d'allure sigmoïdale obtenue au cours de la PCR en temps réel.	53
Figure 11 : Droite d'étalonnage établie à partir de 6 dilutions (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9}) de l'extrait de <i>P. jiroveci</i>	59
Figure 12 : Résumé du protocole utilisé pour cette étude.	61
Figure 13 : Représentation graphique de la répartition des âges de la population étudiée (n=189).	73
Figure 14 : Répartition graphique des pathologies sous jacentes dans la population étudiée (n=189).	73
Figure 15 : Arbre décisionnel appliqué aux 38 échantillons uniquement positifs en PCR <i>Pneumocystis</i>	77
Figure 16 : Quantité d'ADN (Log_{10} copies/réaction) chez les patients atteints de pneumocystose en fonction de leur statut vis-à-vis du VIH [VIH+ (n=5) ; VIH- (n=5)].	81
Figure 17 : Quantités d'ADN (Log_{10} copies/réaction) de <i>P. jiroveci</i> chez les patients atteints d'une pneumocystose prouvée, probable ou colonisés.	94
Figure 18 : Composition du mix pour la PCR M13.	109
Figure 19 : Marqueur de poids moléculaire V de 8 à 587 pb. Roche [®]	114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nomenclature trinominale pour <i>Pneumocystis</i> (Workshop 1994).....	16
Tableau 2 : Taux de colonisation (%) par <i>P. jiroveci</i> en fonction de la catégorie de patients étudiée..	26
Tableau 3 : Caractéristiques des pneumocystoses selon le statut immunitaire des patients vis-à-vis du VIH (Sepkowitz 2002).....	30
Tableau 4 : Taux d'attaque pour la pneumocystose en fonction des pathologies sous jacentes chez des patients ne recevant pas de prophylaxie (Rodriguez and Fishman 2004).....	32
Tableau 5 : Traitement de la pneumocystose d'après Lacombe, 2004 (Lacombe and Girard 2004). ...	40
Tableau 6: Prophylaxies primaires et secondaires de la pneumocystose (Lacombe and Girard 2004). 44	44
Tableau 7 : Indications possibles pour l'utilisation d'une prophylaxie anti- <i>Pneumocystis</i> chez les patients immunodéprimés non VIH (Rodriguez and Fishman 2004).	45
Tableau 8 : Nombre approximatif de copies de <i>P. jiroveci</i> contenues dans chacune des dilutions de l'extrait d'ADN.....	59
Tableau 9 : Résultats de l'optimisation de la concentration en MgCl ₂ de la PCR <i>P. jiroveci</i>	64
Tableau 10 : Résultats de l'optimisation de la température de la PCR <i>P. jiroveci</i>	65
Tableau 11 : Résultats des 10 PCR effectuées sur 8 dilutions de l'extrait d'ADN de <i>P. jiroveci</i> , avec une prise d'essai de 5 µL.	66
Tableau 12 : Résultats de l'étude de répétabilité intra-essais de la PCR <i>P. jiroveci</i>	67
Tableau 13 : Résultats de l'étude de reproductibilité inter-essais de la PCR <i>P. jiroveci</i>	68
Tableau 14 : Reproductibilité des paramètres de la droite d'étalonnage pour la PCR <i>P. jiroveci</i>	69
Tableau 15 : Résultats de la recherche de <i>P. jiroveci</i> par la coloration de Musto et par la PCR sur 201 échantillons de LBA.	74
Tableau 16 : Résultats de l'immunofluorescence directe réalisée sur les échantillons positifs quantifiables (n=19).....	75
Tableau 17 : Résultats des 2 PCR <i>Pneumocystis</i> et de l'électrophorèse en gel réalisées sur les échantillons positifs non quantifiables (n=19).....	76
Tableau 18 : Comparaison de l'âge, du taux des CD4+, de la durée des prodromes, du nombre de copies de <i>P. jiroveci</i> et du pourcentage de mortalité chez les patients ayant présenté une pneumocystose en fonction de leur statut vis-à-vis du VIH.	80
Tableau 19 : Résultats de la PCR <i>Pneumocystis</i> chez 3 patients ayant eu plusieurs LBA successifs... 83	83
Tableau 20 : Taux de colonisation à <i>P. jiroveci</i> en fonction de la pathologie sous jacente.	84
Tableau 21 : Quantités de copies de <i>P. jiroveci</i> détectées chez les 32 patients colonisés.	85
Tableau 22 : Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP) et valeur prédictive négative (VPN) de la coloration de Musto et de la PCR <i>Pneumocystis</i> dans notre étude (n=201) pour le diagnostic de pneumocystose.	88

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Bon de demande spécifique pour les recherches mycologiques et parasitologiques dans les LBA	101
Annexe 2 : Technique de coloration de Musto (Gomori Grocott modifié)	102
Annexe 3 : Technique de coloration May-Grünwald-Giemsa.....	103
Annexe 4 : Technique de coloration au bleu de toluidine	104
Annexe 5 : Extraction de l'ADN de LBA	105
Annexe 6 : Position des amorces et de la sonde utilisées dans la PCR <i>Pneumocystis</i>	106
Annexe 7 : Procédure de clonage pGEM [®] -T easy.	107
Annexe 8 : Procédure d'extraction du plasmide.....	111
Annexe 9 : Technique d'immunofluorescence.....	112
Annexe 10 : Gel pour électrophorèse des produits de PCR	113
Annexe 11 : PCR en temps réel <i>Pneumocystis jiroveci</i>	115
Annexe 12 : Résultats des 201 LBA.....	116
Annexe 13 : Données cliniques des patients non VIH atteints de pneumocystose.	127
Annexe 14 : Données cliniques des patients VIH + atteints de pneumocystose.	128
Annexe 15 : Données cliniques des cas de pneumocystose probables.....	129
Annexe 16 : Données cliniques des patients colonisés par <i>P. jiroveci</i>	130
Annexe 17 : Spécificité de la PCR <i>Pneumocystis</i>	133

Introduction

Pneumocystis jiroveci, anciennement connu sous le nom de *Pneumocystis carini*, est un champignon atypique ubiquitaire, responsable de pneumopathie mortelle en l'absence de traitement spécifique chez les sujets immunodéprimés.

Au laboratoire, le diagnostic est généralement réalisé par la mise en évidence du micro-organisme à l'examen microscopique. Néanmoins, les techniques de colorations employées ne sont pas suffisamment sensibles pour garantir avec certitude l'absence de pneumocystose, en particulier chez les patients non VIH, pour lesquels la quantité de kystes dans le LBA est souvent faible.

Or, il est indispensable de ne pas méconnaître ce diagnostic car il s'agit d'une pathologie grave mettant en jeu le pronostic vital du patient.

Depuis les années 1990, les progrès accomplis dans le domaine de la biologie moléculaire ont mené au développement de techniques de PCR très sensibles et probablement plus performantes pour la recherche de *Pneumocystis*.

Le but de cette étude était donc de mettre en place une technique de PCR quantitative pour la détection de *P. jiroveci* dans les LBA et de déterminer les intérêts et les limites de cet outil pour le diagnostic de pneumocystose. Pour cela, nous avons comparé les résultats obtenus par la coloration de Musto et par la PCR sur 201 LBA testés de façon rétrospective. Nous avons ensuite analysé les résultats quantitatifs de la PCR pour déterminer s'il était possible de définir un seuil permettant de différencier les sujets colonisés par *P. jiroveci* de ceux développant une pneumocystose.

Partie 1 : Généralités

I Historique

Pneumocystis jiroveci, anciennement connu sous le nom de *Pneumocystis carini* est un micro-organisme eucaryote très répandu qui parasite le poumon de l'homme et d'autres mammifères. La première description du parasite revient à Chagas en 1909, qui l'isole dans des poumons de cobayes infectés par *Trypanosoma cruzi*. Il prit d'abord le micro-organisme pour un élément du cycle du trypanosome (Chagas 1909).

En 1910, Carini retrouve ce même micro-organisme dans des poumons de rats infectés par *Trypanosoma lewisi* (Carini 1910). Trois ans plus tard, Delanoë et Delanoë à l'institut Pasteur de Paris observent dans les poumons de rats non infectés par *Trypanosoma* spp la présence de kystes pulmonaires comprenant huit corps intrakystiques en tout point identiques à ceux isolés par Carini. Ils l'individualisent alors et le nomment *Pneumocystis carini* en raison de la localisation pulmonaire des kystes et en hommage à Antonio Carini (Delanoë and Delanoë 1912).

C'est après la première guerre mondiale que furent rapportées les premières descriptions cliniques de pneumopathies interstitielles chez des enfants dénutris ou en état d'immunodépression congénital dans des orphelinats allemands (Feyrter 1927).

Mais ce n'est qu'en 1952 que Vanek *et al.* établissent son implication en pathologie humaine. En effet, ils retrouvent le micro-organisme dans l'exsudat alvéolaire d'enfants prématurés et malnutris, atteints de pneumopathies interstitielles plasmocytaires en Europe (Vanek 1951). Il faudra attendre 1958 pour montrer l'efficacité de l'isethionate de pentamidine dans ces pneumonies (Ivaldy and Paldy 1958).

C'est principalement dans les années 1960, avec l'essor de l'immunodépression thérapeutique, que resurgit l'intérêt du corps médical pour cette pathologie pulmonaire. Avant 1980, *P. jiroveci* est considéré comme responsable de pneumonies graves voire mortelles en l'absence de traitement survenant uniquement chez les patients immunodéprimés, lors de chimiothérapies, à la suite de cancers ou de transplantations d'organes (Bientz and Rochemaure 1973; Walzer, Perl et al. 1976).

En 1981, le CDC (Centers for Disease Control) d'Atlanta (Georgie, USA) relève une demande accrue de pentamidine destinée au traitement de pneumocystoses survenant chez des homosexuels new yorkais atteint de sarcome de Kaposi et ne recevant pas d'immunosuppresseur. Cette épidémie de pneumocystose conduit ainsi à la première mise en évidence du Syndrome d'Immunodéficience Acquis (Centers for Disease Control 1981).

C'est avec la pandémie de SIDA, que la pneumocystose commence réellement à retenir l'attention de la communauté scientifique. Elle représente alors la première infection opportuniste inaugurant le passage au stade SIDA. La prophylaxie instaurée dès 1989 a largement contribué à diminuer l'incidence de cette pathologie. Par la suite, l'avènement des multithérapies anti-rétrovirales et la meilleure prise en charge des patients VIH+ ont réduit l'incidence et la mortalité de cette maladie. Néanmoins, la pneumocystose reste à l'heure actuelle un problème majeur pour les patients sidéens n'ayant pas accès aux traitements anti-rétroviraux, notamment dans les pays en voie de développement, pour les patients ne répondant pas aux thérapeutiques ou ceux n'ayant pas connaissance de leur statut sérologique concernant le VIH (Morris, Lundgren *et al.* 2004).

L'impact de *P. jiroveci* ne se limite pas aux seuls patients VIH+, mais s'étend aussi à l'ensemble des personnes bénéficiant de thérapeutiques immunosuppressives lors de transplantations d'organes, de maladies inflammatoires chroniques ou d'hémopathies.

***Pneumocystis jiroveci*, anciennement connu sous le nom de *Pneumocystis carini*, fut décrit pour la première fois par Chagas en 1909. Dans les années 1950, Vanek et Jirovec le définissent comme l'agent étiologique de la pneumonie interstitielle en pathologie humaine.**

Mais, c'est à partir des années 1980, avec la pandémie de SIDA que ce parasite émerge au premier plan des agents opportunistes les plus pathogènes.

II Agent pathogène

Il s'agit d'un micro-organisme eucaryote unicellulaire ubiquitaire considéré définitivement comme un champignon atypique opportuniste pouvant se développer chez différents mammifères dont l'homme.

II.1 Taxonomie

La position taxonomique de ce parasite a toujours fait l'objet de controverses. Tout d'abord classé parmi les protozoaires, il a été par la suite rapproché des champignons.

II.1.1 Appartenance au règne des Protozoaires

D'abord classé par erreur parmi les *Trypanosomatidae* par Chagas en 1909, *Pneumocystis jiroveci* va par la suite être rapproché des protozoaires et cela jusqu'en 1988.

Différents arguments viennent étayer cette hypothèse :

- La sensibilité aux médicaments anti-protozoaires, tels que la pentamidine et l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (Queener, Bartlett *et al.* 1988).
- L'absence de développement *in vitro* sur les milieux appropriés à la culture fongique type Sabouraud (Dei-Cas, Cailliez *et al.* 1992).
- La capacité à synthétiser *de novo* des folates à partir de l'acide para-aminobenzoïque, comme les Apicomplexa (Kaneshiro 1998).
- L'absence d'ergostérol dans la membrane, ce qui expliquerait sa résistance aux antifongiques, tels que l'amphotéricine B (polyène) et les azolés (Kaneshiro 1998).
- La présence de prolongements cytoplasmiques (filopodes) conférant aux trophozoïtes un aspect amiboïde (de Souza and Benchimol 2005).

II.1.2 Appartenance au règne des Fungi

D'autres arguments en revanche tendent à le rapprocher des champignons :

- La paroi du kyste : la structure trilamellaire (couche externe, couche moyenne et membrane plasmique) de la paroi du kyste et la présence dans cette paroi de β (1-3) glucane qui évoquent la paroi fongique (Ruffolo, Cushion *et al.* 1989).

- L'existence de facteur d'élongation FE3 nécessaire à la synthèse des protéines présent dans de nombreux genres fongiques et montrant une analogie d'environ 57% avec *Saccharomyces cerevisiae* (Ypma-Wong, Fonzi *et al.* 1992).
- Des affinités immunologiques se traduisant par la présence d'épitopes communs entre *P. jiroveci* et certains champignons comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus fumigatus* (Lundgren, Kovacs *et al.* 1992).
- Au niveau génétique : la comparaison de la structure du gène 5S de l'ARN ribosomal (ARNr) de *P. jiroveci* avec d'autres micro-organismes, suggère qu'il est associé au groupe de rhizopodes/myxomycètes/zygomycètes (Watanabe, Hori *et al.* 1989). Au contraire, l'étude des gènes 16S et 26S de l'ARNr tend à le rapprocher des Ascomycètes (Stringer, Hudson *et al.* 1989; Liu, Rocourt *et al.* 1992). L'étude menée par Wakefield sur la grande sous unité de l'ARNr mitochondrial (mtLSU ARNr) montre l'existence d'affinité avec les Basidiomycètes (Wakefield, Peters *et al.* 1992).
- La constitution d'arbres phylogénétiques comme celui réalisé à partir de la séquence protéique de la β -tubuline, qui place *P. jiroveci* dans le même groupe que *Candida*, *Saccharomyces* et *Schizosaccharomyces* (Li and Edlind 1994).

L'étude du génome suggère donc fortement l'appartenance de *P. jiroveci* au règne des champignons. Il s'agit **d'un champignon atypique** qui ne pousse pas sur les milieux usuels et dont la classification reste à préciser. En 1994, Eriksson a proposé de créer **une nouvelle famille au sein des Ascomycètes : les *Pneumocystidaceae* ayant pour ordre les Pneumocystidales** (Eriksson 1994). La majorité des études s'accordent à le classer parmi les Ascomycètes (Hibbett, Binder *et al.* 2007). Ces difficultés de classification illustrent le caractère singulier de ce micro-organisme.

Jusqu'en 1988, *P. jiroveci* est perçu comme un protozoaire. Grâce à l'étude du génome et la constitution d'arbres phylogénétiques, il est désormais classé dans le règne des Fungi parmi les Ascomycètes, au sein d'une famille spécifique : les *Pneumocystidaceae*. Cependant, du fait de ses particularités morphologiques, structurales et culturelles, il doit être considéré comme un champignon atypique.

II.2 Spécificité d'hôte / Biodiversité

II.2.1 Spécificité d'hôte

Pneumocystis se développe chez différents mammifères et présente des aspects morphologiques identiques en microscopie optique, c'est pourquoi, on a longtemps pensé qu'il s'agissait d'un seul et même micro-organisme. Il existe en fait **plusieurs espèces de *Pneumocystis*** qui présentent une **spécificité pour un hôte précis** et se distinguent les unes des autres par des caractéristiques phénotypiques et génétiques propres à chacune.

Des études immunologiques ont montré que la plupart des anticorps dirigés contre les *Pneumocystis* d'une même espèce ne présentent pas de réaction croisée avec des préparations antigéniques provenant de *Pneumocystis* issus d'autres espèces d'hôtes (Kovacs, Halpern *et al.* 1989; Vasquez, Smulian *et al.* 1996).

La spécificité d'hôte a aussi été mise en évidence par l'échec des tentatives d'infections croisées à partir d'inoculation de *Pneumocystis* provenant d'hôtes différents (Atzori, Agostoni *et al.* 1999).

De plus, l'analyse des caryotypes de *Pneumocystis* isolés de plusieurs espèces animales (rat, souris, furet, homme) en gel d'électrophorèse en champ pulsé a montré que les chromosomes sont différents, tant en nombre qu'en taille, avec des profils de migration différents d'une espèce à une autre (Weinberg and Durant 1994).

Enfin, l'étude des séquences nucléotidiques de plusieurs gènes tels que ceux codant pour les ARNr mitochondriaux, les ITS (Internal Transcribed Spacers), la thymidine kinase ou la β tubuline, a montré un polymorphisme génétique entre les *Pneumocystis* provenant d'hôtes différents confirmant ainsi l'existence d'une spécificité d'hôte (Mazars, Odberg-Ferragut *et al.* 1994; Weinberg, Edlind *et al.* 1994; Hunter and Wakefield 1996; Latouche, Poirot *et al.* 1997).

Après les premières données sur les séquences d'ADN de *Pneumocystis*, un changement de nomenclature a été suggéré, afin de refléter la spécificité d'hôte. Cependant, il semblait prématuré à ce moment de parler de nouvelles espèces et c'est pourquoi, lors du workshop de 1994, une **nomenclature trinomiale** provisoire a été adoptée (Workshop 1994).

Dans ce système, chaque sorte de *Pneumocystis* est considérée comme une « forme spéciale » et on ajoute à *Pneumocystis carini*, le nom latin de chaque espèce d'hôte dans laquelle il se développe (tableau 1). Ainsi, dans ce système *P. jiroveci* est appelé *Pneumocystis carini formae specialis hominis*.

Au fil des années, les données sur les séquences d'ADN se sont complétées et il est devenu clair que l'organisme responsable de la pneumocystose humaine devait être considéré comme une espèce à part entière. En 2001, le nom *P. jiroveci* a ainsi été proposé pour l'espèce décrite chez l'homme (Stringer, Cushion *et al.* 2001; Stringer, Beard *et al.* 2002)

Dénomination trinomiale	Autre dénomination	Espèce hôte
<i>Pneumocystis carini</i> f.sp <i>carini</i>	<i>Pc carini</i>	Rat (prototype)
<i>Pneumocystis carini</i> f.sp <i>rattus</i>	<i>Pc rattus</i>	Rat (variant)
<i>Pneumocystis carini</i> f.sp <i>hominis</i>	<i>Pc hominis</i>	Homme
<i>Pneumocystis carini</i> f.sp <i>mustelae</i>	<i>Pc mustelae</i>	Furet
<i>Pneumocystis carini</i> f.sp <i>muris</i>	<i>Pc muris</i>	Souris
<i>Pneumocystis carini</i> f.sp <i>equi</i>	<i>Pc equi</i>	Cheval
<i>Pneumocystis carini</i> f.sp <i>suis</i>	<i>Pc suis</i>	Porc
<i>Pneumocystis carini</i> f.sp <i>oryctolagi</i>	<i>Pc oryctolagi</i>	Lapin

Tableau 1 : Nomenclature trinomiale pour *Pneumocystis* (Workshop 1994).

II.2.2 Biodiversité au sein de *P. jiroveci*

D'autres études se sont attachées à démontrer la biodiversité au sein d'une même espèce. Chez l'homme, des études génomiques utilisant notamment le séquençage de certains fragments de gènes après PCR ont été mises à profit.

Il semble que les gènes espaceurs internes ITS (ITS1 et ITS2) soient les plus performants et permettent de différencier jusqu'à 810 génotypes dont environ 10% ont été décrits (Lee, Helweg-Larsen *et al.* 1998; Nimri, Moura *et al.* 2002).

Deux autres gènes peuvent être utilisés pour le typage : le gène de la grande sous unité de l'ARN mitochondrial (mtLSU ARNr) (Latouche, Ortona *et al.* 1997) et le gène de la dihydroptéroate synthétase (DHPS) (Santos, Lacube *et al.* 1999). Néanmoins, ces gènes étant plus conservés au sein des *Pneumocystis*, ils sont donc moins discriminants pour la mise en évidence de différents génotypes.

La possibilité de co-infection avec plusieurs souches génétiquement différentes a été rapportée (Totet, Duwat *et al.* 2004; Miller, Lindley *et al.* 2005).

Chez *Pneumocystis*, il a été montré un polymorphisme caryotypique et antigénique qui suggère une spécificité d'hôte. Cette spécificité d'hôte a été confirmée par l'échec des infections croisées. En 1994, cette découverte a abouti à la création d'une nomenclature trinomiale incluant le nom latin de chaque espèce hôte. En 2001, le nom de *P. jiroveci* a été retenu pour l'espèce décrite chez l'homme. L'existence d'une hétérogénéité au sein d'une même espèce, c'est à dire de souches différentes, a pu être mise en évidence.

II.3 Morphologie et cycle biologique

A l'heure actuelle, le cycle parasitaire de *P. jiroveci* reste encore incertain. Les formes connues sont retrouvées presque exclusivement au niveau des alvéoles pulmonaires et exceptionnellement dans d'autres organes.

Les données ultra-structurales obtenues en microscopie électronique à partir de l'étude de poumons humains ou animaux infectés par *P. jiroveci*, ont permis de mettre en évidence 3 principaux aspects morphologiques : le trophozoïte, le prékyste et le kyste.

Le trophozoïte est une forme végétative uninucléée dont la taille varie de 2 à 5 μm . Chez l'hôte infecté, les trophozoïtes sont généralement retrouvés associés les uns aux autres formant des clusters. Ils sont délimités par une membrane cellulaire munie d'élongations, les filopodes, qui permettraient leur attachement à la surface des pneumocytes de type I et assureraient les échanges nutritifs avec la cellule hôte.

Les prékystes mesurent de 3 à 8 μm . On distingue trois stades en fonction du nombre de noyaux (1 à 8) et de la structure de la paroi :

- les prékystes précoces (uninucléés)
- les prékystes intermédiaires (2 à 8 noyaux)
- les prékystes tardifs (8 noyaux)

Le kyste mature mesure de 6 à 8 μm . Il est sphérique et contient 8 corps intrakystiques. A maturité, le kyste se rompt et libère de jeunes trophozoïtes. Il en résulte un kyste vide ayant une forme caractéristique en « ballon dégonflé ».

En 1989, Yoshida *et al.* ont proposé un schéma pour tenter d'expliquer le déroulement du cycle de *P. jiroveci* au niveau des alvéoles pulmonaires (Yoshida 1989). Bien que le cycle biologique décrit ici semble accepté par une majorité d'auteurs, il reste néanmoins en partie incertain. En effet, l'absence de système expérimental permettant d'entretenir facilement le parasite *in vitro*, limite considérablement l'étude en détail de chacune des étapes du cycle biologique.

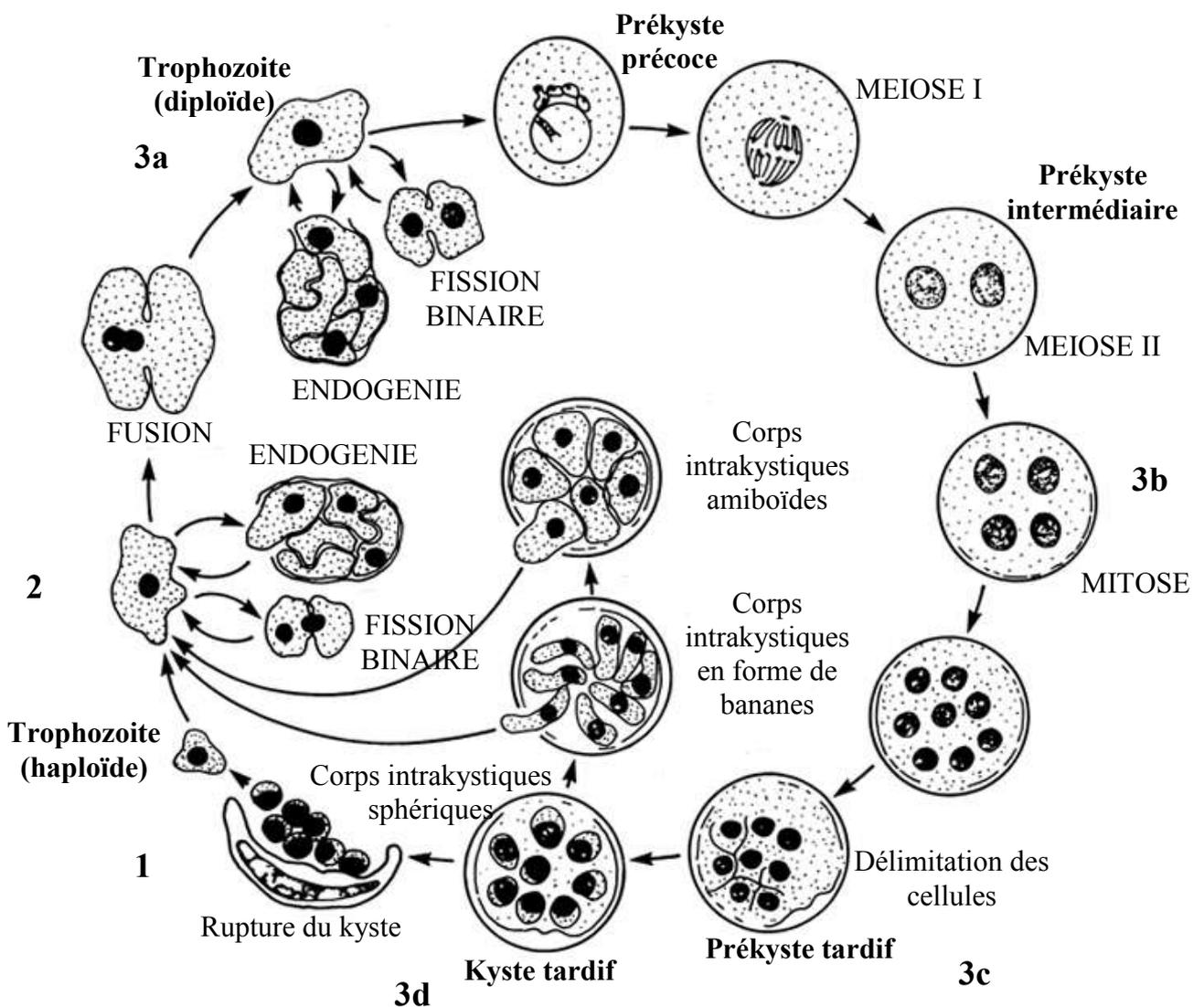


Figure 1 : Cycle hypothétique de *P. jiroveci* d'après Yoshida (1989).

Le cycle hypothétique proposé (figure 1) se déroule uniquement au niveau des poumons de l'hôte. Il est entièrement extra-cellulaire et inclus une phase sexuée et une phase asexuée. Les différentes étapes du cycle sont détaillées ci-après :

1- A maturité, les kystes se rompent et libèrent chacun 8 jeunes trophozoïtes.

2- A ce stade, les trophozoïtes peuvent se multiplier par division asexuée selon deux modes, soit une fission binaire, soit un cycle endogénique.

3-Le cycle se poursuit par une division sexuée au cours de laquelle, le trophozoïte évolue en prékyste, puis en kyste :

3a- Deux trophozoïtes haploïdes fusionnent aboutissant ainsi à une cellule diploïde, le prékyste précoce.

3b- Le noyau du prékyste précoce subit deux divisions méiotiques et une mitose aboutissant respectivement à la formation de 4 puis 8 noyaux haploïdes, correspondant au stade de prékystes intermédiaires.

3c- Au stade de prékyste tardif, chaque noyau s'entoure d'une membrane provenant de l'invagination de la membrane plasmique de la cellule mère.

3d- Dans le kyste mature, 8 corps intrakystiques sont parfaitement individualisés. Ils peuvent être de forme sphérique, amiboïde ou en forme de banane. A maturité, la rupture du kyste conduit à la libération de 8 jeunes trophozoïtes haploïdes.

Le cycle se déroule dans les poumons de l'hôte. Au cours du cycle, le parasite revêt successivement trois aspects morphologiques : le trophozoïte, le prékyste et le kyste. Il fait intervenir deux phases, sexuée et asexuée qui aboutissent à la constitution d'un kyste tardif contenant 8 corps intrakystiques à l'origine de nouveaux trophozoïtes. Néanmoins, il persiste des interrogations concernant le cycle de *P. jiroveci* et notamment, concernant les formes infectantes qui n'ont pour le moment, pas été identifiées avec certitude.

III Physiopathologie et immunité

III.1 Interactions de *Pneumocystis* avec les cellules épithéliales, les macrophages alvéolaires et le surfactant

III.1.1 Interaction avec les cellules épithéliales

P. jiroveci possède un tropisme pour les alvéoles pulmonaires. L'épithélium alvéolaire est constitué de 2 types de cellules, les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II. Les trophozoïtes vont d'abord adhérer aux pneumocytes de type I grâce aux expansions de leurs membranes.

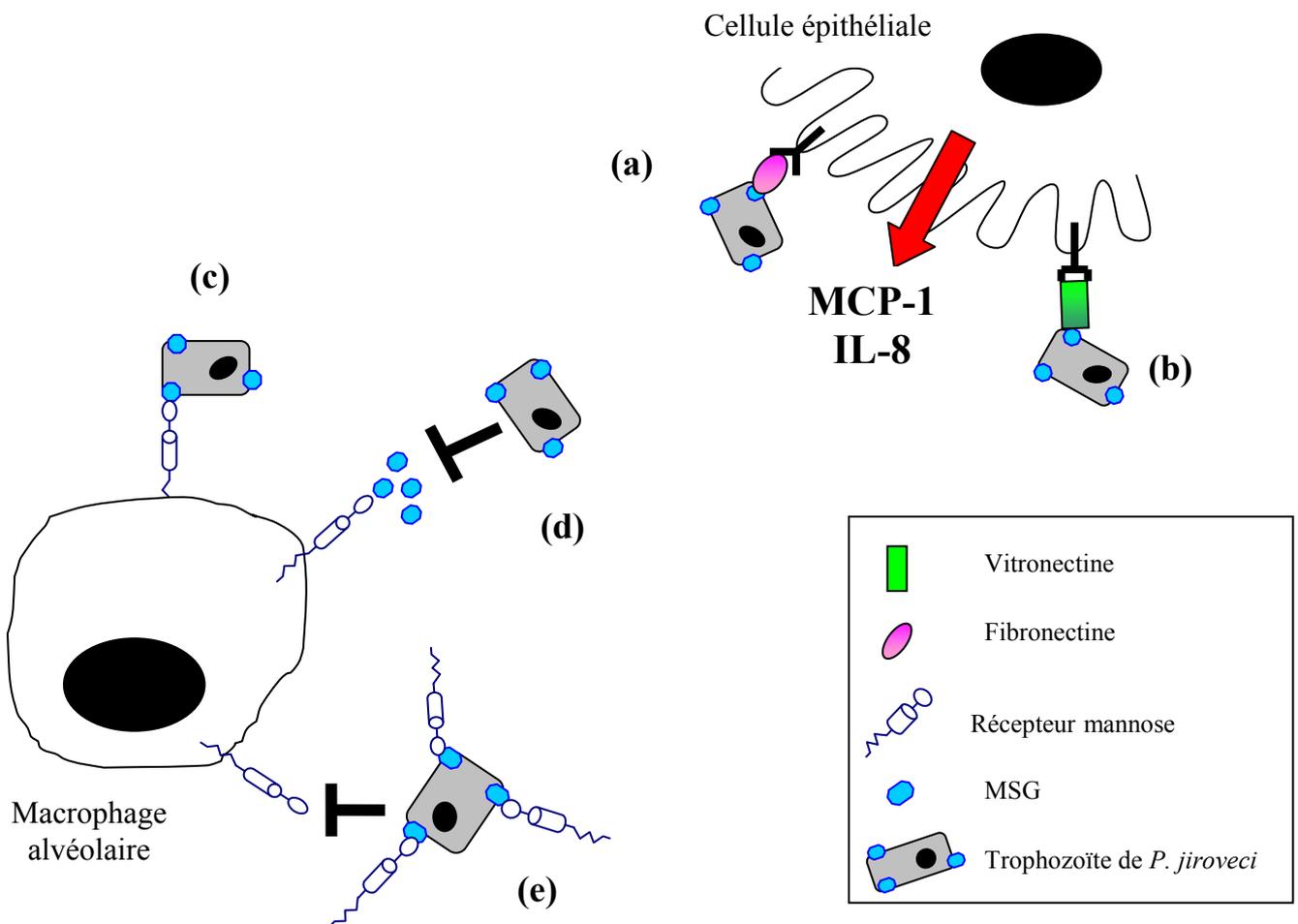


Figure 2 : Interactions entre *Pneumocystis* et son hôte (Pop, Kolls *et al.* 2006).

(a) et (b) La MSG du pneumocyste se lie à des protéines de l'hôte, telles que la fibronectine (a) et la vitronectine (b). Cette attachement stimule la sécrétion de substances pro-inflammatoires (MCP-1 et IL-8) par la cellule épithéliale. (c) Interaction entre les résidus mannoses de la MSG de *P. jiroveci* et le récepteur mannose situé à la surface du macrophage alvéolaire, entraînant la phagocytose et la clairance du micro-organisme. (d) *P. jiroveci* peut sécréter sa MSG qui peut alors empêcher par compétition la fixation du parasite sur les récepteurs mannoses et favoriser son évation vis-à-vis du système immunitaire. (e) *P. jiroveci* peut augmenter la sécrétion de récepteurs mannoses libres, bloquant ainsi l'adhésion du parasite aux macrophages alvéolaires.

Il a été démontré que cette adhésion pouvait être facilitée par des protéines sécrétées par l'hôte, telles que la fibronectine et la vitronectine (figure 2 (a) et (b)), qui seraient reconnues à la fois par les récepteurs de *P. jiroveci* et ceux de la cellule-hôte (Thomas and Limper 2004). En effet, ces protéines pourraient se lier à la surface du micro-organisme grâce à la MSG (Major Surface Glycoprotein) aussi appelée gpA (glycoprotéine A) qui constitue le principal antigène de surface du *Pneumocystis* (Nakamura 1998; Stringer and Keely 2001). Elles pourraient ainsi médier l'attachement aux récepteurs des intégrines présents à la surface des cellules épithéliales alvéolaires de l'hôte.

Cette attachement initierait la réponse inflammatoire. En réponse à la fixation du parasite, les cellules épithéliales alvéolaires produiraient des chemokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 et le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) (Benfield and Lundgren 1998).

