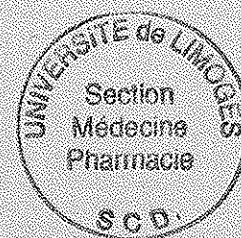


UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE



Année 2010



THESE N° 3330/4

**INVESTIGATION DE CAS GROUPES
DE PNEUMOCYTOSE DANS UN
SERVICE DE NEPHROLOGIE**

MEMOIRE

Pour le DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES de PHARMACIE SPECIALISEE

Tenant lieu de

THESE

Pour le DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement

le 18 Octobre 2010 à Limoges

par

Nathalie PESTOURIE

Née le 15 Avril 1982 à Brive-la-Gaillarde (Corrèze)

JURY

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ
Madame le Professeur Marie-Laure DARDE
Madame le Professeur Marie ESSIG
Madame le Professeur Anne-Marie ROGUES
Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY
Madame le Docteur Marcelle MOUNIER

Président
Juge
Juge
Juge
Membre invité
Directeur de thèse



INVESTIGATION DE CAS GROUPES
DE PNEUMOCYTOSE DANS UN
SERVICE DE NEPHROLOGIE

MEMOIRE

Pour le DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES de PHARMACIE SPECIALISEE

Tenant lieu de

THESE

Pour le DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement

le 18 Octobre 2010 à Limoges

par

Nathalie PESTOURIE

Née le 15 Avril 1982 à Brive-la-Gaillarde (Corrèze)

JURY

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ

Madame le Professeur Marie-Laure DARDE

Madame le Professeur Marie ESSIG

Madame le Professeur Anne-Marie ROGUES

Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY

Madame le Docteur Marcelle MOUNIER

Président

Juge

Juge

Juge

Membre invité

Directeur de thèse

UNIVERSITE DE LIMOGES - FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur **Jean –Luc DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN :

Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2^{ème} VICE-DOYEN :

Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE – CRYPTOLOGAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE – CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE – CHIMIE MINERALE

DESMOULIERE Alexis

PHYSIOLOGIE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE – MYCOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE – BIOPHYSIQUE

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE – HYDROLOGIE – ENVIRONNEMENT

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

BATTU Serge

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN GIRY Karine

PHARMACIE GALENIQUE

BILLET Fabrice

PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude

BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE

CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE A LA THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES

PHARMACEUTIQUES :

DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
---------------------------------	-----------------------------------

PROFESSEUR CERTIFIÉ :

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

A notre Président de jury :

Madame le Professeur Sylvie Rogez,

*Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant la présidence
de ce jury de cette thèse.*

Nous vous remercions d'avoir bien voulu vous intéresser à ce travail.

Soyez assurée de notre vive reconnaissance et de notre respectueuse considération.

A notre jury de thèse :

Madame le Professeur Marie-Laure Darde,

Vous nous faites l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury de thèse.

Nous vous remercions de l'aide que vous nous avez apportée et le temps que vous nous avez consacré pour la réalisation de ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre profond respect et notre vive gratitude.

Madame le Professeur Marie Essig,

Nous vous sommes reconnaissant de l'intérêt que vous avez bien voulu nous porter en acceptant de juger cette thèse.

Nous vous remercions du temps que vous nous avez accordé pour l'aboutissement de ce travail.

Soyez assurée de notre grand respect et de notre profonde gratitude.

Madame le Professeur Anne-Marie Rogues,

*Nous vous sommes infiniment reconnaissant d'avoir accepté de faire le déplacement en terre
limougeaude pour juger ce travail.*

*Nous vous remercions de nous avoir accueilli avec une extrême gentillesse dans votre service
et de nous avoir tant appris.*

Recevez ici le témoignage de notre profonde admiration et de notre vive reconnaissance.

Madame le Professeur Marie-Cécile Ploy,

Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

*Nous vous remercions vivement pour tout ce que vous avez fait pour nous au cours
de ces années d'internat.*

Recevez l'expression ici de notre profonde considération et de mon immense reconnaissance.

A notre directeur de thèse :

Madame le Docteur Marcelle Mounier,

Nous vous sommes reconnaissant d'avoir accepté de diriger cette thèse.

Vous nous avez fait l'honneur de votre temps et de votre expertise mais aussi de votre soutien tout au long de ce travail.

Nous vous remercions de l'accueil que vous nous avez fait au sein de l'unité d'hygiène et de nous faire partager vos immenses connaissances en microbiologie et en hygiène hospitalière.

Ces pages sont l'expression de ma grande admiration et de mes plus vifs remerciements.

Je dédie cette thèse,

A mes parents et à ma sœur,

*Je vous remercie pour tout le soutien matériel mais aussi psychologique que vous m'avez apporté durant toutes ces longues années d'études. Ça y'est c'est fini, enfin...
Merci également pour la relecture méticuleuse de ce travail. Je vous aime.*

A Tony,

*Mes plus vifs remerciements vont à toi.
Merci pour ton amour, tes conseils, tes corrections, ton soutien sans faille, ton humour et ta patience légendaire qui me permettent de relativiser mes « moments difficiles ».
A tout ce qui nous attend dans un futur proche... Je t'aime.*

A Loulou,

Ça ne se fait certainement pas de remercier un chien, mais merci à Loulou pour avoir « éponger mon stress ». La pauvre en est toujours traumatisée !

A mes deux co-internes préférées,

Anne et Elo merci pour votre soutien durant cet été 2010 ! Je vous adore !!!!

A toute l'équipe de l'unité d'hygiène,

Merci à tous, vous avez été là au quotidien pour me soutenir et me supporter...

A tous les chefs du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène,

En particulier à Olivier et à ceux que j'ai embêté avec mes problèmes de thèse (Fabien, Sébastien...).

A Monsieur le Professeur François Denis,

A Marie-Claire Baclet, Sandra Da Ré et Thomas Jové,

Merci pour le soutien méthodologique et technique pour la partie génotypage.

A toute l'équipe des laboratoires de Bactériologie-Virologie-Hygiène

et de Parasitologie-Mycologie,

Un merci particulier pour Muriel.

A Monsieur le Professeur Gilles Nevez,

pour le protocole de génotypage.

A tous les co-internes avec qui j'ai partagé un semestre,

*En particulier la team des « nems » de bactério : Axel, Hélène, Aurélie, Paméla, Stéphanie et Elo,
ce semestre passé avec vous restera le meilleur !*

A ma famille,

A tous mes amis de la fac, de l'internat, du volley et d'ailleurs...

PLAN

Introduction

Première partie : Généralités

- I. Un peu d'histoire...
- II. Pneumocystis jirovecii
- III. Revue de la littérature des cas groupés de pneumocystose
- IV. Pneumocystis et transplantation rénale

Deuxième partie : Cas groupés de pneumocystose dans le service de Néphrologie

- I. Alerte
- II. Investigation
- III. Matériels et méthodes
- IV. Résultats
- V. Discussion

Liste des abréviations

ADN : Acide Desoxyribonucléique
ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique
BPCO : Broncopneumopathie Chronique Obstructive
CDC : Center for Diseases Control
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CMV : Cytomégalovirus
ddNTP : didésoxyribonucléotides triphosphates
DHFR : Dehydrofolate reductase
DHPS : dihydroptéroate synthétase
DHPS : dihydroptéroate synthétase
dNTP : désoxyribonucléotides triphosphates
EDTA : éthylène diamine tétra acétique
GTP : Guanosine Triphosphate
IRA : insuffisance rénale aiguë
ITS : Internal Transcribed Spacer
IV : Intra-veineuse
LBA : lavage-bronchoalvéolaire
LDH : Lactate Deshydrogénase
MGG : May-Grunvald-Giemsa
MLST : Multi locus DNA sequence typing
MMF : mycophénolate mofétil
mTOR : mamalian target of rapamycin
NaCl : Chlorure de Sodium
NCA : néphropathie chronique de l'allogreffe
NTI : néphropathie tubulo-interstitielle
NTIC : néphropathie tubulo-interstitielle chronique
NYHA : New York Heart Association
pb : paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm : rotation par minute
SAM : S-Adénosyl méthionine
SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SMX : sulfaméthoxazole
SSCP : Single-strand conformation polymorphism
TDM : tomodensitométrie
TMP : triméthoprime
UPGMA : Unweighted Pair Group Method with arithmetic Average
UV : Ultra-Violet
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

La pneumocystose est une maladie opportuniste due à un microorganisme eucaryote ubiquitaire nouvellement classé dans les champignons : *Pneumocystis jirovecii*. Il est principalement responsable de pneumopathie interstitielle chez les sujets atteints de déficit immunitaire congénital ou acquis. La pneumocystose peut être mortelle en l'absence de traitement.

Les premières descriptions cliniques remontent à la deuxième guerre mondiale, en Europe de l'Est, où *Pneumocystis* était responsable de pneumopathie interstitielle chez des enfants institutionnalisés dans des orphelinats et présentant des terrains débilisés. La pneumocystose était décrite comme une maladie touchant des enfants prématurés ou malnutris.

Dans les années 1960, *Pneumocystis* est surtout décrit comme agent de pneumopathie chez des sujets immunodéprimés. Avec la découverte d'une thérapeutique efficace, l'intérêt pour ce pathogène a diminué.

Au début des années 1980, une demande accrue de pentamidine a alerté le CDC (Center for Diseases Control) d'Atlanta en Géorgie (USA). Cette augmentation de consommation de pentamidine était liée à une recrudescence de cas de pneumocystose. Ceci a conduit à la découverte du virus du SIDA et a propulsé à nouveau *Pneumocystis* sur le devant de la scène, ce qui en a fait un problème majeur médical et de santé publique. La prévalence de la pneumocystose a connu une diminution, due à l'apparition de trithérapies efficaces pour retarder l'évolution vers la phase SIDA. Toutefois, en 2008, en France, la pneumocystose reste encore au premier rang des pathologies inaugurales de SIDA (28 %) suivi de la tuberculose (19 %) puis de la candidose œsophagienne (16 %) (1).

L'utilisation de plus en plus large des thérapeutiques immunosuppressives dans le traitement des maladies auto-immunes ou après transplantation d'organe ou greffe de moelle osseuse ont créé de nouveaux hôtes réceptifs pour le *Pneumocystis* et ont ainsi modifié son épidémiologie.

De plus, récemment, la biologie moléculaire a révolutionné les données sur l'épidémiologie de la pneumocystose. En effet, la contamination par voie aérienne et la transmission inter-humaine, bien que longtemps rejetées, sont aujourd'hui quasiment démontrées.

Au cours des dernières années, de nombreuses publications ont fait état de cas groupés de pneumocystose dans les établissements de santé, en particulier chez des transplantés rénaux. Notre établissement, le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Limoges, a été confronté à ce phénomène. En effet, de la fin de l'année 2007 au début de l'année 2010, 15 diagnostics de pneumocystose ont été posés dans le service de néphrologie, dont 14 chez des transplantés rénaux, alors que jusqu'à ces dates la description de cette maladie était anecdotique dans ce service. L'alerte a été communiquée à l'unité d'hygiène par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie et le service de Néphrologie afin d'investiguer les cas et d'apporter des mesures correctrices et préventives. Ce travail présente les résultats de ces investigations.

Première partie :

Généralités

I. Un peu d'histoire...

La première évocation de *Pneumocystis* remonte à 1909 avec Carlos Chagas qui découvre ce qu'il appelle alors une nouvelle forme de trypanosome chez le cochon d'Inde (2). L'année suivante Antonio Carini identifie cette « forme » chez le rat (3). L'impossibilité de la cultiver, l'absence d'ergostérol dans sa paroi, un cycle proche de celui des protozoaires lui ont valu d'être classé parmi ces derniers. En 1912, les frères Delanoe prouvent qu'il ne s'agit pas d'un trypanosome et décident de le nommer *Pneumocystis carinii*, en l'honneur d'Antonio Carini (4). Longtemps classé dans le règne des protozoaires, *P. carinii* est aujourd'hui considéré comme un champignon du fait de la composition et de la structure de sa membrane cellulaire (5,6), mais également du fait de son génome plus proche des champignons que des protozoaires.

C'est Edman *et al.* (7) en 1988 qui ont démontré pour la première fois l'appartenance de *P. carinii* au règne des champignons, grâce à la biologie moléculaire. Cette démonstration a été réalisée grâce au séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Des résultats similaires ont été rapportés par Stringer *et al.* l'année suivante (8). Puis, les résultats d'études portant sur les gènes de la beta-tubuline (9,10), le gène de l'ARNr 5S (11), le gène codant pour l'ARN mitochondrial et les gènes codant pour d'autres protéines mitochondriales (12) ont permis de rapprocher *Pneumocystis* des champignons filamenteux plutôt que des levures. Il est maintenant classé dans le phylum Ascomycota. En revanche, contrairement aux champignons, il n'est pas sensible aux antifongiques comme l'amphotéricine B ou les azolés du fait de l'absence d'ergostérol dans sa paroi.

Pneumocystis spp. est capable d'infecter différentes espèces de mammifères : humain, singe, cheval, cochon, lapin. Toutefois, il est spécifique d'hôte (13). A titre d'exemple, le *Pneumocystis* du cochon ne pourra pas infecter un rat et celui de l'homme n'infectera pas un autre animal. Les animaux ne constituent donc pas un réservoir de *Pneumocystis* humain. Sur le plan morphologique, les différentes espèces de *Pneumocystis* sont très proches, mais l'analyse des séquences de l'ARN ribosomique révèle des différences génomiques. Pour refléter au mieux ces différences, une nouvelle dénomination trinominale a été créée en 1994 (14). Dans ce système, *P. carinii* humain a été nommé *P. carinii sp. hominis*, pour le rat *P. carinii sp. carinii* et pour la souris *P. carinii sp. muris*. Mais dans la pratique, cette dénomination s'est avérée difficile à utiliser. En 2002, un nouveau système a

été proposé et adopté (15). Cette nouvelle dénomination donne le nom de *P. jiroveci* au *Pneumocystis* humain, nom déjà proposé par Jacob K. Frenkel en 1976 (16), en référence au premier auteur à l'avoir décrit chez l'homme : Otto Jirovec. La dénomination *P. carinii* correspond désormais au *Pneumocystis* du rat, *P. murinae* à celui de la souris et *P. mustelae* à celui du furet...

II. *Pneumocystis jirovecii*

A. Morphologie

Les données obtenues en microscopie électronique sur des poumons humains ou d'animaux infectés par *Peumocystis* ont permis de mettre en évidence deux formes parasitaires : les trophozoïtes et les formes kystiques (17). Les termes trophozoïte et kyste font en principe référence au monde des protozoaires et devraient être remplacés par les termes ascospore et asque dans le cas de *Pneumocystis*. Mais, par habitude, la première dénomination est restée.

1. Le trophozoïte (ascospore) :

- c'est une forme végétative uninucléée de 2 à 5 µm de diamètre, délimitée par une membrane cellulaire aux contours amiboïdes ;
- la présence de filopodes (visibles en microscopie électronique) permettrait l'attachement du trophozoïte à la surface des pneumocytes de type I de l'alvéole pulmonaire. Ils permettraient également d'assurer les échanges nutritifs avec la cellule hôte.

2. Les kystes (asques) :

Deux formes kystiques (asques) sont observées: les prékystes et les kystes matures :

- Les prékystes ont une forme ovoïde et mesurent 3 à 8 μm . Ils constituent une forme intermédiaire entre le trophozoïte et le kyste mature. Les prékystes sont répartis en 3 stades de développement :
 - le prékyste précoce qui est uninucléé et possède une paroi similaire à celle du trophozoïte,
 - le prékyste intermédiaire qui présente de 2 à 8 noyaux,
 - le prékyste tardif qui présente une paroi plus épaisse qui délimite un cytoplasme, dans lequel vont s'individualiser, par invagination de la membrane plasmique, les 8 corps intrakystiques uninucléés.
- Les kystes matures, éléments infectants probables, mesurent 6 à 8 μm de diamètre et libèrent *in situ* 8 corps intrakystiques qui se transforment rapidement en trophozoïtes. Les kystes vides ont une forme en ballon dégonflé caractéristique.

B. Cycle biologique hypothétique dans l'alvéole pulmonaire

A l'heure actuelle, toutes les étapes du cycle parasitaire de *P. jirovecii* ne sont pas connues. La forme infectante reste encore inconnue. Les formes connues de *Pneumocystis* peuvent être retrouvées dans l'alvéole pulmonaire mais aussi, plus rarement, dans d'autres organes comme la rate, le foie, le cœur, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse... Dans l'alvéole pulmonaire, le microorganisme est extracellulaire. Il existe une phase asexuée au cours de laquelle les formes trophiques se multiplient par division binaire. Cette division binaire n'est que rarement visualisée et peu documentée. Au cours de la phase sexuée, les trophozoïtes haploïdes se conjuguent pour donner un zygote diploïde qui deviendra un prékyste, puis par la suite un kyste après méiose et mitose des noyaux. Les corps intrakystiques se développent pour être ensuite libérés et donner naissance à des trophozoïtes (17).

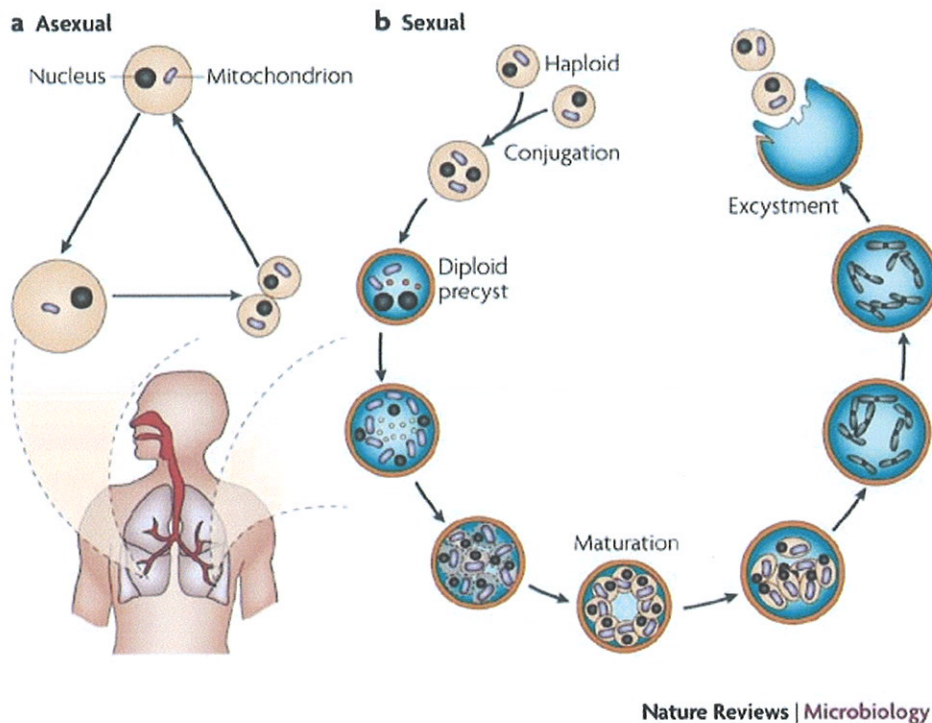


Figure 1 : Cycle hypothétique de *Pneumocystis spp.* dans l'alvéole pulmonaire (d'après Charles F. Thomas & Andrew H. Limper, Nature Reviews Microbiology, 2007) (18).

C. Physiopathologie

Pneumocystis est transmis par voie aérienne. Une fois inhalé, le microorganisme échappe aux défenses naturelles des voies aériennes supérieures. Il se dépose ensuite dans les alvéoles pulmonaires où il s'attache préférentiellement aux pneumocytes de type 1. Il se produit alors des modifications au niveau du microorganisme et de la cellule hôte afin de permettre la prolifération de *Pneumocystis*. La réplication est sous la dépendance de gènes récemment identifiés : *Cdc 2*, *Cdc 13* et *Cdc 25* (19). L'adhésion de *Pneumocystis* empêche la croissance des cellules épithéliales pulmonaires par l'intermédiaire de différents mécanismes enzymatiques comme les cyclines dépendantes kinases ou la GTP (Guanosine Triphosphate).

La présence de *Pneumocystis* crée une réaction inflammatoire locale avec recrutement cellulaire : lymphocytes, polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages. Cette réponse inflammatoire peut être excessive et entraîner des dommages tissulaires. La réaction inflammatoire est considérée comme la cause majeure des

dommages pulmonaire lors de la pneumocystose (20). Les lymphocytes T CD8+ seraient, en grande partie, responsables des lésions pulmonaires (21) par un mécanisme non connu à l'heure actuelle. Les macrophages jouent également un rôle très important : ils produisent des cytokines (IL1- β , TNF- α , IL6...) responsables de l'attraction des autres cellules et agissent également comme cellules présentatrices d'antigènes. Les macrophages sont activés par la glycoprotéine majeure de surface de *P. jirovecii* (22).