III.1.2 Les macrophages alvéolaires

La réponse immunitaire développée par l'hôte résulte d'interactions complexes entre les cellules épithéliales alvéolaires, les lymphocytes T CD4+, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages alvéolaires. Ces derniers assurent majoritairement la phagocytose du parasite. Ces macrophages vont produire une grande variété de substances pro-inflammatoires afin d'éliminer le micro-organisme (Limper, Hoyte *et al.* 1997). Le paradoxe de cette situation tient dans le fait que la réponse inflammatoire nécessaire à l'élimination du parasite va engendrer des dommages pulmonaires conduisant à une détérioration de l'état respiratoire du patient (Huang, Morris *et al.* 2006). Cette constatation explique le recours aux corticoïdes dans les formes de pneumocystoses très hypoxémiantes.

III.1.3 Le surfactant pulmonaire

Des modifications de la composition du surfactant pulmonaire au cours des pneumocystoses ont été rapportées (Thomas and Limper 2004). Elles se traduisent par une diminution des phospholipides et des protéines B et C du surfactant et une augmentation des protéines A et D. Ces altérations du surfactant seraient à l'origine de perturbations dans la mécanique pulmonaire et dans les échanges gazeux. Ces altérations réduiraient ainsi la clairance du parasite au niveau pulmonaire.

III.2 Facteurs de virulence

Pour que la phagocytose ait lieu, il faut préalablement que les macrophages fixent le parasite. Il s'agirait d'une reconnaissance directe via des liaisons de type ligand-récepteur entre les «résidus mannoses» de la MSG du parasite et les récepteurs au mannose disposés à la surface des macrophages alvéolaires (figure 2 (c)).

P. jiroveci a développé différents mécanismes d'évasion vis-à-vis de la réponse immunitaire (figure 2 (d) et (e)) (Pop, Kolls *et al.* 2006). Lasbury *et al.* ont montré que le parasite sécrétait sa MSG afin de bloquer la phagocytose par compétition pour le récepteur mannose situé à la surface des macrophages alvéolaires (Lasbury, Lin *et al.* 2004). Le parasite pourrait induire la sécrétion de récepteurs mannoses libres par les macrophages alvéolaires, ce qui empêcherait son attachement via les récepteurs mannoses situés à la surface de ces derniers, bloquant ainsi la phagocytose (Fraser, Takahashi *et al.* 2000).

P. jiroveci disposerait aussi d'un système de variation antigénique de la MSG, qui lui permettrait d'échapper au système immunitaire. Ce système serait très proche de celui utilisé par *Trypanosoma brucei* (Stringer and Keely 2001).

Enfin, le parasite pourrait modifier la composition du surfactant pulmonaire. En particulier, il pourrait augmenter la production de la protéine D, ce qui favoriserait l'aggrégation des pneumocystes entre eux et rendrait leur phagocytose par les macrophages difficile (Yong, Vuk-Pavlovic *et al.* 2003).

III.3 Réponse immunitaire

III.3.1 Réponse à médiation cellulaire

Plusieurs observations indiquent que les lymphocytes T CD4 jouent un rôle primordial dans les mécanismes de défense de l'hôte vis-à-vis de *P. jiroveci*.

Chez les patients VIH+, le risque de développer une pneumocystose augmente quand le nombre de lymphocytes T CD4 circulants diminue. Cette observation a conduit à instaurer une prophylaxie systématique quand le taux de CD4 est inférieur à 200/mm³.

Chez les animaux, des cas de pneumocystoses spontanées ont pu être observés chez des souris nude (sans thymus) et des souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) (Roths, Marshall *et al.* 1990).

Des pneumocystoses ont aussi pu être induites chez des souris et des rats traités par corticoïdes ou malnutris (Walzer 1999). Des souris ayant subi une déplétion spécifique en lymphocytes T CD4 développent une infection à *P. jiroveci*. Quand leur système immunitaire est reconstitué avec des lymphocytes T CD4, elles retrouvent la capacité d'éliminer le parasite (Huang, Morris *et al.* 2006).

III.3.2 Réponse à médiation humorale

La prévalence élevée d'anticorps spécifiques chez des enfants très tôt dans l'enfance et dans la population générale (Pifer, Hughes *et al.* 1978; Peglow, Smulian *et al.* 1990) gêne considérablement l'étude de la réponse humorale. Le fait que ces anticorps n'empêchent pas la survenue d'une pneumocystose a conduit à leur attribuer un rôle modéré dans les mécanismes de défense à l'encontre du parasite. Cependant, ils pourraient participer à la réponse immunitaire en tant qu'opsonines (Walzer 1999). Actuellement, les recherches s'orientent sur l'analyse des réponses anticorps vis-à-vis de différents épitopes de la MSG (Daly, Fichtenbaum *et al.* 2002; Huang, Morris *et al.* 2006).

La réponse immunitaire vis-à-vis de *P. jiroveci* résulte d'interactions complexes entre les lymphocytes CD4+, les macrophages alvéolaires, les polynucléaires neutrophiles et les médiateurs solubles. Les lymphocytes CD4+ semblent constituer les cellules centrales de la réponse immunitaire. La réponse immunitaire conduit à une inflammation au niveau pulmonaire qui est paradoxalement délétère pour l'hôte.

IV Epidémiologie

IV.1 Théories de la contamination

IV.1.1 Réactivation d'une infection latente

L'hypothèse d'une réactivation endogène du parasite, présent à l'état latent dans les alvéoles pulmonaires et favorisée par un état d'immunodépression, a longtemps prévalu. Cette hypothèse s'appuie sur plusieurs constatations et notamment, le développement d'une pneumocystose spontanée chez des animaux immunodéprimés par une corticothérapie (Dei-Cas, Brun-Pascaud *et al.* 1998).

Certaines caractéristiques propres au micro-organisme lui-même sont en faveur d'un portage au long cours du parasite. Stringer *et al.* ont montré que *P. jiroveci* serait capable de faire varier ses MSG afin d'échapper à la réponse immunitaire ce qui signifie que le parasite persisterait chez l'homme pendant des périodes prolongées (Stringer and Keely 2001).

L'échec des contaminations croisées à partir d'isolats de *Pneumocystis* provenant de différentes espèces de mammifères a mis en évidence une spécificité d'hôte étroite qui implique que le micro-organisme aurait évolué pendant longtemps chez son hôte (Gigliotti, Harmsen *et al.* 1993).

IV.1.2 Contamination *de novo*

Progressivement, de nouvelles constatations sont venues étayer l'hypothèse d'une contamination *de novo* à partir d'une source exogène provenant d'un réservoir environnemental ou humain (Morris, Beard *et al.* 2002).

Des études ont montré la disparition de la totalité des *Pneumocystis* chez des animaux guéris d'une pneumocystose (Chen, Gigliotti *et al.* 1993). De plus, après leur guérison, si les souris sont de nouveau immunodéprimées, elles ne développent pas un nouvel épisode de pneumocystose. De même, chez le rat, des études ont rapporté que la survie du parasite dans les poumons après une première infection, était limitée à environ un an (Vargas, Hughes *et al.* 1995) Des résultats similaires montrant la négativation des techniques de détection de *P. jiroveci* (colorations, immunofluorescence et PCR) ont été retrouvés chez des patients guéris d'une pneumocystose, attestant de la clairance totale

du parasite (O'Donnell, Pieciak *et al.* 1998). Ainsi, la disparition du micro-organisme après un épisode de pneumocystose va à l'encontre de l'hypothèse d'une latence.

D'autres arguments viennent renforcer l'hypothèse d'une contamination *de novo*. Des études menées sur des LBA provenant de patients ayant présenté des épisodes récurrents de pneumocystose, ont établi que les génotypes isolés chez un même patient lors des récurrences pouvaient être différents (Keely and Stringer 1997; Latouche, Poirot *et al.* 1997).

Enfin, il a été démontré que la fréquence des génotypes de *P. jiroveci* varient d'une région géographique à l'autre. En particulier, les génotypes seraient plutôt reliés au lieu de l'infection, plutôt qu'au lieu de naissance des patients, suggérant une infection acquise récemment et non une réactivation (Beard, Carter *et al.* 2000).

IV.2 Réservoir

IV.2.1 Réservoir environnemental

Le développement de techniques de plus en plus sensibles comme la PCR a permis de retrouver de l'ADN de *P. jiroveci* dans l'environnement (Morris, Beard *et al.* 2002). L'ADN de *P. jiroveci* a été détecté dans de l'eau (Casanova-Cardiel and Leibowitz 1997), mais aussi dans l'air en milieu rural (Wakefield 1996), hospitalier (Olsson, Lidman *et al.* 1998) et dans des animaleries (Latouche, Olsson *et al.* 1997).

Bien que ces études attestent de la présence de l'ADN du micro-organisme dans le milieu extérieur, il faut souligner qu'aucune étude n'a pu mettre en évidence le parasite lui-même. De plus, ces travaux ne permettent pas d'évaluer la viabilité et l'infectiosité des formes détectées.

Bien qu'un réservoir environnemental soit envisageable, il est nécessaire de poursuivre et d'approfondir les investigations afin de préciser la circulation des différentes espèces de *Pneumocystis*, leurs réservoirs potentiels, ainsi que la nature des formes infectantes du champignon.

IV.2.2 Réservoir humain et transmission interhumaine

Les techniques de biologie moléculaire ont permis la mise en évidence d'ADN de *Pneumocystis* dans des prélèvements respiratoires provenant de patients ne présentant aucun signe de pneumocystose (Morris, Lundgren *et al.* 2004).

Cette découverte suggère l'existence de porteurs sains du parasite, c'est à dire de patients colonisés. Les taux de colonisation rapportés dans les études sont variables et dépendent des techniques de détection utilisées et des populations étudiées (tableau 2). Certains auteurs ont suggéré que la colonisation pourrait être impliquée dans la mort subite du nourrisson (Beard, Fox *et al.* 2005), mais les résultats des études sont controversés (Vargas, Ponce *et al.* 2007). Les données animales indiquent que la colonisation serait à l'origine d'une intense réponse inflammatoire au niveau pulmonaire (An, Gigliotti *et al.* 2003; Board, Patil *et al.* 2003). Il serait intéressant de savoir si une réponse similaire existe chez l'homme. Enfin, le rôle de la colonisation en tant que facteur favorisant la survenue d'une pneumocystose n'est pas encore prouvé.

Catégories de patients	Taux de colonisation (%)	Références bibliographiques
VIH+	10-69	(Takahashi, Goto <i>et al.</i> 2002; Huang, Crothers <i>et al.</i> 2003; Wakefield, Lindley <i>et al.</i> 2003; Larsen, Huang <i>et al.</i> 2004; Morris, Kingsley <i>et al.</i> 2004)
Adultes ayant une pathologie pulmonaire chronique	7-19	(Nevez, Raccurt <i>et al.</i> 1999; Sing, Roggenkamp <i>et al.</i> 1999; Sing, Geiger <i>et al.</i> 2001; Morris, Scirba <i>et al.</i> 2004)
Femmes enceintes	16	(Vargas, Ponce <i>et al.</i> 2003)
Adultes immunocompétents	0-20	(Medrano, Montes-Cano <i>et al.</i> 2005; Nevez, Magois <i>et al.</i> 2006)
Enfants immunocompétents (avec atteintes respiratoires ou bronchiolite)	15-32	(Vargas, Hughes <i>et al.</i> 2001; Totet, Meliani <i>et al.</i> 2003)

Tableau 2 : Taux de colonisation (%) par *P. jiroveci* en fonction de la catégorie de patients étudiée.

La possibilité de transmission inter-humaine a été évoquée suite à la constatation de « cas groupés » de pneumocystoses :

- Des « épidémies » de pneumocystoses ont été décrites chez des enfants prématurés ou dénutris dans des orphelinats (Goldman, Goldman *et al.* 2005).
- Des cas groupés ont été rapportés dans les hôpitaux recevant simultanément des patients immunodéprimés, VIH+ et VIH- (Goesch, Gotz *et al.* 1990; Chave, David *et al.* 1991; Helweg-Larsen, Tsolaki *et al.* 1998).
- Des cas de transmission ont été retrouvés parmi des patients transplantés rénaux (de Boer, Bruijnesteijn *et al.* 2007).
- Un cas de transmission d'ADN de *P. jiroveci* entre un patient atteint de pneumocystose et des soignants a été constaté (Vargas, Ponce *et al.* 2000).

De même, les modèles animaux appuient la théorie d'une transmission inter-individus par voie respiratoire (Powles, McFadden *et al.* 1992; Vogel, Miller *et al.* 1993)

Cependant, Helweg-Larsen *et al.* ont étudié les génotypes des souches de *P. jiroveci* isolées d'un cas groupé comportant 14 patients pour tenter d'établir un lien entre eux (Helweg-Larsen, Tsolaki *et al.* 1998). Parmi les 14 patients, seuls 4 partageaient un génotype commun. Une autre étude a comparé les génotypes isolés de patients avec les génotypes provenant d'échantillon d'air de leur chambre d'hôpital. (Olsson, Lidman *et al.* 1998). Ils retrouvent des génotypes identiques pour 4 échantillons parmi les 5. Mais, il est difficile de déterminer si l'ADN détecté dans l'air provient d'une source environnementale ou des personnes infectées.. Les résultats de ces travaux ne permettent pas de conclure avec certitude à l'existence d'une transmission inter-humaine.

Deux hypothèses ont été avancées concernant l'origine de la contamination, l'une en faveur d'une réactivation de *P. jiroveci* présent à l'état latent dans les alvéoles pulmonaires et l'autre en faveur d'une contamination *de novo*, à partir d'une source exogène. Le réservoir du parasite pourrait être environnemental ou même humain. La mise en évidence d'une colonisation par *P. jiroveci* chez les adultes et particulièrement chez les enfants suggère le rôle potentiel de ces individus en tant que réservoir du parasite et leur possible implication dans la transmission inter-humaine.

V Aspects cliniques de la pneumocystose

V.1 Tableaux cliniques

V.1.1 Infections chez le nourrisson

Des épidémies de pneumocystoses, rapportées sous le nom de pneumonies plasmocytaires ont été décrites en Europe, au cours des années 1950, chez des enfants dénutris, atteints d'un déficit immunitaire congénital ou prématurés (Goldman, Goldman *et al.* 2005). La maladie survient entre le deuxième et le sixième mois. Le début est généralement insidieux avec des signes non spécifiques (diarrhées, perte de poids...). Puis, il apparaît une polypnée associée à une cyanose périorale, évoluant vers un tableau de détresse respiratoire.

V.1.2 Infections chez le patient immunodéprimé

Dans la forme typique, la pneumocystose se présente sous forme d'une pneumopathie hypoxémiante. Elle se manifeste classiquement par une triade de symptômes associant dyspnée, toux sèche et fièvre. Cependant, cette triade clinique est souvent incomplète voire absente dans certains cas (Thomas and Limper 2004). Dans leur étude portant sur 32 patients VIH+, Fujii *et al* ont retrouvé une dyspnée, une toux et de la fièvre dans respectivement 65%, 74% et 74% des cas. La triade complète étant présente chez 41% des patients (Fujii, Nakamura *et al.* 2007). L'examen physique révèle typiquement une tachypnée et une tachycardie. L'auscultation pulmonaire est souvent normale.

Biologiquement, les gaz du sang retrouvent souvent une hypoxémie en rapport avec une pO_2 diminuée. La profondeur de cette hypoxémie constitue un élément pronostique. Des augmentations des LDH (Lactates déshydrogénases) sériques ont aussi été rapportées, mais elles manquent de spécificité.

La radiographie pulmonaire objective généralement un infiltrat interstitiel diffus bilatéral (figure 3) (Huang, Stansell *et al.* 1999). Cependant, une grande variété d'images radiologiques a été rapportée au cours des pneumocystoses. Au début de l'infection, la radiographie pulmonaire peut même être normale. Parfois, le recours au scanner, technique plus sensible, permet de mettre en évidence des images anormales non décelées sur la radiographie pulmonaire (Crans and Boiselle 1999).

Lorsque le diagnostic est porté très tardivement, l'évolution se fait vers un tableau d'insuffisance respiratoire aiguë. La radiographie pulmonaire est alors quasi opaque en « verre dépoli » ou « poumons blancs ».

Les complications les plus fréquentes sont les pneumothorax qui peuvent être spontanés ou faire suite à la ventilation assistée (Metersky, Colt *et al.* 1995).



Figure 3 : Radiographie pulmonaire chez un patient de 68 ans atteint de pneumocystose. Infiltrat alvéolo-interstitiel prédominant à droite (Thomas and Limper 2004).

Il semble que la présentation clinique de la pneumocystose diffère selon le statut immunitaire vis-à-vis du VIH (tableau 3).

Chez les patients infectés par le VIH, la pneumocystose débute généralement de façon insidieuse. A l'inverse, chez les patients immunodéprimés non infectés par le VIH, le début de la maladie est généralement plus brutal et l'évolution vers l'insuffisance respiratoire souvent plus rapide. La période entre le début des symptômes et le diagnostic de pneumocystose est de 28 jours chez les patients VIH alors qu'elle est inférieure à 5 jours en moyenne chez les sujets non VIH (Sepkowitz 2002).

Les patients VIH+ abritent une quantité significativement plus importante de *Pneumocystis* associés à peu de polynucléaires neutrophiles dans leurs poumons. Au contraire chez les patients non VIH, on retrouve généralement peu de *Pneumocystis* mais beaucoup de polynucléaires neutrophiles.

Chez les patients VIH+, la rareté des polynucléaires neutrophiles témoignent d'une faible réaction inflammatoire au niveau pulmonaire qui serait corrélée à une pO₂ plus élevée, c'est à dire une meilleure oxygénation et un taux de survie plus élevé, d'environ 80-90 % dans ce groupe de patients. Ainsi, paradoxalement, c'est la capacité supérieure des patients non VIH à pouvoir développer une réaction inflammatoire qui serait à l'origine d'un taux de complications et de mortalité plus élevés de 30 à 60 %, en fonction de la population à risque (Ng, Yajko *et al.* 1997; Thomas and Limper 2004).

	VIH+	Immunodéprimés non VIH
Durée des prodromes (jours)	28	< 5
pO ₂ (mm Hg)	69	50
Charge parasitaire (LBA)	Importante	Faible
Polynucléaires neutrophiles (LBA)	rare	nombreux
Mortalité (%)	< 20	30-60 ^a

a : selon les populations étudiées (hémopathies, transplantation d'organes, maladies auto-immunes)

Tableau 3 : Caractéristiques des pneumocystoses selon le statut immunitaire des patients vis-à-vis du VIH (Sepkowitz 2002).

La pneumocystose décrit typiquement un tableau de pneumopathie hypoxémiante qui survient chez des patients immunodéprimés.

Le diagnostic est difficile à porter du fait du manque de spécificité des signes cliniques et radiologiques et de la coexistence chez ces patients d'autres pathogènes opportunistes. Il semble que la présentation clinique de la pneumocystose diffère selon le statut immunitaire du patient vis-à-vis du VIH.

V.1.3 Pneumocystoses extra-pulmonaires

Ces formes résultent de la dissémination des trophozoïtes par voie sanguine ou lymphatique à partir de la localisation pulmonaire. Plusieurs cas de pneumocystoses extra-pulmonaires ont été rapportés chez des patients VIH+, le plus souvent, mais aussi chez des patients immunodéprimés non VIH.

Cependant, ces formes cliniques demeurent exceptionnelles avec une incidence faible, inférieure à 1% (Ng, Yajko *et al.* 1997).

Les atteintes peuvent être localisées à un site (foie, rate, reins, conduits auditifs, moëlle osseuse, thyroïde, œil...) ou au contraire touchées plusieurs organes (atteinte disséminée). Leur diagnostic n'est pas facile à réaliser.

Certaines études ont suggéré que l'utilisation d'aérosols de pentamidine en prophylaxie pouvait favoriser la survenue de localisations extra-pulmonaires du fait de concentrations insuffisantes de pentamidine dans le sang périphérique (Terris, Marche *et al.* 1996). Néanmoins, des cas de pneumocystose extra-pulmonaire rapportés chez des patients recevant une prophylaxie systémique par dapsonne/pyriméthamine suggèrent l'existence d'autres facteurs intervenant dans la dissémination (Carlin, Coker *et al.* 1993; Podzamczar, Martos *et al.* 1993).

Les pneumocystoses extra-pulmonaires demeurent exceptionnelles.

V.2 Facteurs de risque prédisposant à la pneumocystose

V.2.1 Patients VIH+

Le principal facteur de risque est un taux de lymphocytes CD4+ < 200/mm³. En dessous de ce seuil, le risque de développer une pneumocystose augmente exponentiellement avec la diminution des CD4+ (Morris, Lundgren *et al.* 2004).

V.2.2 Patients immunodéprimés non VIH

Chez ces patients, le risque de développer une pneumocystose ne semble pas aussi bien corrélé avec le taux de CD4+ (Overgaard and Helweg-Larsen 2007). Ce risque serait surtout lié à la nature de la pathologie sous jacente ainsi qu'à la profondeur et la durée de l'immunodépression (tableau 4) (Roblot, Le Moal *et al.* 2003; Rodriguez and Fishman 2004).

L'utilisation de thérapeutiques immunosuppressives (corticoïdes, chimiothérapies, molécules anti-rejet) favoriserait ainsi la survenue de la pneumocystose par le biais d'une altération qualitative et quantitative de l'immunité cellulaire. Dans leur étude portant sur 50 cas de pneumocystoses survenues chez des patients non VIH, Overgaard et Helweg-Larsen retrouvent comme principaux facteurs de risque : l'usage de corticoïdes (76%) et la chimiothérapie (72%) (Overgaard and Helweg-Larsen 2007).

Pathologies sous jacentes	Taux d'attaque (%)
LAL	6,5-42,9
Transplantation pulmonaire / cardio-pulmonaire	6,5-43
Syndrome d'immunodéficience sévère combiné	27-42
Transplantation cardiaque	2-41
Transplantation rénale	0,6-14
Maladie de Wegener	3,5-12
Transplantation hépatique	3-11
Allogreffe de moëlle	5-11
Collagénoses	<2
Maladie de Hodgkin	1,3

Tableau 4 : Taux d'attaque pour la pneumocystose en fonction des pathologies sous jacentes chez des patients ne recevant pas de prophylaxie (Rodriguez and Fishman 2004).

VI Diagnostic

VI.1 Les prélèvements

VI.1.1 Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA)

Il constitue le prélèvement de référence. Il est réalisé chez un patient à jeun après une anesthésie locale ou générale. Le fibroscope est introduit par la bouche ou le nez jusqu'au territoire atteint sur la radiographie ou jusqu'au lobe moyen en cas de pneumopathie diffuse. Deux à 3 fractions de 50 mL de soluté physiologique sont injectées, puis réaspirées immédiatement à l'aide d'une seringue reliée au fibroscope. Le LBA obtenu est ensuite réparti en flacons stériles pour différentes analyses (anatomopathologie, bactériologie, virologie, parasitologie).

Les sensibilités obtenues avec les LBA pour le diagnostic de la pneumocystose varient de 89 à 98% en fonction des colorations utilisées (Broaddus, Dake *et al.* 1985; Huang, Hecht *et al.* 1995). Il s'agit d'une procédure invasive et la survenue de complications bien que rare, est possible.

Il permet aussi le diagnostic d'autres infections pulmonaires chez les patients immunodéprimés (tuberculose, cryptococcose, aspergillose, pneumonies bactériennes communautaires...).

VI.1.2 Expectoration induite

Elle vise à obtenir du matériel d'origine alvéolaire en déclenchant un phénomène de toux par inhalation de soluté hypertonique (Holz, Kips *et al.* 2000). L'induction est réalisée à l'aide d'un aérosol obtenu par un nébuliseur le plus souvent de type ultrasonique. L'expectoration induite étant une procédure moins invasive que le LBA, il a été suggéré de la réaliser en première intention pour le diagnostic des pneumocystoses chez les patients VIH+ du fait de la présence d'une plus grande quantité de kystes de *P. jiroveci* que chez les patients non VIH. Cependant, les performances de l'expectoration induite associée aux techniques de colorations semblent inférieures au LBA en terme de sensibilité (Turner, Schwarz *et al.* 2003). Ces performances pourraient être améliorées en utilisant des méthodes plus sensibles comme la PCR.

VI.1.3 Les Biopsies pulmonaires

Elles consistent à effectuer un prélèvement de tissu pulmonaire sur lequel est réalisé un examen histologique. Il s'agit de techniques invasives pouvant entraîner des complications (pneumothorax, hémorragies, infections), ce qui limite fortement leur utilisation au profit de techniques moins invasives (Bigby 1994) .

VI.1.4 Liquide de Rinçage Oropharyngé (LROP)

Il s'agit de faire gargariser un patient à jeun avec 10 mL de sérum physiologique pendant 30 secondes à 1 minute. Cette technique est peu invasive et peut être réalisée de façon itérative (Wakefield, Miller *et al.* 1993).

Ce type de prélèvement, couplé aux techniques de biologie moléculaire, se prête à la fois au diagnostic de pneumocystose (Larsen, Huang *et al.* 2004) mais aussi aux enquêtes épidémiologiques et notamment à la recherche de porteurs sains de *Pneumocystis* (Soula 2002). Il peut aussi être indiqué pour le suivi-post thérapeutique des patients ayant développé une pneumocystose.

Les contraintes liées au LROP sont le délai d'acheminement au laboratoire qui doit être inférieur à 1 heure afin d'éviter la dégradation enzymatique des ADN et la présence en grande quantité d'inhibiteurs de PCR (Soula 2002).

Le LBA demeure l'examen de première intention pour le diagnostic de pneumocystose. Le développement de la biologie moléculaire pourrait améliorer les performances de procédures moins invasives, comme les expectorations induites et les LROP.

VI.2 Techniques diagnostiques

VI.2.1 Les colorations

Il est recommandé d'utiliser deux techniques de colorations complémentaires, l'une mettant en évidence tous les stades parasites et tous les types cellulaires, l'autre mettant en évidence la paroi des kystes et prékystes.

VI.2.1.1 Le Gomori-Grocott

Il s'agit d'une technique d'imprégnation argentique réalisée en 2 heures. Il est possible de réduire le temps de réalisation en utilisant une variante (Musto, Flanigan *et al.* 1982). Seules les formes kystiques et prékystiques sont mises en évidence par cette coloration. Ceci serait dû à la présence d'une structure particulière dans la paroi du kyste sur laquelle se déposerait les particules d'argent et qui serait absente des trophozoïtes (Yoshikawa and Yoshida 1987).

Les kystes sont ronds ou aplatis généralement disposés en amas. Leur paroi fortement colorée en brun-noir contraste avec le fond vert (figure 4). A l'intérieur du kyste, il est possible de discerner les corps intra kystiques sous forme d'une ou plusieurs tâches foncées. Outre les kystes de *P. jiroveci*, cette technique présente l'avantage de mettre en évidence d'autres éléments tels que les filaments mycéliens et les levures. Bien que les kystes soient relativement faciles à repérer pour un opérateur averti, il ne faut pas les confondre avec d'autres structures également colorées par cette technique (levures, spores fongiques, débris cellulaires, dépôts argentiques).

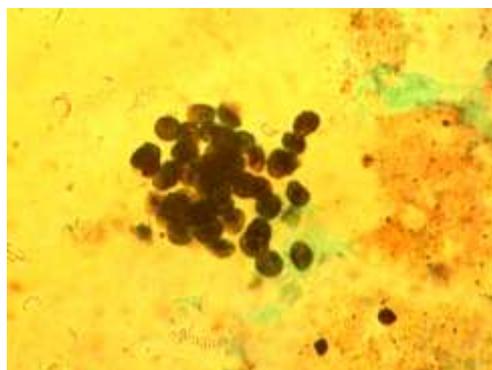


Figure 4 : Amas de kystes de *P. jiroveci* colorés au Musto (grossissement x40) collection personnelle.

Cette coloration présente une sensibilité assez modeste pour le diagnostic de pneumocystose, et en particulier, elle peut être prise en défaut lorsque les kystes sont en faible quantité, comme c'est souvent le cas chez les patients immunodéprimés non VIH. Enfin, il faut noter que les réactifs utilisés présentent une toxicité importante.

Une variante de cette technique (coloration de Musto) est actuellement utilisée à Nantes.

VI.2.1.2 May-Grünwald-Giemsa (MGG)

Les trophozoïtes se présentent sous forme d'amas avec un cytoplasme bleuté et un noyau pourpre. Les kystes sont difficilement observables car leur paroi ne prend pas la coloration et seuls les corps intrakystiques sont colorés en violet (Walker, Conner *et al.* 1989). On observe généralement un aspect dit « spumeux » (figure 5). Cette méthode est rapide à réaliser (20 minutes) et permet de rechercher simultanément les toxoplasmes. Par contre, les pneumocystes sont difficiles à repérer, ce qui rend la lecture des lames longue et assez fastidieuse. Cette technique est actuellement utilisée à Nantes.

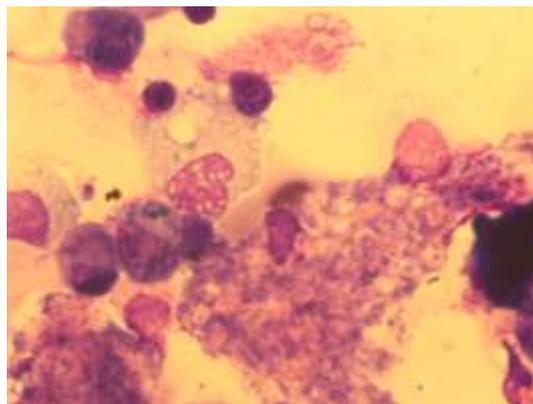


Figure 5 : Amas de kystes de *P. jiroveci* colorés au MGG (grossissement x40) collection personnelle.

VI.2.1.3 Bleu de toluidine

Cette méthode colore en bleu lavande la paroi des kystes sur un fond bleu (Gosey, Howard *et al.* 1985). A la lecture, les kystes sont groupés par paquet et sont assez facilement identifiés. Cependant, les kystes isolés constituent une difficulté majeure d'interprétation car ils ne doivent pas être confondus avec des levures.

VI.2.1.4 Autres colorations

VI.2.1.4.1 Gram Weigert

La paroi des kystes ainsi que les inclusions intrakystiques sont colorées en violet. Cette technique est peu employée car la reconnaissance des kystes est souvent gênée par des débris cellulaires également colorés en violet.

VI.2.1.4.2 PAS (Acide périodique de Schiff)

Cette méthode colore la paroi des kystes. D'autres structures telles que les levures prennent aussi la coloration au PAS. Cette technique ne permet pas à elle seule d'affirmer le diagnostic et reste plus appropriée au domaine d'anatomopathologie.

VI.2.2 Immunofluorescence Directe

Elle consiste à utiliser des anticorps monoclonaux dirigés contre *P. jiroveci*. Selon les kits, les anticorps peuvent être spécifiques ou non d'un stade parasitaire. Les kystes apparaissent de couleur vert pomme, plus ou moins brillants sur fond noir. Ils peuvent être marqués de manière uniforme ou irrégulière (figure 6).

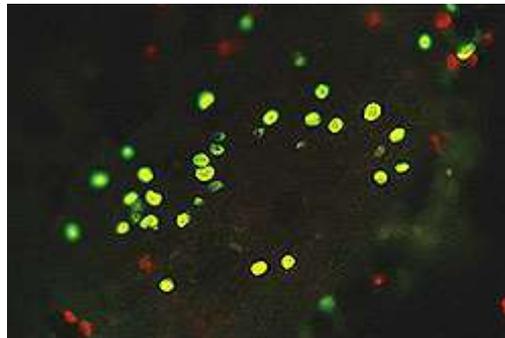


Figure 6 : Kystes de *P. jiroveci* (en vert) et débris cellulaires (en rouge) observés au microscope à fluorescence kit Monofluo[®], Biorad.

Le principal atout de cette technique est d'augmenter la sensibilité (Rigole, Basset *et al.* 1997) pour la recherche des pneumocystes grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux et à un volume de prélèvement supérieur à celui utilisé pour les colorations. Parmi les limites, il faut noter que cette technique est longue à réaliser, de coût relativement élevé et qu'elle nécessite un lecteur averti capable de discerner les kystes de *P. jiroveci* au sein de la fluorescence résiduelle.

VI.2.3 Sérologie

Il est possible de rechercher des anticorps spécifiques anti-*P. jiroveci* par immunofluorescence indirecte, par ELISA ou par immunoblot. Ces anticorps ont pu être détectés chez les enfants dès le plus jeune âge (Respaldiza, Medrano *et al.* 2004) mais aussi chez des sujets sains. Leur détection présente donc peu d'intérêt dans le diagnostic biologique, mais peut se révéler utile dans les études épidémiologiques et notamment dans la mise en évidence de la primo-infection (Vargas, Hughes *et al.* 2001).

VI.2.4 Biologie moléculaire

Différents types de PCR ont été développés afin de rechercher le génome de *P. jiroveci*. La grande sensibilité de ces techniques constitue un atout majeur pour la recherche de colonisation et peut se révéler intéressante pour les patients non VIH, chez lesquels le faible taux de pneumocystes peut être inférieur au seuil de détection de la microscopie.

VI.2.5 Microscopie électronique

Cette technique n'est pas utilisable en routine. Par contre, elle présente un intérêt en recherche, où elle a notamment permis d'approfondir les connaissances sur l'ultrastructure et le cycle biologique de *P. jiroveci*.

VI.2.6 Cultures

Aucun système de culture *in vitro* n'est actuellement disponible pour cultiver en continu *P. jiroveci*.

Au laboratoire, le diagnostic de pneumocystose est généralement réalisé par microscopie (colorations, immunofluorescence). Afin de pallier au manque de sensibilité de ces techniques, de plus en plus de laboratoires ont recours à des techniques de biologie moléculaires.

VII Traitements

VII.1 Traitement spécifique

VII.1.1 Molécules anti-*Pneumocystis*

Les molécules disponibles pour le traitement de la pneumocystose ainsi que leurs posologies sont regroupées dans le tableau 5.

Cotrimoxazole (Bactrim®)

C'est la molécule de choix pour le traitement de la pneumocystose (Benson, Kaplan *et al.* 2004). Il s'agit d'une association de deux anti-folates, le triméthoprim qui inhibe la dihydrofolate reductase (DHFR) et le sulfaméthoxazole qui inhibe la dihydroptéroate synthétase (DHPS). Ce médicament est caractérisé par une excellente diffusion tissulaire, une biodisponibilité identique entre la voie orale et la voie parentérale et surtout une réponse clinique rapide (Fishman 1998). La durée du traitement est généralement de 21 jours.

Le principal inconvénient de cette molécule demeure sa toxicité. Les effets secondaires (troubles digestifs, rash cutané, cytopénies, fièvre, élévations des transaminases, insuffisance rénale) sont très fréquents, particulièrement chez les patients VIH+ (environ 50% des cas) et peuvent conduire à des états allergiques ou à des intolérances parfois graves (Floris-Moore, Amodio-Groton *et al.* 2003). Ils surviennent généralement au bout de 7 à 10 jours de traitement et ne nécessitent pas systématiquement une interruption du traitement.

Pentamidine (Pentacarinat®)

Il s'agit d'une di-amine aromatique, qui inhibe la synthèse des folates et des polyamines. Elle constitue la principale alternative en cas d'allergie au cotrimoxazole. L'administration se fait par voie intraveineuse. La pentamidine s'accumule lentement dans les poumons ce qui retarde son efficacité en comparaison avec le cotrimoxazole. Par contre, sa demi-vie longue et son accumulation graduelle dans les poumons lui permettent de prolonger son activité au-delà de l'arrêt du traitement.

L'accumulation de la pentamidine dans l'organisme est aussi à l'origine d'une toxicité importante (pancréatite, hypoglycémie, cytopénies, hypotension et atteintes rénales) obligeant à une surveillance accrue (Fishman 1998).

Atovaquone (Wellvone®)

Il s'agit d'une naphthoquinone qui possède un large spectre d'activité non seulement à l'encontre des protozoaires (paludisme, babésiose, toxoplasmose) mais aussi à l'encontre de *P. jiroveci* (Baggish and Hill 2002). Cette molécule n'est indiquée que dans les formes modérées de pneumocystose. Elle représente une alternative intéressante pour les patients intolérants au cotrimoxazole du fait de sa moindre toxicité (Hughes, LaFon *et al.* 1995). Elle peut aussi être utilisée en relai oral d'un traitement par pentamidine.

La biodisponibilité constitue un élément clé puisqu'il a été démontré que la réussite de la thérapeutique est corrélée avec les concentrations plasmatiques de l'atovaquone. Bien que la biodisponibilité ait été améliorée par la formulation d'une suspension orale, l'efficacité de l'atovaquone peut être diminuée chez les patients ayant une absorption intestinale altérée. Enfin, un autre inconvénient est le coût élevé de cette molécule, environ 50 à 100 fois plus cher que le cotrimoxazole (Horowitz and Wormser 1999).

	Traitements	Voie	Doses
Première intention	Cotrimoxazole ¹	Orale/IV	TMP ⁹ 15 mg/kg/jour et SMX ¹⁰ 75 mg/kg/jour (sans dépasser 12 amp. Bactrim IV) TMP ⁹ 20 mg/kg/jour et SMX ¹⁰ 100 mg/kg/jour (sans dépasser 6 cps Bactrim forte)
Deuxième intention	Pentamidine ²	IV	3-4 mg/kg/jour
	Atovaquone ³	Orale	750 mg/12 heures
Alternatives	Dapsone ⁴ + triméthoprime ⁵	Orale	100 mg/jour + 20 mg/kg/jour
	Clindamycine ⁶ + primaquine ⁷	Orale	600 mg/6 heures ou 900 mg/8 heures + 15-30 mg/j
	Trimétrexate ⁸ + acide folinique	Orale	30-45 mg/m ² /jour + 20 mg/m ² /6 heures
	Pentamidine	Aérosols	300-600 mg/jour
1: Bactrim® Forte, 2: Pentacarinat®, 3: Wellvone®, 4: Disulone®, 5: Wellcoprim®, 6: Dalacine®, 7: Primaquine®, 8: Neutrexin®, 9: Triméthoprime, 10: Sulfaméthoxazole			

Tableau 5 : Traitement de la pneumocystose d'après Lacombe, 2004 (Lacombe and Girard 2004).

Le traitement de première intention de la pneumocystose repose sur l'utilisation du cotrimoxazole. La pentamidine et l'atovaquone peuvent être employées en cas d'effets secondaires graves liés au cotrimoxazole. D'autres alternatives thérapeutiques existent.

VII.1.2 L'émergence de résistance

L'utilisation très large du cotrimoxazole (pour le traitement et surtout pour la prophylaxie de la pneumocystose et des autres infections opportunistes) a entraîné l'émergence de résistance chez les bactéries. Cette constatation a conduit à s'interroger sur d'éventuelles résistances aux sulfamides chez *P. jiroveci*.

Les axes de recherche concernant les résistances ont très vite été limités du fait de l'impossibilité de cultiver *P. jiroveci* et donc l'incapacité de confirmer ces résistances *in vitro*.

Plusieurs équipes ont orienté leurs travaux vers la mise en évidence de mutations dans le gène de la DHPS et ont étudié les corrélations entre la présence *vs* l'absence de ces mutations et le devenir clinique des patients (mortalité *vs* survie, échec du traitement par cotrimoxazole *vs* guérison). Cette approche a été en partie choisie, d'une part, car des études animales ont démontré que l'activité du cotrimoxazole est presque entièrement attribuable au sulfaméthoxazole, un inhibiteur de la DHPS et d'autre part, car des mutations similaires confèrent une résistance aux sulfamides chez différents micro-organismes tels que *E. coli*, *S. pneumoniae*, *N. meningitis*, *P. falciparum* (Lopez, Espinosa *et al.* 1987; Dallas, Gowen *et al.* 1992; Brooks, Wang *et al.* 1994; Fermer, Kristiansen *et al.* 1995).

Il semble que l'apparition de ces mutations soient liées à l'emploi d'une prophylaxie utilisant les sulfamides ou apparentés (Kazanjian, Armstrong *et al.* 2000; Huang, Crothers *et al.* 2004; Kazanjian, Fisk *et al.* 2004). La durée d'exposition à ces drogues pourrait aussi jouer un rôle dans la survenue de ces mutations (Huang, Beard *et al.* 2000). Les mutations du gène de la DHPS les plus fréquemment rapportées sont localisées aux niveau des codons 55 et 57 et conduisent à des modifications d'acides aminés. Ces mutations situées à proximité du site d'attachement des sulfamides perturberaient la liaison des drogues à leur cible et conféreraient ainsi la résistance à ces molécules.

Les résultats des travaux portant sur l'impact clinique (mortalité, échec thérapeutique) de la présence de mutations dans le gène de la DHPS sont controversés (Helweg-Larsen, Benfield *et al.* 1999; Kazanjian, Armstrong *et al.* 2000; Navin, Beard *et al.* 2001). Ceci peut s'expliquer en partie par l'utilisation de définitions différentes de la prophylaxie anti-*Pneumocystis*, de l'échec ou du succès des traitements et des outils statistiques différents employés pour l'analyse des données. Il est difficile d'évaluer l'impact de ces mutations sur le devenir des patients, car celui-ci résulte de multiples facteurs (co-infections, âge, pathologies sous jacentes).

Enfin, bien que les résultats de ces études divergent, il est intéressant de remarquer que les patients atteints de pneumocystose pour lesquels il existait des mutations dans le gène de la DHPS, ont reçu un traitement par cotrimoxazole et ont pour la plupart bien répondu et survécu (Huang, Crothers *et al.* 2004).

Par homologie aux mécanismes de résistance bactériens vis-à-vis des sulfamides, des études ont montré l'existence de mutations dans le gène de la DHPS de *P. jiroveci*. Ces mutations pourraient être favorisées par la large utilisation du cotrimoxazole en prophylaxie. L'impact de ces mutants sur l'échec du traitement de la pneumocystose par cotrimoxazole et sur le devenir des patients n'est pas encore bien élucidé.

VII.1.3 Perspectives

Avec l'expansion de l'épidémie de VIH dans le monde et le large recourt aux thérapeutiques immunosuppressives, le traitement de la pneumocystose demeure une problématique majeure. L'émergence potentielle de résistance aux sulfamides ainsi que la toxicité des traitements anti-*Pneumocystis* actuellement disponibles sur le marché ont incité à développer de nouvelles molécules. De nouveaux agents anti-*Pneumocystis* très prometteurs, sont en cours de développement, telles que les échinocandines et les pneumocandines qui inhibent la synthèse des beta-glucanes ou les sodarines qui inhibent la synthèse des protéines fongiques (Patel and Koziel 2004).

De nouvelles molécules anti-*Pneumocystis* telles que les échinocandines, les pneumocandines et les sodarines sont en cours de développement.

VII.2 Traitements adjuvants

VII.2.1 Corticothérapie

Dans les formes sévères de pneumocystose, l'adjonction d'une corticothérapie est indiquée quand la pO_2 est inférieure à 70 mm Hg (Consensus. 1990; Thomas and Limper 2004).

La corticothérapie a montré un bénéfice notable sur le taux de mortalité, la prévention de l'hypoxie majeure et la fibrose (Briel, Bucher *et al.* 2006). Néanmoins, il faut surveiller la survenue de réactivations d'infections latentes (CMV, mycobactéries, herpès virus) notamment si la corticothérapie est poursuivie au-delà de 21 jours.

VII.2.2 Ventilation assistée

En dépit de son aspect longtemps controversé, le recours à une ventilation assistée peut être nécessaire dans les formes de pneumocystoses sévères et très hypoxémiantes ne s'améliorant pas sous ventilation non invasive (Lacombe and Girard 2004).

Le recours à une corticothérapie est indiquée dans les formes très hypoxémiantes de pneumocystoses. Parfois, il est nécessaire d'y associer une ventilation assistée.

VIII Prophylaxie

VIII.1 Prévention de l'exposition

En l'absence de données suffisantes, la Société Française d'Hygiène recommande l'isolement des patients en chambre seule et la mise en place de précautions « gouttelettes ».

VIII.2 Prophylaxie primaire

Chez les patients VIH+, il est recommandé de débiter une prophylaxie primaire dès que le taux de lymphocytes T CD4 est inférieur à 200/mm³ (Lacombe and Girard 2004).

L'efficacité du cotrimoxazole et son activité vis-à-vis de la toxoplasmose et des infections bactériennes des voies aériennes justifient son utilisation en première intention (Kaplan, Masur *et al.* 2002). En cas d'intolérance ou d'effets indésirables graves, plusieurs stratégies sont envisageables, soit diminuer les posologies ou la fréquence des prises du cotrimoxazole, soit le réintroduire à doses progressives (désensibilisation). Si les effets indésirables persistent, il est justifié de recourir à d'autres traitements. Les molécules et les posologies utilisées pour la prophylaxie de la pneumocystose sont présentées dans le tableau 6.

	Molécules	Prophylaxie primaire	Prophylaxie secondaire
Première intention	Cotrimoxazole ¹ TMP/SMX	160/800 mg/j ou 3 fois/semaine	idem
Alternatives si intolérance	Pentamidine ² aérosol	300 mg/mois	idem
	Dapsone ³	100 mg/j	
	Dapsone + pyriméthamine ⁴ + acide folique ⁵	50 mg/j + 50 mg/semaine + 25 mg/semaine	
	Atovaquone ⁶	750 mg/j	

1 : Bactrim Forte[®], 2 : Pentacarinat[®], 3 : Disulone[®], 4 : Malocide[®], 5 : Lederfoline[®], 6 : Wellvone[®]

Tableau 6: Prophylaxies primaires et secondaires de la pneumocystose (Lacombe and Girard 2004). Les posologies sont données à titre indicatif, plusieurs schémas thérapeutiques sont envisageables.

Une prophylaxie discontinue chez les patients traités par anti-rétroviraux présentant un taux de CD4 supérieur à 200/mm³ et une réplication virale basse est envisageable à condition que le taux de CD4 reste supérieur à 200/mm³ plus de trois mois d'affilée (Furrer, Egger *et al.* 1999; Lopez Bernaldo de Quiros, Miro *et al.* 2001).

Une prophylaxie discontinue est préconisée chez ces patients car elle permet d'améliorer leur qualité de vie (Masur, Kaplan *et al.* 2002) :

- en allégeant les quantités de drogues.
- en favorisant l'observance vis-à-vis des traitements anti-rétroviraux.
- en réduisant le risque de toxicité et d'interactions médicamenteuses.
- en limitant l'émergence de micro-organismes résistants.

La prophylaxie devra être réintroduite dès que le taux de CD4 redescend en dessous de 200/mm³. Récemment, D'Egidio *et al.* ont suggéré qu'un taux de CD4+ inférieur à 200/mm³, n'entraînait pas obligatoirement la réintroduction d'une prophylaxie anti-*Pneumocystis*, en l'absence de réplication du VIH (D'Egidio, Kravcik *et al.* 2007).

Pour les patients non VIH, les règles d'instauration de la prophylaxie ne sont pas aussi bien établies. L'instauration de la prophylaxie chez ces sujets dépend de la nature, de l'intensité et de la durée de l'immunodépression.

Les indications possibles pour l'utilisation d'une prophylaxie chez les patients non VIH sont rapportées dans le tableau 7.

<p>Transplantations d'organe solide ou allogreffe de moëlle osseuse :</p> <p>Si patient à haut risque :</p> <ul style="list-style-type: none">-antécédent de pneumocystose,-infection invasive à CMV,- immunosuppression pour rejet aigu,-GVH,-traitement anti-lymphocytaire <p>Autogreffe de moëlle osseuse, si conditionnement intensif par fludarabine ou 2-CDA¹</p> <p>Neutropénie prolongée.</p> <p>Corticothérapie > 20 mg/j de prednisone pendant plus de 2 à 3 semaines.</p> <p>¹ : 2-chlorodeoxyadenosine</p>

Tableau 7 : Indications possibles pour l'utilisation d'une prophylaxie anti-*Pneumocystis* chez les patients immunodéprimés non VIH (Rodriguez and Fishman 2004).

Cependant, il faut noter que des cas de pneumocystose malgré une prophylaxie adaptée ont déjà été rapportés dans la littérature (Mikaelsson, Jacobsson *et al.* 2006; Overgaard and Helweg-Larsen 2007).

VIII.3 Prophylaxie secondaire

Elle concerne les patients ayant des antécédents de pneumocystose, afin de prévenir le risque de rechute ou de récurrence.

Théoriquement, cette prophylaxie est maintenue à vie, mais une interruption de la prophylaxie secondaire est possible chez les patients VIH+ répondant aux anti-rétroviraux (Ledergerber, Mocroft *et al.* 2001). Ainsi, elle pourra être interrompue chez les patients dont le taux de lymphocytes CD4 est supérieur à $200/\text{mm}^3$ pendant plus de 3 mois (Lopez Bernaldo de Quiros, Miro *et al.* 2001). La survenue d'une pneumocystose malgré un taux de lymphocytes CD4 supérieur à $200/\text{mm}^3$ justifie le maintien à vie d'une prophylaxie (Masur, Kaplan *et al.* 2002).

Pour les patients VIH+, une prophylaxie anti-*Pneumocystis* est recommandée quand le taux de CD4+ est inférieur à $200/\text{mm}^3$. Pour les patients non VIH, les recommandations sont moins bien établies et tiennent compte de la pathologie sous-jacente et des thérapeutiques immunosuppressives employées.

Partie 2 : Matériels et méthodes

I Recueil et traitement des échantillons

Les échantillons ont été recueillis sur une période de 7 mois allant de décembre 2006 à juin 2007. Au total, 290 LBA ont été envoyés au laboratoire de Parasitologie du C.H.U de Nantes. Dans certains cas, les échantillons de LBA reçus étaient en quantité insuffisante pour permettre à la fois la réalisation des examens de routine et la PCR *Pneumocystis*. Tous les échantillons n'ont donc pas pu être utilisés dans notre étude. Ainsi, parmi les 290 LBA reçus, 201 soit 69% ont pu être inclus dans notre étude.

Ces LBA provenaient de patients hospitalisés au C.H.U de Nantes, à l'exception d'un prélèvement provenant du C.H.G de Saint-Nazaire. En majorité, les LBA ont été réalisés par les services cliniques de Réanimation, Pneumologie et Hématologie.

Afin de faciliter l'exploitation des données, un bon de demande (Annexe 1) spécifiquement orienté vers la recherche de *P. jiroveci* a été mis à la disposition des services cliniques.

Dans un premier temps, les examens systématiques de mycologie ont été pratiqués sur les LBA reçus. Lorsque le volume de LBA le permettait, un aliquot a été congelé à -20°C pour la réalisation de la PCR *Pneumocystis*. La prise en charge des LBA est résumée sur la figure 7.

Pour la recherche spécifique de *P. jiroveci*, deux colorations ont été réalisées au C.H.U de Nantes :

- la coloration de Musto (Gomori Grocott modifié) (Annexe 2)
- la coloration au MGG (Annexe 3)

Au C.H.G de Saint-Nazaire, la coloration utilisée est le bleu de toluidine (Annexe 4).

201 LBA, soit 69% de la totalité des LBA reçus au laboratoire de Mycologie/Parasitologie durant la période allant de décembre 2006 à juin 2007, ont été inclus dans notre étude. La recherche de *Pneumocystis* au C.H.U de Nantes est effectuée par la coloration de Musto et par la coloration au MGG.

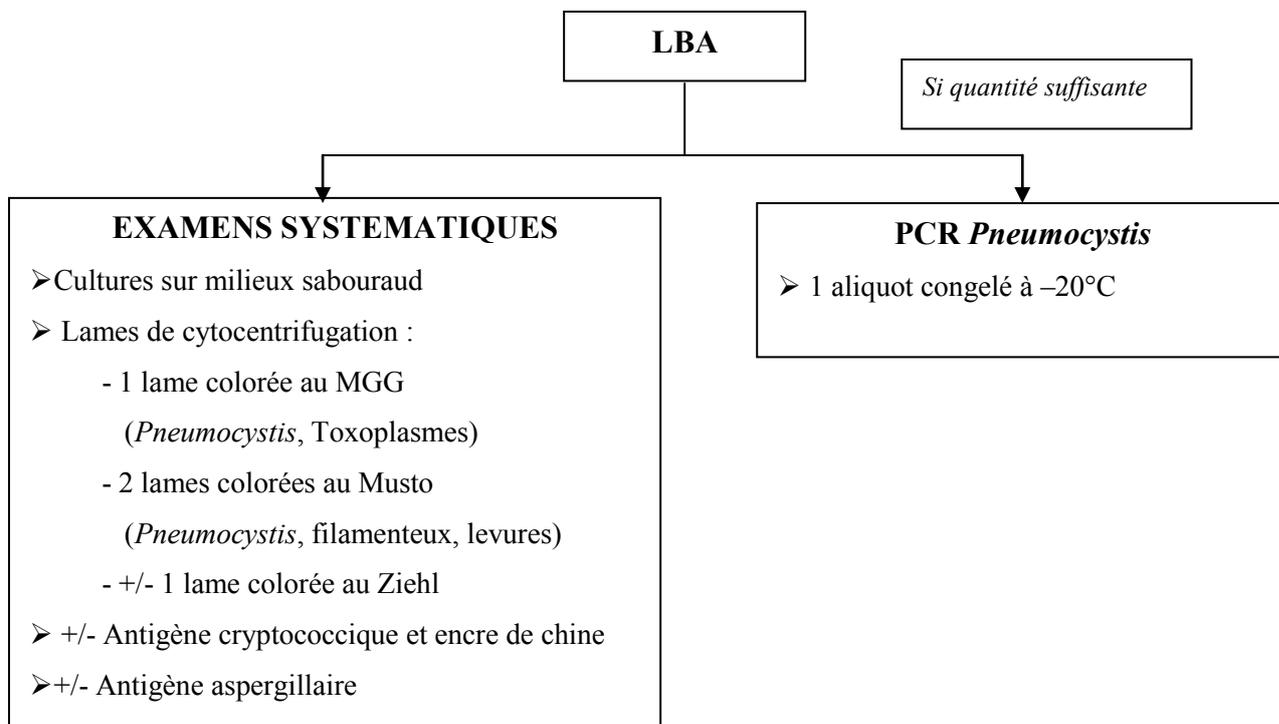


Figure 7 : Prise en charge des LBA au laboratoire de Mycologie/Parasitologie du C.H.U de Nantes.

II Extraction de l'ADN

L'extraction a été réalisée avec la trousse NucleoSpin[®]Tissue (Macherey Nagel, Hoerd, France). La prise d'essai de LBA a été fixée à 1000 μL . Pour les échantillons dont le volume était inférieur à 1000 μL , la prise d'essai était de 500 ou 200 μL , selon les quantités de LBA disponibles. Après centrifugation à 3000 tours pendant 10 minutes, les culots de LBA ont été repris dans 200 μL de surnageant, puis extraits selon les recommandations du fabricant (Annexe 5).

Pour 6 LBA très visqueux, une étape de fluidification dans du Digest-EUR[®] (Eurobio, Les Ulis, France) a été nécessaire. Ces LBA ont donc été dilués au $\frac{1}{2}$ dans le Digest-EUR[®], vortexés et laissés 1 heure dans un bain-marie à 56°C . Ensuite, ils ont été soumis à la même procédure d'extraction que les autres LBA. Les éluats obtenus suite à l'extraction ont été conservés à -20°C .

Afin de limiter au maximum le risque de contamination durant cette étape :

- L'extraction a été réalisée sous une hotte.
- Un témoin d'extraction a été inclus dans chaque série.
- Un nombre limité de 9 LBA étaient extraits au cours de chaque série.

L'extraction a été réalisée à partir de 1000, 500 ou 200 μL de LBA.

III PCR quantitative en temps réel

III.1 Technologie utilisée

La technologie *TaqMan* est basée sur l'utilisation d'une sonde, fragment oligonucléotidique, marquée par deux groupements fluorophores en ses extrémités.

Un fluorophore émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde et son émission est inhibée par un second fluorophore suppresseur (quencher) situé à l'extrémité 3'. Du fait de la proximité des deux groupements fluorophores, liée à la petite taille de la sonde (20 à 40 nucléotides), l'énergie absorbée par le reporter excité est transférée au quencher par le principe de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). Le spectre d'excitation du quencher ne chevauchant pas le spectre d'émission du reporter, le quencher absorbe l'énergie qui lui est transmise mais n'émet aucune fluorescence.

La particularité du système *TaqMan* est d'exploiter l'activité 5'-exonucléasique de la *Taq*Polymérase qui permet d'hydrolyser la sonde hybridée à sa cible spécifique lors de l'étape d'élongation des amorces. Le clivage de la sonde a pour conséquence de libérer le reporter de l'environnement du quencher rétablissant ainsi l'émission de fluorescence du reporter. L'activité 5'-exonucléasique de la *Taq*Polymérase étant spécifique de l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent donc intactes et aucune fluorescence n'est émise. L'intensité de la fluorescence émise par le reporter est mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification.

Récemment, de nouveaux types de sondes, les sondes *TaqMan*[®] MGB, ont été développées afin de pallier à certaines limites du système *TaqMan* (Tse and Capeau 2003). L'innovation de ces sondes porte sur l'introduction d'une molécule MGB (Minor Groove Binder) à l'extrémité 3' de la sonde.

Dans notre étude, nous avons utilisé une sonde *TaqMan*[®] MGB (figure 8) qui porte à l'extrémité 5' un fluorochrome, FAM, qui est un dérivé de la fluorescéine et à l'extrémité 3', un quencher non fluorescent couplé au noyau MGB.

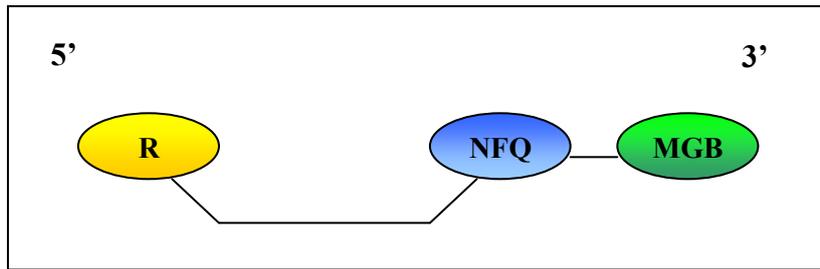


Figure 8 : Représentation schématique de la sonde *TaqMan*[®] MGB

R : reporter ; NFQ : quencher non fluorescent ; MGB : minor groove binder

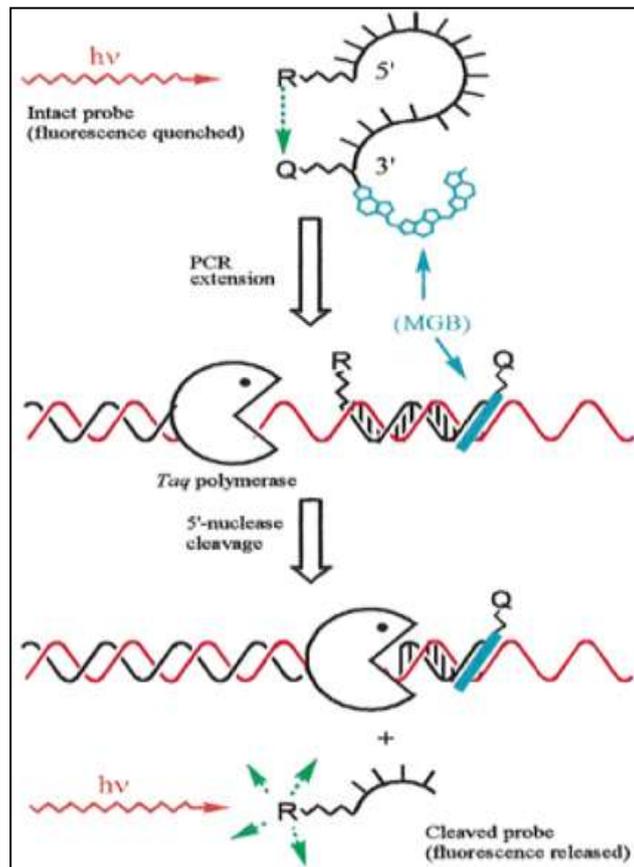


Figure 9 : Principe de la PCR en temps réel utilisant une sonde *TaqMan*[®] MGB.

La sonde porte à l'extrémité 5', un reporter (R) marqué à la fluorescéine et à son extrémité 3', un quencher (Q), couplé à une molécule de MGB. L'hybridation de la sonde avec la molécule d'ADN est stabilisée par la fixation de la molécule de MGB au sein du petit sillon de la double hélice d'ADN. Pendant, la phase d'élongation, la sonde est clivée par l'activité 5'-exonucléase de la *Taq* Polymérase, ce qui entraîne l'émission d'une fluorescence. Cette fluorescence est mesurée en temps réel au cours de la PCR (Kutyavin, Afonina *et al.* 2000).

Le noyau MGB est une petite molécule en forme de croissant qui s'insère parfaitement dans le petit sillon de l'ADN double brin formé par la sonde et la séquence cible. Ainsi, lorsque la sonde *TaqMan* s'hybride, le MGB stabilise l'hybridation en se déployant dans le petit sillon de l'ADN double brin (figure 9).

Cette interaction rend le duplex sonde/ADN cible très stable ce qui s'accompagne d'une augmentation de la T_m (melting Temperature ou température de fusion) et permet l'utilisation de sonde plus courte (13 à 20 nucléotides) par rapport aux sondes *TaqMan* standard (généralement 20 à 40 nucléotides).

La méthode gagne aussi en spécificité, car un mésappariement au sein du duplex (sonde/ADN cible) dans lequel s'insère le noyau MGB est particulièrement déstabilisant (Kutyavin, Afonina *et al.* 2000).

La PCR *Pneumocystis* est une PCR en temps réel basée sur la technologie *TaqMan* et utilisant une sonde *TaqMan*[®] MGB.

III.2 Appareillage

L'automate utilisé pour notre étude est le RotorGene 3000[®] (Cobett research).

L'appareil est constitué de 2 unités :

- un thermocycleur qui assure les changements de température grâce à un système à air pulsé.
- un spectrofluorimètre de type LED (Light Emitting Diode) qui permet de mesurer la fluorescence.

Le mélange réactionnel (mix) est déposé dans des microtubes 0,2 mL qui s'adaptent sur un carroussel dont la capacité est de 36 échantillons.

La fluorescence émise par les fluorophores est mesurée à chaque cycle d'amplification. L'augmentation de l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN générée pendant la PCR.

Les résultats sont représentés sous forme d'une courbe d'allure sigmoïdale dont l'axe des abscisses correspond aux cycles de la PCR et l'axe des ordonnées correspond à l'intensité de fluorescence, c'est à dire la quantité de produits de PCR formés (figure 10).

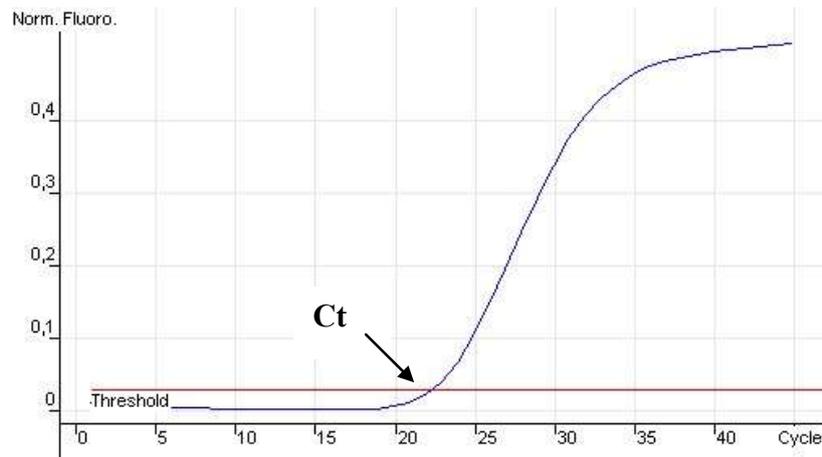


Figure 10 : Courbe d'allure sigmoïdale obtenue au cours de la PCR en temps réel.

Ct : Cycling threshold

L'interprétation des courbes de résultats nécessite de fixer un threshold ou ligne seuil, c'est à dire un niveau de fluorescence qui permet de conclure à la négativité ou à la positivité d'un échantillon. Ce threshold est fixé de façon à se placer au-dessus du bruit de fond. Il est alors possible de déterminer le Ct (Cycling threshold), c'est à dire le nombre de cycles d'amplification à partir duquel les échantillons sont considérés comme positifs.

Une quantification peut être réalisée grâce à l'utilisation d'une gamme d'étalonnage constituée de dilutions successives de l'ADN de *P. jiroveci* de concentrations connues.

Le thermocycleur utilisé est le RotorGene 3000[®]. Un maximum de 36 réactions est réalisable au cours de chaque PCR.

III.3 Conditions réactionnelles de la PCR

III.3.1 Composants du mélange réactionnel

III.3.1.1 Amorces, sondes et gène cible

Le couple d'amorces (Annexe 6) choisi (Eurogentec[®]) est le suivant :

Pj sens 5' CTT AAA ATA AAT AAT CAG ACT ATG TGC GAT AAG 3'

Pj anti-sens 5' GGA GCT TTA ATT ACT GTT CTG GGC 3'

Les amorces lyophilisées ont été reconstituées avec de l'eau Pour Préparation Injectable (PPI) de manière à obtenir une concentration de 10 µM. Elles sont ensuite aliquotées et conservées à -20°C. Afin d'éviter leur altération, elles n'ont jamais été décongelées plus de 5 fois.

La sonde (Annexe 6) utilisée est une sonde *TaqMan*[®] MGB (Applied Biosystems) de 20 pb. Sa séquence est la suivante :

Sonde *Pj* 5' FAM TAG ATA GTC GAA AGG GAA AC NFQ/MGB 3'

La sonde a été diluée dans de l'eau PPI afin d'obtenir une concentration de 10 µM, puis aliquotée et conservée à -20°C.

Les amorces et la sonde permettent l'amplification d'un **fragment d'ADN de *P. jiroveci* de 81 pb** situé dans la région de la grande sous unité de l'ARN ribosomal mitochondrial (mtLSU ARNr). Il s'agit d'un gène multicopie, très conservé au sein du genre *Pneumocystis* et donc performant pour le diagnostic de pneumocystose chez l'homme (Meliani, Develoux *et al.* 2003; Totet, Meliani *et al.* 2003).

Le fragment d'ADN de *P. jiroveci* amplifié (81 pb) appartient à la grande sous unité de l'ARN ribosomal mitochondrial (mtLSU ARNr). Il s'agit d'un gène multicopie, très conservé au sein du genre *Pneumocystis*.

III.3.1.2 MgCl₂

L'ion Mg²⁺ est un cofacteur indispensable à la *Taq*Polymérase. Ce cation bivalent interagit avec les charges négatives de la chaîne d'ADN, limitant ainsi les forces de répulsion entre les brins d'ADN et favorisant donc la stabilité de l'hybridation. Plus la concentration en MgCl₂ est importante, plus l'hybridation est facilitée que celle-ci soit spécifique ou non. Une trop forte concentration peut alors conduire à une augmentation des signaux non spécifiques. Ainsi, la concentration en ions Mg²⁺ influence la spécificité de la réaction et c'est pourquoi, il est important de déterminer la concentration optimale en MgCl₂. La solution de MgCl₂ est conservée à -20°C.

III.3.1.3 Désoxyribonucléotides triphosphate : dNTP

Le mélange de nucléotides est constitué de dATP, dCTP, dGTP et dUTP.

III.3.1.4 *Taq*Polymérase

La polymérase utilisée est l'Ampli*Taq* Gold[®] (Applied Biosystems). Il s'agit d'une polymérase de type « Hot Start », contenant un inhibiteur thermolabile. Son activation nécessite donc une incubation à 95°C pendant 10 minutes, évitant ainsi toute activité prématurée au cours de la préparation du mix. Elle est conservée à -20°C.

III.3.1.5 Solution tampon 10X

Cette solution sert à tamponner le milieu réactionnel (pH, concentration saline) de façon à être dans des conditions optimales pour le fonctionnement de la *Taq*Polymérase. Il est conservé à -20°C.

III.3.1.6 Contrôle interne

L'IPC ou Internal Positive Control (Exogenous[®], AB Systems) est un témoin interne de PCR temps réel. Il est constitué de l'IPC Mix 10X (amorces et sonde) de l'IPC DNA 50X (cible). Il permet de vérifier l'absence d'inhibiteur dans chaque extrait d'ADN. Il est conservé à -20°C.

III.3.2 Préparation du mix

Le mix est réalisé dans une pièce « propre » afin d'éviter tout risque de contamination. Dans un souci de reproductibilité et de gain de temps, une grande quantité de mix (dépourvue d'UDG et de *Taq*Polymérase), pouvant servir à la réalisation de plusieurs PCR est préparée en une fois puis aliquotée et congelée à -20°C . Ainsi, à chaque PCR, seul un aliquot de mix, auquel on ajoute l'UDG et la *Taq*Polymérase est décongelé.

III.4 Quantification

III.4.1 Stratégie de quantification

Le principe de la quantification est basé sur la réalisation d'une gamme d'étalonnage à partir de dilutions d'un extrait de *P. jiroveci* de concentration connue. A partir de la gamme, il sera ensuite possible de quantifier les échantillons provenant de patients.

III.4.2 Obtention d'ADN de *P. jiroveci* par clonage

III.4.2.1 Principe

Le clonage consiste en l'insertion d'un fragment d'ADN de *P. jiroveci* dans un plasmide (vecteur). Le kit de clonage utilisé est le kit pGEM[®]-T easy (Promega, Madison USA). La procédure complète est présentée en annexe 7.

III.4.2.2 Les étapes

- **Amplification du fragment d'ADN à insérer**

Il s'agit d'amplifier le fragment de 81 pb de *P. jiroveci* situé dans la région codant pour l'ARNr de la grande sous unité mitochondriale (mtLSU ARNr). Pour cela, nous avons effectué une PCR en temps réel à partir d'un extrait de LBA positif.

- **Ligation**

Cette étape consiste à intégrer notre insert de 81 pb dans le plasmide.

- **Transformation**

Le but de cette étape est d'intégrer le plasmide contenant l'insert de 81 pb dans une bactérie (souche JM109). Le processus utilisé est un choc thermique.