En ce qui concerne la réponse immunitaire, les deux systèmes semblent importants dans la défense de l'organisme contre *P. jirovecii*. Du point de vue de l'immunité cellulaire, le rôle des lymphocytes T CD4+ apparaît évident dans la mesure où la majorité des patients atteints ont un taux de CD4 bas. De plus, des expérimentations réalisées chez des souris déficitaires en CD4+ montraient qu'elles étaient plus susceptibles à développer une infection à *Pneumocystis* (23,24). Des infections plus sévères ont été observées chez les souris déficitaires en CD4 et CD8 que chez celles déficitaires uniquement en CD4 (25). Le rôle de l'immunité humorale est suggéré par plusieurs publications : il a été observé chez la souris la nécessité des lymphocytes B pour lutter contre l'infection (26) et il a été décrit des infections chez des patients atteints d'agammaglobulinémie bien que leur système cellulaire soit intact (27,28).

D. Diagnostic clinique :

Il existe des formes asymptomatiques chez le sujet immunocompétent avec une guérison spontanée dans la plupart des cas. Les pneumocystoses cliniques se manifestent généralement chez des sujets immunodéprimés : sujets séropositifs pour le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), transplantés d'organes, patients sous immunosuppresseurs (29,30), prématurés... C'est une maladie grave, souvent mortelle sans la mise en place d'une thérapeutique adaptée. La pneumocystose est la plus fréquente des pathologies inaugurales de SIDA (28 % des cas en 2008) (1). Il n'existe que peu de données sur une éventuelle période d'incubation de la maladie. Autrefois, elle était évaluée à 2 mois chez les patients VIH+ (31). Mais, les données récentes sur la colonisation ne permettent pas de confirmer une telle durée d'incubation, que ce soit pour les patients VIH+, mais aussi pour les autres types de patients. Ainsi, dans certaines publications on peut retrouver des périodes

d'incubation très longues jusqu'à plusieurs mois (32), sous-tendant l'hypothèse qu'un patient colonisé peut développer la pathologie au décours d'une diminution clinique ou thérapeutique de ces défenses naturelles.

1. Pneumocystose pulmonaire

Elle survient généralement chez des patients ayant un taux de lymphocytes T CD4 inférieur à $200/\text{mm}^3$. La fréquence d'acquisition est dépendante du nombre de CD4 : 0,5 %, si le taux de CD4 est compris entre 200 et $350 \text{ CD4}/\text{mm}^3$ à près de 8 % pour un taux de CD4 inférieur à $200 \text{ CD4}/\text{mm}^3$.

La pneumonie à *P. jirovecci* se traduit par une triade de symptômes d'apparition progressive associant fièvre, toux sèche et dyspnée d'intensité croissante dans 50 % des cas. L'auscultation pulmonaire est normale au début. Les gaz du sang montrent une hypoxémie dans 80 % des cas. Des douleurs thoraciques ont également été décrites (22).

Le diagnostic radiologique est délicat. Le plus souvent un syndrome interstitiel bilatéral est observé. Mais, la radiographie du thorax peut être normale, même en cas d'hypoxémie importante. Il existe également souvent des formes trompeuses sous la forme d'infiltrats uni- ou bilatéraux, de nodules pulmonaires, de pneumothorax, voire d'adénopathies médiastinales. La tomодensitométrie est le meilleur examen pour le diagnostic radiologique avec une sensibilité de 100 % et une spécificité de 89 %.

En règle générale, la pneumocystose chez le non VIH se distingue en plusieurs points :

- début plus brutal avec une installation d'en moyenne 5 jours contre 28 jours en moyenne chez les patients VIH+ (33) ;
- insuffisance respiratoire très importante d'emblée avec un risque d'hospitalisation en unité de soins intensifs estimé à 50 % (34) et allant même jusqu'à des insuffisances respiratoires fulminantes.

Mais il peut également y avoir des tableaux cliniques torpides associant une fatigue et une altération de l'état général importante. Dans ce cas-là, le diagnostic est difficile à poser. Il doit reposer sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et microbiologiques. Il n'existe pas, à l'instar de l'aspergillose, de définition précise de la pneumocystose.

La différence de symptomatologie chez les patients VIH+ et non VIH serait liée à la physiopathologie. Chez les patients VIH+, la symptomatologie résulterait plus de la pathogénie intrinsèque du micro-organisme et de la multiplication des kystes. Alors que chez l'immunodéprimée non VIH, elle serait plutôt le résultat de la réaction inflammatoire locale (35).

2. Formes extrapulmonaires :

Les formes extrapulmonaires ont été plus particulièrement décrites depuis le début de l'épidémie de SIDA. Une publication de 1997 rapportait 90 cas de pneumocystose extrapulmonaire chez des patients VIH+ (36). Ces formes sont particulièrement retrouvées chez des patients à un stade avancé de SIDA, ne recevant pas de prophylaxie ou uniquement des aérosols de pentamidine. Les principaux sites atteints sont les ganglions lymphoïdes, la rate, le foie, la moelle osseuse, le tractus gastro-intestinal, les yeux, la thyroïde et les reins. Ces manifestations peuvent rapidement conduire à une infection systémique.

E. Diagnostique mycologique :

Le diagnostic est généralement plus facile chez les patients VIH+ que chez les patients avec un autre type d'immunodépression du fait d'une concentration plus importante de micro-organismes dans les poumons (37). La particularité du diagnostic mycologique réside dans l'impossibilité de cultiver les *Pneumocystis*. Il n'est donc pas possible d'obtenir une souche de *Pneumocystis* et le diagnostic se fait par examen direct, par diagnostic indirect ou par biologie moléculaire.

1. Les prélèvements

Les examens sont réalisés sur des prélèvements d'origine pulmonaire ou provenant de l'oropharynx. Le *Pneumocystis* n'étant que très rarement retrouvé dans les expectorations, d'autres types de prélèvements doivent être pratiqués.

Le liquide de lavage-bronchoalvéolaire (LBA) constitue le prélèvement de choix car c'est un prélèvement profond et protégé. Il permet de poser un diagnostic positif dans plus de 90 % des cas (38,39). Cette technique permet également de mettre en évidence la réponse inflammatoire locale de l'hôte (40). Mais c'est une technique invasive (fibroscopie bronchique) qui ne peut pas être pratiquée chez tous les patients et ne peut s'appliquer à la recherche de portage.

D'autres prélèvements moins « nobles » peuvent être réalisés comme l'expectoration provoquée après nébulisation de NaCl à 3 % ou le lavage oro-pharyngé réalisé par gargarisme de 10 mL de NaCl à 0,9 %. Le lavage oro-pharyngé et l'expectoration provoquée sont des techniques simples et efficaces pour détecter la présence de *Pneumocystis*. Le rendement de ces méthodes va de 50 à 90 % suivant les études et les techniques de détection utilisées (38,39,41).

Enfin les biopsies pulmonaires transbronchiques ou transthoraciques peuvent être réalisées pour examen anatomopathologique. Elles peuvent apporter des éléments non obtenus avec le LBA mais sont associées à un taux élevé de complications, en particulier des pneumothorax ou des hémorragies.

2. Examen direct

Il existe différentes techniques permettant de mettre en évidence *P. jirovecii* par microscopie.

Lorsqu'il est abondant, le *Pneumocystis* peut être mis en évidence en microscopie à contraste de phase. Cependant, des colorations sont le plus souvent nécessaires. Plusieurs colorations peuvent être réalisées pour améliorer le diagnostic par microscopie :

- Certaines vont permettre de visualiser uniquement les trophozoïtes : coloration de Giemsa (coloration violette des trophozoïtes et des corps intrakystiques) (42) ;
- D'autres visualisent uniquement la paroi des kystes et pré-kystes : coloration de Gomori-Grocott (coloration noire), le bleu de toluidine (coloration bleue), calcofluor (43)(composé chimiofluorescent qui peut être visualisé sous UV). Ces divers colorants se lient à des composés glucidiques présents dans la paroi des champignons. Ils ne sont donc pas spécifiques de *Pneumocystis*.

L'immunofluorescence directe est la technique de diagnostic immunologique la plus utilisée pour la détection de *Pneumocystis* (43,44). Elle utilise des anticorps monoclonaux fluorescents dirigés contre *P. jirovecii*, soit contre la paroi du kyste, soit contre les trophozoïtes. Il existe des kits commerciaux pour cette technique. L'immunofluorescence est la technique la plus sensible par rapport aux autres colorations.

Remarque : La coloration de Papanicolaou, utilisée par les anatomo-cytopathologistes, peut être utile pour la mise en évidence de la réaction éosinophile associée à la pneumocystose. Des techniques d'immunohistochimie sont également utilisées pour la détection dans les tissus (ex : pour les biopsies pulmonaires).

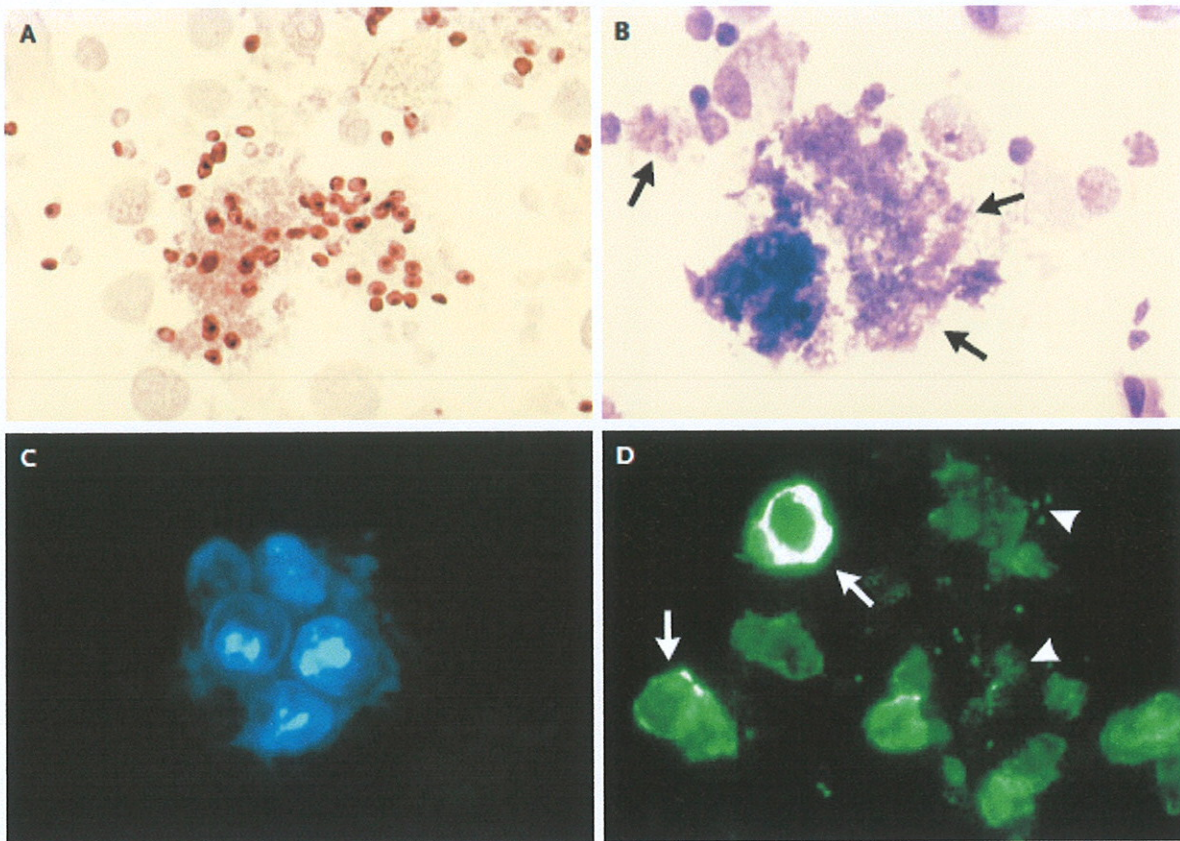


Figure 2 : (d'après Thomas *et al.*, NEJM, 2004) (45) : Détection de *Pneumocystis* par des différentes techniques de coloration. Image A : Coloration de Gomori-Grocot (x 100), mise en évidence de kystes. Image B : coloration de Giemsa (x100), identification des formes trophiques (flèches) à condition que la charge en micro-organisme soit élevée. Image C : Coloration au Calcofluor (x400), permet de visualiser rapidement les formes kystiques mais n'est pas spécifique. Image D : Immunofluorescence (x400), permet d'identifier à la fois les formes trophiques (pointes de flèches) et les kystes (flèches).

3. Diagnostic indirect

Les antigènes solubles de *Pneumocystis* peuvent être retrouvés dans les prélèvements par immunoblot. Mais la technique reste du domaine de la recherche et n'est pas employé en routine diagnostique.

La plupart des techniques de sérologie ne sont pas spécifiques de *Pneumocystis* (17) et ne peuvent être utilisées que chez des sujets immunocompétents. De plus, la sérologie est positive chez 70 à 80 % des enfants à l'âge de 20 mois (46). La sérologie n'a donc pas d'intérêt dans le diagnostic.

D'autres outils de diagnostics indirects sont à évoquer. Il s'agit des marqueurs sériques. Il est possible de doser la S-Adénosyl méthionine (SAM). La SAM est indispensable à la croissance de *P. jirovecii*, mais il est incapable de la synthétiser. De ce fait, il consomme la SAM présente. Le taux de SAM sanguin est donc bas en cas d'infection, puis augmente de nouveau lors du traitement. Bien qu'intéressant, le dosage est délicat et il existe de grandes variabilités individuelles (47).

Le Béta-D glucane, qui est un constituant de la paroi fongique, peut aussi être utilisé. C'est un indicateur d'une infection fongique, mais il n'est pas spécifique de *P. jirovecii*. La sensibilité est de 90 % mais là aussi le dosage est délicat (48).

La LDH sérique fréquemment augmentée dans les pneumocystoses diminue en général sous traitement. Elle n'a pas d'intérêt dans le diagnostic mais son suivi peut constituer un marqueur de succès thérapeutique (17).

4. Biologie moléculaire

L'introduction de l'amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a introduit un nouveau niveau de sensibilité dans le diagnostic de la pneumocystose. La PCR a prouvé son efficacité dans la détection de *Pneumocystis* dans plusieurs types de prélèvements respiratoires (39,49,50). Plusieurs techniques ont été mises au point :

- PCR dites conventionnelles ;
- PCR nichées qui améliorent la sensibilité. Elles sont principalement utilisées pour le génotypage car trop sensibles pour le diagnostic ;
- PCR en temps réel quantitatives ou non pour lesquelles il existe des kits commerciaux.

Différents gènes cibles pour les PCR diagnostiques ont été décrits. Parmi eux on retrouve :

- Gènes codant pour les ARN mitochondriaux qui sont des gènes multicopies, ce qui offre une meilleure sensibilité (ex : 23SARNr),
- Gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ex : 5SARNr),
- Gènes intervenant dans le cycle cellulaire (ex : cdc2 (51)).

La PCR est 100 à 1000 fois plus sensible que l'immunofluorescence. Elle permet un meilleur rendement sur les expectorations provoquées et chez les patients immunodéprimés.

La biologie moléculaire a considérablement amélioré le diagnostic de la pneumocystose, mais impose de se poser des questions sur la spécificité de la méthode pour le diagnostic de celle-ci et de faire la différence entre infection réelle et colonisation due à une exposition continue à *P. jirovecii*. Ces notions récentes de colonisation posent des problèmes dans l'interprétation des prélèvements positifs uniquement par PCR.

F. Prophylaxie et traitement

1. Traitement prophylactique

Il existe deux types de traitement prophylactique : la prophylaxie primaire et la prophylaxie secondaire.

La prophylaxie primaire s'adresse aux patients à risque et elle a pour but d'éviter la survenue de la pneumocystose. Elle doit, en particulier, être envisagée dès qu'un patient a le taux de CD4 qui chute en dessous de $200/\text{mm}^3$. Elle peut être réalisée :

- par prise quotidienne de 1 comprimé de triméthoprime (TMP) + sulfaméthoxazole (SMX) (BACTRIM®) à la dose de 80 mg de TMP + 400 mg de SMX ou à la dose de 160 mg de TMP + 800 mg de SMX (BACTRIM FORTE®)(52). En cas d'intolérance, il y a une

possibilité de prise de dapsonne (DISULONE®) selon le schéma 100 mg le 1^{er} jour, puis 50 mg/j associée éventuellement à la pyriméthamine (50 mg 1 à 3 fois par semaine) et à l'acide folinique (50 mg/semaine) (52). L'utilisation de l'atovaquone (WELLVONE®) à 1500 mg/j en 2 prises est également possible en cas d'intolérance (17);

- par prise 3 fois par semaine de BACTRIM FORTE® (160 mg TMP + 800 mg SMX) soit 1 comprimé tous les 2 jours (52);
- de manière mensuelle avec des aérosols de pentamidine (PENTACARINAT®) à la dose de 300 mg par séance (52).

La prophylaxie par TMP-SMX ne protège pas seulement contre la pneumocystose mais aussi vis-à-vis de la toxoplasmose et de certaines infections bactériennes, ce qui est particulièrement intéressant chez les patients VIH+. Mais, des effets indésirables apparaissant chez près de 50 % des patients nécessitent le passage à une prise discontinue dans 30 à 40 % des cas. Les effets indésirables sont moins fréquents avec le schéma posologique de 3 prises par semaine (17). Les allergies sont relativement fréquentes avec le TMP-SMX avec en particulier des réactions cutanées pouvant aller jusqu'à des syndromes de Stevens-Johnson. Des protocoles de désensibilisation au TMP-SMX sont réalisables et permettent parfois de réintroduire le TMP-SMX.

Les aérosols de pentamidine sont moins efficaces en particulier sur les formes extrapulmonaires, mais ils sont bien tolérés et moins coûteux que le TMP-SMX ou la dapsonne (17).

La dapsonne et le TMP-SMX ne doivent pas être proposés aux patients déficitaires en G6PD (45).

La durée de la prophylaxie varie suivant le type de patient. Elle est en général maintenue chez les patients VIH+ tant que leur CD4 sont <200 /mm³. Elle est en général de 6 mois après greffe de moelle osseuse et de 3 mois après transplantation d'organe. Des données récentes suggèrent que la durée de la prophylaxie après transplantation devrait être allongée à 6 mois (45).

La prophylaxie secondaire s'adresse aux patients ayant déjà développé une pneumocystose. C'est un traitement d'entretien qui permet d'éviter les rechutes. Elle se fait selon les mêmes schémas thérapeutiques que la prophylaxie primaire.

Une autre méthode de prévention est de « booster » les défenses immunitaires du patient. En effet, on sait qu'un patient, qui a un taux de CD4 élevé, a moins de chance de développer une pneumocystose, en particulier s'il s'agit de patients VIH+, chez lesquels la prophylaxie pourra être interrompue si les CD4 sont $>200/\text{mm}^3$ et si la charge virale est <1000 copies/mL.

Il ne faut pas non plus négliger les mesures de prévention qui évitent ou limitent l'exposition à *P. jirovecii* (cf paragraphe : I.B.7 Prévention de la transmission).

2. Traitement curatif :

La mise en place d'un traitement efficace est indispensable. Le médicament de choix est, comme pour la prophylaxie, le TMP-SMX pour toutes les formes de pneumocystose. Les avantages de ce médicament sont multiples : il est disponible en deux formes (orale et parentérale). Sa pharmacocinétique est bien connue et il possède des propriétés antibactériennes et a un faible coût (17). Le TMP-SMX est administré par voie orale ou IV à la dose de 15 à 20 mg/kg de TMP + 75 à 100 mg/kg de SMX par jour en 3 fois (52). La forme parentérale doit être privilégiée dans les formes sévères ou chez les patients présentant des troubles gastro-intestinaux. Les effets indésirables principaux sont les troubles digestifs et l'apparition de rash cutané, mais aussi fièvre, cytopénie, hyperkaliémie, acidose métabolique... L'apparition d'effets indésirables est plus fréquente chez les VIH+ que chez les autres. Le traitement dure de 14 à 21 jours suivant le type de patient.

Comme pour le traitement prophylactique, il existe des alternatives au TMP-SMX en cas d'allergie, d'intolérance ou d'inefficacité de celui-ci. Ces alternatives sont listées dans le tableau 1.

<i>Molécule</i>	<i>Posologie</i>	<i>Voie d'administration</i>	<i>Remarque</i>
TMP + SMX	15 à 20 mg/kg/j + 75 à 100 mg/kg/j en 3 prises	Orale ou IV	Première intention
Pentamidine	4 mg/kg/j	Intraveineuse	Alternative thérapeutique
	600 mg/jour	Aérosol	
Primaquine + Clindamycine	30 mg/j + 1800mg/j en 3 prises	Orale	Alternative thérapeutique
Atovaquone	1500 mg/j en 2 prises	Orale	Alternative thérapeutique

Tableau 1 : Molécules utilisées dans le traitement curatif de la pneumocystose.

La pentamidine était au départ utilisée dans le traitement de la leishmaniose. Elle a la capacité de se lier à l'ADN, mais son mécanisme d'action précis n'est pas connu. En utilisation intraveineuse, elle provoque des effets indésirables chez 80 % des patients traités à types d'hypotension, troubles du rythme, pancréatite, hyperkaliémie, hypocalcémie, neutropénie...