- **Mise en culture des bactéries**

- **Sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide recombiné**

Le rendement des étapes de ligation et de transformation n'étant pas 100%, il est nécessaire d'effectuer une sélection afin d'isoler seulement les bactéries contenant le plasmide et ayant intégré l'insert. Cette sélection utilise d'une part, les propriétés de résistance vis-à-vis de l'ampicilline, liées à la présence du gène de résistance à cet antibiotique chez les bactéries contenant le plasmide et d'autre part, des propriétés chromogènes dues à la présence du gène de la β -galactosidase chez les bactéries.

- **Vérification de la présence de l'insert dans les clones par PCR « M13 »**

- **Extraction du plasmide**

Cette extraction a été effectuée à l'aide du kit Nucleospin[®] Plasmid (Macherey Nagel), selon les recommandations du fabricant (Annexe 8).

- **Séquençage**

Le séquençage du produit de PCR est nécessaire afin de vérifier l'absence de mutation dans l'insert par comparaison à la séquence de référence.

<p>La première étape de la quantification consiste à obtenir un extrait plasmidique contenant l'ADN de <i>P. jiroveci</i> par une technique de clonage.</p>

III.4.3 Préparation de la gamme d'étalonnage

III.4.3.1 Les étapes

III.4.3.1.1 Quantification de l'ADN contenu dans le plasmide

La quantification de l'extrait plasmidique obtenu par clonage a été réalisée par la mesure de la densité optique par spectrophotométrie à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop® à la longueur d'onde de 260 nm.

La teneur en ADN de l'extrait est de 22,25 ng/μL.

III.4.3.1.2 Calcul du nombre de copies de *P. jiroveci* contenues dans l'extrait

Les données nécessaires pour déterminer le nombre de copies de *P. jiroveci* contenues dans l'extrait, sont les suivantes :

$$1\text{kb ds DNA} = 6,6 \times 10^5 \text{ Da}$$

$$1\text{Da} = 1,66054 \times 10^{-27} \text{ kg}$$

$$\text{Plasmide} = 3015 \text{ pb}$$

$$\text{Insert de } P. jiroveci = 81 \text{ pb}$$

Le plasmide utilisé contient 3015 pb et l'insert de *P. jiroveci* 81 pb, soit au total 3096 pb.

La quantité d'ADN de l'extrait est 22,25 ng/μL soit $22,25 \cdot 10^{-12}$ kg/μL.

$$\text{soit } 1,33 \cdot 10^{16} \text{ Da}/\mu\text{L}$$

Sachant que $3,096 \text{ kpb} = 20,43 \cdot 10^5 \text{ Da}$, on en déduit que la quantité de copies est égale à $1,33 \cdot 10^{16} / 20,43 \cdot 10^5$, soit approximativement $6,55 \cdot 10^9$ copies/μL.

Le nombre de copies contenu dans l'extrait d'ADN est approximativement de $6,55 \cdot 10^9$ copies /μL.

III.4.3.1.3 Dilutions de l'ADN plasmidique

La gamme est réalisée par dilutions en série (10 en 10) de l'extrait plasmidique titrant à $6,55 \cdot 10^9$ copies/ μ L dans l'eau PPI. Nous avons ainsi obtenu 11 dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-11} . Connaissant le titre de l'extrait pur, il est possible de déterminer la concentration de chaque dilution (tableau 8). On sélectionne ensuite 5 à 6 dilutions pour établir une droite d'étalonnage (figure 11). Cette droite exprime les variations du Ct en fonction de la quantité d'ADN cible contenu dans chaque dilution. Après validation de la droite, il est possible d'en extrapoler le Ct et par conséquent d'en déduire la quantité d'ADN présente dans chaque échantillon provenant de patients.

Dilutions	Pur	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Copies <i>P. jiroveci</i> / μ L	$6,55 \times 10^9$	$6,55 \times 10^8$	$6,55 \times 10^7$	$6,55 \times 10^6$	$6,55 \times 10^5$	$6,55 \times 10^4$

Dilutions	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}
Copies <i>P. jiroveci</i> / μ L	$6,55 \times 10^3$	655	65,5	6,55	0,655	0,065

Tableau 8 : Nombre approximatif de copies de *P. jiroveci* contenues dans chacune des dilutions de l'extrait d'ADN.

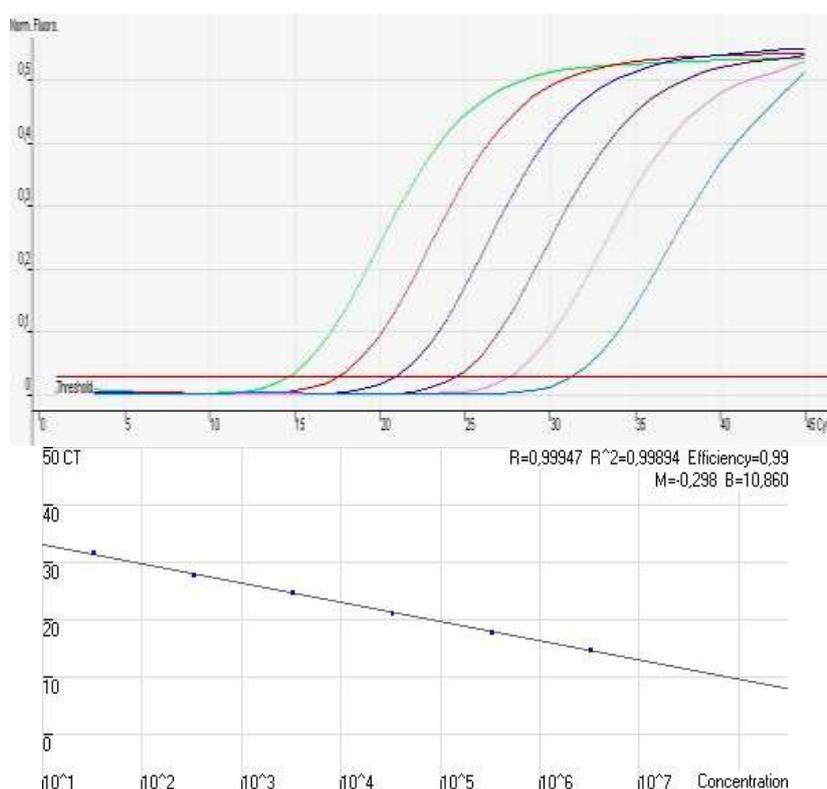


Figure 11 : Droite d'étalonnage établie à partir de 6 dilutions (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9}) de l'extrait de *P. jiroveci*.

Les dilutions de l'extrait du clone de *P. jiroveci* de concentrations connues permettent d'établir une droite d'étalonnage à partir de laquelle, il est possible de déduire les quantités d'ADN de *P. jiroveci* contenues dans chaque échantillon provenant de patients.

IV Techniques complémentaires

IV.1 Immunofluorescence directe

Pour quelques échantillons, nous avons été amenés à réaliser cette technique. Nous avons utilisé le kit Monofluo[®] (Biorad Marnes-la-Coquette, France) en appliquant les recommandations du fournisseur (annexe 9).

IV.2 Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 9%

Cette technique a été réalisée selon le mode opératoire extrait du GBEA du C.H.U de Nantes (annexe 10). Elle nous a permis de vérifier la présence ou l'absence d'une bande de 81 pb, correspondant au fragment d'ADN de *P. jiroveci* que nous souhaitons détecter.

V Résumé du protocole utilisé dans l'étude

Le résumé du protocole utilisé dans cette étude est présenté sur la figure 12.

Chaque PCR permettait de passer 36 microtubes :

- 6 microtubes réservés pour 6 points de gamme (10^{-4} à 10^{-9}).
- 2 microtubes utilisés pour tester le témoin d'extraction.
- 1 microtube pour le témoin négatif.
- 27 microtubes réservés pour les échantillons provenant de patients. Chaque patient ayant été passé en triplicate, 9 LBA de patients pouvaient être techniqués au cours d'une PCR.

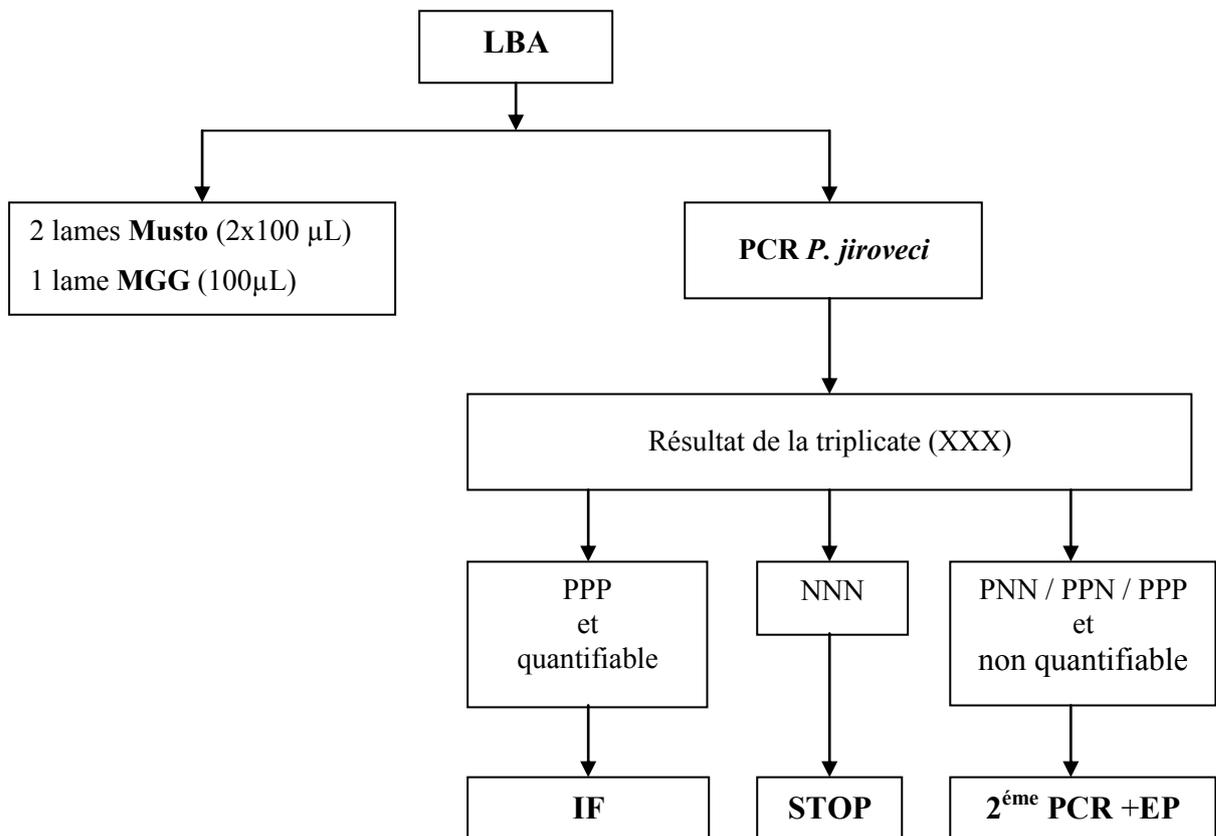


Figure 12 : Résumé du protocole utilisé pour cette étude.

P : positif, N : négatif, IF : immunofluorescence directe, EP : électrophorèse en gel de polyacrylamide

Partie 3 : Résultats

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés en 3 parties :

- La première partie est consacrée à l'optimisation des conditions réactionnelles de la PCR.
- La deuxième partie regroupe tous les résultats ayant permis la validation de la technique, notamment en termes de reproductibilité et répétabilité.
- Enfin, dans la troisième partie, nous avons évalué les résultats de notre PCR sur une série de 201 LBA testés de façon rétrospective.

I Optimisation des conditions de PCR

I.1 Volume de la prise d'essai d'ADN

Dans un premier temps, nous avons testé 6 dilutions de la gamme (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , et 10^{-9}) en utilisant une prise d'essai de 1 μL . Les résultats des Ct obtenus se sont avérés très aléatoires, et en particulier les dilutions les plus faibles de la gamme (10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9}) n'étaient pas toujours détectées. Ces difficultés étaient en fait liées à une prise d'essai trop faible. Nous avons donc décidé d'utiliser une prise d'essai de 5 μL .

Le volume optimal de prise d'essai d'ADN est de 5 μL .

I.2 Gamme de MgCl_2

Afin de déterminer la concentration optimale de MgCl_2 , nous avons testé 6 dilutions de la gamme avec 3 concentrations de MgCl_2 (4 mM, 5 mM et 6 mM) au cours d'une PCR (tableau 9).

		Ct en fonction de la concentration en MgCl_2		
		4 mM	5 mM	6 mM
Dilutions	10^{-4}	16,27	16,78	16,71
	10^{-5}	19,63	20,23	20,30
	10^{-6}	23,05	23,60	23,63
	10^{-7}	26,64	27,01	26,95
	10^{-8}	30,36	30,20	30,32
	10^{-9}	35,13	34,97	33,88

Tableau 9 : Résultats de l'optimisation de la concentration en MgCl_2 de la PCR *P. jiroveci*.

Les Ct obtenus sont sensiblement les mêmes pour les 3 concentrations MgCl_2 , sauf pour le dernier point de gamme où les Ct les plus faibles sont obtenus avec la concentration de MgCl_2 à 6 mM, qui correspond donc à la concentration optimale en MgCl_2 pour notre PCR.

La concentration optimale en MgCl_2 est de 6mM.

I.3 Gamme de température

Trois programmes de température d'hybridation et d'élongation ont été testés (tableau 10) :

- Programme n°1 : 95°C (15 s) + 58°C (60 s)
- Programme n°2 : 95°C (15 s) + 58°C (20 s) + 72°C (5 s)
- Programme n°3 : 95°C (15 s) + 60°C (30 s)

		Ct en fonction du programme de température		
		Programme n°1	Programme n°2	Programme n°3
Dilutions	10 ⁻⁴	16,71	16,41	15,80
	10 ⁻⁵	20,30	19,56	18,87
	10 ⁻⁶	23,63	22,96	22,28
	10 ⁻⁷	26,95	26,33	25,79
	10 ⁻⁸	30,32	29,60	28,79
	10 ⁻⁹	33,88	33,19	32,04

Tableau 10 : Résultats de l'optimisation de la température de la PCR *P. jiroveci*.

Les résultats des Ct obtenus lors de ces essais n'ont pas montré de différence significative entre les 3 programmes de température. Au final, nous avons retenu le programme n°3 pour deux raisons, d'une part parce que la température de 60°C est plus proche de la température optimale d'activité de la *Taq*Polymérase et d'autre part, parce que cela nous a permis de réduire la durée de la PCR d'environ 30 minutes.

La température optimale d'hybridation et d'élongation est de 60°C.

I.4 Composition du mix utilisé

La composition exacte du mix utilisé pour la réalisation de la PCR *Pneumocystis* est présentée en annexe 11.

II Validation de la PCR quantitative en temps réel

II.1 Limite de détection et seuil de positivité

Pour déterminer la limite de détection et le seuil de positivité, 8 dilutions (10^{-4} à 10^{-11}) de l'extrait d'ADN de *P. jiroveci* titrant à 22,25 ng/ μ L, ont été testées au cours de 10 PCR différentes. Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

Dilutions	Copies de <i>P. jiroveci</i> dans la prise d'essai de 5 μ L	Résultats de la PCR
10^{-4}	$32,75 \times 10^5$	10/10
10^{-5}	$32,75 \times 10^4$	10/10
10^{-6}	$32,75 \times 10^3$	10/10
10^{-7}	3275	10/10
10^{-8}	327,5	10/10
10^{-9}	32,8	10/10
10^{-10}	3,3	4/10
10^{-11}	0,3	0/10

Tableau 11 : Résultats des 10 PCR effectuées sur 8 dilutions de l'extrait d'ADN de *P. jiroveci*, avec une prise d'essai de 5 μ L.

La **limite de détection** correspond au nombre de copies pour lequel la réaction de PCR s'est avérée positive pour au moins un essai. D'après nos résultats, la limite de détection correspond à **3 copies pour une prise d'essai de 5 μ L, soit 3 copies par réaction**.

Il est aussi possible de déterminer le **seuil de positivité**, qui correspond au plus petit nombre de copies de *P. jiroveci* pour lequel la PCR est positive dans 100% des essais. Pour notre PCR, le seuil de positivité peut être estimé à 32,8 copies pour une prise d'essai de 5 μ L, soit approximativement **30 copies par réaction**.

Pour une prise d'essai de 5 μ L, la limite de détection est de 3 copies par réaction et le seuil de positivité est approximativement de 30 copies par réaction.

II.2 Répétabilité

La répétabilité de la technique a été réalisée en intra-essais. Pour cela, 6 dilutions (10^{-4} à 10^{-9}) de la gamme provenant de l'extrait titrant à 22,25 ng/ μ L ont été testées 10 fois au cours de 2 PCR (tableau 12). En effet, il n'a pas été possible faire cet essai au cours d'une seule PCR car le carrousel du RotorGene[®] que nous utilisons ne dispose que de 36 places.

Dilutions	Valeurs Cycling Threshold (Ct)					
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Nombre de copies de <i>P. jiroveci</i>	$32,75 \times 10^5$	$32,75 \times 10^4$	$32,75 \times 10^3$	3275	327,5	32,75
Test 1	15,76	19,05	22,52	25,81	29,33	33,16
Test 2	15,85	19,05	22,24	25,57	29,05	33,27
Test 3	15,86	19,20	22,95	26,26	29,38	33,62
Test 4	15,87	18,93	22,03	26,24	28,97	34,51
Test 5	15,71	18,98	22,17	24,36	29,27	33,12
Test 6	15,64	18,59	22,07	25,71	30,11	34,80
Test 7	15,70	18,72	22,45	25,93	28,23	32,81
Test 8	15,71	18,70	22,63	25,78	28,67	33,77
Test 9	15,60	18,68	22,05	25,49	28,48	31,99
Test 10	15,68	18,70	22,15	24,66	28,43	30,82
Moyenne	15,74	18,86	22,33	25,58	28,99	33,19
Ecart type	0,09	0,21	0,30	0,62	0,56	1,16
Variance	0,01	0,04	0,09	0,39	0,32	1,34
CV (%)	0,60	1,09	1,36	2,43	1,94	3,49

Tableau 12 : Résultats de l'étude de répétabilité intra-essais de la PCR *P. jiroveci*

Les coefficients de variation (CV) sont compris entre 0,6 et 3,49%, c'est à dire en dessous de 5%. On peut donc considérer que notre PCR est répétable.

Les coefficients de variation pour chaque point de gamme sont inférieurs à 5% : la PCR est donc répétable.

II.3 Reproductibilité

La reproductibilité de la technique a été évaluée en inter-essais sur 6 dilutions de l'extrait d'ADN (10^{-4} à 10^{-9}). Pour cela, des dilutions de la gamme ont été préparées, aliquotées et congelées à -20°C . Puis chaque dilution a été testée dans 10 PCR différentes. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 13.

Dilutions	Valeurs de Cycling Threshold (Ct)					
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Nombre de copies de <i>P. jiroveci</i>	32,75x10 ⁵	32,75x10 ⁴	32,75x10 ³	3275	327,5	32,75
Test 1	14,93	18,45	20,73	24,16	28,44	32,11
Test 2	15,54	19,67	21,41	25,91	28,75	32,50
Test 3	15,49	18,69	21,68	24,93	28,70	31,74
Test 4	14,83	18,41	20,89	25,09	28,58	31,29
Test 5	15,21	18,40	20,66	25,09	28,35	31,81
Test 6	15,75	18,91	20,72	24,50	28,35	31,17
Test 7	15,06	17,98	21,32	24,28	28,73	32,53
Test 8	15,12	18,70	20,59	25,31	27,84	31,32
Test 9	15,55	18,81	20,80	23,98	28,05	31,30
Test 10	14,88	18,35	20,95	24,43	27,60	31,44
Ct moyen	15,236	18,637	20,975	24,768	28,339	31,721
Ecart-type	0,325	0,452	0,368	0,601	0,394	0,509
Variance	0,106	0,204	0,135	0,361	0,155	0,259
CV (%)	2,13	2,42	1,75	2,42	1,39	1,60

Tableau 13 : Résultats de l'étude de reproductibilité inter-essais de la PCR *P. jiroveci*

Les valeurs des coefficients de variation obtenus pour chaque point de gamme étant faibles (< 5%), on peut considérer que la PCR est reproductible.

Pour confirmer la reproductibilité de notre technique, nous avons testé les droites d'étalonnage au cours des 10 essais. Ces droites ont été établies par régression linéaire du Ct, en fonction du logarithme de la concentration de chaque dilution d'ADN de *P. jiroveci* selon l'équation :

$$y = a\text{Log}(x) + b$$

avec :

y, le Ct

x, la concentration, c'est à dire le nombre de copies de *P. jiroveci* dans 5µL

a, la pente minimale de la droite d'étalonnage

b, l'interception de la droite d'étalonnage avec l'axe des ordonnées

La reproductibilité des droites d'étalonnage au cours des 10 essais a été étudiée grâce à 3 paramètres:

- Le coefficient de régression linéaire (r) qui permet de s'assurer de la reproductibilité du pipetage et des dilutions.
- L'efficacité de l'amplification (E) avec $E = 10^{(-1/\text{pente})}$
- Le rendement de la PCR (R) avec $R = E - 1$

Lorsque le rendement de la PCR est de 100%, l'efficacité est égale à 2. Ainsi, pour valider les droites d'étalonnage, nous devons avoir un rendement proche de 100% et donc une efficacité proche de 2.

Les résultats des 3 paramètres (r^2 , E et R) pour chacune des 10 PCR effectuées sont présentés dans le tableau 14.

	Inteception	Pente	Efficacité (E)	Rendement (R)	r²
Test 1	36,955	-3,436	1,954	0,954	0,993
Test 2	37,443	-3,356	1,986	0,986	0,993
Test 3	36,725	-3,279	2,018	1,018	0,999
Test 4	36,658	-3,356	1,986	0,986	0,996
Test 5	35,849	-3,145	2,080	1,080	0,992
Test 6	36,761	-3,367	1,982	0,982	0,995
Test 7	35,702	-3,175	2,065	1,065	0,990
Test 8	35,713	-3,155	2,075	1,075	0,992
Test 9	36,228	-3,257	2,028	1,028	0,993
Test 10	36,443	-3,356	1,986	0,986	0,999
Moyenne	36,448	-3,288	2,016	1,016	0,994
Ecart type	0,574	0,102	0,044	0,044	0,003
Variance	0,330	0,010	0,002	0,002	0,000

Tableau 14 : Reproductibilité des paramètres de la droite d'étalonnage pour la PCR *P. jiroveci*.

Les variances observées pour l'interception, l'efficacité et le rendement sont faibles. Le coefficient de régression linéaire r^2 est toujours supérieur ou égale à 0,99. Ces résultats sont satisfaisants et traduisent donc une bonne reproductibilité inter-essais des droites d'étalonnage.

La PCR est reproductible.

II.4 Critères de validation de la gamme d'étalonnage

Les résultats satisfaisants obtenus lors de l'étude de reproductibilité autorisent l'inclusion au sein de chaque PCR quantitative d'une gamme d'étalonnage constituée des 6 dilutions précédemment testées (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) qui servira de standard externe.

Il est néanmoins nécessaire de définir des critères qui permettront de valider la droite d'étalonnage au cours de chaque PCR. Cette étape est indispensable pour pouvoir ensuite interpréter les résultats provenant de patients.

En se basant sur les résultats de l'étude de reproductibilité (tableau 14), nous avons donc décidé que la droite d'étalonnage ne serait validée que si elle remplit les 3 critères suivants :

- $r^2 \geq 0,99$
- une efficacité d'amplification (avec un intervalle de confiance à 99%) comprise entre :
 $E = 2,016 \pm 2,576 \times 0,044$ soit **[1,90 - 2,13]**
- un rendement de la PCR (avec un intervalle de confiance à 99%) compris entre :
 $R = 1,016 \pm 2,576 \times 0,044$ soit **[0,90 - 1,13]**

Dans le cas où ces 3 critères ne seraient pas tous remplis, les résultats de la PCR ne pourront être exploités.

Les conditions de validation de la droite d'étalonnage de chaque PCR sont les suivants : $r^2 \geq 0,99$, E compris entre [1,90 - 2,13], et R compris entre [0,90 - 1,13].

II.5 Expression des résultats

Les résultats seront rendus en nombre de copies par réaction, c'est à dire dans 5 µL de prise d'essai d'extrait d'ADN, obtenu à partir de 1000 µL de LBA de patient. Néanmoins, pour certains patients les quantités de LBA étaient insuffisantes (<1000 µL). Nous avons donc travaillé sur un volume de 500 ou 200 µL de LBA en fonction des quantités disponibles. Les résultats obtenus par la PCR quantitative ont par conséquent été soumis à un facteur de correction (respectivement x2 et x5) de façon à rapporter tous les échantillons à un volume de LBA identique de 1000 µL. Cette correction est indispensable pour pouvoir comparer nos résultats quantitatifs entre eux. Chaque échantillon ayant été testé en triplicate, les résultats présentés dans cette étude correspondent à la moyenne de la triplicate.

Les résultats seront rendus en nombre de copie/réaction (5µL d'extrait). Les résultats quantitatifs ont été systématiquement corrigés par le facteur de correction adapté afin de s'affranchir des volumes de LBA utilisés et ainsi, pouvoir comparer nos résultats quantitatifs entre eux. Ces résultats sont obtenus en réalisant la moyenne de la triplicate de chaque échantillon.

II.6 Limite de quantification

D'après les résultats obtenus précédemment, on peut considérer que notre PCR bénéficie d'une reproductibilité acceptable jusqu'à la dilution 10^{-9} de l'extrait d'ADN de *P. jiroveci*, c'est à dire 31,75 Ct.

Au-delà de ce Ct, la reproductibilité de la technique n'étant plus assurée, il devient impossible de réaliser une quantification précise du nombre de copies. Ainsi, pour les échantillons détectés par la PCR avec des Ct supérieurs à 31,75, on parlera d'échantillons positifs non quantifiables.

La valeur théorique minimale d'un résultat rendu positif non quantifiable correspond théoriquement à la limite de détection de la technique soit **3 copies/réaction**.

La valeur théorique maximale d'un résultat rendu positif non quantifiable correspond au nombre de copies de la dilution 10^{-9} soit approximativement **30 copies/réaction**.

La quantification de l'ADN de *P. jiroveci* est fiable jusqu'au seuil de 30 copies/réaction. En dessous de ce seuil, les échantillons détectés par la PCR ne seront pas quantifiés et rendus positifs non quantifiables. Les échantillons positifs non quantifiables contiennent de 3 à 30 copies/réaction.

III Application de la PCR en temps réel quantitative pour le diagnostic de pneumocystose

III.1 Caractéristiques de la population étudiée

Au total, 201 échantillons de LBA provenant de 189 patients ont été recueillis durant la période de l'étude allant de décembre 2006 à juin 2007. Les résultats sont regroupés en annexe 12.

Le sex ratio était d'environ 1,9 et la moyenne d'âge était de 54 ans (17 à 84 ans) (figure 13). Les patients présentaient différentes pathologies sous jacentes qui sont rapportées sur la figure 14. Parmi les 189 patients, 17 (9%) étaient séropositifs pour le VIH.

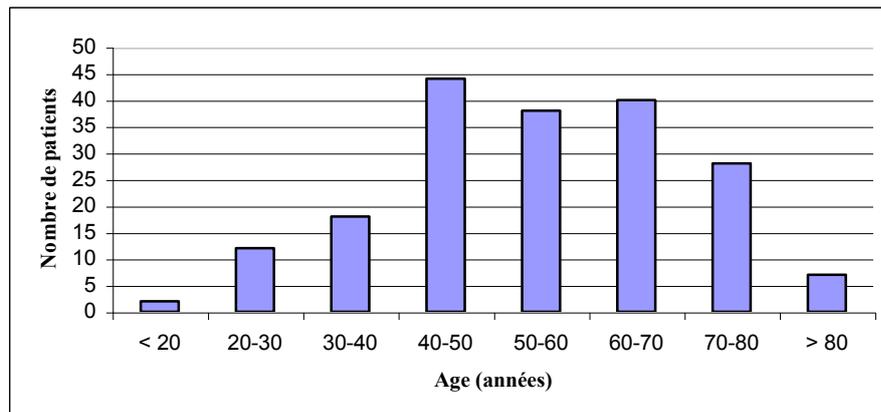


Figure 13 : Représentation graphique de la répartition des âges de la population étudiée (n=189).

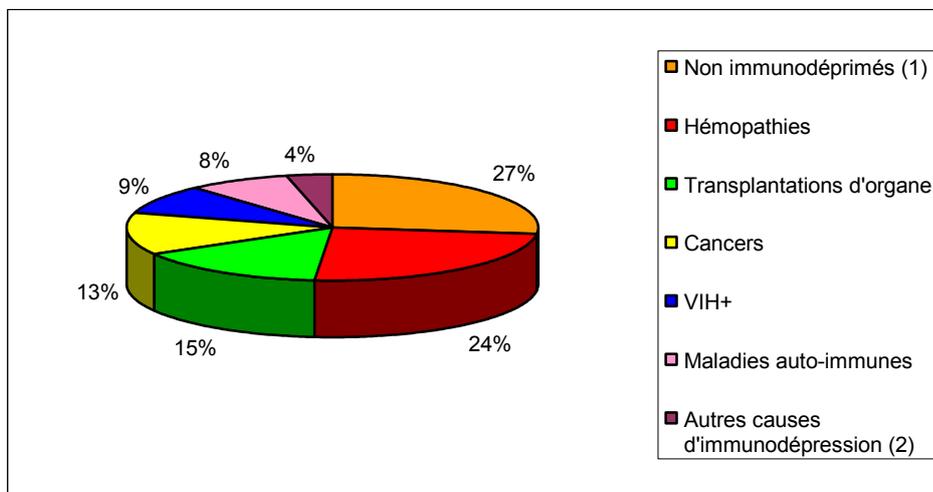


Figure 14 : Répartition graphique des pathologies sous jacentes dans la population étudiée (n=189).

(1) Considérés comme non immunodéprimés, d'après les renseignements disponibles.

(2) Neutropénie constitutionnelle, corticothérapie au long cours, DICV, Hépatite C.

III.2 Résultats

Les résultats de la recherche de *P. jiroveci* pour les 201 LBA sont présentés dans le tableau 15.

Musto	PCR		
	Positive	Négative	Total
Positive	9	0	9
Négative	38	154	192
Total	47	154	201

Tableau 15 : Résultats de la recherche de *P. jiroveci* par la coloration de Musto et par la PCR sur 201 échantillons de LBA.

Parmi les 201 LBA étudiés, provenant de 189 patients, 9 se sont avérés être positifs par la coloration de Musto. La prévalence globale de la pneumocystose dans notre population avec cette technique est donc de 4,8% (9/189).

Par ailleurs, on constate une discordance importante entre les résultats obtenus par la coloration de Musto et la PCR. En effet, 38 échantillons sur les 201 testés (18,9%) se sont avérés être positifs uniquement en PCR. Afin d'analyser ces discordances, nous avons décidé d'une part, de réaliser des techniques complémentaires sur ces échantillons et d'autres part, d'utiliser les données cliniques.

III.2.1 Techniques complémentaires réalisées sur les 38 échantillons discordants

L'analyse du nombre de copies obtenues pour ces 38 LBA a permis de les séparer en 2 groupes :

-Les échantillons positifs quantifiables (n=19), pour lesquels une quantification précise du nombre de copies a pu être réalisée.

-Les échantillons positifs non quantifiables (n=19), pour lesquels les quantités d'ADN de *Pneumocystis* très faibles (<30 copies/réaction) contenues dans les prélèvements, ne permettent pas de réaliser une quantification fiable puisqu'on se trouve en dehors de la zone de reproductibilité de la technique.

Les **19 échantillons quantifiables** ont été soumis à une technique d'immunofluorescence directe, plus sensible que la coloration de Musto utilisée en routine au laboratoire. Les résultats de l'immunofluorescence sont présentés dans le tableau 16. Un seul échantillon (patient 63) s'est avéré positif en immunofluorescence.

Références patients	PCR <i>P. jiroveci</i> copies/réaction	Immunofluorescence
10	376	Neg
13	122	Neg
21	6734	Neg
30	155	Neg
43	49	Neg
55	43	Neg
56	78	Neg
63	9398	Pos
67	336	Neg
94	234	Neg
102	156	Neg
107	1170	Neg
113	78	Neg
116	170	Neg
117	650	Neg
142	464	Neg
145	4130	Neg
154	238	Neg
157	228	Neg

Tableau 16 : Résultats de l'immunofluorescence directe réalisée sur les échantillons positifs quantifiables (n=19).

Neg : négatif, Pos : positif

Les **19 échantillons non quantifiables** ont été soumis à une **deuxième PCR** afin de confirmer leur positivité. Les résultats de la deuxième PCR sont présentés dans le tableau 17. Tous les échantillons se sont révélés positifs dans au moins une des trois réactions de la triplicate lors de la seconde PCR. Afin de s'assurer que la positivité de la PCR correspondait effectivement à de l'ADN de *P. jiroveci*, les échantillons ont été passés en **électrophorèse en gel de polyacrylamide à 9%** (tableau 17). Un témoin de poids moléculaire introduit dans la série d'échantillons a permis de mettre en évidence dans tous les extraits de LBA, une bande de 81 pb correspondant au fragment d'ADN de *P. jiroveci* amplifié dans notre PCR, confirmant ainsi la présence de l'ADN de *P. jiroveci* dans nos 19 échantillons.

Références patients	Résultats de la triplicate		Electrophorèse en gel
	1 ^{ère} PCR	2 ^{ème} PCR	Présence d'une bande de 81 pb
17	PNN	PNN	oui
23	PPN	PPP	oui
24	PNN	PPP	oui
28	PPP	PPP	oui
31	PPP	PPP	oui
42	PPN	PNN	oui
50	PNN	PPN	oui
59	PNN	PPN	oui
60	PNN	PPN	oui
61	PNN	PPN	oui
66	PNN	PNN	oui
92	PPP	PPP	oui
97	PPN	PPN	oui
104	PPN	PPP	oui
158	PPP	PPP	oui
166	PPN	PPP	oui
168	PPN	PNN	oui
169	PPP	PPP	oui
177	PPP	PPP	oui

Tableau 17 : Résultats des 2 PCR *Pneumocystis* et de l'électrophorèse en gel réalisées sur les échantillons positifs non quantifiables (n=19).

P : positif, N : négatif

L'immunofluorescence a permis de confirmer le diagnostic de pneumocystose pour le patient 63. La deuxième PCR et l'électrophorèse en gel de polyacrylamide témoignent de la présence spécifique d'ADN de *P. jiroveci* dans les échantillons faiblement positifs.

III.2.2 Analyse des données cliniques

La technique de PCR étant plus sensible que l'examen microscopique, il est possible que certains cas de pneumocystoses n'aient pas été mis en évidence par l'examen microscopique. En l'absence de « gold standard » permettant d'affirmer avec certitude le diagnostic de pneumocystose, nous avons décidé d'analyser les **données cliniques disponibles pour les 38 patients positifs uniquement en PCR.**

Ces données ont permis de suspecter une pneumocystose chez certains d'entre eux, et cela malgré la négativité de l'examen microscopique.

Dans un souci d'objectivité, un arbre décisionnel reprenant les **critères cliniques les plus évocateurs d'une pneumocystose** a été élaboré afin de repérer les patients pour lesquels le diagnostic de pneumocystose était fortement envisageable (figure 15).