L'efficacité de l'association primaquine + clindamycine a été vérifiée par des essais cliniques randomisés mais le mécanisme d'action n'est pas connu (53,54). Parmi les effets indésirables, on retrouve : rash cutané, fièvre, neutropénie, troubles gastro-intestinaux et méthémoglobinémie. La primaquine peut causer des hémolyses chez les patients atteints de déficit en G6PD (17).

A l'origine, l'atovaquone est un antipaludique. Des études cliniques ont montré que l'atovaquone est moins efficace que le TMP-SMX mais aussi efficace que la pentamidine. En revanche, l'atovaquone est mieux tolérée avec quand même des effets indésirables possibles: rash cutané, fièvre, troubles gastro-intestinaux, perturbation du bilan hépatique (17).

Il existe une autre possibilité de traitement par voie parentérale : le trimétrexate (NEUTREXIN®). C'est un inhibiteur de la DHFR, dérivé du méthotrexate, administré à la dose de 45 mg/m²/j. Le trimétrexate est un antinéoplasique qui peut être utilisé dans le traitement des pneumocystoses sévères, à condition d'être associé à l'acide folinique afin de limiter sa cytotoxicité. Ce médicament n'est pas disponible en France.

Dans les pneumocystoses modérées à sévères, il est également conseillé l'adjonction de corticostéroïdes pendant les 72 premières heures du traitement. Des études (55,56) ont proposé l'utilisation des corticostéroïdes dans le traitement de la pneumocystose et en particulier dans les formes hypoxémiantes.

3. Résistance aux traitements

Le SMX et la dapsonne agissent sur la dihydroptéroate synthétase (DHPS), alors que le TMP agit sur la dihydrofolate réductase (DHFR). Le SMX est largement utilisé en tant qu'antibactérien et les bactéries résistantes à cette molécule par mutation au niveau de la DHPS sont courantes (22). Des mutations similaires ont été retrouvées chez *P. jirovecii* suggérant l'existence de souches résistantes au SMX (57,58). Les mutations au niveau de la DHPS sont reliées à une exposition antérieure au SMX (59). En effet, les isolats possédant des mutations sont retrouvés chez 62 à 100 % des patients sous prophylaxie par SMX contre 11 à 47,5 % chez ceux n'en recevant pas (22). Ces mutations sont associées à des échecs de prophylaxie (60). Des mutations au niveau de la DHFR ont également été découvertes chez *Pneumocystis* et sont également associées à ce type d'échecs (61). L'atovaquone est un analogue de l'ubiquinone et se fixe au cytochrome b de *Pneumocystis*. Des mutations au niveau de ce cytochrome b ont été détectées (62,63). Cette résistance paraît être inducible car 30 % des souches issues de patients traités par l'atovaquone possèdent ces mutations contre 6 % chez ceux jamais exposés (64). Ces mutations sont également associées à des échecs de prophylaxie (62). A l'heure actuelle, l'émergence de souches résistantes ne pose pas de problème d'impasse thérapeutique. A l'instar des bactéries, de tels problèmes pourraient émerger dans les années futures...

G. Epidémiologie

1. Notion d'épidémiologie de base

P. jirovecii est un micro-organisme ubiquitaire signalé dans le monde entier. Des études sérologiques ont permis de confirmer sa répartition mondiale. Malgré tout, la répartition des génotypes varie suivant les régions géographiques (65).

Les enfants sont probablement l'hôte naturel préférentiel pour le pathogène. En effet, le contact avec *P. jirovecii* se fait dans les tous premiers mois de la vie. Ceci est confirmé par une étude de 2001 dans laquelle les auteurs retrouvaient près de 40 % de prélèvements positifs chez des enfants atteints de pathologies respiratoires mais en bon état de santé générale (46). Jusqu'à la fin des années 1980, la pneumocystose pulmonaire était considérée comme la réactivation de kystes latents sous l'effet d'une immunosuppression. Cette thèse était confortée par des études de séroprévalence qui montraient de 66 à 100 % d'enfants porteurs d'anticorps anti-pneumocystis à l'âge de 5 ans (66,67).

La transmission de *Pneumocystis* n'est pas encore complètement comprise et aucune niche environnementale n'a été mise en évidence. La transmission par voie aérienne est la plus probable. Des travaux de biologie moléculaire ont permis de retrouver la présence de *Pneumocystis* dans l'air hospitalier, en présence ou non de patients porteurs du micro-organisme (68-70). Dans l'étude de Choukri *et al.*, le génome de *Pneumocystis* a été retrouvé jusqu'à 3 mètres d'un patient atteint, dans la chambre de celui-ci et jusqu'à 8 mètres à l'extérieur de la chambre (70). La contamination nosocomiale à partir de l'air, qui ferait de l'air hospitalier une source environnementale, est envisageable (71) mais la transmission inter-humaine apparaît de plus en plus comme un mode de transmission préférentiel (45).

2. Notion de colonisation et de transmission inter-humaine

Les notions anciennes sur la pneumocystose humaine faisaient état de l'existence de porteurs sains et du phénomène de réactivation. Cette théorie s'appuyait sur une publication de Walzer datant de 1977 (72) dans laquelle il rapportait l'existence d'un

saprophytisme du champignon au niveau pulmonaire chez les mammifères dont l'homme. De nombreuses études portant sur la recherche de *Pneumocystis* dans des prélèvements nécropsiques de patients décédés de causes autres qu'une pneumocystose, mais possédant des terrains débilisés, argumentaient cette théorie (73-75). La notion de saprophytisme s'appuyait donc sur des études réalisées chez des patients à risques chez lesquels le diagnostic de pneumocystose n'avait peut-être pas été posé. Cette notion de porteur sain était également confortée par des études de séroprévalence qui rapportaient des séroconversions chez 100 % des enfants avant l'âge de 2 ans et la présence d'anticorps anti-*Pneumocystis* chez 95 % des 15-60 ans selon Meuwissen *et al.* (66) et chez 66 % des enfants âgés de 4 ans selon Pifer *et al.* (67). Ces données ont été réinterprétées et sont actuellement considérées comme le reflet d'un contact avec le micro-organisme mais pas forcément de la persistance de formes latentes (76).

Le concept de colonisation pulmonaire est apparu au début des années 1990 avec les travaux de Wakefield (77) et l'utilisation de la PCR pour le diagnostic de la pneumocystose. La détection par biologie moléculaire, en l'absence de détection microscopique chez des patients immunodéprimés présentant un diagnostic alternatif à la pneumocystose, a permis d'instaurer le concept de portage asymptomatique ou colonisation pulmonaire (76). Ainsi, un portage asymptomatique a pu être retrouvé chez des patients VIH+ et non VIH (78) et chez des bronchopathes chroniques (79,80). D'autres études ont rapporté des taux de 14 % (81) à 19 % (82) de colonisés parmi des patients immunocompétents atteints de pathologies respiratoires. Des études ont également été réalisées chez des enfants : *Pneumocystis* a été détecté dans 24,6 % des prélèvements nasopharyngés d'enfants atteints de bronchiolite (83), mais aussi sur 32,3 % des prélèvements autopsiques d'enfants morts décédés en dehors établissement de santé (84). En 2008, Morris *et al.* (85) ont publié une revue de la littérature au sujet des études réalisées sur la colonisation chez différents types de patients. Une synthèse de cette revue de la littérature est présentée dans le tableau 2. Les pourcentages obtenus varient énormément d'une étude à l'autre (de 0 % à 100 %). Cet effet est dû à des populations différentes mais aussi à la technique utilisée. Les techniques de biologie moléculaire sont beaucoup plus sensibles que les techniques classiques et permettent donc de détecter plus de porteurs. De plus, de nouvelles techniques de PCR en temps réel améliorent encore la sensibilité. Ceci pourrait expliquer, en partie, les variations

énormes entre les pourcentages décrits dans les différentes publications. Toutefois, il est possible de noter des pourcentages plus importants pour les patients atteints de pathologies respiratoires (immunodéprimés ou non) de même que chez les enfants.

Type de patient	Sous-population	Nombre d'études	Pourcentage de colonisation
Enfants	Avec pathologies respiratoires	4	15,9 % à 32 %
Enfants	Mort subite du nourrisson	2	9,4 % à 13,9 %
Enfants	Mort de causes diverses	4	17,3 % à 100 %
Adultes	Immunocompétents	7	0 % à 20 %
Adultes	Immunodéprimés VIH -	4	15,5 % à 58,8 %
Adultes avec pathologies pulmonaires	Mucoviscidose	3	0 % à 21,6 %
Adultes avec pathologies pulmonaires	Maladie pulmonaire primaire	4	2,6 % à 35,3 %
Adultes avec pathologies pulmonaires	BPCO ou bronchite chronique	5	10 % à 54,9 %
Adultes VIH +	VIH +	3	10 % à 43,8 %
Adultes VIH +	Hospitalisés	1	20 %
Adultes VIH +	Mort de causes autres que pneumocystose	1	46,2 %
Adultes VIH +	Avec symptomatologie respiratoire	3	28,8 % à 68,8 %

Tableau 2 : Variation des pourcentages de colonisation selon les populations étudiées et les études. Synthèse réalisée d'après une revue de la littérature de Morris *et al.* (85).

La question de la durée de colonisation est également sans réponse à l'heure actuelle. En revanche, on sait que la colonisation par *P. jirovecii* induit un contexte inflammatoire chronique au niveau du poumon, ce qui pourrait favoriser d'autres atteintes pulmonaires, en particulier chez les patients BPCO qui font partie des patients les plus colonisés (86).

Une étude récente, publiée en février 2010, réalisée sur des prélèvements d'autopsie de personnes décédées dans la rue (de cause violente ou non violente), rapporte 64,9 % des personnes colonisées (87). Ceci représente une prévalence importante dans la population générale qui pourrait agir comme réservoir du champignon.

Cette prévalence importante permet d'envisager le portage chez les personnels des établissements de santé. Une étude publiée en 2001, s'est intéressée à la détection de *Pneumocystis* chez le personnel soignant s'occupant de patients atteints de pneumocystose (88). Les résultats de cette étude suggèrent une circulation complexe de *P. jirovecii* entre immunodéprimés et immunocompétents. La transmission inter-humaine par voie aérienne semble envisageable avec deux voies de transmission possible :

- d'un patient immunodéprimé infecté vers un individu immunodéprimé susceptible ;
- d'un patient immunodéprimé infecté vers un individu immunocompétent après un contact rapproché.

On peut également s'interroger sur la transmission à partir d'un individu immunocompétent colonisé vers un individu immunodéprimé susceptible. La démonstration de cette transmission a déjà été faite chez la souris (89). Même si les concentrations de microorganismes ne sont probablement pas équivalentes chez un colonisé que chez un infecté, cette possibilité pourrait impliquer la contamination d'un patient par l'intermédiaire d'un personnel soignant colonisé. Cette notion pourrait constituer un autre type de contamination nosocomiale et renforce la nécessité de mesures de prévention dans les établissements de santé.

H. Prévention de la transmission

La transmission de *Pneumocystis* a été démontrée de manière expérimentale chez les animaux (90). Cependant, il y a quelques années encore, les recommandations de prévention des infections nosocomiales ne préconisaient pas l'isolement des patients atteints de pneumocystose. Les données sur la transmission inter-humaine étaient jugées peu convaincantes et l'idée d'une réactivation d'une infection latente était encore très présente dans les esprits. Les avancées de la biologie moléculaire de même que la description dans la littérature de survenue de cas groupés de pneumocystose dans des établissements de santé en particulier chez des patients transplantés rénaux ont écarté de plus en plus la thèse de la réactivation (32,91). De plus, grâce aux nouvelles techniques, l'ADN de *Pneumocystis* a pu être mis en évidence dans l'air mais aussi chez des individus asymptomatiques. On sait maintenant qu'en plus de la transmission d'un patient atteint vers un autre patient immunodéprimé, il est possible d'avoir un portage asymptomatique chez le personnel soignant. Devant toutes ces nouvelles données, le CDC Hospital Infection Control Practice Advisory Committee (92) recommande seulement d'éviter l'hospitalisation d'un patient atteint de pneumocystose dans un service hébergeant des immunodéprimés. Certains auteurs, rapportant des cas groupés de pneumocystose recommandent le port de masque chez les patients atteints (93). En France, il est recommandé la mise en place d'un isolement de type « gouttelettes » autour des patients atteints de pneumocystose (94). Les précautions « gouttelettes » sont mises en place pour tout patient atteint d'une pathologie pouvant être transmise par l'intermédiaire de particules d'une taille supérieure à 5 µm. A ce jour, ces mesures comprennent :

- l'isolement en chambre seule ;
- le port d'un masque chirurgical pour le personnel intervenant autour du lit du malade ;
- la limitation des déplacements et le port du masque par le patient lorsqu'il quitte la chambre.

Ces précautions sont à mettre en place en complément des précautions « standard » applicables par tout soignant pour tout patient, quel que soit son statut infectieux.

I. Génotypage de P. jirovecii

Le génotypage est un ensemble de techniques visant à étudier les variations génétiques de certains fragments d'ADN prédéterminés. Il existe des techniques de génotypage pour la plupart des organismes vivants. La plupart du temps, ces techniques sont utilisées afin d'étudier des diversités génétiques, de relier des espèces entre elles et de réaliser de la phylogénie. Pour *P. jirovecii*, des techniques de génotypage ont été mises au point afin de déterminer des sous-groupes (génotypes ou haplotypes) au sein de l'espèce. Ces génotypes ont principalement un intérêt épidémiologique : étude de la répartition géographique ou dans le cadre d'investigation de cas groupés.

1. Méthodes de génotypage

Plusieurs techniques de biologie moléculaire ont été mises au point pour le génotypage de *P. jirovecii*. Ces techniques ont des cibles différentes. Les gènes cibles utilisées sont moins spécifiques et plus polymorphes que ceux utilisés pour les PCR diagnostiques :

- Internal Transcribed Spacer (ITS1 et ITS2) (95) ;
- Locus de la dihydroptéroate synthétase (DHPS) (96) ;
- Gène de la β -tubuline (97).

Dans la littérature, on peut retrouver différentes méthodes de génotypage :

- Séquençage d'un gène prédéterminé, précédé ou non d'une étape de clonage dans un vecteur, exemple séquençage ITS qui permet par la suite de déterminer un génotype (95) ;
- MLST : Multi Locus DNA Sequence Typing qui est un séquençage de plusieurs gènes suivi d'une comparaison des séquences (98) ;
- SSCP : Single-Strand Conformation Polymorphism qui est une méthode proche du MLST (99) ;

- RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism. Cette méthode n'est pas très répandue. Elle est basée sur la restriction enzymatique d'un fragment amplifié suivi d'une migration sur gel. Les profils obtenus sont ensuite comparés à l'aide d'une application informatique (100).

2. Génotypage des ITS

En 1994, une publication de Lu *et al.* (101) proposait un typage de *P. jirovecii* par analyse des ITS du gène codant pour les ARNr (figure 3) dans des prélèvements d'origine humaine. Cette analyse a abouti à la description de 4 types parmi les 15 patients testés. Le typage était effectué en fonction de la séquence de la région ITS 1 et ITS2. Les auteurs décrivent 2 séquences différentes pour ITS 1 (A et B) et 3 différentes pour ITS 2 (a, b et c).

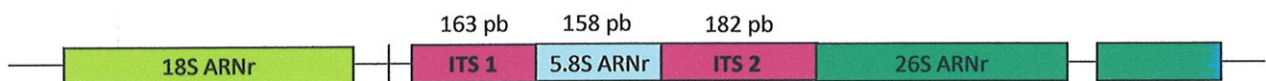


Figure 3 : Représentation schématique du gène des ARNr. En rose : les ITS.

En 1996, Tsolaki *et al.* (95) évoquaient également la diversité génétique de la région des ITS. Dans deux publications de 1998 et 1999 (102,103), ils utilisent, de manière plus précise, ces variations comme méthode de typage de *Pneumocystis*. Dans une étude portant sur des prélèvements oropharyngés provenant de patients sidéens atteints de pneumocystose, les échantillons positifs ont été typés par analyse des variations dans la séquence de la région des ITS. Cette étude aboutit également à la description de types en fonction de la séquence de la région ITS 1 (5 types) et ITS2 (9 types) (103). Une numérotation des différents types est créée : la première lettre en majuscule correspond au type ITS 1 et la deuxième en minuscule au type ITS 2 (exemple : B₁a₃). Une publication de Lee de 1998 (104) propose également une étude des génotypes avec une description beaucoup plus étendue du nombre de sous types : avec 15 types ITS 1 et 14 types ITS 2. Il propose également une nomenclature sur le même principe, sans chiffre en indice, avec les types ITS 1 de A à O et les types ITS 2 de a à n (exemple : type Ab ou Eg). Les génotypes ainsi obtenus sont parfois dénommés haplotypes dans certaines publications (105,106).

Une étude récente décrit un nouveau type ITS 1 SYD1 ainsi que de nouveaux types ITS 2 syd2, syd3 et syd4 (105) mais il est possible que d'autres nouveaux génotypes soient décrits du fait de la variabilité génétique de la région des ITS.

Une publication de 2003 donne une idée des génotypes prépondérants en France (107). Cette étude réalisée sur 17 patients (6 colonisés et 11 infectés) retrouve 35,3 % de génotype Ne, suivi par le génotype Eg (29,5 %) puis le Gg (17,6 %).

Dans la littérature, on retrouve également des données sur le grand polymorphisme de la région ITS qui serait lié à l'instabilité intrinsèque de cette région (108). Le taux moyen de substitution de la région ITS est de $1,4 \pm 1,3 \times 10^{-6}$ substitutions par site et par année (109). Un changement à cette fréquence ne pose pas de problème dans l'utilisation des génotypes ITS pour des études génétiques (96).

3. Signification clinique des génotypes de *P. jirovecii*

La question de la corrélation entre génotypes et caractéristiques phénotypiques des souches est actuellement un axe de recherche. Par exemple, il est connu que les mutants DHPS sont associés à une résistance aux sulfamides. Concernant une association entre ces génotypes et des facteurs de pathogénicité, les données sont contradictoires. Une étude a démontré une corrélation entre le génotype Ai et le développement d'une maladie modérée à sévère alors que le génotype Ne serait associé à une maladie moins grave (110). Au Portugal, une étude a également montré que Ne serait associé à une pathologie peu grave (111). Parmi les cas décrit par Van Hal *et al.*, 3 types Ne étaient associés à des pathologies graves et le nouveau génotype Isyd2 associé à des pathologies moins sévères (105). Ces données sont contradictoires et sont basées sur de faibles nombres de patients. Il n'existe pas de données sur une association entre un génotype et des souches possédant un pouvoir épidémiogène particulier.

III. Revue de la littérature des cas groupés de pneumocystose

Dans la littérature, on retrouve de nombreux rapports de cas de pneumocystose chez des patients avec ou sans co-morbidités. Les descriptions de cas groupés de pneumocystose sont moins fréquentes, mais des épisodes sont régulièrement rapportés. Ces publications concernent essentiellement des transplantés rénaux mais aussi des patients d'hématologie. Les autres types de transplantés semblent moins concernés par cette pathologie...

Les publications rapportant des épidémies hors transplantés rénaux sont répertoriées dans le tableau 3. Ces cas groupés concernent plus particulièrement des patients atteints de pathologies hématologiques. La première publication retrouvée rapportait 2 cas de pneumocystose chez des patients atteints de leucémies aiguës. Au cours de cet épisode, les auteurs évoquaient déjà l'hypothèse d'une transmission entre les 2 patients. Les deux études suivantes (112,113) n'avaient pas le support de la biologie moléculaire mais envisageaient l'hypothèse d'une transmission interhumaine nosocomiale.

Les trois études suivantes (114-116) utilisent des techniques de génotypage mais les auteurs ne se prononcent pas en faveur d'une transmission interhumaine. Ces trois études concernaient des patients d'hématologie et de transplantation rénale, mais les deux dernières rapportaient également des cas groupés parmi des patients VIH+. La description d'épidémie chez des patients VIH+ hospitalisés est rare. On ne retrouve pas non plus dans la littérature de description de cas groupés chez des transplantés d'organe hors greffe rénale.

Une étude très récente de 2010 rapporte des cas groupés de pneumocystose chez un nouveau type de patients : les patients atteints de rhumatismes inflammatoires. Les traitements ont beaucoup évolué dans ce domaine et peuvent maintenant provoquer une immunodépression sévère chez ces patients qui deviennent ainsi des hôtes susceptibles.

Références	Année de publication	Nombre de patients	Type de patients	Méthode de génotypage	Nombre de génotypes retrouvés	Investigation épidémiologique réalisée	Hypothèse des auteurs
Goesch <i>et al.</i> (117)	1990	2	Leucémie aigüe	Non	-	Non	Transmission interhumaine
Cheung <i>et al.</i> (112)	1994	3	Leucémie aigüe + tumeur cérébrale	Non	-	Oui	Transmission nosocomiale
Ong <i>et al.</i> (113)	1998	5	Hématologie	Non	-	Oui	Transmission interhumaine
Helweg-Larsen <i>et al.</i> (114)	1998	14	Hématologie + VIH	Séquençage ITS	9 types différents mais 3 clusters différents	Oui	Transmission interhumaine mais non prédominante
Olsson <i>et al.</i> (115)	2001	17	Hématologie + transplantés rénaux	mt LSU RINA 85	3 types mt LSU	Oui	Transmission interhumaine mais non prédominante
Rabodominrina <i>et al.</i> (116)	2004	39	VIH + transplantés rénaux	Typage DHPS par SSCP	19 types différents pour tous les patients (différents bâtiments et types de patients)	Oui	Transmission nosocomiale
Mori <i>et al.</i> (118)	2010	14	Arthrites rhumatoïdes	Non	-	Oui	Transmission interhumaine Rôle des porteurs sains ?

Tableau 3 : Publications rapportant des cas groupés de pneumocystose hors transplantés rénaux.

Les publications rapportant des épidémies chez les transplantés rénaux sont répertoriées dans le tableau 4. La première publication évoquant des cas groupés de pneumocystose chez des transplantés rénaux remonte à 1984 (119). Dans cet article, Hardy *et al.* rapportait 14 cas en 19 mois chez les 156 greffés rénaux suivis dans l'établissement. Des investigations épidémiologiques ont été menées, mais elles n'ont pas permis aux auteurs d'envisager une diffusion nosocomiale ou une transmission inter patient. L'étude cas-témoins réalisée a montré une immunosuppression plus importante chez les cas que chez les témoins. L'instauration d'une prophylaxie par TMP-SMX avait permis de stopper l'épidémie.

Au début des années 1990, trois publications de Bensoussan *et al.* (120), Chave *et al.* (121) et Hennequin *et al.* (122), faisaient état de cas groupés parmi les transplantés rénaux. Ces articles rapportaient des épisodes respectivement de 10, 5 et 7 cas. La biologie moléculaire n'a pas été utilisée dans ces études (trop anciennes), mais les deux premiers auteurs ont toutefois évoqué la possibilité d'une transmission inter patient, alors que Hennequin *et al.* (122) préconisaient l'utilisation des techniques de typage moléculaire avant de conclure. A noter la publication de Chave *et al.* (121) qui évoquait la contamination d'un greffé rénal par un patient VIH+ atteint de pneumocystose.

Les premières études utilisant le typage moléculaire ont été publiées au début des années 2000. Selon les articles, différentes méthodes de génotypage sont décrites, avec différentes techniques mais aussi différents gènes cibles. La cible de typage la plus fréquemment utilisée est le locus ITS, par différentes méthodes : séquençage seul (32,91), MLST (93,98) ou SSCP (99). Le séquençage seul du gène codant pour la DHPS (116) et le gène mt LSU RNA 85 (115) est également utilisé. Ces études aboutissaient, pour la majorité, à la même conclusion. Seul Olson *et al.* en 2001 (115), avec une méthode de séquençage de mt LSU RNA 85, se prononçait en faveur d'une transmission inter-humaine non prédominante. Dans les autres publications, les auteurs attribuaient les cas groupés à un génotype prédominant et donc à une source commune de contamination des différents patients. Ces données renforcent les hypothèses de transmission nosocomiale inter patients de la maladie. Le génotypage de *Pneumocystis* a permis de relier entre eux des cas de pneumocystose survenus dans des services de transplantés rénaux sur des périodes relativement courtes. Seules les études les plus récentes évoquent la transmission

interhumaine comme mode principal de contamination dans ce genre d'épidémies même si certaines n'excluent pas complètement une source environnementale commune plutôt d'origine nosocomiale.

Toutes ces études montrent l'intérêt de la mise en place de mesures barrières face à un patient atteint de pneumocystose en particulier s'il est hospitalisé dans un service accueillant des patients immunodéprimés.

Références	Année de publication	Nombre de patients	Méthode de genotypage	Nombre de génotypes retrouvés	Investigation épidémiologique réalisée	Hypothèse des auteurs
Hardy <i>et al.</i> (119)	1984	14	Non	-	Étude cas-témoins	Données insuffisantes pour conclure sur un type de transmission
Bensouan <i>et al.</i> (120)	1990	10	Non	-	Non	Transmission interhumaine
Chave <i>et al.</i> (121)	1991	5	Non	-	Oui	Transmission depuis un patient VIH+ vers un patient immunodéprimé
Hennequin <i>et al.</i> (122)	1995	7	Non	-	Non	Utilisation du typage moléculaire
Olsson <i>et al.</i> (115)	2001	17	mt LSU RNA 85	3 types mt LSU	Oui	Transmission interhumaine mais non prédominante
Rabodominina <i>et al.</i> (116)	2004	8	SSCP multi cibles	19 types différents pour tous les patients (différents bâtiments et types de patients)	Oui	Transmission nosocomiale interhumaine
Höcker <i>et al.</i> (99)	2005	4	SSCP multi cibles	2 types identiques chez tous les patients	Oui	Transmission nosocomiale interhumaine
De Boer <i>et al.</i> (91)	2007	22	Séquençage ITS	2 types dont 1 (type Ne) chez 12 patients sur 16 analysés	Oui	Transmission interhumaine ou source environnementale
Schmoldt <i>et al.</i> (93)	2008	20	MLST	1 seul type MLST chez les patients concernés par l'épisode	Oui	Transmission nosocomiale interhumaine
Yazaki <i>et al.</i> (32)	2009	27	Séquençage ITS	1 seul type (Bi)	Oui	Transmission nosocomiale interhumaine
Gianella <i>et al.</i> (98)	2009	19	MLST	1 seul type MLST pour 7 échantillons analysés	Oui	Transmission nosocomiale interhumaine
Arichi <i>et al.</i> (123)	2009	10	Non	-	Étude cas-témoins	Transmission nosocomiale interhumaine

Tableau 4 : Publications rapportant des cas groupés de pneumocystose chez des transplantés rénaux.

IV. *Pneumocystis* et transplantation rénale

Le rein a été le premier organe transplanté avec succès chez l'homme et cette intervention est aujourd'hui associée à un taux élevé de réussite. La transplantation rénale libère les patients de la nécessité d'une dialyse, mais le processus de sélection d'un rein adapté à la transplantation pour un patient donné est complexe. Même en cas de compatibilité parfaite, le maintien du greffon ne peut être garanti à vie chez un patient. De ce fait, les patients transplantés doivent prendre des traitements immunosuppresseurs afin d'éviter le rejet du rein transplanté. Ces médicaments, comme tout traitement immunomodulateur, provoquent une immunodépression chez les patients qui les rend plus susceptibles aux infections. Les patients transplantés doivent prendre ces traitements médicamenteux à vie, ou tant que le greffon reste fonctionnel.

A. Pneumocystose et transplantation d'organe

La pneumocystose est une pathologie connue depuis longtemps pour son impact chez les transplantés d'organe. D'anciens rapports établis avant l'introduction de la prophylaxie décrivent les taux d'attaque les plus importants chez les transplantés de poumon ou cœur-poumon avec des incidences allant de 10 à 40 %. Chez les transplantés de foie et de rein l'incidence était moins importante de 2 à 10-15 % (124). Ces taux ont fortement diminué depuis l'introduction de la prophylaxie en post-greffe et une utilisation un peu moins intensive des corticostéroïdes (125).

B. Immunosuppression en transplantation rénale

Les deux contraintes majeures en transplantation rénale sont d'éviter les épisodes de rejet aigu du greffon et de limiter les effets secondaires des immunosuppresseurs. Chaque épisode de rejet présente un facteur de risque majeur de perte du greffon. Le risque de rejet est plus élevé durant les trois premiers mois suivant la greffe et maximal durant le premier mois. Une période d'induction avec une immunosuppression forte est nécessaire durant cette période. A ce moment, les patients sont donc particulièrement sensibles aux infections. Dans la majorité des cas, la pneumocystose survient dans les 3 à 6 mois post-transplantation (119,126,127). C'est pourquoi, une prophylaxie est recommandée durant les 6 premiers mois de la greffe (128,129).

Parmi les immunosuppresseurs les plus utilisés en transplantation rénale, on retrouve les inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine et tacrolimus). Ils sont utilisés en temps qu'immunosuppresseur principal. Ils inhibent la transcription des gènes des cytokines. Les inhibiteurs de la calcineurine présentent la particularité d'être néphrotoxiques et donc de poser des problèmes lors de leur utilisation.

Le sirolimus agit également sur les gènes des cytokines mais en inhibant la mTOR (mammalian target of rapamycin). Il ne présente pas la néphrotoxicité de la ciclosporine et du tacrolimus.

Il existe également des inhibiteurs de la synthèse des purines (azathioprine et mycophénolate mofétil (MMF), des anticorps antilymphocytaires (OKT3 et ATG), des anticorps antirécepteurs à l'interleukine-2 (daclizumab et basiliximab) qui sont plus spécifiques que les anticorps antilymphocytaires.

L'usage associé des corticostéroïdes reste toujours incontournable malgré leurs très nombreux effets secondaires.

C. Facteurs de risques

1. Thérapeutiques immunosuppressives

Les risques de pneumocystose augmentent avec l'intensité de l'immunosuppression. Dans un établissement, l'incidence de la pneumocystose était passée de 3 % quand les patients étaient traités par azathioprine, à 9 % quand ils sont passés à la ciclosporine (119). Dans une autre étude, l'incidence était de 1 % chez les patients traités par ciclosporine et de 14 % chez ceux traités par tacrolimus (127).

Le sirolimus aurait, lui aussi, tendance à potentialiser le risque de pneumocystose (130,131). Il a également la particularité d'être associé à des pneumopathies interstitielles qui peuvent être confondues ou coexister avec une pneumocystose (132).

A contrario, le MMF avait montré des effets protecteurs contre *Pneumocystis* chez un modèle murin (133) probablement dû à sa capacité à se lier à l'inosine monophosphate

deshydrogénase de *Pneumocystis* (134). Des études cliniques semblaient confirmer cette hypothèse (135-137). Mais dans une étude cas-témoins de 2009, le traitement par MMF est significativement associé à un risque prédictif de pneumocystose (123).

Une analyse rétrospective réalisée chez des patients non VIH retrouvait un traitement par corticostéroïdes dans plus de 90 % des cas. Les doses et durées médianes retrouvées étaient de 30 mg/j de prednisone pendant plus de 12 semaines (138).

2. Facteurs cliniques

Le traitement des épisodes de rejet apparaît comme étant un facteur de risque évident du fait de la nécessité d'une intensification de l'immunosuppression. Dans une étude cas-témoin le traitement pour un, deux ou trois et plus épisodes de rejet augmentait le risque de pneumocystose de 2, 5 et 10 % respectivement comparé aux patients non traités (139).

Les infections à CMV se produisent fréquemment en même temps qu'une pneumocystose (119,139,140). Il semblerait que ces co-infections soient principalement le reflet d'un état d'immunodépression sévère, mais certains pensent qu'il pourrait aussi s'agir de l'effet immunosuppresseur intrinsèque du CMV (139). Dans une autre étude le risque relatif de pneumocystose pour 0, 1 ou 2 et plus épisodes de CMV était de 1, 2,32 et 13 respectivement (141). Dans cette même étude, la tuberculose, les infections pulmonaires bactériennes et l'hépatite C sont également décrits comme des co-facteurs (141).

L'association pneumocystose-taux de CD4 < 200/mm³ est un phénomène connu depuis de nombreuses années chez les patients VIH+ (142). Cette association a également été décrite chez les transplantés rénaux (143).

Deuxième partie :

Cas groupés de pneumocystose dans un service de Néphrologie

I. Alerte

L'alerte a été donnée au mois de septembre 2009 devant une recrudescence des cas de pneumocystose dans le service de néphrologie du CHU de Limoges chez des transplantés rénaux.

En effet, au cours de l'été 2009, quatre cas ont été dénombrés, dont deux pour le mois d'août. Les cliniciens du service avaient remarqué que cette pathologie, rarissime auparavant, était en recrudescence chez leurs patients. Sept patients avaient développé la pathologie depuis le début de l'année 2009. En fait, l'épidémie avait débuté depuis mai 2008 avec 3 cas. Un cas a également été retrouvé à la fin de l'année 2007. Ce patient constitue le patient 0 de cet épisode. Entre septembre 2009 et février 2010, trois nouveaux cas viendront compléter la liste. Au total, cet épisode a concerné 15 patients, dont 14 transplantés rénaux sur une période de 29 mois (novembre 2007 à février 2010).

II. Investigation

Suite à cette alerte, les investigations ont eu plusieurs orientations : épidémiologique, mycologique et génotypique. La première étape a consisté en la vérification de la réalité de cette recrudescence en réalisant une enquête rétrospective des cas de pneumocystose au CHU de Limoges et plus particulièrement dans le service de néphrologie. La deuxième étape a été de s'intéresser aux patients atteints de la maladie : une définition d'un cas a été instaurée et une analyse des caractéristiques des patients a été réalisée. Ces patients étant très souvent à l'hôpital, une analyse approfondie de leurs différents séjours a été réalisée afin de déterminer s'il existait des liens entre eux. Par la suite, la question d'une enquête environnementale s'est posée mais n'a pas abouti du fait d'un manque de matériel adapté. En effet, la recherche de *P. jirovecii* dans l'environnement se fait à partir de prélèvement d'air réalisé à l'aide d'un collecteur d'air spécial (Coriolis de chez Bertin) qui concentre le prélèvement dans un liquide à partir duquel l'ADN peut être extrait et une PCR réalisée. Malheureusement, cet appareil n'est pas en la possession de l'unité d'hygiène. La recherche de portage chez le personnel soignant a également été

envisagée. Cette recherche doit, de préférence, se faire lors de l'hospitalisation d'un patient atteint et après l'alerte le port de masque étant recommandé, cette recherche n'avait plus d'intérêt. De plus, les quantités d'ADN recueillies dans l'environnement et dans les cas de portage sont souvent insuffisantes pour poursuivre les investigations (exemple : génotypage). Les ADN extraits des prélèvements de patients ayant été conservés, un génotypage des souches des patients a pu être réalisé.

III. Matériels et méthodes

A. Contexte

Le centre hospitalier universitaire de Limoges compte environ 2000 lits, répartis sur deux sites et cinq hôpitaux (Hôpital Dupuytren, Hôpital Mère-Enfant, Hôpital Le Cluzeau, Hôpital Jean Rebeyrol et Hôpital Dr Chastaingt).

Le service de néphrologie se situe au quatrième étage de l'hôpital Dupuytren qui est le bâtiment principal. Le service comprend 19 lits d'hospitalisation traditionnelle, 5 lits de soins intensifs dont 2 chambres adaptées aux greffés rénaux en post-greffe, 3 lits de dialyse et 2 pièces réservées à l'hôpital de jour. La file active de transplantés rénaux suivis dans le service était de 495 patients au 22/04/2010. Ce service travaille en étroite collaboration avec le service d'hémodialyse qui se situe dans une annexe de l'hôpital Dupuytren. C'est également dans cette annexe que se déroulent les consultations externes des transplantés rénaux et de néphrologie.

Le secteur des consultations externes dispose d'une salle d'attente commune aux greffés et aux autres patients suivis dans le service ; une salle de prélèvement ; 2 bureaux de consultation et une salle de restauration. Les consultations des greffés sont programmées le matin et plusieurs patients sont convoqués le même jour. Il n'est pas rare que deux patients soient reçus en même temps dans la salle de prélèvement. Après la réalisation du bilan biologique, ils se retrouvent dans la salle de restauration où leur est servi un petit déjeuner. Cette salle est de petite taille et peu aérée. Les patients convoqués un même jour s'y

retrouvent mais n'y croisent pas les autres patients venus en consultation contrairement à la salle d'attente.

B. Génotypage des séquences ITS

Cette méthode sera celle utilisée dans la suite du travail pour la détermination des génotypes des souches des patients de cet épisode de cas groupés. Cette technique n'a pas été mise au point au laboratoire. Le protocole nous a été fourni par le Professeur Gilles Nevez du CHU de Brest qui avait déjà utilisé cette technique pour plusieurs publications, en se basant sur la méthode décrite par Tsolaki *et al.* (103). Ce protocole a été suivi, à l'exception de la Hot start Taq polymérase qui a été remplacée par une Taq polymérase classique.

Les séquences ITS ont d'abord été amplifiées par une réaction de PCR nichée ou nested PCR, puis séquencées.

a) Réaction de PCR nichée

Une réaction de nested PCR a été réalisée selon les conditions réactionnelles décrites par Tsolaki *et al.* (102) avec une modification de la durée d'extension de la PCR interne.

Les amorces utilisées sont spécifiques de *P.jirovecii* :

- N18SF (5'-GGT CTT CGG ACT GGC AGC-3') et N26SRX (5'-TTA CTA AGG GAA TCC TTG TTA-3') sont les amorces utilisées pour la PCR externe.
- ITS F3 (5'-CTG CGG AAG GAT CAT TAG AAA-3') et ITS 2 R3 (5'-GAT TTG AGA TTA AAA TTC TTG-3') sont les amorces utilisées pour la PCR interne.

L'amplicon obtenu a une taille de 517 paires de bases (pb).

(1) Réaction de PCR externe

Elle a été réalisée dans un volume final de 50 μ L. Le mélange réactionnel comprenait :

- les amorces N18SF et N26SRX à la concentration finale de 1 μ M chacune ;
- 1 unité de Taq DNA Polymérase (New England Biolabs) ;
- des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) à la concentration finale de 0,2 mM chacun ;
- du $MgCl_2$ à la concentration finale de 3 mM ;
- 5 μ l de tampon de réaction ;
- 10 μ L d'ADN extrait ;
- et de l'eau pour préparation injectable pour compléter le volume à 50 μ L

La PCR a été réalisée sur le thermocycleur GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) et comprenait les étapes suivantes :

- 1 cycle de dénaturation de 5 min à 94°C

- * une dénaturation à 94°C pendant 1 min 30
 - * une hybridation à 55°C pendant 1 min 30
 - * une extension à 72°C pendant 2 min
- } 40 cycles

- puis une extension à 72° C pendant 7 min.

(2) Réaction de PCR interne

Elle a été réalisée dans un volume final de 50 μ L. Le mélange réactionnel comprenait :

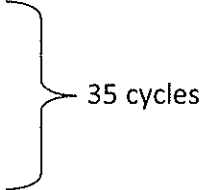
- les amorces ITS F3 et ITS 2 R3 à la concentration finale de 1 μ M chacune ;
- 1 unité de Taq DNA Polymérase (New England Biolabs) ;
- les dNTP à la concentration finale de 0,2 mM chacun ;
- du $MgCl_2$ à la concentration finale de 3 mM ;
- 5 μ l de tampon 5X ;
- 1,5 μ L du produit de PCR externe ;
- de l'eau pour préparation injectable pour compléter le volume à 50 μ L.

Pour chaque échantillon, la PCR interne a été réalisée 2 fois, soit au final 100µl de produit de PCR interne.

La PCR a été réalisée sur le même thermocycleur et comprenait les étapes suivantes :

- 1 cycle de dénaturation 5 min, 94°C

* une dénaturation à 94°C pendant 1 min 30
* une hybridation à 55°C pendant 1 min 30
* une extension à 72°C pendant 5 min



au lieu de 2 min dans le protocole décrit par Tsolaki et *al.*

- puis une extension à 72°C pendant 7 min.

Dans le protocole fourni par le Pr Gilles Nevez, la réaction de PCR était suivie d'une réaction de clonage avant le séquençage. Cette étape permet d'améliorer la sensibilité de la technique en augmentant la quantité d'ADN et de détecter des infections mixtes. Cette étape n'a pas été utilisée pour ce travail.

b) Révélation des produits d'amplification

Cinq microlitres de chacun des produits de la réaction de PCR interne ont été révélés par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5 % en tampon Tris Borate EDTA (TBE, Sigma). Le gel a ensuite été plongé 20 minutes dans un bain de bromure d'éthidium à une concentration de 1 µg/mL. Après rinçage à l'eau distillée, le gel a été exposé aux rayons UV pour mettre en évidence les bandes recherchées par comparaison à un témoin de poids moléculaire (123 bp DNA ladder®, Invitrogen, life technologies). La taille attendue du fragment était de 517 pb.

Les produits de PCR ont ensuite été purifiés à l'aide du kit Powerprep Express PCR purification kit (Marligen Biosciences).

c) PCR de séquence

Par la suite une PCR de séquence a été réalisée avec les amorces utilisées pour la PCR interne. Le mélange réactionnel comprenait :

- 2 pmol d'une seule amorce (sens ou anti-sens) ;
- 4 µl d'ADN amplifié ;
- 2,5 µl de Big Dye (Mix Applied Biosystems , Foster-City, USA) qui contient les dNTP, les ddNTP, l'enzyme ;
- 2 µL de tampon.

La PCR a été réalisée toujours à l'aide du même thermocycleur avec le programme suivant:

* Dénaturation 10 s à 96°C	}	25 cycles
* Hybridation 5 s à 50°C		
* Elongation 4 min à 60°C		

Les produits de PCR obtenus ont ensuite été purifiés par une technique de purification à l'éthanol en plaque. Les échantillons ont été transférés dans une plaque de séquençage. Le mélange suivant a été réalisé pour un puit :

Acétate de sodium 3M	1 µL
EDTA 125mM	1 µL
Ethanol 95% glacial	<u>50 µL</u>
Total	52 µL

Par la suite les différentes étapes ont été réalisées :

- Recouvrir et mélanger par retournement pendant 15 secondes ;
- Laisser 15 minutes sur la paillasse à l'abri de la lumière ;
- Centrifuger pendant 30 minutes à 3300 rpm à 15°C ;
- Jeter le surnageant en retournant brusquement la plaque une fois (projetée) ;
- Centrifuger brièvement la plaque retournée sur un papier absorbant préalablement changé : 1 minute à 1000 rpm.