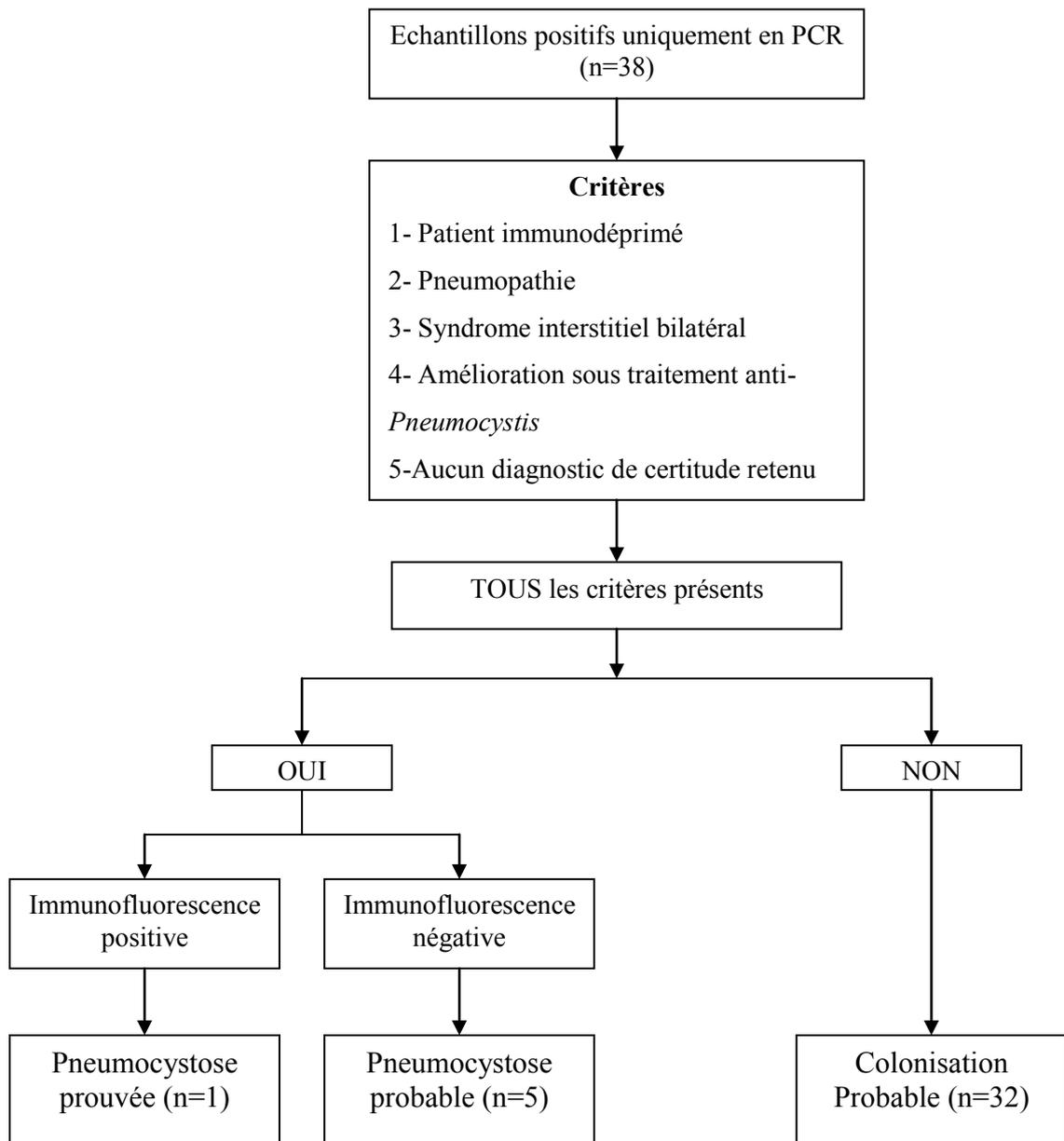


Figure 15 : Arbre décisionnel appliqué aux 38 échantillons uniquement positifs en PCR *Pneumocystis*.

Il est ainsi possible de classer nos résultats de patients (n=189) en 4 catégories :

-Les pneumocystoses prouvées, pour lesquelles la présence de *P. jiroveci* a été confirmée à l'examen microscopique (coloration de Musto ou immunofluorescence) (n=10). Les données cliniques de ces 10 patients sont regroupées en annexes 13 et 14.

-Les pneumocystoses probables, qui correspondent aux LBA uniquement positifs en PCR et pour lesquels, les patients présentaient une clinique compatible avec le diagnostic de pneumocystose (n=5). Les données cliniques concernant ces 5 patients sont présentées en annexe 15.

-Les colonisations par *P. jiroveci*, qui correspondent aux LBA uniquement positifs en PCR et pour lesquels, les patients ne présentaient pas tous les critères cliniques d'une pneumocystose (n=32). Les données cliniques de ces patients sont disponibles en annexe 16.

-L'absence de *P. jiroveci* dans le LBA a été retenue quand toutes les techniques utilisées pour la recherche du champignon sont restées négatives (n=142).

En tenant compte des 5 cas de pneumocystoses probables, la prévalence globale de la pneumocystose dans notre population est d'environ 7,9% (15/189).

Il est possible de classer nos résultats en 4 catégories : les pneumocystoses prouvées, probables, les colonisations et l'absence de détection de *P. jiroveci* dans le LBA. La prévalence globale de la pneumocystose dans notre étude est de 7,9%.

III.3 Analyse des 4 catégories de patients

III.3.1 Patients ayant une pneumocystose prouvée (n=10) (annexe 13 et 14)

-Pathologies sous jacentes

Parmi les 10 cas positifs, 5 étaient des patients séropositifs pour le VIH et 5 étaient des patients immunodéprimés, mais non VIH.

La prévalence de la pneumocystose dans la population VIH+ de notre étude est de 29,4% (5/17). Au sein du groupe VIH+, le patient 108 se distinguait des autres sur plusieurs points. Tout d'abord, il était le seul patient à bénéficier d'un traitement anti-rétroviral au moment de l'épisode et à avoir une charge virale indétectable pour le VIH (<1,6 log). Ensuite, ce patient présentait dans ses antécédents un lymphome de Burkitt diagnostiqué en 2004, traité par radiothérapie et chimiothérapie et actuellement en rémission complète.

Parmi les patients non VIH, on notait un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde, un patient présentant une spondylarthrite ankylosante, un greffé rénal, une patiente hospitalisée pour la prise en charge d'un cancer du sein et enfin un patient qui bénéficiait d'une corticothérapie au long cours. Au moment du diagnostic de pneumocystose, ces 5 patients bénéficiaient d'une thérapeutique immunosuppressive (corticoïdes, anti-cancéreux, ou anti-rejet).

Le tableau 8 regroupe une comparaison des données obtenues pour les patients VIH+ et non VIH.

-Taux de CD4

Le taux de CD4+ dans le groupe VIH+ était bas (<20/mm³) sauf pour le patient 108 (373/mm³), soit très inférieur au seuil de 200/mm³, seuil au-delà duquel, le risque de développer une pneumocystose est très fortement majoré au sein de la population VIH+. Dans le groupe non VIH, le taux de lymphocyte CD4+ moyen (229/mm³) est plus élevé que dans le groupe VIH+. Le taux de CD4+ varie entre 172 et 350/mm³.

-Durée des prodromes

Chez les patients VIH+, la durée des prodromes était d'environ 32 jours. Le patient 108 se démarquait du reste du groupe par l'ancienneté des symptômes (> 3 mois). Chez les patients VIH-, la durée des prodromes était plus courte (8 jours), ce qui se traduisait par un début de la maladie plus brutal.

	VIH+	VIH-
Moyenne âge (années)	45,8	67,4
Moyenne CD4+ (/mm3)	85,2	229,3
Moyenne durée des prodromes (jours)	32	8
Moyenne copies de <i>P.j</i> /réaction	9 342 197	534 746
% de mortalité	0	40

Tableau 18 : Comparaison de l'âge, du taux des CD4+, de la durée des prodromes, du nombre de copies de *P. jiroveci* et du pourcentage de mortalité chez les patients ayant présenté une pneumocystose en fonction de leur statut vis-à-vis du VIH.

-Signes cliniques

Le signe clinique le plus fréquent était la fièvre (100%), puis la dyspnée (90%) et enfin la toux (40%). La triade clinique complète (dyspnée, fièvre, toux) n'était présente que chez 3 patients parmi les 10.

-Imagerie thoracique

L'imagerie mettait en évidence un syndrome interstitiel bilatéral dans 90% des cas.

-Prophylaxie

Parmi les 10 patients, **aucun ne bénéficiait d'une prophylaxie anti-*Pneumocystis*.**

-Traitement / évolution

Tous les patients ont bénéficié d'un traitement de 21 jours par Bactrim® (IV puis relais *per os*), molécule classiquement utilisée en première intention dans le traitement de la pneumocystose. Seul le patient 63 (9398 copies/réaction) a bénéficié d'un traitement par Bactrim® mais à dose prophylactique. Pour 8 des 10 patients, il a été nécessaire d'associer au Bactrim® une corticothérapie ainsi qu'une oxygénothérapie.

L'évolution a été rapidement favorable pour 7 patients. Pour le patient 63, l'évolution a été favorable, mais beaucoup plus lente avec persistance d'une dyspnée. Deux des patients non VIH sont décédés au décours de l'épisode.

-Autres germes retrouvés dans le LBA

Chez les patients VIH, d'autres germes ont été retrouvés dans les LBA (*S. aureus*, CMV, *B. catarrhalis* et *C. albicans*).

-Quantification de l'ADN de *P. jiroveci*

Les résultats des quantifications de l'ADN de *P. jiroveci* pour les 10 patients sont représentés sur la figure 16. On constate que les quantités de copies/réaction sont supérieures au seuil de 10^4 , sauf pour le patient 63. Le nombre de copies obtenu pour les patients VIH+ est plus élevé que celui des patients non VIH. Néanmoins, la dispersion importante des résultats pour chacune des 2 populations VIH+ et VIH-, ne permet pas de mettre en évidence un seuil différent selon la population étudiée.

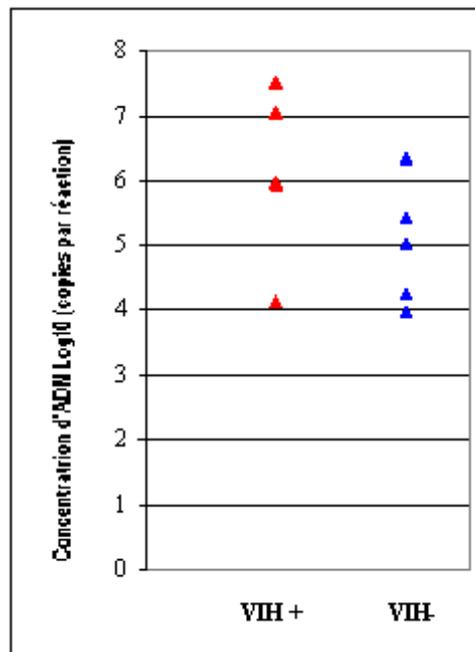


Figure 16 : Quantité d'ADN (Log_{10} copies/réaction) chez les patients atteints de pneumocystose en fonction de leur statut vis-à-vis du VIH [VIH+ (n=5) ; VIH- (n=5)].

Chez 9 des 10 patients atteints de pneumocystose, on constate que les nombres de copies de *P. jiroveci* sont supérieures au seuil de 10^4 .

III.3.2 Cas de pneumocystoses probables (n=5) (Annexe 15)

D'après l'arbre décisionnel, il est possible de suspecter fortement une pneumocystose pour 5 patients, qui répondent à la totalité des critères.

-Pathologies sous jacentes

La moyenne d'âge pour ces patients est de 68,8 ans. Il s'agit d'individus immunodéprimés non VIH. Deux patients bénéficient d'un traitement immunosuppresseur dans le cadre de leur greffe rénale. Trois autres patients sont porteurs d'une hémopathie.

-Taux de CD4+

Les patients 13 (lymphopénie profonde) et 113 présentent des taux de CD4+ très bas.

-Prophylaxie

Aucun des 5 patients ne recevaient de prophylaxie lors de l'épisode. Pour les patients 113 et 145, la prophylaxie par aérosols de Pentacarinat[®] avait été arrêtée quelques mois auparavant.

-Traitement / évolution

La forte suspicion clinique de pneumocystose a conduit à entreprendre un traitement probabiliste anti-*Pneumocystis* en association avec une antibiothérapie large spectre chez ces patients, malgré la négativité de la coloration de Musto. Une corticothérapie a été débutée en parallèle pour 4 des 5 patients.

L'évolution a été favorable pour les 5 patients.

-Quantification de l'ADN de *P. jiroveci*

Le taux moyen de copies dans ce groupe est de 2288 copies/réaction (78 à 6734 copies/réaction). Pour le patient 13 (122 copies/réaction), et le patient 113 (78 copies/réaction), il faut noter que les LBA ont été réalisés respectivement 4 jours et 1 jour après le début du traitement par Bactrim[®].

Pour les patients 13, 113 et 145, de nouveaux LBA ont été pratiqués. La PCR *Pneumocystis* réalisée sur ces échantillons n'a pas retrouvé d'ADN de *P. jiroveci* (tableau 19).

Références patients	Date du LBA	Indications des LBA	CD4 + (/mm ³)	Autres germes dans le LBA	PCR <i>P. j</i> Copies /réaction
13a	18/12/06	Pneumopathie interstitielle résistante aux antibiotiques	nr	<i>C. albicans</i>	122
13b	28/03/07	Pneumopathie lobaire supérieure droite résistante aux antibiotiques	nr	<i>C. albicans</i>	0
113a	11/04/07	Pneumopathie interstitielle bilatérale	20	0	78
113b	20/04/07	Pneumopathie d'évolution défavorable	40	0	0
145a	5/05/07	Pneumopathie interstitielle bilatérale	663	0	4 130
145b	15/05/07	Premier LBA non contributif	nr	0	0
145c	28/06/07	Récidive de pneumopathie interstitielle hypoxémiante	nr	0	0

nr : non renseigné

Tableau 19 : Résultats de la PCR *Pneumocystis* chez 3 patients ayant eu plusieurs LBA successifs.

-Diagnostic différentiel

Pour 3 des 5 patients, le diagnostic différentiel évoqué était une pneumopathie médicamenteuse au Rapamune[®] et à la Cordarone[®]. Des cas de pneumopathies interstitielles au Rapamune[®] ont déjà été rapportés à plusieurs reprises chez des greffés rénaux (Mingos and Kane 2005; Weiner, Sellin *et al.* 2007).

Pour les 2 autres patients, le diagnostic retenu était une pneumopathie infectieuse d'étiologie inconnue.

III.3.3 Patients colonisés (n=32) (Annexe 16)

Pour 32 échantillons, la PCR a mis en évidence de l'ADN de *P. jiroveci* sans que les patients ne présentent une symptomatologie clinique typique de pneumocystose. Ces patients peuvent donc être considérés comme colonisés par le parasite. La prévalence globale de la colonisation dans la population étudiée est donc de 16,9% (32/189).

-Pathologie sous jacentes

Les pathologies sous jacentes des 32 patients colonisés ainsi que les prévalences de la colonisation au sein de chaque groupe sont présentées dans le tableau 20. On remarque que la colonisation atteint aussi des patients immunocompétents. Parmi les 6 patients considérés comme non immunodéprimés, les patients 43, 66 et 116 étaient hospitalisés pour des bilans dans le cadre d'une suspicion de sarcoïdose.

Le patient 50 présentait un tableau clinique ainsi qu'un dosage de quantiferon® évocateur d'une tuberculose latente. Les patients 31 et 61 ne présentaient pas d'antécédents notables.

Des cas de porteurs sains ont déjà été décrits chez des patients immunocompétents (Medrano, Montes-Cano *et al.* 2005; Nevez, Magois *et al.* 2006), et en particulier chez des patients présentant des pathologies pulmonaires chroniques (Nevez, Raccurt *et al.* 1999; Sing, Roggenkamp *et al.* 1999; Morris, Scirba *et al.* 2004; Vidal, de la Horra *et al.* 2006).

Pathologies sous jacentes dans la population totale (n=189)	Nombre de patients colonisés (n=32)	Taux de colonisation en fonction de la pathologie sous jacente (%)
Maladies auto-immunes (n=15)	5	33,3
Cancers (n=24)	6	25
Hémopathies (n=46)	9	19,6
VIH+ (n=17)	3	17,6
Autres causes d'immunodépression (n=7)	1	14,2
Non immunodéprimés (n=51)	6	11,8
Transplantations d'organe (n=29)	2	6,9

Tableau 20 : Taux de colonisation à *P. jiroveci* en fonction de la pathologie sous jacente.

-Taux de CD4+

Ces taux n'étant pas disponible pour la plupart des patients, il apparaît difficile de les interpréter.

-Prophylaxie

De l'ADN de *P. jiroveci* a pu être mis en évidence chez 3 patients (17, 60 et 142) qui bénéficiaient pourtant d'une prophylaxie par Bactrim® au moment de la réalisation du LBA. Dans leur étude, Wakefield *et al.* ont mis en évidence des cas similaires, ce qui suggère que la prophylaxie même si elle prévient la survenue d'une pneumocystose, n'assure pas obligatoirement la clairance totale du parasite (Wakefield, Lindley *et al.* 2003). Il pourrait aussi s'agir d'un défaut d'observance quant à la prophylaxie chez les patients.

-Traitement

Les patients 104, 158 et 166 ont bénéficié d'un traitement par Bactrim®. Ces patients n'ont pas été retenus comme des cas probables de pneumocystose car ils ne répondaient pas à tous les critères de l'arbre décisionnel.

Pour le patient 104, le diagnostic de pneumopathie bactérienne a été retenue du fait des germes retrouvés dans le LBA (*S. pneumoniae* et *S. aureus*). Les cas des patients 158 et 166 sont plus discutables et il est difficile d'exclure avec certitude le diagnostic de pneumocystose.

-Quantification de l'ADN de *P. jiroveci*

La quantification variait de moins de 30 à 1170 copies/réaction. Il n'a pas été possible de réaliser une moyenne puisque certains résultats étaient rendus positifs non quantifiables. A l'exception du patient 107 atteint d'une pneumopathie virale, on remarque que tous les patients colonisés ont un nombre de copies/réaction inférieur à 10^3 (tableau 21).

Copies de <i>P. jiroveci</i> /réaction	Nombre de patients
<30	19
30 à 10^2	3
10^2 à 10^3	9
$>10^3$	1

Tableau 21 : Quantités de copies de *P. jiroveci* détectées chez les 32 patients colonisés.

La prévalence de la colonisation dans notre population est de 16,9%. On constate que 31 des 32 patients considérés comme colonisés présentent des quantités de copies de *P. jiroveci* inférieures au seuil de 10^3 .

III.3.4 Absence de *Pneumocystis* dans le LBA (n=142)

Pour 142 patients, la recherche de *Pneumocystis* par les colorations de Musto, de Giemsa et par la PCR s'est révélée négative. Ceci peut s'expliquer car certains de ces prélèvements ont été réalisés dans des contextes peu évocateurs de pneumocystose (LBA systématique, à visée biopsique, en dehors de toute pneumopathie...).

Pour un certain nombre de patients, on constate qu'aucun germe n'a été identifié dans le LBA, malgré un tableau de pneumopathie. L'administration d'anti-infectieux avant la réalisation du LBA peut expliquer que ces prélèvements soient restés stériles. Parfois les germes impliqués ont été isolés dans d'autres prélèvements (hémocultures, liquides pleuraux, pièges...). Enfin, les pneumopathies peuvent aussi avoir une origine non infectieuse (médicamenteuse par exemple).

Discussion

Le but de cette étude était de mettre en place au C.H.U de Nantes, une PCR quantitative en temps réel pour la recherche de *P. jiroveci*, de comparer les performances de la PCR avec les techniques de coloration habituellement utilisées au laboratoire de Parasitologie/Mycologie et enfin de déterminer l'intérêt et les limites de la quantification de l'ADN de *P. jiroveci* dans le diagnostic de pneumocystose.

Pour la détection de *P. jiroveci* dans les échantillons cliniques, plusieurs études ont été publiées, utilisant différentes techniques de PCR, comme la PCR en temps réel (Brancart, Rodriguez-Villalobos *et al.* 2005; Linssen, Jacobs *et al.* 2006), la PCR « nichée » ou nested PCR (Flori, Bellete *et al.* 2004; Alvarez-Martinez, Miro *et al.* 2006) et la PCR conventionnelle (Flori, Bellete *et al.* 2004).

Pour notre étude, nous avons choisi de travailler avec une PCR en temps réel car elle présente plusieurs avantages :

- il s'agit d'une technique rapide (< 5 heures).
- peu contraignante puisqu'elle ne nécessite pas de révélation en gel, ce qui limite aussi le risque de contamination en post-amplification.
- elle permet de rendre des résultats quantitatifs.

Différents fragments de gènes de *P. jiroveci* peuvent être employés comme gènes cibles et amplifiés au cours de la PCR (Robberts, Liebowitz *et al.* 2007). On peut citer le gène de la DHPS (Alvarez-Martinez, Miro *et al.* 2006), la DHFR (Bands and Monecke 2007), le gène *cdc2* (Arcenas, Uhl *et al.* 2006), la β -tubuline (Brancart, Rodriguez-Villalobos *et al.* 2005), les ITS de l'ARNr (Torres, Goldman *et al.* 2000), le gène 5S (Bands and Monecke 2007), la MSG (Linssen, Jacobs *et al.* 2006), le gène de la mtLSU ARNr (Wakefield, Pixley *et al.* 1990).

Nous avons décidé d'utiliser le fragment de gène **mtLSU ARNr**, et cela pour 2 raisons :

- d'une part, parce qu'il s'agit d'un **gène très conservé** au sein du genre *Pneumocystis*.
- d'autre part, parce qu'il s'agit d'un **gène multicopie**. Le caractère multicopie de ce gène permet la détection de très faible quantité de *Pneumocystis* et confère à la PCR une grande sensibilité, bien supérieure à la sensibilité obtenue avec des gènes simple copie (Robberts, Liebowitz *et al.* 2007).

▪ **Analyse comparative des résultats par la coloration de Musto et par la PCR**

Nous avons comparé les résultats obtenus par la coloration de Musto et la PCR pour la recherche de *P. jiroveci* sur 201 LBA. On constate une concordance entre les 2 techniques pour 81,1% (163/201) des échantillons testés. Ce chiffre est inférieur à celui trouvé par Meliani *et al.*, qui rapportent dans leur étude (n=529) un taux de concordance de 91,3% entre la PCR en temps réel (mtLSU ARNr) et l'examen microscopique (Meliani, Develoux *et al.* 2003). Cette différence peut néanmoins s'expliquer par l'utilisation dans l'étude de Meliani de l'immunofluorescence directe, une technique microscopique plus sensible que la coloration de Musto employée dans notre travail.

Aucun échantillon positif en microscopie ne s'est révélé être négatif en PCR. Par contre, nous avons constaté une discordance de résultats pour 38 LBA (provenant de 38 patients), pour lesquels seule la PCR était positive.

L'analyse clinique rétrospective des dossiers des 38 échantillons discordants a permis de retenir 5 cas pour lesquels le diagnostic de pneumocystose pouvait être considéré comme probable, selon l'arbre décisionnel précédemment établi. En tenant compte de ces 5 cas, la prévalence globale de la pneumocystose dans notre population est de 7,9% (15/189).

Sensibilité et spécificité

Dans notre population, on peut donc estimer à 15 le nombre de cas de pneumocystoses (prouvées ou probables) et à 186 le nombre de LBA pour lesquels les patients n'étaient pas atteints de pneumocystose.

Techniques	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Musto	60 (9/15)	100 (186/186)	100	96,9
PCR <i>Pneumocystis</i>	100 (15/15)	82,7 (154/186)	31,9	100

Tableau 22 : Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP) et valeur prédictive négative (VPN) de la coloration de Musto et de la PCR *Pneumocystis* pour le diagnostic de pneumocystose dans notre étude (n=201).

Les résultats présentés dans le tableau 22 confirment la grande sensibilité de la PCR et la faible sensibilité de la coloration de Musto. La PCR présente alors un taux de « faux positifs » de 17,2% (32/186). Ces résultats sont assez comparables avec ceux rapportés par Flori *et al.* (Flori, Bellete *et al.* 2004). Dans leur étude, la sensibilité et la spécificité de la PCR conventionnelle (gène mtLSU ARNr) pour la détection de *P. jiroveci* sont respectivement de 100% et 87% et celles de la coloration de Grocott, respectivement de 60% et 100%, sur une population de 150 patients dont le diagnostic de pneumocystose a été établi cliniquement. Ils retrouvent un taux de « faux positifs » avec la PCR conventionnelle de 12,9%.

Valeurs prédictives

On constate une bonne valeur prédictive négative pour la PCR, ce qui n'est pas surprenant, étant donné la grande sensibilité de la technique. Par contre, la valeur prédictive positive est assez faible, mais s'explique par la présence des cas de colonisation.

En l'absence de « gold standard », c'est à dire de technique permettant de poser avec certitude le diagnostic de pneumocystose, nous avons décidé d'utiliser les données cliniques pour comparer nos techniques, comme cela a déjà été fait dans d'autres études (Weig, Klinker *et al.* 1996; Torres, Goldman *et al.* 2000; Flori, Bellete *et al.* 2004; Arcenas, Uhl *et al.* 2006).

Cette démarche introduit évidemment un biais, puisque d'une part, l'analyse des dossiers a été réalisée de façon rétrospective et donc probablement influencée par les résultats déjà connus et d'autre part, les critères cliniques retenus (patient immunodéprimé, pneumopathie, syndrome interstitiel bilatéral, amélioration sous traitement anti-*Pneumocystis*, aucun diagnostic de certitude retenu) ne garantissent pas une sélection exhaustive des cas de pneumocystose.

Ainsi, le cas de la patiente 188, atteinte de pneumocystose, prouve que l'imagerie thoracique ne montre pas toujours un syndrome interstitiel bilatéral.

De plus, chez les patients atteints de pneumocystose, l'administration d'un traitement adapté, tel que le Bactrim[®] n'entraîne pas toujours une amélioration clinique, comme semble le prouver les décès des patients 144 et 188. Parfois, l'amélioration clinique peut

aussi être liée à l'effet antibiotique du Bactrim[®], lorsque la pneumopathie est causée par une bactérie sensible à cette molécule.

Enfin, d'après nos critères, seuls les patients pour lesquels, la pneumopathie n'avait pas de cause documentée ont été retenus. Néanmoins, la population étudiée est majoritairement constituée de patients immunodéprimés, et il est tout à fait possible que ces patients puissent être atteints par des infections résultant de l'association de plusieurs germes opportunistes (Overgaard and Helweg-Larsen 2007). C'est le cas des patients VIH+ 70 et 155 atteints de pneumocystose, et pour lesquels on a retrouvé dans le LBA un *S. aureus* et un CMV.

▪ **Analyse des discordances**

Différentes raisons peuvent expliquer les discordances entre les résultats de la PCR et de la coloration de Musto :

La différence de sensibilité entre les 2 techniques

Pour les échantillons discordants, on remarque que les nombres de copies sont faibles (<30 jusqu'à 9 000 copies/réaction) par rapport aux échantillons provenant de patients atteints de pneumocystose et positifs dans toutes les techniques (13 000 jusqu'à 33 millions de copies/réaction). Il est donc possible que la coloration de Musto, du fait de sa faible sensibilité n'ait pas pu mettre en évidence de kystes de pneumocystes dans ces échantillons.

Une technique complémentaire d'immunofluorescence directe plus sensible que la coloration de Musto a été réalisée sur les échantillons positifs quantifiables. Elle ne s'est avérée positive que pour le patient 63, mettant en évidence de rares kystes de *Pneumocystis*. Ce patient était positif en PCR avec 9398 copies/réaction. Le cas du patient 63 montre les limites de la recherche du champignon par la coloration de Musto. Les conditions de réalisation de l'immunofluorescence n'étant pas optimales (volume de LBA insuffisant, parfois utilisation de surnageant de LBA), il est difficile de conclure à la négativité certaine des autres échantillons.

Volume de LBA utilisé

Pour la PCR, nous avons travaillé sur un volume de 1 mL de LBA, alors que pour la réalisation des colorations de Musto, le volume de LBA utilisé était de 100 µL par lame de cyto centrifugation, soit 200µL pour 2 lames. De plus, *P. jiroveci* a tendance à se regrouper **en amas**, entraînant une **répartition hétérogène** du parasite dans le prélèvement. Ainsi, plus la prise d'essai est faible, plus on a un risque de ne pas avoir prélevé de *Pneumocystis*.

Concernant la signification de cas discordants, 2 hypothèses sont envisageables :

La première hypothèse est de considérer ces cas comme étant des faux positifs en PCR.

Il pourrait alors s'agir de **réactions croisées** de la PCR avec d'autres micro-organismes présents dans le LBA. Cette hypothèse est très peu probable car les amorces et la sonde que nous avons utilisées ont préalablement été choisies après avoir vérifié sur un logiciel spécialisé, l'absence de séquence similaire chez d'autres micro-organismes.

De plus, la présence de différents germes dans les LBA de patients pour lesquels la PCR *Pneumocystis* est restée négative (annexe 17) est en faveur de l'absence de réaction croisée.

Enfin, la présence d'une bande isolée de 81 pb en électrophorèse en gel polyacrylamide pour nos échantillons positifs faibles confirme l'amplification de notre fragment de gène cible de *P. jiroveci*. Ces arguments ne sont donc pas en faveur d'échantillons faux positifs en PCR.

La deuxième hypothèse, plus probable est l'existence de patients colonisés par le champignon.

Pour notre étude, le taux de colonisation global est de 16,9% (32/189). La colonisation concerne principalement des patients immunodéprimés, ce qui a déjà été décrit dans la littérature (Huang, Crothers *et al.* 2003).

On constate aussi des cas dans le groupe des patients immunocompétents, et plus particulièrement chez des patients atteints de pathologies pulmonaires chroniques (1 cas de tuberculose et 3 cas de sarcoïdose). Plusieurs études ont montré l'existence de colonisation chez des patients atteints de désordres pulmonaires (Nevez, Raccurt *et al.* 1999; Sing, Roggenkamp *et al.* 1999; Morris, Sciurba *et al.* 2004; Vidal, de la Horra *et al.* 2006).

▪ Quantification

Pour quantifier l'ADN de *Pneumocystis*, nous nous sommes heurtés à plusieurs difficultés :

Nous avons ainsi constaté que la qualité du prélèvement (LBA) influençait significativement nos résultats quantitatifs.

Cette difficulté est illustrée par le cas de la patiente 188. En effet, le LBA reçu au laboratoire de Parasitologie pour cette patiente montrait de rares formes à la morphologie très altérée, pouvant évoquer des kystes de pneumocystes sur la coloration de Musto mais sans certitude. Il a donc été décidé de refaire une coloration de Musto sur le reste du même LBA provenant du laboratoire de Bactériologie. Sur cette deuxième coloration, le diagnostic de pneumocystose était aisé.

Cette disparité entre les résultats des 2 LBA a été confirmée par la PCR. Le premier LBA reçu au laboratoire de Parasitologie était positif à 30 copies/réaction, tandis que dans le deuxième LBA provenant du laboratoire de Bactériologie, la PCR retrouvait 17 750 copies de *P. jiroveci*/réaction.

Il est difficile de déterminer avec certitude la cause ayant engendré cette différence de résultats au sein d'un même LBA. La répartition hétérogène du parasite dans les flacons destinés aux différents laboratoires ou le lieu exact du lavage pourraient être des explications (Bands and Monecke 2007).

La quantité de sérum physiologique instillée au moment du lavage, en diluant plus ou moins le prélèvement, peut aussi modifier la qualité du LBA. Il est donc important de tenir compte de la quantité de cellules présentes dans le LBA, puisqu'elle reflète la qualité de celui-ci.

Ceci est d'autant plus important, que les pneumocystes adhèrent aux cellules épithéliales. Ainsi, la quantification d'ADN de *Pneumocystis* n'aura pas la même signification selon que le prélèvement est riche ou non en cellules (Robberts, Liebowitz *et al.* 2007). Il apparaît donc indispensable de pouvoir évaluer la quantité de cellules dans le LBA. Pour cela, il est possible d'employer dans la PCR un gène dit de « ménage », c'est à dire présent dans les cellules humaines. Classiquement, le gène

utilisé est celui de l'albumine. La réalisation d'une gamme d'étalonnage d'albumine permet ainsi de quantifier l'ADN d'albumine présent dans l'échantillon en parallèle à la quantification de l'ADN de *Pneumocystis* (Bands and Monecke 2007). Les quantités d'ADN du champignon sont alors exprimées en fonction de la quantité d'ADN d'albumine.

Cette technique est déjà employée dans le domaine de la Virologie pour quantifier l'ADN du CMV dans les leucocytes (Gault, Michel *et al.* 2001).

Une autre limite concernant la quantification de l'ADN de *P. jiroveci* est l'utilisation d'un gène multicopie pour lequel le nombre de copies par pneumocyste n'est pas connu et est susceptible de varier selon les souches.

D'autres facteurs pourraient aussi influencer les résultats quantitatifs. Ainsi, on ne connaît pas l'impact d'un traitement ou d'une prophylaxie anti-*Pneumocystis* sur l'ADN du parasite, et en particulier on ne sait pas combien de temps l'ADN persiste dans l'organisme d'un patient à partir du moment où celui-ci est traité.

- **Etablissement d'un « cut-off »**

L'intérêt de réaliser une PCR quantitative est de pouvoir définir un seuil de copies permettant de différencier les patients colonisés par le parasite et ceux développant une pneumocystose (Larsen, Masur *et al.* 2002). Les résultats quantitatifs de l'ensemble des LBA positifs en PCR sont regroupés dans la figure 17.

On constate ainsi, que l'ensemble des patients présentant une pneumocystose prouvée sont tous supérieurs à 10^4 copies/réaction (à l'exception du patient 63, 9398 copies/réaction) et que tous les patients considérés comme colonisés (à l'exception du patient 107, 1170 copies/réaction) sont tous inférieurs à 10^3 copies/réactions. Entre 10^3 et 10^4 copies/réaction, on retrouve 2 des 5 cas classés comme pneumocystose probable. Cependant, il reste 3 cas probables pour lesquels les taux de copies sont inférieurs à 10^3 . Parmi ces 3 cas, il faut souligner que les patients 113 et 13 avaient reçu respectivement 1 et 4 jours de traitement par Bactrim[®] avant que le LBA ne soit réalisé.

Plusieurs équipes ont proposé un cut-off sensé permettre d'interpréter les résultats quantitatifs obtenus avec la PCR (Flori, Bellete *et al.* 2004; Brancart, Rodriguez-Villalobos *et al.* 2005; Arcenas, Uhl *et al.* 2006; Linssen, Jacobs *et al.* 2006; Bands and Monecke 2007; Huggett, Taylor *et al.* 2007; Huggett, Taylor *et al.* 2007). D'autres, devant la complexité du problème ont préféré utiliser leur PCR de façon qualitative (Arcenas, Uhl *et al.* 2006).