Laver le culot avec 50 μ L d'éthanol à 70 % glacial, fait du jour même :

- Centrifuger pendant 15 minutes à 3300 rpm à 15°C ;
- Jeter le surnageant en retournant brusquement la plaque une fois (projetée) ;
- Centrifuger brièvement la plaque retournée sur un papier absorbant préalablement changé : 1 minute à 1000 rpm (permet d'éliminer les traces résiduelles d'éthanol) ;
- laisser sécher 5 minutes sur la paillasse ;

Reprendre le résidu avec 15 μ L de formamide :

- Incuber 3 minutes exactement à 95°C (dans le thermocycleur) ;
- Placer immédiatement les tubes dans la glace et laisser 3 minutes ;
- Vortexer et centrifuger brièvement.

d) Analyse des séquences

Les séquences obtenus ont été vérifiées puis alignées à la séquence consensus décrite par Lee *et al.* (104) qui sert de base au génotypage. Après analyse et comparaison des séquences obtenues, le génotype a été déterminé à l'aide de la publication de Lu *et al.* (101) et aussi celle de Van Hall *et al.* (105) décrivant de nouveaux génotypes. Les séquences ont été alignées grâce au logiciel ClustalW2 (EMBL-EBI). A partir des séquences alignées un arbre phylogénétique a pu être construit, toujours à l'aide du même logiciel. Le phylogramme a été obtenu en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with arithmetic Average) en laissant les paramètres par défaut. Cet arbre sert essentiellement à illustrer le résultat du génotypage.

C. Enquête épidémiologique

1. Données microbiologiques

Les données pour l'enquête mycologique rétrospective ont été obtenues à partir du logiciel de gestion du laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Glims® (MIPS, Belgique). Les données antérieures à 2006 ont été obtenues à partir des cahiers du laboratoire de Parasitologie-Mycologie.

2. Données cliniques

Les données cliniques des patients ont été récupérées à l'aide du dossier patient informatisé et/ou du dossier papier. Toutes ces données ont été saisies dans un tableur Excel qui a également servi à réaliser une analyse statistique descriptive de la population de l'étude.

3. Données administratives

Les codes postaux des patients ont été retrouvés à partir des dossiers. Les données concernant les passages des patients dans le CHU ont été extraites du système de gestion des mouvements centralisés. Ces données ont également été saisies dans un tableur Excel qui a permis la construction d'un tableau synoptique.

IV. Résultats

A. Enquête rétrospective : Pneumocystose au CHU de Limoges

1. Evolution du diagnostic

La recherche de *P. jirovecii* (anciennement *P. carinii*) est effectuée depuis plus de 25 années par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges. La recherche se fait par examen direct après coloration de May-Grunvald-Giemsa (MGG) et par une technique d'immunofluorescence (Monofluo Kit *P. jirovecii*® de chez Bio-Rad). La technique de PCR a été mise au point en 2000 et est utilisée en routine depuis cette date, en plus des 2 autres techniques. Le gène cible de cette PCR est mt LSU RNA. Une PCR en temps réel quantitative est en cours de mise au point au laboratoire.

Une étude sur l'apport de la PCR a été réalisée par le laboratoire entre 2000 et 2005 : 41 prélèvements avaient été retrouvés positifs. Ces prélèvements concernaient 34 patients. Parmi eux, 19 étaient positifs uniquement par PCR, les deux autres méthodes diagnostiques étant négatives. Pour ces prélèvements, le diagnostic de pneumocystose a été retenu pour 14 d'entre eux (12 patients). Pour les 5 autres prélèvements, les diagnostics d'infection fongique, pneumopathie bactérienne et insuffisance respiratoire ont été retenus. Sur cette période de 5 ans, la PCR avait permis d'étiqueter une pneumopathie chez 12 patients pour lesquels les techniques de diagnostics classiques étaient négatives. La plus grande sensibilité de la technique implique que le résultat soit confronté à la clinique avant de poser le diagnostic.

Le nombre de demandes de recherche de *P. jirovecii* est stable au cours du temps et se situe autour de 150 demandes par an.

2. L'évolution du nombre de cas de pneumocystose

Le nombre de cas de pneumocystose détectée au laboratoire a été analysé. Les données de laboratoire ont permis de remonter jusqu'à 1987 et de retrouver 171 prélèvements positifs au CHU de Limoges (figure 4). Ce schéma permet de visualiser l'évolution du nombre de cas au cours du temps au CHU. Le nombre de cas retrouvés chaque année est très variable : de 1 en 1997, 1999 et 2000 à 22 cas en 2009 pendant l'épidémie dans le service de néphrologie.

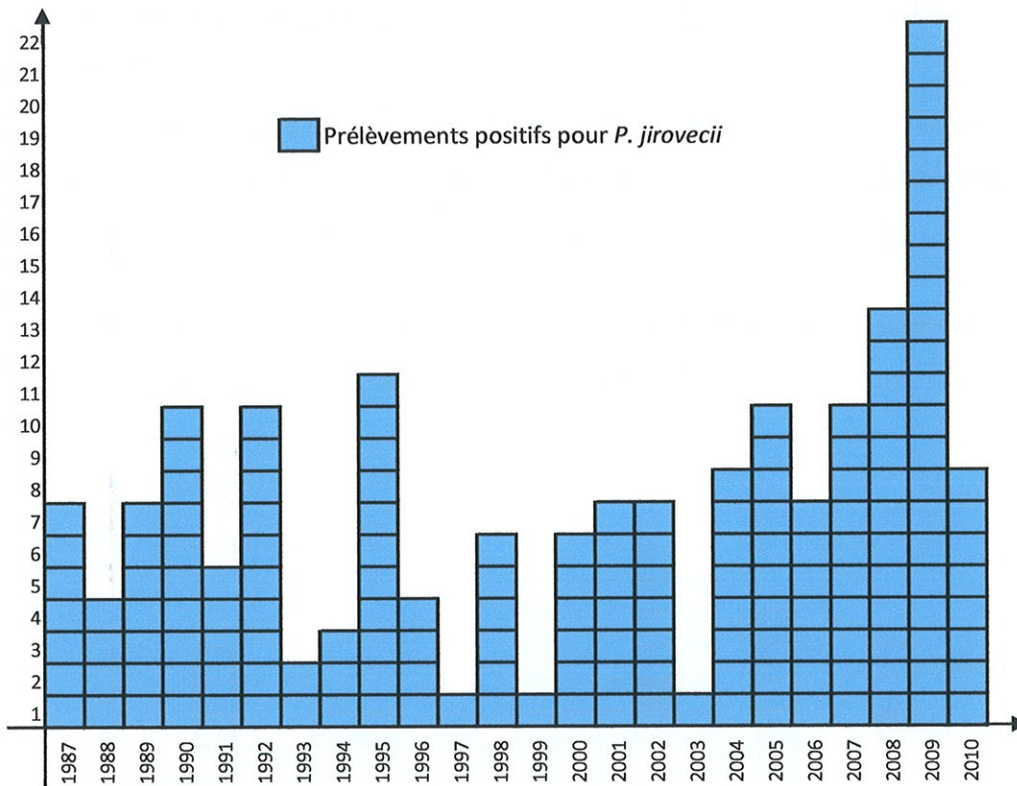


Figure 4 : Evolution du nombre de prélèvements positifs pour *P. jirovecii* au CHU de Limoges entre 1987 et 2010.

La courbe épidémiologique réalisée depuis 1987 (figure 5), répertoriant les cas dans le service de néphrologie, permet de confirmer un pic de cas de pneumocystose, ce qui confirme que l'on est bien en présence d'un phénomène épidémiologique.

B. Les patients

1. Définition d'un cas

Un cas a été défini comme tout patient suivi dans le service de néphrologie ayant un prélèvement respiratoire positif à *P. jirovecii*, associé à une clinique évocatrice.

2. Descriptions des cas

Les caractéristiques générales des patients sont regroupées dans le tableau 5.

Patient 0 (B-B)

Ce patient est le premier de la série à avoir développé une pneumocystose en néphrologie. Ce patient a été greffé des suites d'une hyalinose segmentaire et focale le 11/04/2005. Il a été hospitalisé le 4 novembre 2007 pour fièvre prolongée et toux sèche évoluant depuis 5 jours. Le jour de son hospitalisation, son traitement anti-rejet était à base de mycophénolate mofétil (MMF) et sirolimus. La radiographie pulmonaire montrait des opacités interstitielles des 2 bases. Quatre jours après son entrée, un lavage broncho-alvéolaire permettait la mise en évidence de *P. jirovecii* par PCR. Le diagnostic de pneumocystose était retenu et le patient a été placé sous TMP-SMX. Une perturbation du bilan hépatique, avec cytolyse et cholestase apparue sous TMP-SMX, n'a pas compromis la suite du traitement. Un dosage des CD4 a été réalisé et montrait un taux à 326/mm³.

Patient 1 (R-J) :

Il s'agit d'un homme de 76 ans suivi en néphrologie pour dystrophie kystique, greffé le 02 novembre 2001. Son traitement anti-rejet initial était : anti CD-25, MMF, corticostéroïdes et ciclosporine. Dans ses antécédents, on retrouvait un rejet aigu en février 2004 traité par corticothérapie. En 2008, la ciclosporine était remplacée par le sirolimus devant une atteinte cutanée. Il a été hospitalisé le 11/05/2008. Le traitement par TMP-SMX sera rapidement remplacé par l'atovaquone pour insuffisance rénale aiguë (IRA). Un retour à la ciclosporine était également effectué du fait d'un doute sur l'étiologie de l'IRA. Le jour de

l'hospitalisation, le traitement immunosuppresseur du patient comprenait : sirolimus, MMF et corticostéroïdes. Le taux de CD4 de ce patient n'a pas été recherché.

Patient 2 (M-MC) :

Le patient 2 est une femme de 54 ans atteinte de néphropathie tubulo-interstitielle sur reflux et ayant des antécédents de lymphome B induit en février 2007, actuellement en rémission et traité par Mabthera®. Cette patiente a été greffée le 1^{er} octobre 1990, soit il y a près de 19 ans. Elle était hospitalisée le 18 juin 2008 pour une toux associée à une dyspnée persistante malgré un traitement antibiotique empirique pour pneumopathie. Son traitement anti-rejet était une association de MMF + corticostéroïdes. Le 21 juin un TDM thoracique était réalisé et montrait une infiltration en faveur d'une surinfection pulmonaire bilatérale. Un 2^{ème} TDM montrera un syndrome interstitiel diffus avec aspect de verre dépoli. Le 23 juin, un liquide de lavage broncho-alvéolaire positif à *P. jirovecii* en PCR posait le diagnostic de pneumocystose. Un traitement par TMP +SMX était alors mis en place suivi d'un relais par atovaquone, suite à une intolérance clinique et biologique au TMP-SMX (leucopénie modérée + augmentation de la créatinine). Le taux de CD4 était de 297/mm³ le 25 juin (J7).

Patient 3 (V-N) :

Il s'agit d'une femme de 39 ans suivie depuis de nombreuses années pour néphropathie tubulo-interstitielle chronique sur spina bifida. Elle a été greffée une première fois le 26 janvier 1996 et a présenté un premier rejet aigu à un an et demi de la transplantation, compliquée de néphropathie chronique de l'allogreffe (NCA). Une deuxième transplantation a été réalisée le 31 mars 2008. Par la suite la patiente a présenté un rejet humoral en août 2008 traité par immunoglobuline. Elle était hospitalisée le 14 novembre 2008 pour toux, dyspnée et fébricule. Une radiographie pulmonaire montrait un foyer de pneumopathie en base gauche. La pneumocystose était confirmée par le LBA positif à *P. jirovecii* et traitée par TMP-SMX puis par atovaquone pour cause d'une insuffisance rénale aiguë sous TMP-SMX. Le 11 novembre elle avait un taux de CD4 à 79/mm³.

Patient 4 (M-E) :

Le patient 4 est un homme de 35 ans atteint de polykystose rénale de type HR. Il a été transplanté le 2 octobre 2005 et son traitement initial anti-rejet était composé de : tacrolimus, anti CD25, MMF et corticostéroïdes. En février 2008, un rejet humoral était traité par Mabthera®, échanges plasmatiques et immunoglobulines. En novembre 2008, il présentait une colite à CMV compliquée d'une insuffisance rénale aiguë. Il était hospitalisé de nouveau le 26 janvier 2009 pour insuffisance rénale aiguë, altération de l'état général, toux et dyspnée aiguë. La radiographie pulmonaire réalisée ne montre rien de particulier et aucun TDM thoracique n'a été réalisé. Le 4 février, le liquide de lavage broncho-alvéolaire était positif à *P.jirovecii* à l'examen direct, par immunofluorescence et par PCR. Un traitement par TMP-SMX et corticostéroïdes était mis en place. Le TMP-SMX sera remplacé par l'atovaquone et aérosol de pentamidine après une pancytopenie et une insuffisance rénale aiguë sous TMP-SMX. Le TMP-SMX sera réintroduit devant l'inefficacité du deuxième traitement. Les CD4 du patient étaient à 110/mm³ le 28 janvier.

Patient 5 (G-D) :

Il s'agit d'une femme de 59 ans atteinte de néphropathie diabétique (type 1) et vasculaire, greffée le 12 avril 2007 et mise initialement sous sérum anti-lymphocytaire, tacrolimus et MMF. La greffe s'est compliquée d'une sténose artérielle du greffon, sans geste, qui n'a pas eu de retentissement sur le débit de filtration glomérulaire. Au mois d'octobre 2008, la patiente présentait un épisode de CMV. Elle était hospitalisée le 26 février 2009 pour toux, dyspnée et altération de l'état général depuis 10 jours avec un taux de CD4 très bas à 38/mm³. Son traitement anti-rejet, le jour de son hospitalisation, était une association tacrolimus et MMF. La radiographie pulmonaire réalisée montrait des opacités nodulaires bilatérales. Le LBA réalisé le 27 février était positif en immunofluorescence et par PCR. Le diagnostic de pneumocystose était retenu et un traitement par TMP-SMX débuté ainsi que par linezolid (ZYVOXID®), du fait de l'isolement concomitant d'un *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline dans le LBA. Cette patiente ne présentera pas d'effets indésirables dus au TMP-SMX.

Patient 6 (G-R) :

Le patient 6 est un homme de 71 ans suivi pour glomérulonéphrite pauci-immune. Il a été transplanté le 22 août 2008 et mis sous anti-CD 25, corticostéroïdes, ciclosporine et MMF. Ce patient n'a, à ce jour, pas présenté de complications de sa greffe. Il a été hospitalisé le 16 mai 2009 sous ciclosporine et MMF. Un LBA, réalisé le jour de l'hospitalisation, était positif à *P. jirovecii* pour les trois techniques. Un traitement par TMP-SMX est débuté. Il sera switché par l'atovaquone pour cause d'insuffisance rénale aiguë sous TMP-SMX. Les CD4 du patient étaient à 264/mm³ à six jours d'hospitalisation.

Patient 7 (M-HH) :

Il s'agit d'une femme de 77 ans dont la maladie rénale initiale était une insuffisance rénale chronique sur hyalinose segmentaire et focale. La transplantation rénale a eu lieu le 17 avril 2005. Son traitement immunosuppresseur de départ était : anti-CD 25, rapamune, MMF et corticostéroïdes. Cette patiente, suivie au CHU, vient de façon moins fréquente que les autres patients. Elle a été hospitalisée le 17 juin 2009. A l'entrée, elle était sous tacrolimus et azathioprine. La patiente était peu symptomatique mais présentait une altération de l'état général avec une dégradation de la fonction rénale. Le 1^{er} juillet, un LBA se révélera positif à *P. jirovecii* en immunofluorescence et par PCR. Le diagnostic de pneumocystose était retenu après 13 jours d'hospitalisation. Le 29 juin, ses CD4 étaient à 135/mm³. Le traitement par TMP-SMX mis en place sera bien toléré. Au cours de cette même hospitalisation, la patiente présentera un épisode de CMV.

Patient 8 (G-C) :

Le 8^{ème} cas est une femme de 59 ans suivie initialement pour une maladie de Berger. Cette patiente a bénéficié d'une première greffe le 22 juillet 1987 puis d'une deuxième le 1^{er} novembre 2007. Le rejet du premier greffon a eu lieu pour cause d'une récurrence IgA. Pour la deuxième greffe, le traitement initial anti-rejet comportait : sérum anti-lymphocytaire, tacrolimus, MMF et corticostéroïdes. Elle est entrée à l'hôpital le 22 juin 2009 avec une altération de l'état général et une toux sèche persistante depuis 15 jours. La radiographie

pulmonaire montrait un syndrome interstitiel bilatéral. Le diagnostic de pneumocystose était posé devant un LBA positif (le 24 juin) pour les trois techniques de détection. Le traitement par TMP-SMX devra être arrêté devant une insuffisance rénale aiguë et sera remplacé par l'atovaquone. Le 1^{er} juillet, la patiente a dû être transférée en réanimation où elle sera mise sous ventilation mécanique et extubée quatre jours plus tard.

Patient 9 (B-JA) :

Le patient 9 est un homme de 58 ans souffrant de polykystose hépato-rénale. Il a été transplanté le 30 août 2008. Son traitement anti-rejet initial était : tacrolimus, anti-CD25, MMF et corticostéroïdes. A J12 post-greffe, le patient a présenté une nécrose tubulaire aiguë. Il a été hospitalisé le 11 août 2009 avec une toux et dyspnée depuis 3 semaines associées à une altération de l'état général. La radiographie pulmonaire ne montrait rien de particulier. Un scanner thoracique était alors réalisé ainsi qu'un LBA. Le scanner montre une pneumopathie interstitielle diffuse bilatérale associée à un infiltrat micronodulaire et un aspect en verre dépoli. Le LBA était positif à *P. jirovecii* pour les trois techniques. Le traitement par TMP-SMX sera bien toléré. Au moment de son hospitalisation, son traitement immunosuppresseur associait le tacrolimus au MMF. Un dosage des CD4, réalisé quelques jours avant son hospitalisation, montrait un taux à 175/mm³.

Patient 10 (G-F) :

Il s'agit d'un homme de 58 ans suivi pour maladie de Berger. Ce patient a bénéficié d'une première transplantation en 1994. Une deuxième a été pratiquée le 23 octobre 2007. Le traitement immunosuppresseur de base était : sérum anti-lymphocytaire, tacrolimus, MMF et corticostéroïdes. En 2008, le patient a présenté un rejet humoral traité par échanges plasmatiques et anti-DQ6. Le patient est admis à l'hôpital le 27 août 2008, il était sous tacrolimus, MMF et corticostéroïdes. Un LBA, réalisé le jour de son hospitalisation, se révélera positif à *P. jirovecii* avec les trois techniques. Le 31 août son taux de CD4 était de 166/mm³.

Patient 11 (C-AM) :

Il s'agit d'une femme de 67 ans qui a présenté une glomérulonéphrite membranoproliférative. Elle a été transplantée le 27 juillet 1995 et mise initialement sous sérum anti-lymphocytaire, ciclosporine, azathioprine et corticostéroïdes. Cette patiente souffre de bronchites à répétition et n'est traitée plus que par sirolimus du fait de lésions dermatologiques. Elle a été hospitalisée le 29 septembre 2009 pour une toux et une dyspnée (stade II NYHA) évoluant depuis cinq semaines. Seul le scanner thoracique montrait une pneumopathie interstitielle diffuse bilatérale associée à un infiltrat micronodulaire. La recherche de *P. jirovecii* effectuée sur un LBA du 30 septembre était positive, mais uniquement par PCR. La patiente a été traitée par TMP-SMX qui provoquera une agranulocytose et une anémie qui nécessitera la transfusion de deux culots globulaires. Un dosage des CD4 réalisé le 1^{er} octobre montrera un taux de CD4 à 131/mm³.

Patient 12 (P-B) :

Le patient 12 est un homme de 47 ans transplanté une première fois le 14 octobre 1999. Il était initialement atteint de néphropathie de reflux. Il vient en consultation le 26 octobre pour suspicion de grippe H1N1. Il rentre à domicile, mais la symptomatologie ne s'améliore pas sous TAMIFLU®. Il sera hospitalisé le 4 novembre pour toux, asthénie et insuffisance rénale aiguë. A son arrivée, il était sous tacrolimus, MMF et corticostéroïdes. La radiographie thoracique montrera une suspicion de pneumocystose confirmée par la positivité du LBA. Le traitement par TMP-SMX devra être arrêté pour cause d'une insuffisance rénale aiguë et sera remplacé par l'atovaquone. Au moment du diagnostic de pneumocystose, le patient était dans un état d'immunodépression profonde avec des CD4 à 22/mm³.

Patient 13 (M-L) :

Il s'agit d'une patiente de 71 ans atteinte initialement de néphropathie tubulo-interstitielle d'origine lithiasique et greffée rénale le 22 janvier 2002. Elle est hospitalisée le 17 novembre dans une clinique de la ville pour dyspnée où un problème d'origine cardiaque est suspecté. Transférée au CHU après diagnostic radiologique d'une pneumopathie interstitielle

bilatérale, elle sera d'abord hospitalisée dans le service de Médecine Interne A puis en Réanimation Polyvalente suite à une dégradation de l'état respiratoire. Des séances de ventilation non invasives seront réalisées durant 3 jours. Le traitement initial par atovaquone, du fait de la suspicion d'une allergie au TMP-SMX, sera après vérification, remplacé par le TMP-SMX qui sera bien toléré.

Patient 14 (G-O) :

Le dernier cas est une patiente de 82 ans qui est la seule à ne pas être greffée rénale. Cette patiente est atteinte d'une polyangéite microscopique avec atteinte rénale traitée par 6 cures de cyclophosphamide puis azathioprine et corticostéroïdes en traitement d'entretien. Une semaine avant son hospitalisation, la patiente présentait une fièvre ainsi que des malaises sans perte de connaissance. Devant l'asthénie et la perte d'appétit, la patiente sera adressée au service de néphrologie où elle sera hospitalisée le 22 février 2010. Elle présentait une dyspnée d'effort et le scanner a mis en évidence un syndrome interstitiel bilatéral. Le diagnostic de pneumocystose a été confirmé par un LBA du 25 février 2010. Le traitement par TMP-SMX sera débuté et une dégradation de la fonction rénale apparaîtra mais ne nécessitera pas l'arrêt de la molécule.

<i>N° Patient</i>	<i>Date de naissance</i>	<i>Pathologie rénale initiale</i>	<i>Transplantation rénale</i>	<i>Episode de rejet</i>	<i>Traitement immunosuppresseur</i>	<i>Décès</i>
0	12/10/1946	Hyalinose segmentaire et focale	Oui	Non	MMF + sirolimus	Non
1	05/09/1932	Dystrophie Kystique	Oui	Non	MMF + sirolimus + corticostéroïdes	Non
2	28/04/1954	NTIC sur reflux	Oui	Non	MMF + corticostéroïdes	Non
3	18/05/1970	NTIC sur spina bifida	Oui	Oui	MMF + tacrolimus + corticostéroïdes	Non
4	07/02/1974	Polykystose rénale de type HR	Oui	Oui	Tacrolimus + corticostéroïdes	Non
5	18/09/1949	Néphropathie diabétique et vasculaire	Oui	Non	MMF + tacrolimus	Non
6	12/11/1938	Glomérulonéphrite pauci-immune	Oui	Non	MMF + ciclosporine	Non
7	22/08/1932	Hyalinose segmentaire et focale	Oui	Non	Tacrolimus + azathioprine	Non
8	21/02/1950	Maladie de Berger	Oui	Non	MMF + tacrolimus + corticostéroïdes	Non
9	20/04/1951	Polykystose hépato-rénale	Oui	Non	MMF + tacrolimus	Non
10	20/06/1951	Maladie de Berger	Oui	Oui	MMF + tacrolimus + corticostéroïdes	Non
11	09/06/1942	Glomérulonéphrite membranoproliférative	Oui	Non	Sirolimus	Non
12	27/04/1963	Néphropathie de reflux	Oui	Non	MMF + tacrolimus + corticostéroïdes	Non
13	02/06/1939	NTI d'origine lithiasique	Oui	Non	MMF + ciclosporine	Non
14	03/08/1928	Polyangéite	Non	.	Azathioprine + corticostéroïdes	Non

Tableau 5 : Description des principales caractéristiques des patients.

3. Caractéristiques générales de la population de l'étude

a) Les patients

Les patients avaient une moyenne d'âge de 60,9 ans (minimum : 35 ans ; maximum : 82 ans) et il y avait un peu plus de femmes que d'hommes (sexe ratio = 0,88). Dans la plupart des cas, le diagnostic a été évoqué dans les premiers jours d'hospitalisation, à l'exception d'une patiente chez laquelle le diagnostic a été posé à 13 jours d'hospitalisation (tableau 6). On dénombre 14 pneumocystoses sur 495 transplantés suivis par le service, ce qui représente un taux d'attaque de 2,82 %.

Les pathologies rénales initiales des patients étaient variées. Huit patients avaient déjà eu des complications liées à leur greffe (rejet...). Parmi tous ces patients, trois en étaient déjà à leur deuxième transplantation rénale. Une seule patiente (cas 14) était suivie en néphrologie pour polyangéite et n'avait pas eu de greffe rénale.

<i>N° Patient</i>	<i>Age</i>	<i>Sexe</i>	<i>Date admission</i>	<i>Date prélèvement</i>	<i>Délai diagnostic</i>	<i>Durée hospitalisation</i>
0	61	H	04/11/2007	08/11/2007	4	10
1	76	H	11/05/2008	13/05/2008	2	10
2	54	F	19/06/2008	23/06/2008	4	19
3	39	F	14/11/2008	15/11/2008	1	12
4	35	H	26/01/2009	28/01/2009	2	30
5	59	F	26/02/2009	27/02/2009	1	7
6	71	H	16/05/2009	16/05/2009	0	12
7	77	F	18/06/2009	01/07/2009	13	8
8	59	F	22/06/2009	24/06/2009	2	25
9	58	H	11/08/2009	11/08/2009	0	9
10	58	H	27/08/2009	27/08/2009	0	11
11	67	F	29/09/2009	30/09/2009	1	13
12	47	H	03/11/2009	05/11/2009	2	21
13	71	F	24/11/2009	24/11/2009	0	23
14	82	F	22/02/2010	25/02/2010	3	22
<i>Moyenne</i>	<i>60,9</i>	<i>0,88*</i>			<i>2</i>	<i>15,47</i>

Tableau 6 : Caractéristiques générales des patients *sexe ratio

La durée moyenne de séjour était de 15,47 jours pour l'hospitalisation pour pneumocystose avec un minimum à 7 jours et un maximum à 30 jours.

Tous les transplantés (sauf la patiente 3) avaient reçu une prophylaxie par TMP-SMX juste après la transplantation rénale pendant 6 mois. La patiente 3 avait bénéficié d'une prophylaxie par aérosol mensuel de pentamidine du fait d'une intolérance digestive du TMP-SMX. La patiente 14, non greffée, n'avait jamais reçu de prophylaxie.

b) Les prélèvements

La plupart des prélèvements positifs étaient des liquides de lavage broncho-alvéolaire donc des prélèvements protégés. Le patient 0 avait eu une aspiration bronchique positive. Cinq patients ont eu un prélèvement positif pour les 3 techniques de recherche de *P. jirovecii* utilisées soit 33,33 % et 20 % étaient positifs en immunofluorescence et en PCR (2 patients). Pour 7 patients, seule la PCR a permis de confirmer la présence de *P. jirovecii* dans les prélèvements respiratoires soit 40 % (tableau 7). Les échantillons d'ADN extraits des LBA pour réaliser la PCR diagnostic ont été conservés à -20°C.

N° patient	Date prélèvement	ED	IF	PCR	Type
0	08/11/2007	-	-	+	Aspiration bronchique
1	13/05/2008	-	-	+	LBA
2	23/06/2008	-	-	+	LBA
3	15/11/2008	+	+	+	LBA
4	28/01/2009	+	+	+	LBA
5	27/02/2009	-	+	+	LBA
6	16/05/2009	+	+	+	LBA
7	01/07/2009	-	+	+	LBA
8	24/06/2009	-	-	+	LBA
9	11/08/2009	+	+	+	LBA
10	27/08/2009	+	+	+	LBA
11	30/09/2009	-	-	+	LBA
12	05/11/2009	-	+	+	LBA
13	23/11/2009	-	-	+	LBA
14	25/02/2010	-	-	+	LBA

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des prélèvements et des résultats microbiologiques des cas.

c) La pathologie

Le délai entre la greffe et la pneumocystose était en moyenne de 62,69 mois (médiane = 35,92) ; avec un minimum de 8 mois et un maximum de 216 mois, soit 18 ans après la transplantation (tableau 8).

N° Patient	Date LBA positif	Date de greffe	Délai greffe/pneumocystose en jour	Délai greffe/pneumocystose en mois
0	08/11/2007	11/04/2005	941	31
1	13/05/2008	02/11/2003	1654	55
2	23/06/2008	09/10/1990	6467	216
3	15/11/2008	31/03/2008	229	8
4	28/01/2009	02/10/2005	1214	40
5	27/02/2009	12/04/2007	687	23
6	16/05/2009	22/08/2008	267	9
7	01/07/2009	17/04/2005	1536	51
8	24/06/2009	01/11/2007	601	20
9	11/08/2009	30/08/2008	346	12
10	27/08/2009	25/10/2007	672	22
11	30/09/2009	27/07/1995	5179	173
12	05/11/2009	01/10/1999	3675	123
13	23/11/2009	22/01/2002	2862	95
Moyenne			1881	62,69

Tableau 8 : Délais entre transplantation rénale et pneumocystose.

Tous les patients avaient été hospitalisés pour ou avec une toux ainsi qu'une dyspnée souvent associées à une altération de l'état général. Seuls 2 patients (7 et 14) étaient peu symptomatiques. La symptomatologie évoluait depuis 18,11 jours en moyenne.

Chez tous les patients le diagnostic de pneumocystose a été confirmé par la clinique et par l'imagerie pour 11 d'entre eux. Six ont eu une radiographie pulmonaire évocatrice et cinq un scanner évocateur, souvent après une radiographie négative. Neuf patients, soit 60 %, ont fait une pneumocystose grave avec une hypoxémie. Parmi eux, trois ont souffert d'hypoxémie modérée et six d'hypoxémie sévère, nécessitant l'adjonction d'une corticothérapie. Deux d'entre eux ont dû être transférés en réanimation et mis sous ventilation mécanique pour l'un et sous ventilation non invasive pour l'autre.

Tous les patients ont été initialement traités par TMP-SMX. La patiente 13 était au départ traitée par de l'atovaquone en raison de la suspicion d'une allergie au TMP-SMX qui sera dédouanée après vérification. Seuls huit patients ont pu recevoir le traitement durant la durée prévue. Toutefois, dix patients, soit 66,67 %, ont eu des effets indésirables sous

traitement qui ont obligé les prescripteurs à switcher le TMP-SMX par de l'atovaquone pour sept patients. Un patient a reçu de l'atovaquone associée à la pentamidine après switch. Les effets indésirables du TMP-SMX se sont manifestés par une insuffisance rénale aiguë pour 5 patients, une dégradation de la fonction rénale pour une patiente et des effets hématologiques ou hépatiques pour les autres.

Bien que 2 patientes aient dû être transférées en réanimation polyvalente, on ne dénombre aucun décès parmi les patients au cours de l'épisode.

d) Les cofacteurs

(1) Les traitements immunosuppresseurs

Tous les patients, même la patiente non transplantée, était sous traitement immunosuppresseurs au long court (tableau 9). La majorité d'entre eux (80 %) recevait du mycophénolate mofétil, 53,33 % du tacrolimus tout comme pour les corticostéroïdes. Quatre-vingt treize pour cent des patients étaient sous bi- voire tri-thérapie immunosuppressive. Une patiente était sous monothérapie de sirolimus, en raison d'une intolérance aux autres molécules. Cinq autres patients n'étaient pas sous immunosuppression particulièrement forte.

<i>Molécules</i>	<i>Nombre de patient</i>	<i>Pourcentage %</i>
MMF	12	80,00
Tacrolimus	8	53,33
Corticostéroïdes	8	53,33
Sirolimus	3	20,00
Ciclosporine	2	13,33
Azatioprine	2	13,33

Tableau 9 : Les traitements immunosuppresseurs.

(2) Episode de rejet

Le traitement des épisodes de rejet humoral impose l'utilisation d'une immunosuppression importante. La mise en place de ces thérapeutiques intensives entraîne une lymphopénie plus importante chez les patients. Trois patients avaient été traités pour un épisode de rejet humoral peu de temps avant de développer la pathologie. Les trois patients greffés pour la deuxième fois recevaient eux aussi une immunosuppression forte.

(3) Les CD4

Le nombre de CD4 a été recherché pour quasiment tous les patients (sauf le patient 1). Les chiffres retrouvés sont issus des recherches effectuées à proximité de la date de diagnostic jusqu'à 8 jours avant. En effet, avant cet épisode d'infection, le dosage des CD4 était effectué de manière moins systématique. Toutefois, ces chiffres permettent de se faire une idée de l'état d'immunodépression de ces patients. Les 14 patients, pour lesquels un dosage avait été effectué, avaient des CD4 inférieurs à 1000/mm³. Parmi eux, cinq avaient des CD4 compris entre 200 et 400/mm³ et tous les autres, soit 66,67%, avaient des CD4 inférieurs à 200/mm³ (tableau 10). Tous les patients étaient dans un état d'immunodépression majeure. Pour certains d'entre eux, la lymphopénie ne s'est pas révélée d'emblée, mais sur un deuxième dosage des CD4 effectué après le diagnostic de pneumocystose.

(4) Infection à CMV

Le CMV est également connu comme cofacteur favorisant les infections à *P. jirovecii*. Trois patients ont développé un épisode de réactivation du CMV dans les mois précédents (patients 4 et 5) ou juste après (patient 7) la pneumocystose (tableau 10).

N° patient	CD4/mm ³	Episode de CMV	Date diagnostic CMV	Délai CMV/ pneumocystose en jours
0	326	non		
1		non		
2	297	non		
3	79	non		
4	110	oui	28/11/2008	61
5	38	oui	13/10/2008	137
6	264	non		
7	135	oui	06/07/2009	-5
8	162	non		
9	175	non		
10	166	non		
11	131	non		
12	50	non		
13	233	non		
14	381	non		

Tableau 10 : Les cofacteurs : Taux de CD4 et infection à CMV.

C. Enquête épidémiologique

1. Etudes des contacts entre les patients

Tout d'abord, une étude des codes postaux d'habitation des patients a été menée afin de vérifier s'ils ne pouvaient pas avoir été exposés à une source environnementale commune, extérieure au CHU. Les patients habitaient dans la région, mais de manière assez dispersée, permettant d'écarter cette hypothèse.

Une étude des circulations des patients au sein du service de néphrologie a été réalisée ; le but étant de déterminer si les patients avaient partagé la même salle au niveau des consultations des transplantés, ou les salles d'hospitalisation de jour, mais aussi s'ils avaient été hospitalisés dans le service au même moment, dans des chambres contiguës (voire des chambres à deux lits).

En ce qui concerne les hospitalisations dans le service, aucun patient n'a été hospitalisé en même temps qu'un autre, que celui-ci soit malade ou en incubation. Pour l'hospitalisation de jour, on note seulement 2 croisements de patients : entre les patients 5 et 9 puis 10 et 13.

En revanche pour les consultations des greffés, on retrouve 51 dates où au moins 2 patients étaient présents. Ces jours là, les patients se sont certainement retrouvés ensemble dans la salle de restauration, dans la salle d'attente ou dans la salle de prélèvement. Cette situation génère une opportunité de transmission entre un patient atteint, en incubation ou colonisé et un patient réceptif. Au maximum, ils étaient 4 de la série convoqués un même jour. Le nombre moyen de contact est de 8,2 par patient (Tableau 11). Certains patients ont eu des contacts très nombreux avec un autre patient du groupe ; par exemple : jusqu'à 25 contacts pour le patient 6. En moyenne, chaque patient a rencontré presque 4 patients différents potentiellement en incubation. Seule la patiente 14 n'a pas été en contact avec les autres patients. Cette patiente, non greffée, ne fréquentait logiquement pas la consultation des transplantés.

<i>N° patient</i>	<i>Nombre de contacts avec un autre patient potentiellement en incubation en consultation externe</i>	<i>Nombre de patients potentiellement en incubation rencontrés</i>	<i>Nombre de contacts avec au moins un autre patient potentiellement en incubation en hôpital de jour</i>
0	2	2	0
1	6	5	0
2	8	5	0
3	10	6	0
4	10	5	0
5	4	4	1
6	25	6	0
7	1	1	0
8	20	6	0
9	19	6	1
10	12	6	1
11	3	3	0
12	1	1	0
13	2	2	1
14	0	0	0
<i>Moyenne</i>	<i>8,2</i>	<i>3,9</i>	<i>0,3</i>

Tableau 11 : Contacts entre patient potentiellement en incubation de la maladie.

2. Synoptique

A partir de toutes les données administratives, un tableau synoptique a été réalisé. Il permet pour chaque patient de visualiser les jours où il était présent au CHU que ce soit en hospitalisation, en hôpital de jour ou en consultation des greffés. Cet outil permet de mieux se rendre compte des croisements entre les patients et de pointer les différentes opportunités de transmission interhumaine. Les jours, où plusieurs patients étaient présents en même temps, sont notés différemment pour être mieux repérés. Les dates de transplantation rénale, de diagnostic de pneumocystose sont également notées sur ce schéma. Le tableau recouvre toute la période de l'épidémie et permet une vue d'ensemble des patients (figure 7).

L'hypothèse de la contamination des patients par un personnel soignant porteur a été évoquée mais la recherche de portage n'a pas été possible. Au niveau des consultations des transplantés, il n'y a pas eu de mouvements particuliers de personnels au cours de la période de l'épidémie. Une nouvelle aide-soignante est arrivée dans le courant de l'année 2008, mais l'épidémie avait déjà débuté.

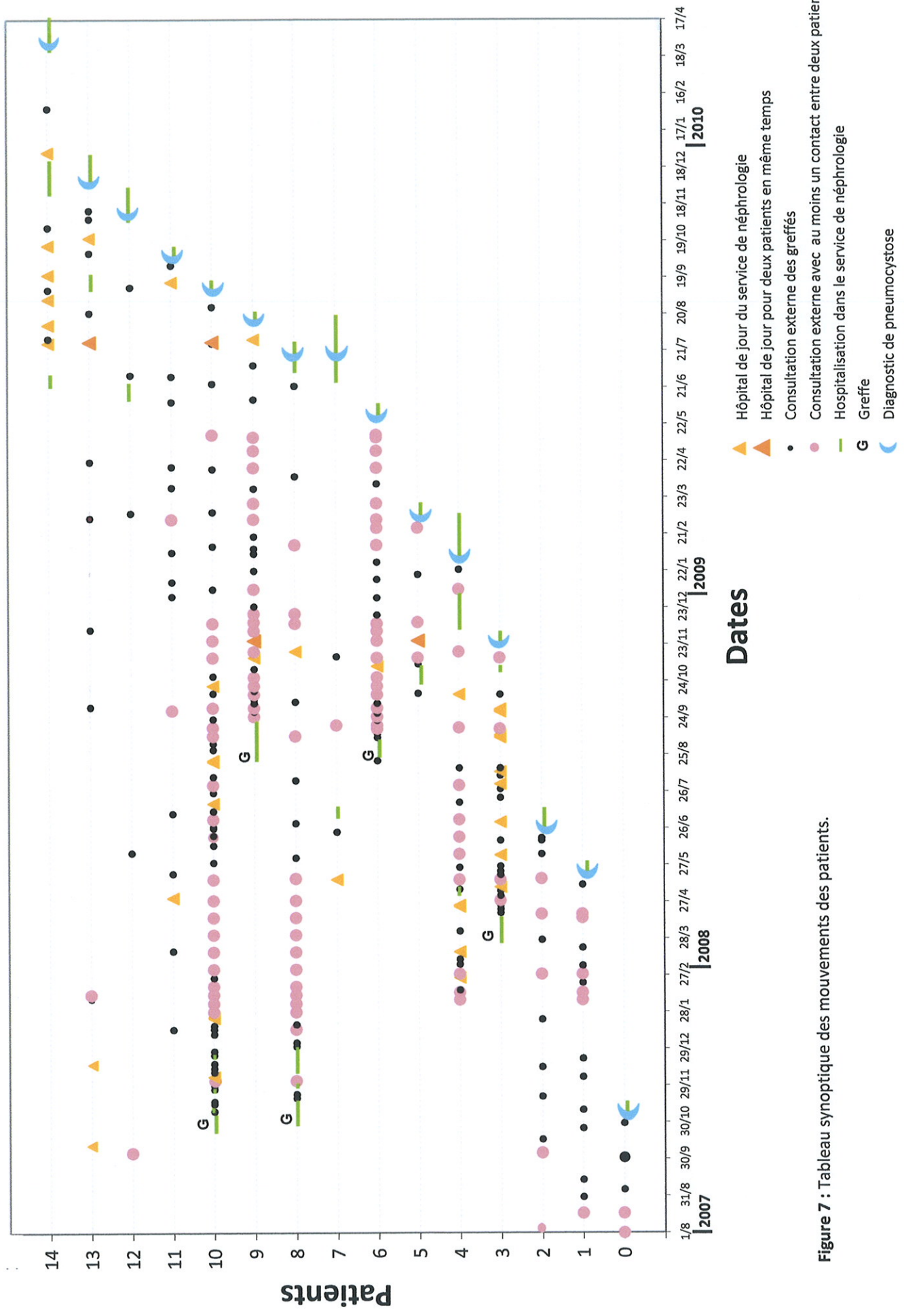


Figure 7 : Tableau synoptique des mouvements des patients.