Il demeure difficile de comparer le seuil suggéré dans notre étude à ceux trouvés dans ces travaux, car les conditions techniques utilisées (techniques de PCR, gènes cibles et populations testées) sont très variables d'une étude à l'autre.

Les résultats du patient 63, négatif par la coloration de Musto, mais positif en immunofluorescence et en PCR avec 9398 copies/réactions et les résultats du patient 108, positif à l'examen microscopique et en PCR avec 13 213 copies/réaction, suggèrent un seuil de détection pour la coloration de Musto d'approximativement 10^4 copies. Ce résultat nécessite d'être confirmé sur d'autres échantillons.

▪ **Intérêts de la PCR pour le diagnostic de la pneumocystose**

La PCR présente plusieurs avantages par rapport aux techniques de coloration habituellement utilisées pour la recherche de *P. jiroveci*.

Tout d'abord, il faut souligner sa sensibilité très élevée, qui lui confère d'une part, une bonne valeur prédictive négative et qui lui permet d'autre part, d'être beaucoup plus performante pour le diagnostic de pneumocystose chez les patients immunodéprimés non VIH, qui présentent généralement de faibles quantités de kystes dans leurs LBA (Limper, Offord *et al.* 1989; Sepkowitz 2002), souvent non détectés avec la coloration de Musto.

De plus, il s'agit d'une technique fiable et reproductible et non influencée par la subjectivité ou l'expérience du lecteur. En pratique, sa réalisation requiert un délai de 4 à 5 heures (temps d'extraction et de PCR compris) et nécessite la disponibilité du thermocycleur. Il s'agit donc d'une technique relativement rapide à exécuter mais uniquement réalisable pendant les heures ouvrables du laboratoire.

Le coût par patient peut être estimé à environ 6 euros (hors coût de l'albumine).

Un des atouts majeurs de la PCR est la possibilité de rendre des résultats quantitatifs permettant de différencier les patients colonisés de ceux atteints de pneumocystose. Ceci nécessite néanmoins l'établissement d'un seuil fiable pour l'interprétation des résultats. Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux facteurs, en particulier liés au prélèvement peuvent influencer la quantification de l'ADN de *Pneumocystis*. Pour la plupart de ces facteurs, il n'existe pas de mesures correctives envisageables. Par contre, il est possible d'évaluer la quantité de cellules dans le LBA en introduisant une gamme d'albumine. **Cette étape paraît indispensable, au vu des résultats de la patiente 188, pour améliorer la standardisation de la technique et pour pouvoir comparer les résultats à un cut-off. Des essais pour mettre en place une gamme d'albumine vont prochainement être débutés au laboratoire de Parasitologie/Mycologie du C.H.U de Nantes.**

La détection d'ADN de *P. jiroveci* à des taux faibles (colonisation) pourrait constituer un argument pour la mise en place d'une prophylaxie anti-*Pneumocystis* chez les patients immunodéprimés.

Parmi les perspectives intéressantes, la PCR pourrait aussi trouver une place dans le suivi post-thérapeutique des patients traités pour une pneumocystose. L'intérêt serait alors de réaliser une PCR quantitative pour suivre la diminution des quantités d'ADN de *P. jiroveci*, mais en utilisant des prélèvements beaucoup moins invasifs que les LBA, tels que les LROP (Tsolaki, Miller *et al.* 1999; Larsen, Huang *et al.* 2004).

Bien que le LBA demeure le prélèvement le plus performant pour la mise en évidence de *P. jiroveci*, il s'agit d'un prélèvement invasif qui n'est donc pas envisageable chez tous les patients. L'utilisation de la PCR pourrait ainsi être étendue à d'autres prélèvements respiratoires, moins invasifs comme les expectorations induites ou les pièges (Turner, Schwarz *et al.* 2003). En effet, ces prélèvements de part leur consistance visqueuse rendent la mise en évidence de kystes de pneumocystes très difficile à l'examen microscopique. La PCR de part sa grande sensibilité serait évidemment plus performante. Cela nécessite cependant une adaptation de la technique d'extraction, avec la mise en place d'une étape de fluidification indispensable pour ces prélèvements visqueux.

Enfin, la PCR constitue un outil intéressant pour la réalisation d'études épidémiologiques, notamment pour la recherche de colonisation (Soula 2002; Huang, Morris *et al.* 2006) ou pour identifier les réservoirs du champignon et les modes de transmission qui restent en grande partie non élucidés.

Il est important de ne pas méconnaître ce diagnostic car il s'agit d'une pathologie grave mettant en jeu le pronostic vital du patient, mais pour laquelle, nous disposons de traitements adaptés et d'autant plus efficaces qu'ils seront débutés précocement.

Dans ce contexte, la PCR constitue un outil supplémentaire et non superflu pour la recherche du micro-organisme. Quelques essais (gamme d'albumine) sont encore nécessaires pour optimiser la technique.

Enfin, il serait souhaitable de mener d'autres études et notamment de façon prospective, afin de confronter les résultats quantitatifs de la PCR avec les données cliniques lors de l'hospitalisation du patient. Cette démarche permettrait d'acquérir une certaine expérience quant à l'interprétation des résultats quantitatifs, ce qui conduirait probablement à l'établissement de seuils plus discriminants.

Abréviations

BOOP :Bronchiolite avec organisation pneumonique

Ct : Cycling threshold

CMV : Cytomegalovirus

CV : Coefficient de variation

Da : Dalton

DDB : Dilatation des bronches

DICV : Déficit immunitaire commun variable

DHFR : Dihydrofolate réductase

DHPS : Dihydroptéroate synthétase

FAM : 6-carboxy-fluorescein

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert

GBEA : Guide de bonne exécution des analyses

GVH : maladie du greffon contre l'hôte

HHV6 : Human herpes virus 6

HSV1 : Herpès simplex 1

IL8 : Interleukine 8

IPTG : Isopropylthio- β -galactoside

IRA : Insuffisance rénale aiguë

ITS : Internal Transcribed Spacers

LAM : Leucémie myéloïde aiguë

LDH : Lactate Déshydrogénase

LED : Lupus érythémateux disséminé

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LMMC : Leucémie myélo-monocytaire chronique

LNH : Lymphome non Hodgkinien

LROP : Liquide de rinçage oro-pharyngé

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1

MGB : Minor Groove Binder
MSG : Major Surface Glycoprotein
mtLSU ARNr : grande sous unité de l'ARN ribosomal mitochondrial
Neg : négatif
NFQ : Non Fluorescent Quencher
nr : non renseigné
pb : paires de bases
pO₂ : Pression partielle en oxygène
PAR : Polyarthrite rhumatoïde
PNQ : Positif non quantifiable
Pos : Positif
PPI : Pour Préparation Injectable
SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VHB : Virus de l'hépatite B
VHC : Virus de l'hépatite C
X Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactoside

Annexes

Annexe 1 : Bon de demande spécifique pour les recherches mycologiques et parasitologiques dans les LBA

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE C.H.U DE NANTES Tél. 02 40 08 4079

Date :

Préleveur :

Prescripteur :

Heure :

Tél ou Bip :

LAVAGE BRONCHOALVEOLAIRE

UNITE DE SOINS

NUMERO PATIENT

RECHERCHE SPECIFIQUES

Pneumocystis jiroveci

Levures/filaments mycéliens

Toxoplasmes

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES

• **Immunodépression** : oui non

Greffe d'organes : _____

Patient HIV+ si oui taux de CD4+ : _____/mm³

Onco/hémato : _____

Autres : _____

• **Images radiologiques** : _____

• **Signes cliniques** :

Fièvre : oui, préciser : _____°C non

Autres : _____

TRAITEMENTS ANTIFONGIQUES :

Non

Oui : préciser : _____

PROPHYLAXIE BACTRIM :

Non

Oui : préciser : _____

Annexe 2 : Technique de coloration de Musto (Gomori Grocott modifié)

Extrait du GBEA du laboratoire de Parasitologie du C.H.U de Nantes (1h30).

REACTIFS

Méthenamine à 3% 125 mL
Nitrate d'argent à 3% 5 mL

} Solution A

Solution A 125 mL
Borate à 5% 10 mL
Eau distillée 125 mL
DMSO 75 mL

} Solution B

Acide chromique à 5%
Bisulfite de sodium à 1%
Chlorure d'or à 0,2 %
Thiosulfate de sodium à 2%
Vert lumière à 1%
(+10 gouttes d'acide acétique glacial pour 200 ml)

} Conservation 3 semaines à l'abri de la lumière, à température ambiante

Xylol, alcool 95°, alcool absolu, liquide d'Eukitt

MODE OPERATOIRE

1 Fixer les lames au minimum 45 min dans l'alcool absolu.

2 Fixer les lames 1 min dans l'acide chromique à 5%, préalablement chauffé à 65°C. Rincer 2 fois à l'eau distillée, puis 1 min dans le bisulfite de sodium. Rincer à l'eau distillée.

3 Imprégnation argentique

Plonger les lames dans la solution B. Chauffer rapidement pendant 3 minutes jusqu'à 90-95°C. Rincer 3 fois à l'eau distillée.

Puis, plonger les lames successivement dans les solutions suivantes :

-Chlorure d'Or à 0,2 % pendant 1 min. Rincer à l'eau distillée.

-Thiosulfite de sodium pendant 1 min. Rincer à l'eau distillée.

-Contre coloration au vert lumière pendant 1 min. Rincer à l'eau pendant 2 min.

4 Déshydratation

Passer les lames quelques secondes dans l'alcool à 95° puis, dans l'alcool absolu.

Plonger les lames dans le xylol et monter les lames en liquide d'Eukitt®.

5 Lecture à l'objectif 40.

Annexe 3 : Technique de coloration May-Grünwald-Giemsa

Extrait du GBEA du laboratoire de Parasitologie du C.H.U de Nantes (20 min).

REACTIFS

May Grünwald (bleu de méthylène-éosine)

Giemsa dilué au 1/20 dans l'eau distillée tamponnée

Eau distillée tamponnée (pH = 7,2)

MODE OPERATOIRE

1-Déposer 500 µl de May Grünwald sur chaque lame pendant 3 minutes et couvrir pour éviter l'évaporation.

2-Déposer 500 µl d'eau tamponnée et laisser incuber 3 minutes.

3-Recouvrir de Giemsa dilué et laisser incuber 20 minutes.

4-Rejeter le colorant et rincer à l'eau distillée et sécher.

5-Lecture des lames à l'objectif x40.

Annexe 4 : Technique de coloration au bleu de toluidine

Extrait du GBEA du laboratoire de Biologie de Saint-Nazaire.

REACTIFS

Acide acétique 30 mL	}	Réactif de sulfatation
H ₂ SO ₄ pur 10 mL		
Bleu de toluidine 300 mg	}	Solution de bleu de toluidine O Conservation 1 an à l'obscurité
Eau distillée 60 mL		
HCl 10 N 2 mL		
Ethanol 95° 140 mL		

Méthanol, éthanol à 95°

MODE OPERATOIRE

- 1- Réaliser des lames par cytocentrifugation de LBA.
- 2- Fixation : immerger les lames 1 min dans du méthanol.
- 3- Coloration :
Plonger les lames dans la solution de sulfatation pendant 10 min.
Rincer dans un bain d'eau du robinet pendant 10 min.
Immerger les lames dans la solution de bleu de toluidine pendant 15 min.
Rincer sous un jet d'eau du robinet.
- 4- *Décoloration* :
Passer la lame sous un jet bref d'éthanol à 95°.
Sécher tout de suite dans un courant d'air chaud.
- 5- Lecture à l'immersion à l'objectif 10 (repérage) et à l'objectif 100 (observation).

Annexe 5 : Extraction de l'ADN de LBA

Kit NucleoSpin[®] Tissue, Macherey Nagel

1- Préparation de l'échantillon de LBA

Centrifuger les LBA 10 minutes à 3000 tours. Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 200 µL de surnageant. Homogénéiser à l'aide d'une pipette par aspirations et refoulements successifs. Transférer 200 µL dans un tube Eppendorf.

2- Pré-lyse

Ajouter 180 µL de solution tampon et 25 µL de protéinase K. Vortexer.

Incuber à 56°C pendant 5 minutes. Vortexer de nouveau.

3- Lyse

Ajouter 200 µL de tampon B3. Vortexer vigoureusement.

Incuber à 70°C pendant 10 minutes.

4- Précipitation par l'éthanol

Ajouter 210 µL d'éthanol.

Vortexer vigoureusement.

5- Transférer dans une colonne

Transférer chaque échantillon dans une colonne préalablement placée sur un tube collecteur.

Centrifuger à 8000 tours pendant 1 minute.

6-Lavages

Ajouter 500 µL de tampon BW. Centrifuger à 8000 tours pendant 1 minute.

Jeter le tube collecteur et en prendre un nouveau.

Ajouter 600 µL de B5. Centrifuger à 8000 tours pendant 1 minute.

Jeter le tube collecteur et en prendre un nouveau.

7- Sécher la membrane de silice

Centrifuger pendant 1 minute à 8000 tours.

8-Eluer l'ADN

Transférer la colonne dans un tube Eppendorf.

Ajouter 100 µL de tampon BE préalablement chauffé à 70°C pendant 5 minutes.

Attendre 1 minute à température ambiante.

Centrifuger 1 minute à 8000 tours.

Récupérer l'ADN.

Annexe 6 : Position des amorces et de la sonde utilisées dans la PCR *Pneumocystis*

PJ sens-PJ anti sens : **81 pb**, région mt LSUrRNA

PJ sens : CTAAAATAAATAATCAGACTATGTGCGATAAG 33 pb

PJ anti : GGAGCTTTAATTACTGTTCTGGGC 24 pb

Sonde PJ : *FAM* TAGATAGTCGAAAGGGAAAC *MGB* 20 pb

>gi|1839288|gb|S79766.1| **rRNA large subunit** [*Pneumocystis carinii*, host=human, HIV+ *Pneumocystis* pneumonia patient, bronchoalveolar lavage fluid, Mitochondrial, 300 nt]
TTGTGGTAAGTAGTGAAATACAAATCGGACTAGGATATAGCTGGTTTTCTGCGAA
AATTGTTTTGGCAAATTGTTTATTCCTCTAAAAATAGTAGGTATAGCACTGAATA
TCTCGAGGGAGTATGAAAATATTTATCTCAGATATTTAATCTCAAATAACTATTT
CTAAAATAAATAATCAGACTATGTGCGATAAG**G****TAGATAGTCGAAAGGGAAA**
C**AGCCCAGAACAGTAATTAAGCTCC**CAAATTAATATTAAGTGAAATAAAAGTT
GTTGGA TATCTAAAACAGTTAAGAAG

Annexe 7 : Procédure de clonage pGEM[®]-T easy.

Réalisation du produit de PCR à amplifier

Réaliser une PCR en temps réel *Pneumocystis* à partir d'un extrait d'ADN provenant d'un LBA positif pour la recherche de *P. jiroveci*. La composition du mix utilisée est présentée en annexe 11.

Amplification d'un fragment de 81 pb.

Vérifier la pureté du produit de PCR sur un gel de polyacrylamide à 9% (annexe10).

Etape de ligation

Homogénéiser la suspension contenant le plasmide pGEM[®]-T.

Préparer le mix de ligation :

- 2X Rapid ligation buffer 5 µL
- pGEM[®]-T 1 µL
- Produits de PCR 1 µL
- T4 DNA ligase 1 µL
- Eau distillée qsp 10µL

Homogénéiser et incuber 1 heure à température ambiante.

Etape de transformation

Préparer les milieux LB/agar/IPTG/X-Gal

Pour 50 mL de milieu (2 boîtes), mélanger dans un tube Falcon :

- Ampicilline 50 µL
- IPTG 250 µL
- X-Gal 80 µL
- LB/agar qsp 50 mL

Couler les milieux et laisser refroidir.

Préparer un bain de glace avec de l'eau pour assurer une meilleure homogénéité de température et y déposer le tube eppendorf dans lequel se fera la transformation.

Sortir la souche JM 109 (maintenue à -80°C) et déposer dans de la glace. Déboucher légèrement le tube. Laisser décongeler les cellules.

Déposer 50 μ L de cellules JM 109 dans un tube Eppendorf et 5 μ L du mélange de ligation.

Laisser en contact 20 min sur la glace.

Faire un choc thermique en déposant le tube dans un bain marie à 42°C exactement pendant 45 à 50 sec.

Replacer immédiatement dans la glace et laisser 2 min.

Incuber 1 h à 37°C sous agitation.

Mise en culture sur LB agar / ampicilline/IPTG/X-Gal

Plater 100 μ L par boîte, faire sécher.

Incuber à 37°C toute la nuit.

Principe de la sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide contenant l'insert

- Le plasmide contient un **gène de résistance à l'ampicilline**. Seules les bactéries ayant intégré le plasmide sont capables de pousser sur le milieu contenant l'ampicilline.
- Le plasmide contient aussi le **gène de la β -galactosidase**. Lorsque le plasmide intègre l'insert, celui-ci clive le gène de la β -galactosidase, le rendant non fonctionnel. Le but est donc de repérer les bactéries dépourvues d'activité β -galactosidase. Pour cela, le milieu de culture contient 2 réactifs qui permettent la mise en évidence de la présence ou non d'une activité β galactosidase : l'IPTG, qui induit l'expression de la β -galactosidase et le X-Gal, qui est un substrat de cette enzyme. Les bactéries ne contenant pas l'insert ont un gène β -galactosidase fonctionnel. Elles vont donc hydrolyser le X-Gal incolore en produit coloré bleu. Les bactéries ayant intégré l'insert, n'ont pas d'activité β -galactosidase. Elles ne peuvent pas hydrolyser le X-Gal et restent donc blanches.

Une bactérie blanche est donc sélectionnée et repiquée de façon à obtenir une culture pure d'un seul clone bactérien.

Vérification de clones par PCR M13

Remplir une plaque de 96 puits au nombre de colonies à tester par 300 µL de LB + ampicilline (1 µl d'ampicilline pour 1 mL de LB).

A l'aide d'un cône, reprendre une colonie et la triturer dans un Eppendorf, avant de le déposer dans un puits de la plaque.

Préparer le mix de PCR (figure 18) et déposer directement dans l'Eppendorf.

Primer M13

M13F TGT AAA ACG ACG GCC AGT

M13R CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Nombre de tubes : 1			
	Concentration initiale		Concentration finale
TAMPON 10X	10X	5	1 X
MgCL₂ 25mM	25 mM	4	2 mM
M13F	20 mM	1,25	0,5 µM
M13R	20 mM	1,25	0,5 µM
dNTP ATCG	5 mM	2	0,2 mM
Taq Promega	5 U/mL	0,3	0,03 U/mL
eau		35,2	

Extrait DNA/tube		1
volume final/tube		50

Figure 18 : Composition du mix pour la PCR M13.

Lancer la PCR selon le programme suivant :

Programme de la PCR	
1 cycle :	Dénaturation 94°C, 2min
35 cycles	Dénaturation 94°C, 1 min
	Hybridation 60°C, 1 min
	Elongation 72°C, 30 sec
1 cycle	Extension 72°C, 4 min

Conserver la microplaque de 96 puits à 37°C. Celle-ci contient les éventuels clones qui seront repris par la suite si la PCR révèle la présence de l'insert.

Révéler la PCR sur gel de polyacrylamide à 9%.

Vérifier la taille du produit d'amplification 314 pb (81 + 233) (Plasmide vide =233 pb).

Extraction du plasmide (cf annexe 8)

Séquençage

Vérifier l'absence de mutation dans l'insert par comparaison à la séquence de référence (81 pb) de *P. jiroveci* :

CTT AAA ATA AAT AAT CAG ACT ATG TGC GAT AAG GTA GAT AGT CGA AAG GGA AAC AGC CCA GAA CAG TAA TTA AAG CTC CCA

Annexe 8 : Procédure d'extraction du plasmide

Kit NucleoSpin plasmid[®] Macherey Nagel

-Préparation de l'échantillon à extraire

Repiquer les bactéries contenant les plasmides dans 10 mL de LB + 10 µL d'ampicilline à 100 mg/mL dans des tubes Falcon pour obtenir une solution saturée de *E. coli*.

Reprendre 1 à 5 mL de culture de LB saturée *E. coli*.

Centrifuger 30 sec à 11 000 g. Eliminer le surnageant.

-Lyse

Ajouter 250 µL de Buffer A1. Vortexer vigoureusement.

Ajouter 250 µL de Buffer A2. Mélanger par retournement 6 à 8 fois.

Incuber à température ambiante 5 min.

Ajouter 300 µL de Buffer A3. Mélanger par retournement 6 à 8 fois.

Centrifuger 5 min à 11 000 g à température ambiante.

-Lavage

Transvaser avec précaution le surnageant dans une colonne.

Centrifuger 1 min à 11 000 g. Eliminer le surnageant.

Ajouter 500 µL de Buffer AW préalablement chauffé à 50°C.

Centrifuger 1 min à 11 000 g. Eliminer le surnageant.

-Sécher la colonne

Placer la colonne sur un tube vide.

Centrifuger 2 min à 11 000 g.

-Eluer l'ADN

Placer la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 mL.

Ajouter 50 µL de buffer AE.

Incuber 1 min à température ambiante.

Centrifuger 1 min à 11 000 g.

Récupérer l'ADN.

Annexe 9 : Technique d'immunofluorescence

Kit , Monofluo[®] Biorad.

1-Centrifuger les échantillons 15 minutes à 3000 g et laver le culot une ou deux fois avec de l'eau distillée. Remettre le culot final en suspension dans une petite quantité d'eau distillée et vortexer.

2-Etaler 10-20 µL d'échantillon sur la totalité de la surface d'un puits d'une lame pour échantillons patients. Evaporer jusqu'à dessiccation à 37°C.

3-Fixer les échantillons en les recouvrant d'une ou deux gouttes d'acétone. Laisser évaporer à température ambiante. Sécher les lames à l'air libre.

4-Diluer l'enzyme constituée au 1/10 dans le diluant. Recouvrir les lames échantillons et les lames contrôles positifs avec 20 µL d'enzyme diluée.

5-Incuber les lames pendant 30 minutes exactement dans une chambre humide à 37°C.

Rincer les lames à l'eau distillée. Eponger l'excès de liquide et sécher les lames à l'air libre.

6-Ajouter 15 µl d'anticorps anti-*P. jiroveci* sur les puits. Incuber dans une chambre humide 15 minutes à 37°C.

7-Rincer les puits, éponger et sécher à l'air.

8-Ajouter 15µL d'anticorps anti-souris conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine. Incuber dans une chambre humide pendant 15 minutes à 37°C.

9-Déposer une goutte du milieu de montage sur chaque puits et recouvrir d'une lamelle. Retourner la lame sur un papier absorbant et presser doucement pour éliminer l'excès de milieu de montage et les bulles d'air.

10-Lecture avec un microscope à fluorescence. Les kystes apparaissent de couleur vert pomme, plus ou moins brillants. Ils peuvent être marqués de manière uniforme ou irrégulière. Les débris cellulaires et d'autres matières peuvent avoir été contre-colorés par le bleu d'Evans et donner une fluorescence rouge.

Annexe 10 : Gel pour électrophorèse des produits de PCR

La visualisation des produits d'amplification obtenus par PCR se fait grâce à :

- L'électrophorèse des produits d'amplification dans un gel de polyacrylamide à 9 % (120 volts pendant 1h15)
- La visualisation sous lampe UV après avoir laissé tremper les gels dans une solution de BET (5-10min).

1. Tampon utilisé pour l'électrophorèse, et la fabrication du gel = TBE 10X

TBE 10X	[Tris Base	54 g
	Acide Borique	27,5 g
	EDTA	4,65 g
	H ₂ O distillée	qsp 1 L

2. Solution pour gel de polyacrylamide à 9% :

Solution Acrylamide bisacryl 37,5/1 9%	[Acrylamide 37,5/1 40%	112 mL
	TBE 10X	50 mL
	Eau distillée	qsp 500ml

3. Gel de polyacrylamide à 9%

Pour un gel (1 plaque)	[Acrylamide bis acryl 37,1/1 9%	10 mL
	Ammonium persulfate	100 µL
	TEMED	10 µL

Laisser polymériser 15 minutes

⇒ **Procédure :**

Préparer les deux plaques de verre avec les espaceurs et placer deux pinces à ce niveau.

Dans un tube de 10mL (bouchon rouge) mélanger :

10 mL d'acrylamide + 100 µL de persulfate + 10 µL de Temed

Agiter par retournement.

Couler les gels entre 2 plaques de verre et placer le peigne permettant de créer les puits pour les dépôts. Garder la fin du tube comme témoin de polymérisation.

Attention aux bulles !

Attendre la polymérisation des gels.

Placer le gel avec les plaques d'un côté de la cuve de migration, fixer avec deux pinces.

Mettre en face une plaque seule plus pinces.

TBE 1X au centre et en bas de la cuve. Enlever le peigne.

Sur un film de Parafilm® faire 8 dépôts de tampon de chargement de 2 µL.

Déposer dans le 1^{er} puits le marqueur V.

Déposer les échantillons dans les puits : **6 µl de produit de PCR mélangé au tampon de chargement.**

Faire migrer à 120 volts jusqu'en bas du gel (environ 1h).

Placer les gels dans une solution de bromure d'ethidium pendant 15 minutes (révélation).

Visualisation sous lumière UV.

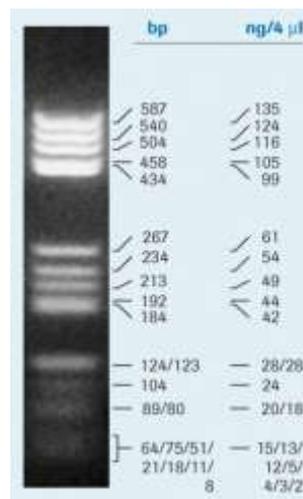


Figure 19 : Marqueur de poids moléculaire V de 8 à 587 pb. Roche®

Annexe 11 : PCR en temps réel *Pneumocystis jiroveci*

Préparation du mix

Calcul des volumes
et concentration

Nombre de tubes :	10
-------------------	----

MIX DETECTION + IPC	concentration initiale		concentration finale		1 tube
TAMPON 10X	10 X	25	1 X	2,5	2,5
MgCL2 25mM	25 mM	60	6 mM	6	6
UDG	1 U	2,5	0,01 U	0,25	0,25
sens	10 µM	12,5	0,5 µM	1,25	1,25
anti sens	10 µM	12,5	0,5 µM	1,25	1,25
sonde	10 µM	5	0,2 µM	0,5	0,5
IPC Mix (primers et sonde)	10 X	25	1 X	2,5	2,5
IPC DNA50X Applied	50 X	2,5	0,5 X	0,25	0,25
dNTP AUCG Eurogentec	5 mM	10	0,2 mM	1	1
Taq GOLD	5 U	1	0,02 U	0,1	0,1
eau		44		4,4	4,4
				total =	20

Extrait DNA/tube		5	50
volume final/tube		25	250

Annexe 12 : Résultats des 201 LBA

Références patients :

Un numéro allant de 1 à 189 a été attribué à chaque patient.

Pour les patients ayant eu plusieurs LBA, les numéros sont suivis d'une lettre.

Pathologies sous jacentes :

- Patients VIH+.
- Patients immunodéprimés.
- Patients non immunodéprimés, d'après les renseignements disponibles.

Signes cliniques :

Seuls les 3 signes cliniques habituellement retrouvés dans la pneumocystose sont mentionnés:

T : Toux

F : Fièvre

D : Dyspnée

0 : Absence de toux de dyspnée et de fièvre

Références patients	Date du LBA	Sexe	Age	Pathologies sous jacentes	Signes cliniques	Imagerie	Immuno supresseur	CD4 (mm ³)	Autres germes retrouvés dans le LBA	Grocott (<i>P. j</i>)	PCR <i>P. j</i> triplicate	Quantification copies / réaction
1	07/12/06	M	37	VIH+	F, D	Discret syndrome interstitiel bilatéral	non	18	<i>C. albicans</i>	Pos	PPP	879 533
2	11/12/06	M	67	/	F, D	Opacité lobe inférieur gauche	non	123	0	Neg	NNN	
3	11/12/06	M	57	/	nr	nr	non	nr	0	Neg	NNN	
4	12/12/06	M	61	Lymphome B de haut grade + LLC	F	Opacités lobe inférieur droit et lobe supérieur droit	oui	503	<i>E. faecium, C. albicans, C. krusei</i>	Neg	NNN	
5	13/12/06	M	50	LAM	/	Opacités excavées lobe supérieur droit	non	154	0	Neg	NNN	
6	13/12/06	M	32	Drépanocytose hétérozygote	F, D, T	Doute sur opacités interstitielles + péricardite	non	nr	0	Neg	NNN	
7a	14/12/06	F	45	Transplantation pulmonaire	nr	Opacités en verre dépoli	oui	nr	<i>P. vulgaris</i>	Neg	NNN	
7b	13/03/07	F	45	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
7c	19/04/07	F	45	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
8	14/12/06	F	29	Transplantation pulmonaire	0	Epanchement pleural base droite	oui	nr	<i>C. glabrata</i>	Neg	NNN	
9	14/12/06	M	44	/	F, D	Syndrome interstitiel	non	nr	0	Neg	NNN	
10	14/12/06	M	84	Greffe rénale	D	Syndrome interstitiel bilatéral, plage de fibrose et verre dépoli	oui	nr	<i>C. krusei</i>	Neg	PPP	376
11	14/12/06	F	62	Myélodysplasie	F, T	Syndrome interstitiel	non	179	0	Neg	NNN	
12	15/12/06	M	67	Greffe rénale	F,D	Syndrome alvéolaire droit	oui	658	0	Neg	NNN	
13a	18/12/06	M	77	Myélodysplasie	F,D, T	Syndrome interstitiel bilatéral	non	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	PPP	122
13b	28/03/07	M	77	Myélodysplasie	F	Infiltrat lobe supérieur droit	non	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
14	18/12/06	F	59	Thrombocytémie essentielle	T	Aspect bronchiolite	non	394	0	Neg	NNN	
15	19/12/06	M	59	Cancer pulmonaire	F	Nodule axillaire gauche	non	nr	<i>S. pneumoniae</i>	Neg	NNN	
16a	20/12/06	M	21	Transplantation pulmonaire	0	nr	oui	nr	<i>P. aeruginosus, A. xyloxydans, C. albicans</i>	Neg	NNN	
16b	02/05/07	M	21	Transplantation pulmonaire	nr	Pneumopathie bilatérale	oui	nr	<i>A. xyloxydans</i>	Neg	NNN	
17	21/12/06	M	43	Myélome multiple	T	Syndrome interstitiel	oui	166	<i>S. pneumoniae, Adenovirus, C. glabrata</i>	Neg	PNN	PNQ
18	22/12/06	M	60	/	D	Epanchement pleural droit	non	nr	0	Neg	NNN	
19	22/12/06	M	75	/	D, T	Aspect bronchiolite	non	nr	<i>B. catharralis</i>	Neg	NNN	

20	26/12/06	M	77	Cancer pulmonaire	F, D	Syndrome alvéolo-interstitiel	oui	nr	<i>P. aeruginosas, C. kefyr, A. fumigatus</i>	Neg	NNN	
21	28/12/06	M	70	Greffe rénale	F, D	Syndrome alvéolo interstitiel bilatéral	oui	nr	0	Neg	PPP	6734
22	29/12/06	F	34	/	F, D, T	Opacité lobe inférieur gauche	non	566	0	Neg	NNN	
23	29/12/06	F	58	Greffe rénale	F, D, T	Opacités interstitielles droites	oui	nr	<i>Rhizomucor</i>	Neg	PPN	PNQ
24	27/12/06	F	44	LAM + LED	F	nr	oui	nr	0	Neg	PNN	PNQ
25	03/01/07	M	70	/	D	nr	non	nr	<i>C. albicans, C. glabrata</i>	Neg	NNN	
26	04/01/07	M	57	VIIH+	D, T	nr	non	252	<i>B. catharralis</i>	Neg	NNN	
27	04/01/07	F	65	/	F	Opacité lobe gauche	non	nr	<i>Rhinovirus</i>	Neg	NNN	
28	05/01/07	M	41	Lymphome de Hodgkin	F	Opacité lobe supérieur gauche	oui	351	0	Neg	PPP	PNQ
29	05/01/07	M	41	Syndrome d'Evans	D, T	Syndrome interstitiel	oui	45	0	Neg	NNN	
30	05/01/07	M	72	LMMC	D	Syndrome interstitiel bilatéral	non	nr	<i>S. aureus</i>	Neg	PPP	155
31	09/01/07	F	60	/	F, T	Pneumopathie bilatérale + épanchement pleural	non	nr	0	Neg	PPP	PNQ
32	10/01/07	M	67	/	F	Opacité lobe droit	non	698	0	Neg	NNN	
33	11/01/07	F	38	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	<i>A. xyloxydans, C. albicans</i>	Neg	NNN	
34	11/01/07	M	62	DICV + Splénectomie	F, D, T	Syndrome interstitiel	non	834	<i>B.catharralis, CMV, HHV 6, A. fumigatus</i>	Neg	NNN	
35	12/01/07	M	41	IRA	F, D, T	Surcharge alvéolo-intertitielle bilatérale	oui	nr	0	Neg	NNN	
36	12/01/07	F	60	/	0	Syndrome syno-bronchique	non	nr	0	Neg	NNN	
37	12/01/07	F	77	PAR	F, D	Syndrome interstitiel bilatéral	oui	172	0	Pos	PPP	261 832
38	18/01/07	M	74	Waldenström	F, D, T	Opacité lobe gauche	non	nr	0	Neg	NNN	
39	23/01/07	M	45	Transplantation cardio-pulmonaire	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
40	23/01/07	F	63	Cancer du sein	F, D, T	Syndrome interstitiel bilatéral + plages de verre dépoli	oui	423	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
41	23/01/07	M	49	VIIH+	T	Pneumopathie	non	509	0	Neg	NNN	