D. Génométypage

1. Le génotypage des patients de néphrologie

Le génotypage des souches de tous les patients de néphrologie a pu être réalisé. La technique de génotypage utilisée est celle du séquençage des ITS sans clonage. Avant le séquençage un gel d'électrophorèse a été réalisé afin de vérifier la taille des bandes obtenues et la conformité du témoin négatif. Pour 13 patients sur 15, le résultat du génotypage est identique et donne le génotype SYD1g. Pour la patiente 11, c'est le génotype Ai qui a été retrouvé et pour la patiente 14, le génotype Eg, qui est l'un des plus fréquemment isolé en France. Les 13 patients sont donc tous porteurs de la même souche de *P. jirovecii*, qui jusqu'à présent n'avait été décrite que récemment en Australie et en Inde. La patiente 14, qui n'a *a priori* pas eu de contact avec les autres patients, s'est contaminée avec un génotype différent fréquent en France.

2. Les patients contrôles

En même temps que le génotypage des ADN extraits des prélèvements des patients de néphrologie, il était indispensable de définir des génotypes de patients extérieurs à l'épidémie. Ces patients constituent un groupe contrôle de la manipulation et serviront aussi à la réalisation d'un arbre phylogénétique de tous les ADN. Les patients contrôles étaient de provenances variées mais représentaient les catégories de patients sensibles à la pneumocystose (Tableau 12). Pour tous, le diagnostic de pneumocystose a été fait au CHU de Limoges. Ces patients n'avaient *a priori* pas de liens entre eux. Les dates de diagnostic de pneumocystose pour ces patients étaient réparties autour du pic de l'épidémie (figure 8).

N° patient	Sexe	Age	Date prélèvement positif	Contexte	Génotype
C1	h	42	24/10/2008	VIH+	Ec
C2	F	49	17/07/2009	Hospitalisation directe en réanimation, non connu au CHU auparavant	Bi
C3	h	77	15/09/2009	Polyarthrite rhumatoïde sous infliximab et corticostéroïdes	Bi
C4	h	66	09/12/2009	Leucémie lymphoïde chronique	Eg

Tableau 12 : Caractéristiques et génotypes des patients contrôles.

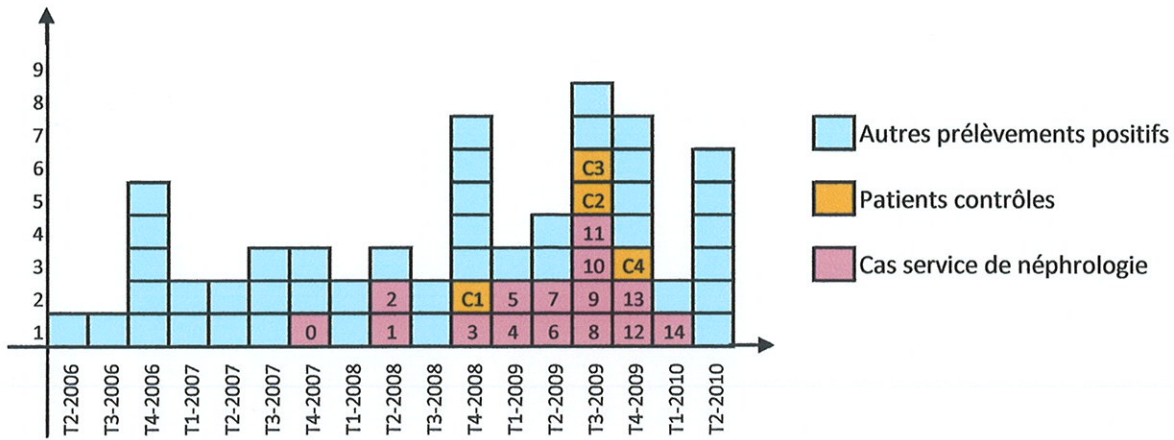


Figure 8 : Répartition dans le temps des patients contrôles par rapport aux patients de néphrologie.

Le génotypage des patients contrôles a permis de retrouver trois génotypes différents Ec, Eg et Bi (pour 2 d’entre eux)(Tableau 12).

3. Arbre phylogénétique (figure 9)

A partir des séquences des patients de néphrologie et des patients contrôles, un arbre phylogénétique a pu être réalisé. Il montre un regroupement des patients transplantés rénaux atteints du même génotype. La souche de la patiente 14 se rapproche de celle retrouvée chez un patient contrôlé. Ces résultats permettent de penser que les transplantés rénaux se sont contaminés avec la même souche.

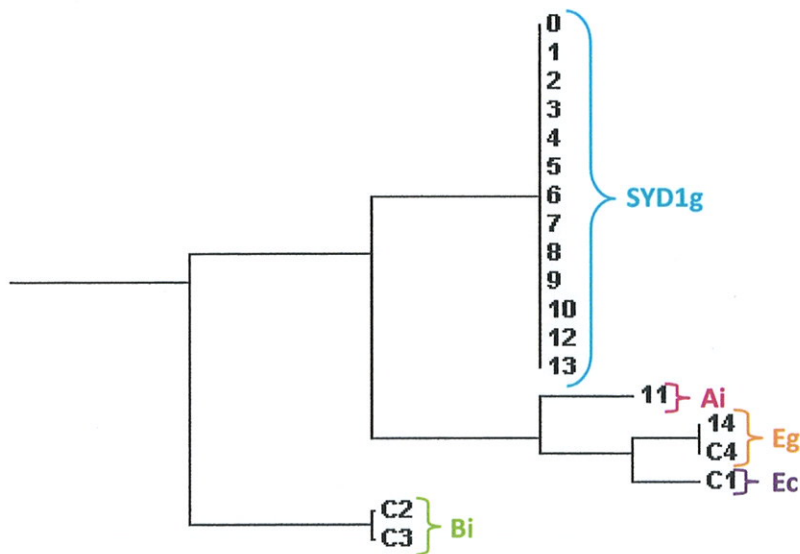


Figure 9 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences des ITS.

E. Mesures mises en places

La première mesure mise en place a été de placer les patients atteints en isolement « gouttelettes ». Ces patients ont été placés en chambre seule avec port de masque par le patient lors de tout déplacement. Le personnel soignant devait également s'équiper d'un masque pour entrer dans la chambre du patient. Cette mesure ne concernait que le service d'hospitalisation conventionnelle. Aucune mesure n'a été prise concernant la salle d'attente et la salle de restauration commune des greffés rénaux. Une autre mesure importante vient de la sensibilisation de l'équipe médicale au suivi du taux de CD4 des patients. En effet, depuis cet épisode, l'équipe est particulièrement vigilante au taux de CD4 chez les patients sous immunosuppression forte ou traités pour un épisode de rejet humoral. Les patients lymphopéniques sont placés sous prophylaxie par TMP-SMX.

V. Discussion

A. Discussion générale

Au cours de ce travail, nous avons répertorié 15 cas de pneumocystose dans le service de néphrologie sur une période de 29 mois. Les courbes épidémiques ont permis de confirmer qu'il s'agissait bien d'un phénomène épidémique. En effet, en presque 20 ans (de 1987 à 2006) seul neuf cas de pneumocystose ont été détectés dans le service de néphrologie, c'est 2 fois moins que durant les 29 mois de l'épidémie. De plus, entre 1997 et 2006, un seul cas avait été détecté. Cette pathologie était donc relativement rare dans ce service. Cette épidémie ne peut être attribuée à un changement des techniques de diagnostic, à une augmentation du nombre de transplantés suivis ou à des changements dans les protocoles d'immunosuppression. En effet, le seul changement de méthode diagnostique vient de l'utilisation de la PCR à partir de 2000. L'introduction de cette méthode, améliorant la sensibilité du diagnostic, n'a pas été suivie d'un pic de cas, en particulier dans le service concerné.

C'est la première fois qu'un tel pic de cas de pneumocystose est observé au CHU de Limoges. Des épisodes de cas groupés chez des transplantés rénaux ont déjà été décrits dans plusieurs publications depuis une dizaine d'années(32,91,98). Ce phénomène est en cours d'investigation au niveau du grand ouest où plusieurs épisodes de cas groupés ont été observés dans différents CHU (Reims, Amiens, Brest...). Un groupe de travail de transplantateurs étudie actuellement la question avec la mise en place de questionnaires à remplir par les établissements concernés par un épisode de cas groupés : un questionnaire général sur la prise en charge de la pneumocystose et un questionnaire spécifique pour chaque patient atteint (annexe 1 et 2). Un groupe d'experts est également en train de se constituer au niveau national afin d'essayer de trouver des réponses à un certain nombre de questions :

- la transmission, la colonisation et la nosocomialité ;
- la signification à donner aux nouvelles techniques diagnostiques ;
- les patients à risques et la prophylaxie.

Dans notre étude, le tracé de la courbe épidémique oriente vers une transmission de personne à personne. La courbe présente un pic puis une décroissance due, soit aux mesures mises en place, soit au fait que toutes les personnes susceptibles ont été atteintes et qu'il n'existe plus de « cibles » pour le pathogène. Les mesures prises (surveillance du taux de CD4 des patients et l'introduction d'une prophylaxie chez les patients les plus à risques) ont, semble-t-il, permis de stopper l'épidémie. La surveillance du taux de CD4 a été renforcée chez les patients traités pour un épisode de rejet humoral. Le port de masque chez les patients atteints était réservé au service d'hospitalisation, il ne peut donc pas expliquer à lui seul la fin de l'épidémie.

B. Les patients

Dans la plupart des cas, les patients ont été hospitalisés avec une symptomatologie respiratoire et le diagnostic de pneumocystose a été évoqué dans les tous premiers jours de l'hospitalisation. Tous les patients présentaient des tableaux cliniques torpides avec une altération majeure de l'état général. Cette symptomatologie diffère beaucoup de celle retrouvée chez les patients VIH+ qui est plus franche et surtout de celle habituellement décrite chez les immunodéprimés non VIH.

Avant l'introduction de la prophylaxie, les données de la littérature rapportaient des délais d'apparition de pneumocystose autour de 6 mois après la transplantation (126,127). La pathologie était même considérée comme rarissime après la première année (144,145). Comme dans d'autres rapports de cas groupés chez des transplantés rénaux (32,91), dans notre étude, les délais entre la pneumocystose et la greffe sont parfois très longs (extrême = 18 ans). Pour 11 patients, la pneumocystose a eu lieu plus d'un an après la greffe, à une période où l'immunodépression est théoriquement moins forte et le risque plus faible.

Le traitement par TMP-SMX a été assez mal toléré par les patients de l'étude. En effet, 66 % des patients ont eu des complications sous traitement. Ce pourcentage élevé d'effets secondaires n'est pas une donnée rapportée chez les patients VIH+ traités pour pneumocystose par les mêmes molécules et aux mêmes doses.

Pour 13 patients, le diagnostic a été posé dans les premiers jours d'hospitalisation (≤ 4 jours). Pour la patiente 7, le diagnostic n'a été posé qu'après 13 jours d'hospitalisation. Au cours de cette hospitalisation, plusieurs infections opportunistes avaient également été diagnostiquées, dues à son état d'immunodépression sévère. La contamination de la patiente en cours d'hospitalisation a été évoquée. Cette hypothèse a été étudiée par l'analyse du séjour de la patiente. Cette patiente était hospitalisée en chambre seule. Un cas de pneumocystose était présent en même temps, mais dans une chambre d'un autre secteur du service. *A priori*, ces deux patients n'ont pas eu de contact entre eux et les équipes soignantes étaient différentes. De plus, un seul croisement avec un autre patient de la série avait été répertorié. L'hypothèse d'une contamination de la patiente au cours de ce séjour est peu probable mais ne peut être totalement exclue.

C. Les facteurs de risques

Les principaux facteurs de risques décrits dans la littérature sont : un taux de CD4 bas et le traitement par immunosuppresseurs pour un épisode de rejet (139).

Tous les patients avaient des taux de CD4 bas. La plupart des patients étaient sous immunosuppression forte du fait d'une seconde greffe ou pour le traitement d'un épisode de rejet. Le traitement des épisodes de rejet apparaît également comme un facteur de risque majeur, du fait de l'importance de l'immunosuppression nécessaire à son traitement et de la grande fragilité induite chez les patients. En contraste avec la littérature, peu d'infections concomitantes à CMV ont été retrouvées chez ces patients.

Les patients étaient tous sous thérapie immunosuppressive. Paradoxalement, cinq d'entre eux n'étaient pas sous immunosuppression forte et sept ne recevaient pas de corticostéroïdes. En théorie, ces patients ne paraissaient pas particulièrement à risque.

En ce qui concerne le mycophénolate mofetil (MMF), une étude avait suggéré un effet protecteur de ce dernier vis-à-vis de *Pneumocystis* (134). Au total, d'autres études n'avaient retrouvé aucun cas de pneumocystose sur les 991 patients recevant du MMF contre 9 cas sur 442 patients recevant de l'azathioprine (2 %) (136,137). Dans notre étude,

l'effet protecteur du MMF n'a pas été retrouvé, puisque 80 % des patients recevaient du MMF et ont tout de même développé la pathologie.

Certains autres cofacteurs décrits par Radisic *et al.*, comme la tuberculose et les infections pulmonaires bactériennes (141), n'ont pas été confirmés par d'autres études. Peut-être que dans ces cas d'association à une tuberculose ou à une autre infection pulmonaire, la présence de *Pneumocystis* pourrait être le reflet d'une colonisation sur des terrains fragiles plutôt que d'une réelle pneumocystose.

Une prophylaxie contre la pneumocystose est recommandée durant les 6 mois suivant la greffe (128,129). Ces recommandations avaient été mises en place suite à une augmentation des cas de pneumocystose chez les greffés d'organe durant les périodes d'induction des traitements immunosuppresseurs (période où l'immunosuppression est la plus forte). Les 14 patients greffés de notre série avaient eu une prophylaxie durant les 6 mois suivant leur greffe. En revanche, il n'existe pas de recommandations pour la réintroduction de la prophylaxie primaire après la période des 6 mois. Au moment de l'infection, aucun patient de la série n'était sous prophylaxie bien qu'ils aient un taux de CD4 bas. C'est pourquoi un meilleur suivi du taux de CD4 a été mis en place. Par la suite, la plupart des patients de l'épisode ont été mis sous prophylaxie secondaire.

D. Les prélèvements

Dans le service de néphrologie, les prélèvements à visée diagnostique étaient le plus souvent des LBA, qui sont les meilleurs prélèvements pour le diagnostic (38).

L'examen direct est la technique de référence et a permis le diagnostic chez 5 patients. Pour 7 patients, le diagnostic n'a été posé que par la PCR, mais compte tenu de la sensibilité de la technique, ces résultats ont du être confirmés par la clinique. Pour 13 patients, *P. jirovecii* a été le seul agent étiologique retenu. Pour les 2 autres patients, la clinique et l'imagerie évoquaient fortement une pneumocystose. Mais, pour le premier, une pneumopathie interstitielle au sirolimus a également été suspectée et pour l'autre un *Staphylococcus aureus* avait également été isolé du prélèvement bactériologique.

E. Génotypage

La technique de clonage est fréquemment utilisée dans les publications sur la diversité génétique de *Pneumocystis* (105,106). Cette technique améliore la sensibilité du séquençage et permet la détection des infections mixtes. Les infections mixtes résulteraient d'une contamination simultanée par plusieurs génotypes (106). Dans le cadre de notre investigation, le clonage n'a pas été utilisé. Les séquences obtenues par séquençage direct des ITS étant interprétables, cette étape n'a donc pas été nécessaire pour la détermination des séquences. Le but du génotypage était de déterminer si un génotype prédominait chez les patients de la série. L'hypothèse d'infections mixtes chez ces patients n'a pas été explorée. De plus, il n'est pas inenvisageable que dans le cadre d'une épidémie, les patients soient infectés avec un seul génotype.

Nous avons retrouvé le même génotype (le génotype SYD1g) chez 13 des 15 patients de néphrologie. Ce génotype diffère du génotype Eg seulement par la délétion d'une base, 1 T (thymine), en position 62-70 dans ITS-1, c'est à dire dans une succession de 10 T. Ces différences au niveau de ce poly-T avaient été remarquées par Lee *et al.* (104), avec des différences allant de 8 à 12 T, mais il n'avait pas considéré ces délétions suffisantes pour la définition de nouveaux génotypes. En 2009, Van Hall *et al.* (105) ont défini cette séquence avec cette délétion en tant que nouvel allèle. Il faut préciser qu'il existe d'autres poly-T ou poly-A dans la séquence d'intérêt qui ne présentent pas de telles variations. Les spécialistes du génotypage de *Pneumocystis* sont encore partagés sur l'importance à donner à la délétion d'un T à cette position, et en particulier si cette délétion peut être utilisée pour définir un nouveau génotype. Pour le moment, ce génotype a été décrit en Australie (105) et en Inde (106) et dériverait de Eg considéré comme le génotype ancestral d'où dériveraient également les autres génotypes (105,146).

En ce qui nous concerne, le choix a été de différencier SYD1g de Eg. Il aurait aussi été possible de le dénommer Eg avec la particularité de ne posséder que 9T en position 62-70 chez 13 des patients de la série.

Le fait que ce génotype, n'ait pas encore été décrit en France, entraîne une triple réflexion :

- Soit le génotype a été importé par un des patients ; soit par le patient 0, soit par un autre patient de la série ou encore par un patient porteur ne faisant pas partie de la série. La population concernée par l'épidémie voyage peu, il est donc peu probable qu'un de ces patients ait rapporté ce génotype d'un voyage en Inde ou en Australie. Le cas considéré comme index n'a pas voyagé dans un de ces pays avant de développer la pathologie.
- Soit ce génotype n'a pas été recherché en France compte tenu de sa description récente ainsi que les divergences d'opinion concernant sa différenciation et le manque de données à ce sujet.
- Soit il s'agit de l'évolution naturelle du type Eg vers le type SYD1g par la délétion d'un T.

Le génotype Eg (proche de SYD1g) est le génotype le plus fréquemment décrit en France dans les épisodes de cas groupés chez les greffés rénaux. Il serait intéressant de déterminer si ces 2 génotypes ont des capacités de transmission singulière qui feraient d'eux des génotypes particulièrement épidémiogènes.

F. Hypothèse de transmission

Les travaux effectués sur la spécificité d'hôte de *Pneumocystis* (13) et ceux ayant abouti à la différenciation entre *P. carinii* et *P. jiroveii* (14,15), ont permis d'écarter complètement l'hypothèse d'un réservoir animal. L'hypothèse de la réactivation d'une infection latente semble, elle aussi, de plus en plus écartée par les données de la littérature (76).

Les croisements des patients de la série, au niveau de la salle d'attente des consultations des greffés et la salle de restauration au cours de la période de l'épidémie, sont extrêmement nombreux. La transmission a donc pu se faire au fil du temps d'un patient porteur, en incubation ou atteint, vers un autre patient réceptif. En effet, au cours de la période d'études les opportunités de transmission inter-humaine ont été fréquentes. En revanche, il est difficile de déterminer si un patient a croisé un autre patient, durant la période d'incubation de sa pneumocystose ou durant le début de sa phase symptomatique, car il n'existe pas de données précises sur la période d'incubation de la pneumocystose. Le problème des porteurs asymptomatiques doit également être évoqué. Certains patients, fréquentant la salle de consultation des greffés et n'ayant pas développé la pathologie, ont pu agir comme réservoir du pathogène et, peut-être, être à l'origine de la contamination d'un ou de plusieurs des cas.

Le patient 0 est le premier de la série à avoir développé la maladie. Ce patient est potentiellement le cas index. Mais compte tenu des incertitudes sur la colonisation et la période d'incubation, il est impossible d'être catégorique sur la détermination du cas index.

Pour 10 patients les opportunités de contamination ont été nombreuses au niveau des consultations des greffés, étayant ainsi l'hypothèse de la transmission inter-humaine et aussi de la variabilité de la durée d'incubation. A titre d'exemple, un patient a bien croisé un autre patient de la série mais près de 5 mois avant de développer la maladie. Ce qui ferait une période d'incubation de 5 mois, cette durée paraît longue à côté des 2 mois évoqués chez les patients VIH+ (31).

Pour 3 patients, dont 2 atteints vers la fin de l'épidémie, cette conclusion est plus difficile à démontrer :

- Le patient 12 a été contaminé avec le même génotype que les autres patients mais nous n'avons retrouvé qu'un seul contact avec un des 15 patients, le 5 octobre 2007 (patiente 2), soit plus de 25 mois avant le début de sa maladie (le 5 novembre 2009). Ce délai d'incubation paraît extrêmement long pour affirmer que cet unique contact a pu être à l'origine de sa contamination. De plus, ce patient n'a été hospitalisé qu'une fois dans le service de néphrologie au cours de la période de l'étude et pas en même temps qu'un patient malade. Il n'a donc *a priori* pas eu de contact direct avec un autre patient de la série, en dehors de celui cité ici.