42	24/01/07	F	44	Hépatite chronique active auto-immune	D	Syndrome interstitiel bilatéral + images en verre dépoli	non	334	0	Neg	PPN	PNQ
43	24/01/07	M	63	Sarcoïdose	D	Masses tissulaires bilatérales calcifiées + adénopathies	non	nr	0	Neg	PPP	49
44a	24/01/07	F	50	Lymphome B de haut grade	nr	Opacités arrondies lobe droit	oui	nr	0	Neg	NNN	
44b	03/04/07	F	50	Lymphome B de haut grade	F	Nodules pulmonaires	oui	nr	0	Neg	NNN	
45	24/01/07	M	39	Sarcoïdose	F	nr	non	nr	<i>A. baumannii</i>	Neg	NNN	
46	25/01/07	M	69	LA biphénotypique + PAR	F	Condensation périphérique pulmonaire avec comblement alvéolaire des bases	oui	nr	0	Neg	NNN	
47	26/01/07	F	57	Myélodysplasie + cancer ORL	F	Syndrome interstitiel bilatéral	oui	nr	0	Neg	NNN	
48	01/02/07	M	44	VIH+	T	Opacité lobe supérieur droit	non	34	0	Neg	NNN	
49	01/02/07	M	35	Transplantation cardio-pulmonaire	nr	Opacité excavée lobe supérieur droit	oui	nr	<i>P. aeruginosa</i>	Neg	NNN	
50	01/02/07	M	40	/	F	Hépatomégalie + adénopathie coéliquale	non	nr	0	Neg	PNN	PNQ
51	01/02/07	M	59	Transplantation cardiaque	F	Opacité diffuse basi-thoracique	oui	481	<i>P. vulgaris</i>	Neg	NNN	
52	02/02/07	M	26	Sarcome granulocyttaire	F, T	Syndrome interstitiel	non	nr	0	Neg	NNN	
53	05/02/07	M	50	Splénectomie	D	Atelectasie des lobes inférieurs	non	nr	0	Neg	NNN	
54	07/02/07	M	56	Greffé rein pancréas	0	Opacité excavée lobe droit	oui	nr	<i>E. coli</i>	Neg	NNN	
55	08/02/07	M	55	LAM 2	F	Opacités alvéolo-interstitielles bilatérales	oui	nr	0	Neg	PPP	43
56	09/02/07	M	65	Cancer pulmonaire	nr	Infiltrat péri-hilaire gauche et opacités juxta pleurales apicales	non	769	0	Neg	PPP	78
57	09/02/07	F	35	/	D, T	Images en verre dépoli	non	nr	0	Neg	NNN	
58	13/02/07	M	49	Splénomégalie myéloïde	D, T	nr	oui	436	<i>Fusarium sp C. albicans</i>	Neg	NNN	
59	14/02/07	F	78	Polyangéite microscopique	T	Syndrome interstitiel et plages de verre dépoli	oui	nr	0	Neg	PNN	PNQ
60	14/02/07	M	44	VIH+	F,D	Infiltrat alvéolaire droit	non	7	<i>M. tuberculosis</i>	Neg	PNN	PNQ
61	14/02/07	F	78	/	F, T	Syndrome alvéolo-interstitiel	non	nr	0	Neg	PNN	PNQ
62	16/02/07	M	57	LMMC	nr	nr	oui	83	0	Neg	NNN	

63	16/02/07	M	56	Spondylarthrite ankylosante	F, D, T	Syndrome interstitiel + atélectasie	oui	nr	0	Neg	PPP	9 398
64	19/02/07	F	37	Sarcoïdose	D	Plages de verre dépoli	non	nr	0	Neg	NNN	
65	23/02/07	M	45	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
66	26/02/07	F	78	/	0	Syndrome interstitiel + adénopathies médiastinales	non	nr	0	Neg	PNN	PNQ
67	28/02/07	M	64	Grefe rénale	F,D,T	Images alvéolaires localisées aux 2 bases	oui	nr	<i>C. glabrata</i>	Neg	PPP	336
68	02/03/07	F	67	LNH	T	Syndrome interstitiel des sommets	0	nr	<i>S. marcescens, C. albicans, A. fumigatus</i>	Neg	NNN	
69	02/03/07	F	60	/	nr	Pneumopathie	non	nr	Streptocoque alpha hémolytique, <i>A. fumigatus</i>	Neg	NNN	
70	02/03/07	M	45	VIH+	F, T	Syndrome interstitiel bilatéral	non	18	<i>S. aureus</i> CMV	Pos	PPP	941 242
71	07/03/07	M	63	Cancer pulmonaire	F, D	Opacités interstitielles bilatérales	non	nr	<i>S. aureus, C. glabrata</i>	Neg	NNN	
72a	08/03/07	F	46	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
72b	15/03/07	F	46	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
73	09/03/07	M	76	Waldenström	nr	Pleuro-pneumopathie bilatérale	non	nr	<i>C. glabrata</i>	Neg	NNN	
74a	09/03/07	M	63	Lymphome B de haut grade	F, D	Atélectasie en bande	oui	nr	0	Neg	NNN	
74b	01/05/07	M	63	Lymphome B de haut grade	F, D	Epanchement pleurale bilatéral + atélectasie	oui	nr	<i>C. albicans</i> , PCR toxoplasme +	Neg	NNN	
75	14/03/07	M	43	VIH+	F	Syndrome interstitiel bilatéral	non	563	0	Neg	NNN	
76	15/03/07	M	42	Grefe rénale	0	Opacités en verre dépoli lobe droit	oui	nr	0	Neg	NNN	
77	15/03/07	M	25	/	/	Poumon gauche blanc	non	nr	<i>S. aureus</i>	Neg	NNN	
78	15/03/07	M	31	LAL	F	nr	oui	nr	<i>C. lusitaniae, Trichosporon asahii</i>	Neg	NNN	
79	15/03/07	M	42	LAM 3	F, D, T	Pneumopathie base droite	oui	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
80	15/03/07	F	71	PAR	F, D, T	Syndrome interstitiel	oui	893	<i>H. influenzae</i>	Neg	NNN	
81	15/03/07	M	49	/	nr	nr	non	nr	<i>P. aeruginosa, C. famata, Trichosporon asahii</i>	Neg	NNN	
82	16/03/07	M	61	Myélome multiple	F, T	Image sommet gauche	oui	309	0	Neg	NNN	

83	16/03/07	M	44	Carcinome neuro-endocrine	D	Masse tumorale médiastinale	non	nr	0	Neg	NNN	
84	19/03/07	M	61	/	F, D, T	Distension thoracique	non	nr	<i>A. fumigatus</i>	Neg	NNN	
85	20/03/07	F	79	Fibrose pulmonaire idiopathique	D, T	Opacités micronodulaires diffuses	non	nr	<i>S. aureus</i>	Neg	NNN	
86	20/03/07	F	66	LMMC	F, D	Epanchements pleuraux bilatéraux + atélectasie	non	nr	0	Neg	NNN	
87	20/03/07	M	35	Transplantation cardio-pulmonaire	nr	nr	oui	nr	<i>Rhinovirus, P. aeruginosa, C. albicans</i>	Neg	NNN	
88	23/03/07	M	42	VIH+	nr	Syndrome interstitiel	non	131	0	Neg	NNN	
89	26/03/07	M	44	VIH+	D,T	Nodule avec halot en verre dépoli	non	139	<i>M. xenopi</i>	Neg	NNN	
90	27/03/07	F	33	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	<i>P. aeruginosa, C. glabrata</i>	Neg	NNN	
91	27/03/07	M	55	Tuberculose ancienne	D,T	Miliaire + bronchiolite en verre dépoli	non	nr	0	Neg	NNN	
92	28/03/07	M	40	LLC	F	Pneumopathie	oui	nr	0	Neg	PPP	PNQ
93	28/03/07	M	27	Sarcoïdose	nr	Infiltrat interstitiel base gauche	non	nr	0	Neg	NNN	
94	28/03/07	F	75	PAR	F, D, T	Syndrome alvéolo-interstitiel bilatéral + opacités en verre dépoli	oui	nr	<i>P. aeruginosa, C. albicans</i>	Neg	PPP	234
95	29/03/07	M	80	LLC	D, T	Opacités interstitielles bilatérales	non	nr	0	Neg	NNN	
96	29/03/07	F	38	DDB	F, D, T	Images micro-nodulaires	oui	569	<i>S. pneumoniae</i>	Neg	NNN	
97	29/03/07	F	42	VIH+ co-infection VHC	D,T	Pneumopathie	non	1	<i>H. influenzae</i>	Neg	PPN	PNQ
98	30/03/07	M	48	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	<i>S. aureus, S. pneumoniae</i>	Neg	NNN	
99	30/03/07	F	70	Waldenström	F,	Syndrome interstitiel	oui	nr	0	Neg	NNN	
100	30/03/07	M	41	/	F, D, T	Syndrome alvéolaire gauche	non	nr	<i>C. albicans, C. krusei</i>	Neg	NNN	
101	30/03/07	M	40	Cancer pulmonaire	D, T	Infiltrats lobe base droit	non	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
102	03/04/07	M	70	Cancer pulmonaire	T	Images en verre dépoli bilatérales	oui	nr	0	Neg	PPP	156

103	04/04/07	F	44	/	D	Syndrome alvéolo-interstitiel bilatéral + épanchement pleural droit	non	nr	<i>C. kefyri</i>	Neg	NNN	
104	03/04/07	F	71	Insuffisance surrénalienne	F,D	Pneumopathie bilatérale	oui	nr	<i>S. aureus + S. pneumoniae, C. albicans</i>	Neg	PPN	PNQ
105	04/04/07	M	26	Neutropénie constitutionnelle	0	Opacités en verre dépoli	non	nr	<i>P. aeruginosa</i>	Neg	NNN	
106	05/04/07	F	80	PAR	D,T	Opacités alvéolo-interstitielles bilatérales	oui	nr	0	Neg	NNN	
107	05/04/07	F	62	Myélome multiple	F, D	Opacité de base gauche	oui	nr	HSV1	Neg	PPP	1170
108	06/04/07	M	58	VIH+, Burkitt	F, D, T	Syndrome interstitiel bilatéral	non	373	<i>B. catharralis</i>	Pos	PPP	13213
109a	06/04/07	F	52	Cancer pulmonaire et rénal	F	nr		nr	<i>K. oxytoca</i>	Neg	NNN	
109b	27/04/07	F	52	Cancer pulmonaire et rénal	nr	nr		nr	0	Neg	NNN	
110	10/04/07	F	46	/	T	Micronodules bilatéraux	non	nr	0	Neg	NNN	
111	10/04/07	F	25	Sarcoïdose	T	Nodules pulmonaires disséminés	non	nr	<i>P. aeruginosa</i>	Neg	NNN	
112	11/04/07	M	72	Cancer oesophagien	nr	Syndrome interstitiel		nr	0	Neg	NNN	
113a	11/04/07	M	60	LMMC	F, D, T	Opacités alvéolo-interstitielles bilatérales	non	20	0	Neg	PPP	78
113b	20/04/07	M	60	LMMC	nr	nr	non	40	0	Neg	NNN	
114	11/04/07	F	59	LAM 2 + cancer du sein	F	Nodule pulmonaire droit	oui	nr	0	Neg	NNN	
115	12/04/07	F	81	Hépatite C	T	Syndrome interstitiel	oui	nr	0	Neg	NNN	
116	12/04/07	F	30	Sarcoïdose	0	Syndrome interstitiel + adénopathies	non	443	0	Neg	PPP	170
117	13/04/07	M	60	Lymphome cérébral	D,T	Syndrome interstitiel bilatéral + plages en verre dépoli	oui	nr	0	Neg	PPP	650
118	13/04/07	M	61	Cancer vésical	0	Nodules multiples	non	nr	0	Neg	NNN	
119	13/04/07	M	49	/	F, D, T	Infiltrat sommet droit	non	nr	0	Neg	NNN	
120	17/04/07	M	26	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	<i>C. glabrata</i>	Neg	NNN	
121	17/04/07	F	17	/	F, T	Image d'abcès pulmonaire base droite	non	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
122	17/04/07	M	25	/	nr	Opacités bilatérales en verre dépoli	non	nr	0	Neg	NNN	

123	18/04/07	F	42	Transplantation cardio-pulmonaire	D	nr	oui	nr	<i>P. aeruginosa, A. xylosoxidans S. maltophilia</i>	Neg	NNN	
124	18/04/07	M	60	Cancer ORL	D	Condensation alvéolo-interstitielles bilatérales	oui	nr	<i>P. oralis</i>	Neg	NNN	
125	19/04/07	F	61	Lymphome B de haut grade	F,D	Pneumopathie	oui	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
126	19/04/07	M	58	Lymphome folliculaire	F	Syndrome interstitiel	oui	106	<i>Echovirus 11</i>	Neg	NNN	
127	20/04/07	M	42	Lymphome T périphérique + Crohn	F	Normal	oui	nr	<i>A. flavus</i>	Neg	NNN	
128	20/04/07	F	31	Transplantation cardio-pulmonaire	nr	nr	oui	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
129	23/04/07	F	77	Cancer du sein + sclérodemie	F, D, T	Pneumopathie gauche	oui	nr	0	Neg	NNN	
130	24/04/07	M	27	Transplantation cardio-pulmonaire	nr	nr	oui	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
131	24/04/07	M	76	/	D	Syndrome interstitiel	oui	nr	0	Neg	NNN	
132	24/04/07	M	51	VIH+	T	Normal	non	396	0	Neg	NNN	
133	24/04/07	M	80	Cancer ORL	0	Opacité excavée lobe inférieur droit	non	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
134	24/04/07	M	50	Suspicion aspergillome	nr	Opacité lobe supérieur droit image en grelot	non	nr	0	Neg	NNN	
135	24/04/07	M	48	Wegener	nr	Syndrome interstitiel bilatéral	oui	254	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
136	24/04/07	M	66	Lymphome B de haut grade	F,D,T	Syndrome interstitiel bilatéral	non	161	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
137	25/04/07	M	52	Cancer ORL	0	Opacité lobe supérieur droit	nr	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
138	25/04/07	M	64	LAM 5	nr	Plage de verre dépoli lobe supérieur droit	non	nr	<i>A. niger, Penicillium</i>	Neg	NNN	
139	27/04/07	M	55	Myélome multiple	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
140	25/04/07	F	55	VIH+	D, F	Syndrome interstitiel bilatéral	non	6	0	pos	PPP	11 377 265
141	02/05/07	M	40	VIH+	F	Syndrome interstitiel	non	36	0	Neg	NNN	

142	04/05/07	M	61	Myélodysplasie + Splénomégalie myéloïde	F	Images nodulaires	oui	nr	0	Neg	PPP	464
143	04/05/07	F	29	Cancer du sein	F,D,T	Syndrome interstitiel bilatéral + images en verre dépoli	oui	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
144	04/05/07	M	76	nr	F, D	Syndrome interstitiel bilatéral	oui	350	0	Pos	PPP	106 500
145a	05/05/07	F	52	LLC allogreffée + LNH	F, D	Syndrome alvéolo-interstitiel bilatéral	oui	663	0	Neg	PPP	4130
145b	15/05/07	F	52	LLC allogreffée + LNH	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
145c	28/06/07	F	52	LLC allogreffée + LNH	nr	Syndrome interstitiel	oui	nr	0	Neg	NNN	
146	04/05/07	M	65	Greffé rénale + LNH B de haut grade	F, D	Opacités alvéolaires multiples + plages en verre dépoli	oui	892	<i>S. haemolyticus, C. albicans</i>	Neg	NNN	
147	09/05/07	M	58	/	nr	Images micro-nodulaires diffuses	non	nr	0	Neg	NNN	
148	09/05/07	M	38	Vascularite Churg et Strauss	nr	Atelectasie, Pleurésie base gauche	non	nr	0	Neg	NNN	
149	11/05/07	M	55	Splénectomie	F	Epanchement pleurale gauche	non	nr	0	Neg	NNN	
150	11/05/07	M	71	/	nr	nr	non	nr	<i>C. albicans</i>	Neg	NNN	
151	14/05/07	F	80	Cancer recto-sigmoïdien	F,D,T	Opacités alvéolaires multiples + plage de verre dépoli	non	nr	0	Neg	NNN	
152a	15/05/07	F	20	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
152b	23/05/07	F	20	Transplantation pulmonaire	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
153	15/05/07	M	51	LNH T	F, D	Infiltrat alvéolo-interstitiel bilatéral + verre dépoli	non	231	<i>C. krusei</i>	Neg	NNN	
154	15/05/07	M	63	Cancer rénal	F, D	Nodules + infiltrats interstitiels bilatéraux	oui	nr	0	Neg	PPP	238
155	21/05/07	M	34	VIH+	F,D,T	Syndrome alvéolo-interstitiel bilatéral	non	11	CMV	Pos	PPP	33 499 730

156	22/05/07	M	46	Transplantation cardio-pulmonaire	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
157	23/05/07	F	67	Polymyosite	F	Syndrome interstitiel bilatéral	non	202	0	Neg	PPP	228
158	26/05/07	F	79	Cancer du sein + LLC	F,D	Pneumopathie	oui	nr	<i>C. kefir</i>	Neg	PPP	PNQ
159	29/05/07	M	48	Transplantation pulmonaire	T	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
160	29/05/07	M	49	/	F	Nodules lobe droit	non	nr	<i>M. tuberculosis C. albicans</i>	Neg	NNN	
161	29/05/07	M	81	/	D	Syndrome interstitiel bilatéral	non	nr	0	Neg	NNN	
162	29/05/07	M	56	Cancer pulmonaire	F	Volumineuse masse lobe supérieur droit	non	nr	<i>C. koseri, C. tropicalis</i>	Neg	NNN	
163	29/05/07	M	69	Greffe rénale	F, D	Syndrome alvéolo-interstitiel bilatéral	oui	183	0	Pos	PPP	2 278 252
164	30/05/07	F	43	LED	F, T	Syndrome interstitiel bilatéral	oui	nr	0	Neg	NNN	
165	31/05/07	M	49	Thrombocytémie essentielle	F, T	Syndrome interstitiel bilatéral	oui	nr	0	Neg	NNN	
166	31/05/07	M	58	VIIH+	F,D,T	Opacité lobe droit	non	138	0	Neg	PPN	PNQ
167	01/06/07	M	76	Greffe rénale	nr	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
168	01/06/07	M	34	Spondylarthrite ankylosante	F	Opacités bilatérales	oui	nr	<i>H. influenzae</i>	Neg	PPN	PNQ
169	01/06/07	M	52	Cancer rénal	F, D, T	Plages en verre dépoli	oui	nr	0	Neg	PPP	PNQ
170	01/06/07	M	38	Transplantation cardio-pulmonaire	F, D	Opacité base gauche	oui	nr	<i>Adenovirus</i>	Neg	NNN	
171	01/06/07	F	41	LAM 1	F	Syndrome interstitiel	oui	nr	0	Neg	NNN	
172	02/06/07	F	52	/	D, T	Syndrome alvéolo-interstitiel + plages de verre dépoli	non	nr	0	Neg	NNN	
173	04/06/07	F	58	/	F	Foyer pulmonaire droit	non	nr	<i>P. aeruginosa E. aerogenes, C. parapsilosis</i>	Neg	NNN	
174	04/06/07	F	79	/	F	Pneumopathie	non	nr	<i>C. glabrata</i>	Neg	NNN	
175	05/06/07	F	76	Myélome multiple	F,T	Syndrome interstitiel bilatéral	oui	nr	<i>Parainfluenzae type 3, B. pertussis</i>	Neg	NNN	

176	06/06/07	F	70	/	T	Opacités labiles	non	nr	<i>M. avium</i>	Neg	NNN	
177	06/06/07	F	67	LAM 1	F	Opacité abcédée lobe supérieur droit	oui	nr	0	Neg	PPP	PNQ
178	06/06/07	M	56	/	F	Pneumopathie gauche	non	nr	<i>C. albicans, S. aureus</i>	Neg	NNN	
179	07/06/07	M	55	/	nr	nr	non	nr	0	Neg	NNN	
180	08/06/07	M	69	PAR	D	Syndrome bronchique diffus avec syndrome interstitiel discret	oui	nr	0	Neg	NNN	
181	08/06/07	M	51	Polymyosite fibrose pulmonaire	F	nr	oui	nr	0	Neg	NNN	
182	08/06/07	M	47	/	T	Normal	non	nr	0	Neg	NNN	
183	08/06/07	F	47	/	T	Nodules excavés	non	nr	0	Neg	NNN	
184	08/06/07	F	62	Lymphome du manteau	F	Syndrome alvéolo-interstitiel bilatéral	oui	63	<i>S. epidemidis, CMV</i>	Neg	NNN	
185	08/06/07	M	65	Carcinome épidermoïde verge	D, T	Syndrome alvéolaire bilatéral	oui	nr	0	Neg	NNN	
186	13/06/07	F	57	LED	F	Epanchement pleural	oui	237	<i>Nocardia nova</i>	Neg	NNN	
187	14/06/07	M	18	VIH+ Co-infection VHB	D	Syndrome interstitiel	non	1	0	Neg	NNN	
188	15/06/07	F	63	Cancer sein	F, D	Opacité diffuse poumon gauche	oui	212	0	Pos	PPP	30 (parasito) 17750 (bactério)
189	15/06/07	F	45	Cancer sein + LAM 5	F,D	Opacité diffuse gauche	oui	21	0	Neg	NNN	

Annexe 13 : Données cliniques des patients non VIH atteints de pneumocystose.

Réf. patients	Sexe	Age (années)	Pathologies sous jacentes	CD4+ (/mm3)	Immuno supresseurs	Prophylaxie anti- <i>P. j</i>	Durée des prodromes (jours)	Contexte clinique	Imagerie	Traitement de l'épisode	Evolution	Autres germes dans le LBA	PCR <i>P. j</i> Copies/réaction Log ₁₀ (Copies/réaction)
37	F	77	Polyarthrite rhumatoïde	172	GC + MTX	non	12	AEG, bronchite trainante malgré ATB dyspnée fébrile	Syndrome interstitiel bilatéral	Bactrim + GC + O ₂	Favorable	0	261 832 (5,42)
63	M	56	Spondylarthrite ankylosante	nr (470)*	GC + MTX	non	7	Dyspnée fébrile, toux sèche	Syndrome interstitiel bilatéral	ATB + Bactrim en prévention	Favorable, malgré dyspnée persistante	0	9398 (3,97)
144	M	76	nr	350	GC	non	nr	Dyspnée fébrile	Syndrome interstitiel bilatéral	Bactrim + GC + O ₂	Décès	0	106 500 (5,03)
163	M	65	Grefte rénale	183	Cellcept + GC	non	7	Dyspnée fébrile	Syndrome alvéolo-interstitiel bilatéral	Bactrim + GC + O ₂	Favorable	0	2 278 252 (6,36)
188	F	63	Cancer du sein	212	Chimiothérapie	non	5	Détresse respiratoire aiguë + fièvre	Opacité diffuse poumon gauche	Bactrim + GC + O ₂	Décès	0	17 750 (4,25)

P. j : *P. jiroveci*, GC : gluco-corticoïdes, O₂ : oxygénothérapie, MTX : méthotrexate, nr : non renseigné, ATB : Antibiothérapie large spectre (sauf Bactrim)

□ : Patient négatif à la coloration de Musto pour la recherche de *P. jiroveci*, mais positif en immunofluorescence directe.

* : Taux de lymphocytes sanguins (en l'absence de données sur les CD4+).

Annexe 14 : Données cliniques des patients VIH + atteints de pneumocystose.

Réf. patients	Sexe	Age (années)	Charge virale VIH (Log ₁₀)	CD4+ (/mm ³)	ATRV	Prophylaxie anti- <i>P. j</i>	Durée des prodromes (jours)	Contexte clinique	Imagerie	Traitement de l'épisode	Evolution	Autres germes dans le LBA	PCR <i>P. j</i> Copies/réaction Log ₁₀ (Copies/réaction)
1	M	37	5,3	18	non	non	30	Dyspnée fébrile d'aggravation progressive AEG + diarrhée	Discret syndrome interstitiel bilatéral	Bactrim + GC +O ₂	Favorable	<i>C. albicans</i>	879 533 (5,94)
70	M	45	6	18	non	non	15	Toux productive diarrhée fièvre + AEG	Discret syndrome interstitiel bilatéral	Bactrim	Favorable	<i>S. aureus</i> CMV	941 242 (5,97)
108	M	58	<1,6	373	oui	non	90	Dyspnée fébrile + toux sèche + AEG	Syndrome interstitiel bilatéral	Bactrim + GC+O ₂	Favorable	<i>B. catarrhalis</i>	13 213 (4,12)
140	F	55	5,6	6	non	non	10	Dyspnée fébrile d'aggravation progressive AEG candidose digestive	Syndrome interstitiel bilatéral	Bactrim + GC +O ₂	Favorable	0	11 377 265 (7,06)
155	M	34	6	11	non	non	15	Dyspnée fébrile + toux	Syndrome alvéolo-interstitiel bilatéral	Bactrim + GC +O ₂	Favorable	CMV	33 499 730 (7,53)

P. j : *P. jiroveci*, ATRV : anti-rétroviraux, GC : gluco-corticoïdes, O₂ : oxygénothérapie

Annexe 15 : Données cliniques des cas de pneumocystose probables

Réf. Patients	Sexe	Age (années)	Pathologies sous jacentes	Lymphocytes sanguins (/mm3)	CD4+ (/mm3)	Immuno suppresseur	Prophylaxie anti- <i>P. j</i>	Contexte clinique	Imagerie	Traitement de l'épisode	Evolution	Autres germes dans le LBA	PCR <i>P. j</i> Copies /réaction	Diagnostic retenu
10	M	84	Greffe rénale Carcinomes cutanés multiples	999	nr	Rapamune	non	AEG, dyspnée d'aggravation progressive	Syndrome interstitiel bilatéral plage de fibrose + aspect en verre dépoli	ATB + Bactrim arrêt Rapamune + GC + O2	Favorable	<i>C. krusei</i>	376	Pneumocystose ou pneumopathie médicamenteuse au Rapamune
13	M	77	Myélodysplasie	140	nr	non	non	Toux sèche dyspnée fébrile	Syndrome interstitiel bilatéral	ATB + Bactrim	Favorable	<i>C. albicans</i>	122	Pneumocystose ou pneumonie bactérienne
21	M	70	Greffe rénale	1280	nr	Rapamune	non	AEG, dyspnée fébrile d'aggravation progressive	Syndrome alvéolo- interstitiel bilatéral	ATB+ Bactrim + arrêt Rapamune + GC	Favorable	0	6734	Pneumocystose ou pneumopathie médicamenteuse au Rapamune
113	M	60	LMMC allogreffée	/	20	non	Aérosols Pentacarinat arrêtés il y a 2 mois	Dyspnée fébrile, toux sèche	Opacités alvéolo-interstitielles bilatérales + plages de verres dépolies	ATB+ATF+ Bactrim + GC	Lentement favorable	0	78	Pneumocystose ou pneumopathie médicamenteuse à la Cordarone
145	F	53	LLC allogreffée + LNH	/	663	GC	Aérosols pentacarinat arrêtés il y a 5 mois	Dyspnée fébrile d'aggravation progressive malgré ATB	Syndrome interstitiel bilatéral	pentacarinat IV + GC + ATV	Favorable	0	4130	Pneumopathie non documentée

nr : non renseigné, GC : glucocorticoïdes, ATB : antibiothérapie large spectre (sauf Bactrim), ATF : antifongiques, ATV : antiviraux, MTX : méthotrexate

Annexe 16 : Données cliniques des patients colonisés par *P. jiroveci*

Réf. patients	Sexe	Age	Pathologies sous jacentes	Lymphocytes sanguins (mm3)	CD4+ (mm3)	Traitement immuno suppresseur	Prophylaxie anti- <i>P. j</i>	Contexte clinique	Imagerie	Traitement de l'épisode	Evolution	Autres germes retrouvés dans le LBA	PCR copies de <i>P.j</i> /réaction	Diagnostic retenu
17	M	43	Myélome multiple allogreffé	/	166	GC	Bactrim	Toux productive persistante + AEG	Syndrome interstitiel	ATB + ATV	Favorable	<i>S.pneumoniae</i> , <i>Adenovirus</i> , <i>C. glabrata</i>	PNQ	Pneumopathie à pneumocoque et Adenovirus
23	F	58	Greffe rénale	570	nr	Rapamune Cellcept	non	Dyspnée fébrile d'aggravation progressive toux	Opacités interstitielles droites	ATB	Favorable	<i>Rhizomucor</i>	PNQ	Broncho-pneumopathie non documenté
24	F	44	LED + LAM	1440	nr	GC	non	Fièvre + défaillance hémodynamique	nr	ATB + ATV + ATF	Décès	0	PNQ	Choc septique sans infection documentée
28	M	41	Lymphome de Hodgkin	/	351	Chimiothérapie	non	Fièvre	Opacité lobe supérieur gauche	ATF	Favorable	0	PNQ	Syndrome fébrile sans documentation infectieuse
30	M	72	LMMC	1510	nr	non	non	Dyspnée	Syndrome interstitiel bilatéral	GC	Favorable	0	155	BOOP secondaire à des pneumonies répétées
31	F	60	0	1570	nr	non	non	Fièvre + toux sèche	Pneumopathie bilatérale + épanchement pleural	ATB	Favorable	0	PNQ	Pneumopathie infectieuse non documentée
42	F	44	Hépatite chronique active auto-immune	/	334	non	non	Dyspnée d'aggravation progressive	Syndrome interstitiel bilatéral + images en verre dépoli	GC	Favorable	0	PNQ	Fibrose pulmonaire dans un contexte de connectivité
43	M	63	Sarcoïdose	nr	nr	non	non	Dyspnée chronique	Masses bilatérales calcifiées + adénopathies	0	/	0	49	Bilan pour suspicion sarcoïdose
50	M	40	0	2710	nr	non	non	Fièvre + AEG	Hépatomégalie + adénopathie coeliaque	0	Favorable	0	PNQ	Tuberculose latente
55	M	55	LAM 2	aplasie	nr	Chimiothérapie	non	Fièvre, détresse respiratoire aigue	Opacités alvéolo-interstitielles bilatérales	ATB + ATF + ATV	Décès	0	43	Aspregillose pulmonaire probable Septicémie à <i>S. haemolyticus</i>
56	M	65	Adénocarcinome pulmonaire	/	769	non	non	0	Infiltrat péri-hilaire gauche + opacités juxta pleurales apicales	0	nr	0	78	Syndrome coronarien aigu

Annexe 16 (suite)

61	F	78	0	570	nr	non	non	Fièvre + toux	Syndrome alvéolo-interstitiel	ATB	Favorable	0	PNQ	Coma hypercapnique sur pneumopathie communautaire
66	F	67	Sarcoïdose	nr	nr	non	non	0	Syndrome interstitiel + adénopathies médiastinales	0	/	0	PNQ	Bilan pour suspicion de sarcoïdose
67	M	64	Greffe rénale	nr	nr	GC	nr	Fièvre, dyspnée modérée, toux depuis 10 jours malgré ATB	Images alvéolaires localisées aux 2 bases	ATB	nr	<i>C. glabrata</i>	336	Pneumopathie d'étiologie indéterminée
92	M	40	LAM	100	nr	Chimiothérapie	non	Fièvre + douleurs abdominales	Pneumopathie	ATB	Favorable	0	PNQ	Choc septique sur cholecystite
94	F	75	PAR + DDB	820	nr	GC	non	Toux, dyspnée fébrile d'aggravation progressive	Syndrome alvéolo-interstitiel bilatéral + opacités en verre dépoli	ATB	Décès	<i>P. aeruginosa, C. albicans</i>	234	Surinfections bronchiques à <i>P. aeruginosa</i>
97	F	42	VIH+ Hépatite C	/	1	Pas d'ATRV	non	Dyspnée fébrile, toux, céphalées, algies diffuses	Pneumopathie	ATB	Favorable	<i>H. influenzae</i>	PNQ	Pneumopathie <i>H. influenzae</i>
102	M	70	Adénocarcinome pulmonaire	nr	nr	GC	non	Toux sèche	Syndrome interstitiel bilatéral	ATB	non	0	156	Rechute carcinomateuse ou BOOP
104	F	71	Insuffisance surrénalienne	1880	nr	GC	non	Dyspnée fébrile d'aggravation progressive	Pneumopathie bilatérale	ATB + Bactrim + GC	Favorable	<i>S. aureus, S. pneumoniae, C. albicans</i>	PNQ	Choc septique suite à une pneumopathie à <i>S. aureus</i> et <i>S. pneumoniae</i>
107	F	62	Myélome multiple	920	nr	Endoxan + GC	non	Dyspnée fébrile persistante malgré ATB	Opacité de base gauche	ATB + ATV + ATF	Favorable	HSV1	1170	Pneumopathie virale
116	F	30	Sarcoïdose	720	443	non	non	Syndrome de Lofgren	Sd interstitiel + adénopathies	0	/	0	170	Bilan pour suspicion de sarcoïdose
117	M	60	Lymphome cérébral	nr	nr	Cures MTX + GC	non	AEG + dyspnée + toux productive	Syndrome interstitiel bilatéral + plages en verre dépoli	ATB	Décès	0	650	Pneumopathie au décours d'un choc septique à <i>K. oxytoca</i>

Annexe 16 (suite)

Réf. patients	Sexe	Age	Pathologies sous jacentes	Lymphocytes sanguins (mm3)	CD4+ (mm3)	Traitement immuno suppresseur	Prophylaxie anti- <i>P. j</i>	Contexte clinique	Imagerie	Traitement de l'épisode	Evolution	Autres germes retrouvés dans le LBA	PCR copies de <i>P.j</i> /réaction	Diagnostic retenu
142	M	63	Myélodysplasie + Splénomégalie myéloïde	nr	nr	Chimiothérapie radiothérapie	Bactrim	Fièvre	Images nodulaires	ATF	Favorable	0	464	Aspergillose invasive pulmonaire probable
154	M	63	Cancer rénal métastasé	nr	nr	Everolimus	non	Dyspnée fébrile d'aggravation progressive depuis 15 jours	Nodules + Syndrome interstitiel bilatéral + images en verre dépoli	Arrêt everolimus	Favorable	0	238	Pneumopathie médicamenteuse à Everolimus
157	F	67	Polymyosite	202	non	non	non	Fièvre	Syndrome interstitiel bilatéral	GC	Favorable	0	228	Syndrome des anticorps anti-synthétases de type anti-JO1 avec fibrose pulmonaire
158	F	79	Cancer sein + LLC	3120	nr	Tamoxifène	non	AEG, dyspnée fébrile d'aggravation progressive	Pneumopathie	ATB + Bactrim + GC	Décès	<i>C. kefir</i>	PNQ	Détresse respiratoire sur probable pneumopathie infectieuse
166	M	58	VIH+	/	138	Pas d'ATRV	non	Dyspnée fébrile, toux productive céphalées	Opacité lobe droit	ATB + Bactrim	Favorable	0	PNQ	Probable pneumopathie bactérienne non documentée
168	M	34	Spondylarthrite ankylosante	1990	nr	TNF + MTX	nr	Fièvre	Opacités bilatérales	ATB	Favorable	<i>H. influenzae</i>	PNQ	Pneumopathie à <i>H. influenzae</i>
169	M	52	Cancer rénal métastasé	nr	nr	Everolimus	non	Dyspnée fébrile, toux sèche	Plages en verre dépoli	Arrêt Everolimus	nr	0	PNQ	Pneumopathie médicamenteuse à l'everolimus
177	F	67	LAM 1	40	nr	Chimiothérapie	non	Douleurs thoraciques fièvre	Opacité abcédée du lobe supérieur droit	ATF	nr	0	PNQ	Aspergillose pulmonaire invasive probable

LED : Lupus érythémateux disséminé, LAM : Leucémie aiguë myéloïde, LMMC : Leucémie myélo-monocytaire chronique, LLC : Leucémie lymphocytaire chronique, GC : glucocorticoïdes, MTX : méthotrexate, ATRV : anti-rétroviraux, nr : non renseigné, ATB : antibiothérapie large spectre (sauf Bactrim), ATF : antifongiques, ATV : antiviraux, PNQ : positifs non quantifiables (<30 copies/réaction)

Annexe 17 : Spécificité de la PCR *Pneumocystis*

Référence LBA	Autres germes retrouvés dans le LBA	PCR <i>Pneumocystis</i>
4	<i>E. faecium</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i>	NNN
7a	<i>P. vulgaris</i>	NNN
8	<i>C. glabrata</i>	NNN
13b	<i>C. albicans</i>	NNN
15	<i>S. pneumoniae</i>	NNN
16a	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. xyloxydans</i> , <i>C. albicans</i>	NNN
16b	<i>A. xyloxydans</i>	NNN
19	<i>B. catharralis</i>	NNN
20	<i>P. aeruginosa</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>A. fumigatus</i>	NNN
25	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	NNN
26	<i>B. catharralis</i>	NNN
27	Rhinovirus	NNN
33	<i>A. xyloxydans</i> , <i>C. albicans</i>	NNN
34	<i>B. catharralis</i> , CMV, HHV 6, <i>A. fumigatus</i>	NNN
40	<i>C. albicans</i>	NNN
45	<i>A. baumannii</i>	NNN
49	<i>P. aeruginosa</i>	NNN
51	<i>P. vulgaris</i>	NNN
54	<i>E. coli</i>	NNN
58	<i>Fusarium sp.</i> , <i>C. albicans</i>	NNN
65	<i>C. albicans</i>	NNN
68	<i>S. marcescens</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	NNN
69	Streptocoque alpha hémolytique, <i>A. fumigatus</i>	NNN
71	<i>S. aureus</i> , <i>C. glabrata</i>	NNN
73	<i>C. glabrata</i>	NNN
74b	<i>C. albicans</i> , PCR toxoplasmes +	NNN
77	<i>S. aureus</i>	NNN
78	<i>C. lusitaniae</i> , <i>Trichosporon asahii</i>	NNN
79	<i>C. albicans</i>	NNN
80	<i>H. influenzae</i>	NNN
81	<i>P. aeruginosa</i> , <i>C. famata</i> , <i>Trichosporon asahii</i>	NNN
84	<i>A. fumigatus</i>	NNN
85	<i>S. aureus</i>	NNN
87	Rhinovirus, <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i>	NNN
89	<i>M. xenopi</i>	NNN
90	<i>P. aeruginosa</i> , <i>C. glabrata</i>	NNN
96	<i>S. pneumoniae</i>	NNN
98	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i>	NNN
100	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i>	NNN
101	<i>C. albicans</i>	NNN
103	<i>C. kefyr</i>	NNN
105	<i>P. aeruginosa</i>	NNN
109a	<i>K. oxytoca</i>	NNN
111	<i>P. aeruginosa</i>	NNN
120	<i>C. glabrata</i>	NNN
121	<i>C. albicans</i>	NNN
123	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. xyloxydans</i> , <i>S. maltophilia</i>	NNN
124	<i>P. oralis</i>	NNN

125	<i>C. albicans</i>	NNN
126	<i>Echovirus 11</i>	NNN
127	<i>A. flavus</i>	NNN
128	<i>C. albicans</i>	NNN
130	<i>C. albicans</i>	NNN
133	<i>C. albicans</i>	NNN
135	<i>C. albicans</i>	NNN
136	<i>C. albicans</i>	NNN
137	<i>C. albicans</i>	NNN
138	<i>A.niger Penicillium</i>	NNN
143	<i>C. albicans</i>	NNN
146	<i>S. haemolyticus, C.albicans</i>	NNN
150	<i>C. albicans</i>	NNN
153	<i>C. krusei</i>	NNN
160	<i>M. tuberculosis C. albicans</i>	NNN
162	<i>C. koseri, C. tropicalis</i>	NNN
170	<i>Adenovirus</i>	NNN
173	<i>P. aeruginosa E. aerogenes, C. parapsilosis</i>	NNN
174	<i>C.glabrata</i>	NNN
175	<i>Parainfluenzae type 3, B. pertussis</i>	NNN
176	<i>M. avium</i>	NNN
178	<i>C. albicans, S. aureus</i>	NNN
184	<i>S. epidemidis, CMV</i>	NNN
186	<i>Nocardia nova</i>	NNN

Revue de la littérature

- Alvarez-Martinez, M. J., J. M. Miro, et al. (2006). "Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jiroveci* in clinical specimens." Diagn Microbiol Infect Dis **56**(2): 153-60.
- An, C. L., F. Gigliotti, et al. (2003). "Exposure of immunocompetent adult mice to *Pneumocystis carinii* f. sp. muris by cohousing: growth of *P. carinii* f. sp. muris and host immune response." Infect Immun **71**(4): 2065-70.
- Arcenas, R. C., J. R. Uhl, et al. (2006). "A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid." Diagn Microbiol Infect Dis **54**(3): 169-75.
- Atzori, C., F. Agostoni, et al. (1999). "*P. carinii* host specificity: attempt of cross infections with human derived strains in rats." J Eukaryot Microbiol **46**(5): 112S.
- Baggish, A. L. and D. R. Hill (2002). "Antiparasitic agent atovaquone." Antimicrob Agents Chemother **46**(5): 1163-73.
- Bands, D. and S. Monecke (2007). "Development and evaluation of real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jiroveci*." Transplant infectious disease.
- Beard, C. B., J. L. Carter, et al. (2000). "Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission." Emerg Infect Dis **6**(3): 265-72.
- Beard, C. B., M. R. Fox, et al. (2005). "Genetic differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immunocompetent infants and from adults with AIDS: Epidemiological Implications." J Infect Dis **192**(10): 1815-8.
- Benfield, T. L. and J. D. Lundgren (1998). "The *Pneumocystis carinii* major surface glycoprotein (MSG): its potential involvement in the pathophysiology of pneumocystosis." FEMS Immunol Med Microbiol **22**(1-2): 129-34.
- Benson, C., J. Kaplan, et al. (2004). "Treating opportunistic infections among HIV-infected adults et adolescents : recommendations from CDC, the National Institute of Health and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America." MMWR Recomm Rep **53**(1-112).
- Bientz, M. and J. Rochemaure (1973). "[*Pneumocystis carinii* pneumopathies in adults]." Poumon Coeur **29**(1): 5-12.
- Bigby, T. D. (1994). "Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. How invasive?" Chest **105**(3): 650-2.
- Board, K. F., S. Patil, et al. (2003). "Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques." J Infect Dis **187**(4): 576-88.
- Brancart, F., H. Rodriguez-Villalobos, et al. (2005). "Quantitative TaqMan PCR for detection of *Pneumocystis jiroveci*." J Microbiol Methods **61**(3): 381-7.
- Briel, M., H. C. Bucher, et al. (2006). "Adjunctive corticosteroids for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in patients with HIV-infection." Cochrane Database Syst Rev **3**: CD006150.
- Broadus, C., M. D. Dake, et al. (1985). "Bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy for the diagnosis of pulmonary infections in the acquired immunodeficiency syndrome." Ann Intern Med **102**(6): 747-52.
- Brooks, D., P. Wang, et al. (1994). "Sequence variation of the hydroxy methyl dihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthetase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfa. ." Eur. J. Biochem **224**: 397-405.
- Carini (1910). "Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*." Boln.Soc.Med.Cir Sao Paulo **18**: 204.

- Carlin, E. M., R. J. Coker, et al. (1993). "Systemic *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis with dapsone and pyrimethamine fails to protect against extrapulmonary pneumocystosis." Genitourin Med **69**(2): 130-2.
- Casanova-Cardiel, L. and M. J. Leibowitz (1997). "Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water." J Eukaryot Microbiol **44**(6): 28S.
- Centers for Disease Control (1981). "*Pneumocystis* pneumonia " Los Angeles MMWR **30**: 250-252.
- Chagas (1909). "Nouvelle espèce de trypanosomiase humaine." Bull.Soc.Path.Exot. **2**: 304-307.
- Chave, J. P., S. David, et al. (1991). "Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients: a cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients." Aids **5**(8): 927-32.
- Chen, W., F. Gigliotti, et al. (1993). "Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*." Infect Immun **61**(12): 5406-9.
- Consensus. (1990). "Consensus statement on the use of corticosteroids as adjunctive therapy for pneumocystis pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. The National Institutes of Health-University of California Expert Panel for Corticosteroids as Adjunctive Therapy for *Pneumocystis* Pneumonia." N Engl J Med **323**(21): 1500-4.
- Crans, C. A., Jr. and P. M. Boiselle (1999). "Imaging features of *Pneumocystis carinii* pneumonia." Crit Rev Diagn Imaging **40**(4): 251-84.
- D'Egidio, G., S. Kravcik, et al. (2007). "*Pneumocystis jiroveci* pneumonia prophylaxis is not required with a CD4+ T-cell count < 200 cells/ μ L when viral replication is suppressed." AIDS **21**: 1711-1715.
- Dallas, W., J. Gowen, et al. (1992). "Cloning, sequencing, and enhanced expression of the dihydropteroatesynthase gene of *Escherichia coli* MC400." J. Bacteriol. **174**: 5961-5970.
- Daly, K. R., C. J. Fichtenbaum, et al. (2002). "Serologic responses to epitopes of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis jiroveci* differ in human immunodeficiency virus-infected and uninfected persons." J Infect Dis **186**(5): 644-51.
- de Boer, M., L. Bruijnesteijn, et al. (2007). "An outbreak of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia with 1 predominant genotype among renal transplant recipients : interhuman transmission or a common environmental source?" Clin Infect Dis **44**: 1143-1149.
- de Souza, W. and M. Benchimol (2005). "Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(8): 903-8.
- Dei-Cas, E., J. C. Cailliez, et al. (1992). "Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent?" Eur J Epidemiol **8**(3): 460-70.
- Dei-Cas, E., M. Brun-Pascaud, et al. (1998). "Animal models of pneumocystosis." FEMS Immunol Med Microbiol **22**(1-2): 163-8.
- Delanoë, P. and M. Delanoë (1912). "Sur les rapports des kystes de *Pneumocystis carini* du poumon de rats avec le *trypanosoma lewisi*." C.R.Acad.Sci.Paris **155**: 658-660.
- Eriksson, O. E. (1994). "*Pneumocystis carinii* : a parasite in lungs of mammals , referred to a new family and order (*Pneumocystidaceae*, *Pneumocystidales*, *Ascomyceta*)." Syst Ascomycetum **13**: 165-180.
- Fermer, C., B. Kristiansen, et al. (1995). "Sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* as defined by site-directed mutagenesis could have its origins in other species." J. Bacteriol. **177**: 4669-4675.
- Feyrter, F. (1927). "Über die pathologische anatomie lungenveränderungen beim keuchhusten." Frankf Z Pathol **35**: 213-255.
- Fishman, J. A. (1998). "Treatment of infection due to *Pneumocystis carinii*." Antimicrob Agents Chemother **42**(6): 1309-14.

- Flori, P., B. Belleste, et al. (2004). "Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens." *J Med Microbiol* **53**(Pt 7): 603-7.
- Floris-Moore, M., M. Amodio-Groton, et al. (2003). "Adverse reactions to trimethoprim/sulfamethoxazole in AIDS." *Ann Pharmacother*. **37**(12): 1810-1813.
- Fraser, I. P., K. Takahashi, et al. (2000). "Pneumocystis carinii enhances soluble mannose receptor production by macrophages." *Microbes Infect* **2**(11): 1305-10.
- Fujii, T., T. Nakamura, et al. (2007). "Pneumocystis pneumonia in patients with HIV infection : clinical manifestations, laboratory findings, and radiological features." *J Infect Chemotherapy* **13**(1): 1-7.
- Furrer, H., M. Egger, et al. (1999). "Discontinuation of primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected adults treated with combination antiretroviral therapy. Swiss HIV Cohort Study." *N Engl J Med* **340**(17): 1301-6.
- Gault, E., Y. Michel, et al. (2001). "Quantification of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time PCR." *Journal of Clinical Microbiology*: 772-775.
- Gigliotti, F., A. G. Harmsen, et al. (1993). "Pneumocystis carinii is not universally transmissible between mammalian species." *Infect Immun* **61**(7): 2886-90.
- Goesch, T. R., G. Gotz, et al. (1990). "Possible transfer of *Pneumocystis carinii* between immunodeficient patients." *Lancet* **336**(8715): 627.
- Goldman, A. S., L. R. Goldman, et al. (2005). "What caused the epidemic of *Pneumocystis pneumonia* in European premature infants in the mid-20th century?" *Pediatrics* **115**(6): e725-36.
- Gosey, L. L., R. M. Howard, et al. (1985). "Advantages of a modified toluidine blue O stain and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia." *J Clin Microbiol* **22**(5): 803-7.
- Helweg-Larsen, J., A. G. Tsolaki, et al. (1998). "Clusters of *Pneumocystis carinii* pneumonia: analysis of person-to-person transmission by genotyping." *Qjm* **91**(12): 813-20.
- Helweg-Larsen, J., T. L. Benfield, et al. (1999). "Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia." *Lancet* **354**(9187): 1347-51.
- Hibbett, D., M. Binder, et al. (2007). "A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*." *Mycological research* **111**(11): 507-547.
- Holz, O., J. Kips, et al. (2000). "Update on sputum methodology." *Eur Respir J* **16**: 335-359.
- Horowitz, H. W. and G. P. Wormser (1999). "Atovaquone compared with dapsone to prevent *Pneumocystis carinii* pneumonia." *N Engl J Med* **340**(19): 1512-3.
- Huang, L., C. B. Beard, et al. (2000). "Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene." *J Infect Dis* **182**(4): 1192-8.
- Huang, L., F. M. Hecht, et al. (1995). "Suspected *Pneumocystis carinii* pneumonia with a negative induced sputum examination. Is early bronchoscopy useful?" *Am J Respir Crit Care Med* **151**(6): 1866-71.
- Huang, L., J. Stansell, et al. (1999). "Performance of an algorithm to detect *Pneumocystis carinii* pneumonia in symptomatic HIV-infected persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group." *Chest* **115**(4): 1025-32.
- Huang, L., K. Crothers, et al. (2003). "Pneumocystis colonization in HIV-infected patients." *J Eukaryot Microbiol* **50 Suppl**: 616-7.
- Huang, L., K. Crothers, et al. (2004). "Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance." *Emerg Infect Dis* **10**(10): 1721-8.
- Huang, L., A. Morris, et al. (2006). "An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP)." *Proc Am Thorac Soc* **3**(8): 655-64.

- Huggett, J., M. Taylor, et al. (2007). "Development and evaluation of a real time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV infected patients." Thorax **August 10**.
- Hughes, W. T., S. W. LaFon, et al. (1995). "Adverse events associated with trimethoprim-sulfamethoxazole and atovaquone during the treatment of AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia." J Infect Dis **171**(5): 1295-301.
- Hunter, J. A. and A. E. Wakefield (1996). "Genetic divergence at the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene among isolates of *Pneumocystis carinii* from five mammalian host species." J Eukaryot Microbiol **43**(5): 24S-25S.
- Ivaldy, G. and L. Paldy (1958). "A new form of treatment of interstitial plasma cell pneumonia with pentamidine." Monatsschr Kinderheilkunde **111**: 297-299.
- Kaneshiro, E. S. (1998). "*Pneumocystis carinii* pneumonia: the status of *Pneumocystis* biochemistry." Int J Parasitol **28**(1): 65-84.
- Kaplan, J. E., H. Masur, et al. (2002). "Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons--2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America." MMWR Recomm Rep **51**(RR-8): 1-52.
- Kazanjian, P., W. Armstrong, et al. (2000). "*Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients." J Infect Dis **182**(2): 551-7.
- Kazanjian, P. H., D. Fisk, et al. (2004). "Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P. carinii* pneumonia, in the United States and China." J Infect Dis **189**(9): 1684-7.
- Keely, S. P. and J. R. Stringer (1997). "Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci." J Clin Microbiol **35**(11): 2745-7.
- Kovacs, J. A., J. L. Halpern, et al. (1989). "Monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*: identification of specific antigens and characterization of antigenic differences between rat and human isolates." J Infect Dis **159**(1): 60-70.
- Kutyavin, I., A. Afonina, et al. (2000). "3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperature." Nucl Acids Res(28): 655-61.
- Lacombe, K. and P. M. Girard (2004). "[A 2004 update on treatment and prophylaxis of opportunistic infections in the course of HIV disease. Part 1: Pneumocystosis and protozoiasis]." Med Mal Infect **34**(6): 239-45.
- Larsen, H. H., L. Huang, et al. (2004). "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 **189**(9): 1679-83.
- Larsen, H. H., H. Masur, et al. (2002). "Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia." J Clin Microbiol **40**(2): 490-4.
- Lasbury, M. E., P. Lin, et al. (2004). "Effect of bronchoalveolar lavage fluid from *Pneumocystis carinii*-infected hosts on phagocytic activity of alveolar macrophages." Infect Immun **72**(4): 2140-7.
- Latouche, S., M. Olsson, et al. (1997). "Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. in air samples collected in animal rooms." J Eukaryot Microbiol **44**(6): 46S-47S.
- Latouche, S., E. Ortona, et al. (1997). "Biodiversity of *Pneumocystis carinii* hominis: typing with different DNA regions." J Clin Microbiol **35**(2): 383-7.
- Latouche, S., J. L. Poirot, et al. (1997). "Study of internal transcribed spacer and mitochondrial large-subunit genes of *Pneumocystis carinii* hominis isolated by repeated bronchoalveolar lavage from human immunodeficiency virus-infected

- patients during one or several episodes of pneumonia." J Clin Microbiol **35**(7): 1687-90.
- Ledergerber, B., A. Mocroft, et al. (2001). "Discontinuation of secondary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection who have a response to antiretroviral therapy. Eight European Study Groups." N Engl J Med **344**(3): 168-74.
- Lee, C. H., J. Helweg-Larsen, et al. (1998). "Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes." J Clin Microbiol **36**(3): 734-41.
- Li, J. and T. Edlind (1994). "Phylogeny of *Pneumocystis carinii* based on beta-tubulin sequence." J Eukaryot Microbiol **41**(5): 97S.
- Limper, A. H., K. P. Offord, et al. (1989). "*Pneumocystis carinii* pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS." Am Rev Respir Dis **140**(5): 1204-9.
- Limper, A. H., J. S. Hoyte, et al. (1997). "The role of alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* degradation and clearance from the lung." J Clin Invest **99**(9): 2110-7.
- Linszen, C. F., J. A. Jacobs, et al. (2006). "Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage fluid samples." J Med Microbiol **55**(Pt 9): 1229-35.
- Liu, Y., M. Rocourt, et al. (1992). "Sequence and variability of the 5.8S and 26S rRNA genes of *Pneumocystis carinii*." Nucleic Acids Res **20**(14): 3763-72.
- Lopez Bernaldo de Quiros, J. C., J. M. Miro, et al. (2001). "A randomized trial of the discontinuation of primary and secondary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia after highly active antiretroviral therapy in patients with HIV infection. Grupo de Estudio del SIDA 04/98." N Engl J Med **344**(3): 159-67.
- Lopez, P., M. Espinosa, et al. (1987). "Sulfonamide resistance in *Streptococcus pneumoniae*: DNA sequence of the gene encoding dihydropteroate synthetase and characterization of the enzyme." J. Bacteriol. **169**: 4320-4326.
- Lundgren, B., J. A. Kovacs, et al. (1992). "*Pneumocystis carinii* and specific fungi have a common epitope, identified by a monoclonal antibody." J Clin Microbiol **30**(2): 391-5.
- Masur, H., J. E. Kaplan, et al. (2002). "Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons--2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America." Ann Intern Med **137**(5 Pt 2): 435-78.
- Mazars, E., C. Odberg-Ferragut, et al. (1994). "Genomic and isoenzymatic markers of *Pneumocystis* from different host species." J Eukaryot Microbiol **41**(5): 104S.
- Medrano, F. J., M. Montes-Cano, et al. (2005). "*Pneumocystis jirovecii* in general population." Emerg Infect Dis **11**(2): 245-50.
- Meliani, L., M. Develoux, et al. (2003). "Real time quantitative PCR assay for *Pneumocystis jirovecii* detection." J Eukaryot Microbiol **50** Suppl: 651.
- Metersky, M. L., H. G. Colt, et al. (1995). "AIDS-related spontaneous pneumothorax. Risk factors and treatment." Chest **108**(4): 946-51.
- Mikaelsson, L., G. Jacobsson, et al. (2006). "*Pneumocystis pneumonia*--a retrospective study 1991-2001 in Gothenburg, Sweden." J Infect **53**(4): 260-5.
- Miller, R., A. Lindley, et al. (2005). "Genotypic variation in *Pneumocystis jirovecii* isolates in Britain." Thorax(60): 679-682.
- Mingos, M. and G. Kane (2005). "Sirolimus induced pneumonitis in a renal transplant patient." Respiratory Care **50**(12).
- Morris, A., C. B. Beard, et al. (2002). "Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*." Microbes Infect **4**(1): 95-103.

- Morris, A., L. A. Kingsley, et al. (2004). "Prevalence and clinical predictors of Pneumocystis colonization among HIV-infected men." *Aids* **18**(5): 793-8.
- Morris, A., J. D. Lundgren, et al. (2004). "Current epidemiology of Pneumocystis pneumonia." *Emerg Infect Dis* **10**(10): 1713-20.
- Morris, A., F. C. Sciurba, et al. (2004). "Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and Pneumocystis colonization." *Am J Respir Crit Care Med* **170**(4): 408-13.
- Musto, L., M. Flanigan, et al. (1982). "Ten-minute silver stain for Pneumocystis carinii and fungi in tissue sections." *Arch Pathol Lab Med* **106**(6): 292-4.
- Nakamura, Y. (1998). "The major surface antigen of Pneumocystis carinii." *FEMS Immunol Med Microbiol* **22**(1-2): 67-74.
- Navin, T. R., C. B. Beard, et al. (2001). "Effect of mutations in Pneumocystis carinii dihydropteroate synthase gene on outcome of P carinii pneumonia in patients with HIV-1: a prospective study." *Lancet* **358**(9281): 545-9.
- Nevez, G., C. Raccurt, et al. (1999). "Pulmonary colonization with Pneumocystis carinii in human immunodeficiency virus-negative patients: assessing risk with blood CD4+ T cell counts." *Clin Infect Dis* **29**(5): 1331-2.
- Nevez, G., E. Magois, et al. (2006). "Apparent absence of Pneumocystis jirovecii in healthy subjects." *Clin Infect Dis* **42**(11): e99-101.
- Ng, V. L., D. M. Yajko, et al. (1997). "Extrapulmonary pneumocystosis." *Clin Microbiol Rev* **10**(3): 401-18.
- Nimri, L. F., I. N. Moura, et al. (2002). "Genetic diversity of Pneumocystis carinii f. sp. hominis based on variations in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes." *J Clin Microbiol* **40**(4): 1146-51.
- O'Donnell, W. J., W. Pieciak, et al. (1998). "Clearance of Pneumocystis carinii cysts in acute P carinii pneumonia: assessment by serial sputum induction." *Chest* **114**(5): 1264-8.
- Olsson, M., C. Lidman, et al. (1998). "Identification of Pneumocystis carinii f. sp. hominis gene sequences in filtered air in hospital environments." *J Clin Microbiol* **36**(6): 1737-40.
- Overgaard, U. and J. Helweg-Larsen (2007). "Pneumocystis jirovecii pneumonia (PCP) in HIV-1 negative patients : A retrospective study 2002-2004." *Scandinavian Journal of infectious Diseases* **39**: 589-595.
- Patel, N. and H. Koziel (2004). "Pneumocystis jirovecii pneumonia in adult patients with AIDS: treatment strategies and emerging challenges to antimicrobial therapy." *Treat Respir Med* **3**(6): 381-97.
- Peglow, S. L., A. G. Smulian, et al. (1990). "Serologic responses to Pneumocystis carinii antigens in health and disease." *J Infect Dis* **161**(2): 296-306.
- Pifer, L. L., W. T. Hughes, et al. (1978). "Pneumocystis carinii infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children." *Pediatrics* **61**(1): 35-41.
- Podzamczar, D., A. Martos, et al. (1993). "Hepatic and pulmonary pneumocystosis during primary prophylaxis for Pneumocystis carinii pneumonia with dapsone/pyrimethamine." *Clin Infect Dis* **16**(1): 171.
- Pop, S. M., J. K. Kolls, et al. (2006). "Pneumocystis: immune recognition and evasion." *Int J Biochem Cell Biol* **38**(1): 17-22.
- Powles, M. A., D. C. McFadden, et al. (1992). "Mouse model for Pneumocystis carinii pneumonia that uses natural transmission to initiate infection." *Infect Immun* **60**(4): 1397-400.
- Queener, S. F., M. S. Bartlett, et al. (1988). "Activity of clindamycin with primaquine against Pneumocystis carinii in vitro and in vivo." *Antimicrob Agents Chemother* **32**(6): 807-13.
- Respaldiza, N., F. J. Medrano, et al. (2004). "High seroprevalence of Pneumocystis infection in Spanish children." *Clin Microbiol Infect* **10**(11): 1029-31.

- Rigole, P., D. Basset, et al. (1997). "[Biological diagnosis of pneumocystis infection. Evaluation and value of a new direct immunofluorescent technique]." Pathol Biol (Paris) **45**(1): 19-23.
- Robbets, Liebowitz, et al. (2007). "polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jiroveci* : evaluation of 9 assays." Diagnostic microbiology and infectious disease **58**: 385-392.
- Roblot, F., G. Le Moal, et al. (2003). "Pneumocystis carinii pneumonia in patients with hematologic malignancies: a descriptive study." J Infect **47**(1): 19-27.
- Rodriguez, M. and J. A. Fishman (2004). "Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients." Clin Microbiol Rev **17**(4): 770-82, table of contents.
- Roths, J. B., J. D. Marshall, et al. (1990). "Spontaneous *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunodeficient mutant scid mice. Natural history and pathobiology." Am J Pathol **136**(5): 1173-86.
- Ruffolo, J. J., M. T. Cushion, et al. (1989). "Ultrastructural observations on life cycle stages of *Pneumocystis carinii*." J Protozool **36**(1): 53S-54S.
- Santos, L. D., P. Lacube, et al. (1999). "Contribution of dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* epidemiology." J Eukaryot Microbiol **46**(5): 133S-134S.
- Sepkowitz, K. A. (2002). "Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome." Clin Infect Dis **34**(8): 1098-107.
- Sing, A., A. Roggenkamp, et al. (1999). "*Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR." J Clin Microbiol **37**(10): 3409-10.
- Sing, A., A. M. Geiger, et al. (2001). "*Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR." J Clin Microbiol **39**(7): 2717-8.
- Soula, F. (2002). "Développement d'une technique de PCR en temps réel pour la détection de *Pneumocystis carinii* chez des patients et des porteurs." Thèse Faculté des Sciences pharmaceutiques et Biologiques dde Lille.
- Stringer, S. L., K. Hudson, et al. (1989). "Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity." J Protozool **36**(1): 14S-16S.
- Stringer, J. R., M. T. Cushion, et al. (2001). "New nomenclature for the genus *Pneumocystis*." J Eukaryot Microbiol Suppl: 184S-189S.
- Stringer, J. R. and S. P. Keely (2001). "Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*." Infect Immun **69**(2): 627-39.
- Stringer, J. R., C. B. Beard, et al. (2002). "A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans." Emerg Infect Dis **8**(9): 891-6.
- Takahashi, T., M. Goto, et al. (2002). "*Pneumocystis carinii* carriage in immunocompromised patients with and without human immunodeficiency virus infection." J Med Microbiol **51**(7): 611-4.
- Terris, B., C. Marche, et al. (1996). "[Extra-pulmonary pneumocystosis in the course of AIDS. Report of a case]." Ann Pathol **16**(1): 41-4.
- Thomas, C. F., Jr. and A. H. Limper (2004). "*Pneumocystis* pneumonia." N Engl J Med **350**(24): 2487-98.
- Torres, J., M. Goldman, et al. (2000). "Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients with polymerase chain reaction: a blinded comparison to standard methods." Clin Infect Dis **30**(1): 141-5.

- Totet, A., L. Meliani, et al. (2003). "Immunocompetent infants as a human reservoir for *Pneumocystis jirovecii*: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the mitochondrial large subunit rRNA gene." *J Eukaryot Microbiol* **50 Suppl**: 668-9.
- Totet, A., H. Duwat, et al. (2004). "Similar genotypes of *Pneumocystis jirovecii* in different forms of *Pneumocystis* infection." *Microbiology* **150**(Pt 5): 1173-8.
- Tse, C. and J. Capeau (2003). "Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel." *Ann Biol Clin*(61): 279-93.
- Tsolaki, A. G., R. F. Miller, et al. (1999). "Oropharyngeal samples for genotyping and monitoring response to treatment in AIDS patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia." *J Med Microbiol* **48**(10): 897-905.
- Turner, D., Y. Schwarz, et al. (2003). "Induced sputum for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV patients: new data, new issues." *Eur Respir J* **21**(2): 204-8.
- Vanek (1951). "[Atypical (interstitial) pneumonia in children caused by *Pneumocystis carinii*.]" *Cas Lek Cesk* **90**(38): 1121-4.
- Vargas, S. L., W. T. Hughes, et al. (1995). "Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia." *J Infect Dis* **172**(2): 506-10.
- Vargas, S. L., C. A. Ponce, et al. (2000). "Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers." *J Clin Microbiol* **38**(4): 1536-8.
- Vargas, S. L., W. T. Hughes, et al. (2001). "Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants." *Clin Infect Dis* **32**(6): 855-61.
- Vargas, S. L., C. A. Ponce, et al. (2003). "Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*." *Emerg Infect Dis* **9**(5): 605-6.
- Vargas, S. L., C. A. Ponce, et al. (2007). "*Pneumocystis* is not a direct cause of sudden infant death syndrome." *Pediatr Infect Dis J* **26**(1): 81-3.
- Vasquez, J., A. G. Smulian, et al. (1996). "Antigenic differences associated with genetically distinct *Pneumocystis carinii* from rats." *Infect Immun* **64**(1): 290-7.
- Vidal, S., C. de la Horra, et al. (2006). "*Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease." *Clin Microbiol Infect* **12**(3): 231-5.
- Vogel, P., C. J. Miller, et al. (1993). "Evidence of horizontal transmission of *Pneumocystis carinii* pneumonia in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques." *J Infect Dis* **168**(4): 836-43.
- Wakefield, A. E., F. J. Pixley, et al. (1990). "Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification." *Lancet* **336**(8713): 451-3.
- Wakefield, A. E., S. E. Peters, et al. (1992). "*Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi." *Mol Microbiol* **6**(14): 1903-11.
- Wakefield, A. E., R. F. Miller, et al. (1993). "Oropharyngeal samples for detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification." *Q J Med* **86**(6): 401-6.
- Wakefield, A. E. (1996). "DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora." *J Clin Microbiol* **34**(7): 1754-9.
- Wakefield, A. E., A. R. Lindley, et al. (2003). "Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients." *J Infect Dis* **187**(6): 901-8.
- Walker, J., G. Conner, et al. (1989). "Giemsa staining for cysts and trophozoites of *Pneumocystis carinii*." *J Clin Pathol* **42**(4): 432-4.
- Walzer, P. D., D. P. Perl, et al. (1976). "*Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States: epidemiologic, diagnostic, and clinical features." *Natl Cancer Inst Monogr* **43**: 55-63.

- Walzer, P. D. (1999). "Immunological features of *Pneumocystis carinii* infection in humans." Clin Diagn Lab Immunol **6**(2): 149-55.
- Watanabe, J., H. Hori, et al. (1989). "Phylogenetic association of *Pneumocystis carinii* with the 'Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group' indicated by comparison of 5S ribosomal RNA sequences." Mol Biochem Parasitol **32**(2-3): 163-7.
- Weig, M., H. Klinker, et al. (1996). "Correlation of *Pneumocystis carinii* PCR with clinical diagnosis in immunocompromised patients." Lancet **347**(9010): 1266.
- Weinberg, G. A. and P. J. Durant (1994). "Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* derived from infected rats, mice, ferrets, and cell cultures." J Eukaryot Microbiol **41**(3): 223-8.
- Weinberg, G. A., T. D. Edlind, et al. (1994). "Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* from different host species at the beta-tubulin gene locus and at the internal transcribed spacer regions of the rRNA gene cluster." J Eukaryot Microbiol **41**(5): 118S.
- Weiner, S., L. Sellin, et al. (2007). "Pneumonitis associated with sirolimus : clinical characteristics, risk factors and outcome. A single centre experience and review of the literature." Nephrol Dial Transplant **July 4**.
- Workshop (1994). "Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*. The *Pneumocystis* Workshop." J Eukaryot Microbiol **41**(5): 121S-122S.
- Yong, S. J., Z. Vuk-Pavlovic, et al. (2003). "Surfactant protein D-mediated aggregation of *Pneumocystis carinii* impairs phagocytosis by alveolar macrophages." Infect Immun **71**(4): 1662-71.
- Yoshida, Y. (1989). "Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*." J Protozool **36**(1): 53-60.
- Yoshikawa, H. and Y. Yoshida (1987). "Localization of silver deposits on *Pneumocystis carinii* treated with Gomori's methenamine silver nitrate stain." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] **264**(3-4): 363-72.
- Ypma-Wong, M. F., W. A. Fonzi, et al. (1992). "Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*." Infect Immun **60**(10): 4140-5.

Nom – Prénoms : GUILLOUZOUIC Aurélie

Titre de la Thèse : Intérêts et limites de la PCR quantitative en temps réel pour le diagnostic de pneumocystose au C.H.U de Nantes. Etude rétrospective allant de décembre 2006 à juin 2007.

Résumé de la Thèse :

Pneumocystis jiroveci est responsable de pneumopathie grave chez les sujets immunodéprimés. Le diagnostic de pneumocystose est difficile et repose encore actuellement sur la mise en évidence du micro-organisme dans le LBA à l'examen microscopique par des techniques modérément sensibles. Depuis les années 1990, les progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire, ont permis de développer des techniques de PCR très sensibles pour la recherche de *Pneumocystis*.

Le but de cette étude était de mettre en place une PCR en temps réel quantitative pour la détection de *P. jiroveci* dans les LBA et d'en déterminer les intérêts et les limites dans le diagnostic de pneumocystose.

De décembre 2006 à juin 2007, 201 LBA, issus de 189 patients, ont été recueillis au laboratoire de Mycologie/Parasitologie du C.H.U de Nantes. La recherche de pneumocystes a été réalisée par microscopie et par PCR, avec une concordance entre les deux techniques de 81,1%. La grande sensibilité de la PCR a permis de suspecter fortement une pneumocystose chez 5 patients, négatifs en microscopie, ainsi qu'une colonisation chez 32 patients. Les résultats quantitatifs de la PCR, nous ont permis de proposer un « cut-off » afin de différencier les patients colonisés de ceux développant une pneumocystose. L'évaluation de la qualité des LBA grâce à une gamme d'albumine, est néanmoins nécessaire pour rendre ce seuil plus discriminant.

Mots Clés : PNEUMOCYSTOSE, PCR QUANTITATIVE, IMMUNODEPRIMES, COLONISATION

JURY :

PRESIDENT : M Patrice LE PAPE, Professeur de Parasitologie - Mycologie,
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : M. Philippe MOREAU, Professeur d'Hématologie Clinique
Faculté de Médecine de Nantes

M. François RAFFI, Professeur de Maladies Infectieuses et Tropicales
Faculté de Médecine de Nantes

M. Anne ESPERN, Assistante Hospitalo-universitaire
Faculté de Médecine de Nantes

M. Michel MIEGEVILLE, Maître de Conférence de Parasitologie – Mycologie
Faculté de médecine de Nantes

Adresse de l'auteur : 16 rue Louis Lavoix 44250 Saint-Brévin