La question du mode de contamination pour ce patient reste posée et on peut dénombrer 3 hypothèses:

- à partir de l'air de la salle de consultation ;
- par l'intermédiaire d'un personnel soignant porteur. L'hypothèse du portage chez un personnel soignant ne peut pas être écartée car la recherche de *P. jirovecii* chez le personnel n'a pas pu être réalisée;
- par l'intermédiaire d'un patient porteur asymptomatique qui aurait croisé un des patients de la série. La recherche de portage chez les autres transplantés rénaux n'a pas non plus été effectuée.

Ce même type de réflexion peut être réalisé pour la patiente 7. Cette patiente n'a eu elle aussi qu'un seul contact connu avec un patient de la série. De plus, il s'agissait d'un greffé récent (patient 6), sous prophylaxie à ce moment là. La transmission par ce patient paraît improbable. Le mode de contamination de cette patiente reste indéterminé et évoque les mêmes hypothèses que pour le patient 12.

- Pour la patiente 13, nous n'avons retrouvé qu'un seul contact avec un autre patient en consultation de greffés. En revanche, elle a séjourné en hôpital de jour en même temps que le patient 10, quelques semaines avant que la pneumocystose de ce dernier ne soit diagnostiquée. Cette opportunité de contamination a pu être suffisante, d'autant plus que le patient croisé était probablement en période d'incubation.

Les résultats du génotypage ont montré que 2 des patients de l'étude avait été infectés avec des génotypes différents.

- La patiente 11 est la seule, parmi les 14 transplantés rénaux infectés, à avoir été contaminée par un génotype différent. Elle n'a eu qu'un contact au CHU avec un patient de la série. Il est à noter que cette patiente avait déjà présenté une pneumocystose quelques mois après sa greffe en 1995. A cette époque, la PCR n'était pas encore effectuée au laboratoire et l'ADN n'était pas extrait et conservé. La comparaison des génotypes n'a donc pas pu être réalisée. Il peut donc s'agir soit d'une nouvelle infection non liée à l'épidémie soit d'une réactivation, bien que cette théorie soit controversée.

- La patiente 14 est la seule personne non greffée infectée au cours de cet épisode. Elle ne fréquentait logiquement pas la consultation des greffés et n'a donc pas partagé la salle de restauration. Elle n'est pas non plus venue en consultation de néphrologie le même jour qu'un des cas et n'a donc pas non plus partagé la salle d'attente avec un des cas de la série. Elle n'est pas non plus venue à l'hôpital de jour en même temps qu'un patient de la série. En revanche, elle a été hospitalisée une fois dans le service de néphrologie en même temps qu'un cas de pneumocystose. Les deux femmes n'étaient pas hospitalisées dans le même secteur. Les équipes soignantes étaient donc *a priori* différentes. De plus, au moment de son hospitalisation, la mise en isolement des patients était déjà effective dans le service de néphrologie. Cette patiente n'avait donc pas de lien avec les autres patients. Pour ce cas, non relié génotypiquement aux autres, l'hypothèse d'une contamination dans le cadre de l'épidémie semble peu probable (cas communautaire ?).

Les recherches de *Pneumocystis* dans l'air ont permis de retrouver de l'ADN mais dans un rayon limité autour d'un patient atteint (70). En revanche, l'existence de sources environnementales persistantes dans le temps n'a jamais été démontrée.

Dans notre étude, l'hypothèse d'une niche environnementale ne peut pas être totalement exclue. En effet, les recherches de *Pneumocystis* dans l'air de la salle de d'attente et la salle de restauration n'ont pas pu être réalisées. Les données épidémiologiques seules ne permettent pas d'exclure ou de confirmer cette hypothèse. Le fait que les patients aient fréquenté très souvent la salle de restauration, pourrait orienter vers une contamination à partir de l'air de cette salle. Toutefois les croisements entre les cas de la série ont été

nombreux, soit au moment de l'infection soit avant. Et, de ce fait, orientent plus fortement vers une contamination inter-humaine.

Une autre hypothèse de contamination est une exposition simultanée à une source commune et une durée d'incubation très variable d'un patient à l'autre. Cette hypothèse est envisageable mais peu probable. En effet, tous les patients ne sont pas venus en consultations de greffés un même jour, voire le même mois, avant le début de l'épidémie. De plus, cinq patients ont été transplantés au cours de la période d'étude et mis sous prophylaxie durant les 6 premiers mois. Au début de l'épidémie, ils ne fréquentaient donc pas la consultation des greffés.

Le génotype retrouvé chez 13 patients sur 15 (SYD1g) n'a pas encore été décrit en France. *A priori* ce génotype n'est pas prépondérant dans la région. Mais les données sur la diversité génétique de *P. jirovecii* en France et dans la région sont peu nombreuses.

Une autre piste est également à envisager et n'a pu être explorée. Ces patients se croisent fréquemment et font parfois partie d'associations de patients. Il se peut que certains aient créé des liens et se rencontrent en dehors de la structure hospitalière.

Conclusion

La description de cas groupés de pneumocystose parmi les transplantés rénaux est de plus en plus fréquente. La rédaction de recommandations nationales concernant la stratégie de prophylaxie chez ces patients paraît indispensable. Rodriguez et Fishman recommandent la mise sous prophylaxie durant les 6 premiers mois post-greffe, durant les périodes de neutropénies profondes et durant les périodes d'intensification de l'immunosuppression (ex : traitement du rejet humoral) (124).

Dans notre série, il semblerait que l'introduction de la prophylaxie chez les patients les plus fragiles ait permis de stopper l'épidémie. Toutefois les conditions d'accueil des patients dans le secteur des consultations n'ont pas changé. La promiscuité entre les patients est toujours la même. Ce mode d'accueil des patients est un choix du service qui souhaite entretenir un lien entre les patients greffés. Une modification paraît difficile à mettre en place.

Cette étude renforce l'hypothèse de la transmission interhumaine. Le délais d'incubation de 2 mois paraît très réducteur et ne repose pas sur des données précises. Il est probable que la maladie soit précédée d'une période de colonisation qui se transforme en infection au décours d'une baisse des défenses immunitaires des patients.

La multiplication des cas groupés de pneumocystose en France et dans le monde remet en cause l'épidémiologie du microorganisme. La transmission interhumaine paraît de plus en plus incontournable, même si cette notion reste encore difficile à admettre par certains cliniciens.

La contamination inter-patients au sein d'un établissement de santé renvoie également à la nosocomialité. La transmission nosocomiale de *Pneumocystis* n'est que rarement évoquée dans la littérature (71). Les établissements de santé doivent donc envisager la mise en place de mesures spécifiques autour d'un cas afin de limiter la diffusion de *P. jirovecii*, en particulier dans les services hébergeant des patients à risques. Les recommandations concernant l'isolement des patients atteints existaient, mais n'étaient pas toujours bien suivies du fait de la faible importance que représentait la transmission interhumaine dans la biologie du parasite.

Il pourrait être intéressant d'envisager une recherche de portage de *P. jirovecii* chez les transplantés rénaux. Cette recherche serait facilitée par la sensibilité des nouvelles techniques et permettrait de détecter les patients colonisés. Il faudrait alors choisir l'attitude à adopter vis-à-vis de ces patients :

- mise sous prophylaxie ?
- décontamination des voies respiratoires par aérosols de pentamidine ?
- quand arrêter la prophylaxie mise en place ?

Il existe peu d'études en France sur la répartition géographique des génotypes. Un génotypage des ADN conservés au laboratoire de Parasitologie-Mycologie pourrait donner une idée de la diversité génétique de *P. jirovecii* dans notre région.

Des études plus importantes sur les spécificités des différents génotypes pourraient peut-être permettre la mise en évidence des génotypes avec des capacités particulières en terme de virulence, résistance au traitement, capacité de transmission et d'adapter les mesures de prévention pour éviter la contamination des personnes à risque.

Bibliographie :

1. Caractéristiques des personnes diagnostiquées avec une infection à VIH ou un sida, France, 2008. http://www.invs.sante.fr/behweb/2009/02/imp_a-2_3.htm.
2. Chagas C. Nova tripanozomiaza humana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159–218.
3. Carinii A. Formas de eschizogonia de Trypanosoma lewisii. Arch Soc Med Cir Sao Paulo. 1910;16:204.
4. Delanoe P, Delanoe M. De la rareté de *Pneumocystis carinii* chez cobayes de la région de Paris; absence de kystes chez d'autres animaux lapin, grenouille, zanguilles. Bull Soc Pathol Exot. 1993;7:271–4.
5. Matsumoto Y, Matsuda S, Tegoshi T. Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. J P rotozool. 1989;36:S21–2.
6. Walker AN, Garner RE, Horst MN. Immunocytochemical detection of chitin in *Pneumocystis carinii*. Infect. Immun. 1990 Fév;58(2):412-415.
7. Edman JC, Kovacs JA, Masur H *et al.*. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature. 1988 Aoû 11;334(6182):519-522.
8. Stringer SL, Stringer JR, Blase MA *et al.*. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. Exp. Parasitol. 1989 Mai;68(4):450-461.
9. Dyer M, Volpe F, Delves CJ *et al.*. Cloning and sequence of a beta-tubulin cDNA from *Pneumocystis carinii*: possible implications for drug therapy. Mol. Microbiol. 1992 Avr;6(8):991-1001.
10. Edlind TD, Bartlett MS, Weinberg GA *et al.*. The beta-tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. Mol. Microbiol. 1992 Nov;6(22):3365-3373.
11. Watanabe J, Hori H, Tanabe K, Nakamura Y. Phylogenetic association of *Pneumocystis carinii* with the 'Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group' indicated by comparison of 5S ribosomal RNA sequences. Mol. Biochem. Parasitol. 1989 Jan 15;32(2-3):163-167.
12. Pixley FJ, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. Mol. Microbiol. 1991 Jun;5(6):1347-1351.
13. Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG, Haidaris PJ. *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. Infect Immun. 1993;61:2886–90.
14. The Pneumocystis Workshop. Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*. J. Eukaryot. Microbiol. 1994 Oct;41(5):1215-1225.
15. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerging Infect. Dis. 2002 Sep;8(9):891-896.
16. Frenkel JK. *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. Natl Cancer Inst Monogr. 1976;43:13–30.

17. Walzer PD, Smulian AG. *Pneumocystis species*. Dans: Infectious diseases and their etiologic agents. Part III chapter 268. p. 3080-3094.
18. Thomas CF, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. Nat. Rev. Microbiol. 2007 Avr;5(4):298-308.
19. Gustafson MP, Thomas CF, Rusnak F *et al.*. Differential regulation of growth and checkpoint control mediated by a Cdc25 mitotic phosphatase from *Pneumocystis carinii*. J. Biol. Chem. 2001 Jan 5;276(1):835-843.
20. Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN *et al.*. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. J. Clin. Invest. 1999 Nov;104(9):1307-1317.
21. Swain SD, Wright TW, Degel PM *et al.*. Neither neutrophils nor reactive oxygen species contribute to tissue damage during *Pneumocystis pneumonia* in mice. Infect. Immun. 2004 Oct;72(10):5722-5732.
22. Lu J, Lee C. *Pneumocystis pneumonia*. J. Formos. Med. Assoc. 2008 Nov;107(11):830-842.
23. Shellito J, Suzara VV, Blumenfeld W *et al.*. A new model of *Pneumocystis carinii* infection in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. J. Clin. Invest. 1990 Mai;85(5):1686-1693.
24. Roths JB, Sidman CL. Both immunity and hyperresponsiveness to *Pneumocystis carinii* result from transfer of CD4+ but not CD8+ T cells into severe combined immunodeficiency mice. J. Clin. Invest. 1992 Aoû;90(2):673-678.
25. Beck JM, Newbury RL, Palmer BE *et al.*. Role of CD8+ lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. J. Lab. Clin. Med. 1996 Nov;128(5):477-487.
26. Burns SM, Read JA, Yap PL, Brettle RP. Reduced concentrations of IgG antibodies to *Pneumocystis carinii* in HIV-infected patients during active *Pneumocystis carinii* infection and the possibility of passive immunisation. J. Infect. 1990 Jan;20(1):33-39.
27. Alibrahim A, Lepore M, Lierl M *et al.*. *Pneumocystis carinii* pneumonia in an infant with X-linked agammaglobulinemia. J. Allergy Clin. Immunol. 1998 Avr;101(4 Pt 1):552-553.
28. Saulsbury FT, Bernstein MT, Winkelstein JA. *Pneumocystis carinii* pneumonia as the presenting infection in congenital hypogammaglobulinemia. J. Pediatr. 1979 Oct;95(4):559-561.
29. Gea-Banacloche JC. Rituximab-associated infections. Semin Hematol. :2010 Apr;47(2):187-98.
30. Komano Y, Harigai M, Koike R *et al.* *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: a retrospective review and case-control study of 21 patients. Arthritis Rheum. 2009 Mar 15;61(3):305-312.
31. Control of communicable diseases in man. An official report of the American Public Health Association. 15ème éd. Washington : AS Benenson editor. 1990, 532 p.
32. Yazaki H, Goto N, Uchida K *et al.*. Outbreak of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in renal transplant recipients: *P. jiroveci* is contagious to the susceptible host. Transplantation. 2009 Aoû 15;88(3):380-385.

33. Kovacs JA, Hiemenz JW, Macher AM *et al.* *Pneumocystis carinii* pneumonia: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. *Ann. Intern. Med.* 1984 Mai;100(5):663-671.
34. Godeau B, Coutant-Perronne V, Le Thi Huong D *et al.* *Pneumocystis carinii* pneumonia in the course of connective tissue disease: report of 34 cases. *J Rheumatol.* 1994 Feb;21(2):246-51.
35. Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin WJ. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989 Nov;140(5):1204-1209.
36. Ng VL, Yajko DM, Hadley WK. Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997 Jul;10(3):401-418.
37. Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia: clinical presentation and diagnosis in patients with and without acquired immune deficiency syndrome. *Semin Respir Infect.* 1998 Déc;13(4):289-295.
38. Kroe DM, Kirsch CM, Jensen WA. Diagnostic strategies for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Semin Respir Infect.* 1997 Jun;12(2):70-78.
39. Caliendo AM, Hewitt PL, Allega JM *et al.* Performance of a PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1998 Avr;36(4):979-982.
40. Huang L, Hecht FM, Stansell JD *et al.* Suspected *Pneumocystis carinii* pneumonia with a negative induced sputum examination. Is early bronchoscopy useful? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995 Jun;151(6):1866-1871.
41. Benson CA, Spear J, Hines D *et al.*. Combined APACHE II score and serum lactate dehydrogenase as predictors of in-hospital mortality caused by first episode *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991 Aoû;144(2):319-323.
42. Montaner JS, Zala C. The role of the laboratory in the diagnosis and the management of AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia. In: Sattler FR, Walzer PD. *Pneumocystis carinii*. London: Baillere Tindall. 1995:471-485.
43. Aslanzadeh J, Stelmach PS. Detection of *Pneumocystis carinii* with direct fluorescence antibody and calcofluor white stain. *Infection.* 1996 Jun;24(3):248-250.
44. Baughman RP. Current methods of diagnosis. In Walzer PD, ed. *Pneumocystis carinii* pneumonia. New York: Marcel Dekker. 1994:381-401.
45. Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2004 Jun 10;350(24):2487-2498.
46. Vargas SL, Hughes WT, Santolaya M *et al.*. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin. Infect. Dis.* 2001 Mar 15;32(6):855-861.
47. Skelly MJ, Holzman RS, Merali S. S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* 2008 Fév 1;46(3):467-471.

48. Persat F, Ranque S, Derouin F *et al.*. Contribution of the (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* 2008 Mar;46(3):1009-1013.
49. Olsson M, Elvin K, Lidman C *et al.*. A rapid and simple nested PCR assay for the detection of *Pneumocystis carinii* in sputum samples. *Scand. J. Infect. Dis.* 1996;28(6):597-600.
50. Mathis A, Weber R, Kuster H, Speich R. Simplified sample processing combined with a sensitive one-tube nested PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1997 Jul;35(7):1691-1695.
51. Arcenas RC, Uhl JR, Buckwalter SP *et al.*. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006 Mar;54(3):169-175.
52. DOROSZ 2004 : Guide pratique des médicaments. 24 \grave{e} me éd. Paris : Maloine, 2004 :1876 p.
53. Safrin S, Finkelstein DM, Feinberg J *et al.*. Comparison of three regimens for treatment of mild to moderate *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. A double-blind, randomized, trial of oral trimethoprim-sulfamethoxazole, dapsone-trimethoprim, and clindamycin-primaquine. ACTG 108 Study Group. *Ann. Intern. Med.* 1996 Mai 1;124(9):792-802.
54. Toma E, Fournier S, Dumont M *et al.*. Clindamycin/primaquine versus trimethoprim-sulfamethoxazole as primary therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS: a randomized, double-blind pilot trial. *Clin. Infect. Dis.* 1993 Aoû;17(2):178-184.
55. Walmsley S, Levinton C, Brunton J *et al.*. A multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial of adjunctive corticosteroids in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia complicating the acquired immune deficiency syndrome. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995 Apr 1;8(4):348-57.
56. Bozzette SA, Morton SC. Reconsidering the use of adjunctive corticosteroids in *Pneumocystis* pneumonia? *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1995 Avr 1;8(4):345-347.
57. Lane BR, Ast JC, Hossler PA *et al.*. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* 1997 Fév;175(2):482-485.
58. Huang L, Crothers K, Atzori C *et al.*. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. *Emerging Infect. Dis.* 2004 Oct;10(10):1721-1728.
59. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA *et al.*. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J. Infect. Dis.* 2000 Aoû;182(2):551-557.
60. Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA *et al.*. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS.* 1998 Mai 28;12(8):873-878.
61. Nahimana A, Rabodonirina M, Bille J *et al.*. Mutations of *Pneumocystis jirovecii* dihydrofolate reductase associated with failure of prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004 Nov;48(11):4301-4305.

62. Walker DJ, Wakefield AE, Dohn MN *et al.*. Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *J. Infect. Dis.* 1998 Déc;178(6):1767-1775.
63. Kessl JJ, Hill P, Lange BB *et al.*. Molecular basis for atovaquone resistance in *Pneumocystis jirovecii* modeled in the cytochrome bc(1) complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2004 Jan 23;279(4):2817-2824.
64. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA *et al.*. *Pneumocystis carinii* cytochrome b mutations are associated with atovaquone exposure in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 2001 Mar 1;183(5):819-822.
65. Smulian AG, Keely SP, Sunkin SM, Stringer JR. Genetic and antigenic variation in *Pneumocystis carinii* organisms: tools for examining the epidemiology and pathogenesis of infection. *J. Lab. Clin. Med.* 1997 Nov;130(5):461-468.
66. Meuwissen JH, Tauber I, Leeuwenberg AD *et al.*. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J. Infect. Dis.* 1977 Jul;136(1):43-49.
67. Pifer LL, Hughes WT, Stagno S, Woods D. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics.* 1978 Jan;61(1):35-41.
68. Philippe L, Rene C, Guillot J *et al.*. Impaction versus filtration for the detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999 Oct;46(5):94S.
69. Bartlett MS, Vermund SH, Jacobs R *et al.*. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *J Clin Microbiol.* 1997 Oct;35(10):2511-3.
70. Choukri F, Menotti J, Sarfati C *et al.*. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Clin. Infect. Dis.* 2010 Aoû 1;51(3):259-265.
71. Nevez G, Chabé M, Rabodonirina M *et al.*. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite.* 2008 Sep;15(3):359-365.
72. Walzer PD. *Pneumocystis carinii* infection. *South. Med. J.* 1977 Nov;70(11):1330-1337.
73. Sheldon W. Subclinical *Pneumocystis* pneumonitis. *Am J Dis Child.* 1959;97:287-297.
74. Sedaghatian MR, Singer DB. *Pneumocystis carinii* in children with malignant disease. *Cancer.* 1972 Mar;29(3):772-777.
75. Hamlin WB. *Pneumocystis carinii*. *J Amer Med Ass.* :1968;204:171-173.
76. Nevez G. Epidemiologie moléculaire des infections à *Pneumocystis jirovecii* Frenkel 1999. Thèse de doctorat d'université. Amiens: Université de Picardie, 2002, 145p.
77. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S *et al.*. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet.* 1990 Aoû 25;336(8713):451-453.
78. Weig M, Klinker H, Wilhelm M *et al.*. Correlation of *Pneumocystis carinii* PCR with clinical diagnosis in immunocompromised patients. *Lancet.* 1996 Mai 4;347(9010):1266.

79. Calderón EJ, Regordan C, Medrano FJ *et al.*. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet*. 1996 Avr 6;347(9006):977.
80. Nevez G, Magois E, Duwat H *et al.*. Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. *Clin. Infect. Dis.* 2006 Jun 1;42(11):e99-101.
81. Nevez G, Raccurt C, Jounieaux V *et al.*. *Pneumocystosis* versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS*. 1999 Mar 11;13(4):535-536.
82. Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1999 Oct;37(10):3409-3410.
83. Totet A, Meliani L, Lacube P *et al.*. 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.* 2003;50 Suppl:668-669.
84. Vargas SL, Ponce CA, Gálvez P *et al.*. *Pneumocystis* is not a direct cause of sudden infant death syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2007 Jan;26(1):81-83.
85. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *pneumocystis* colonization. *J. Infect. Dis.* 2008 Jan 1;197(1):10-17.
86. Calderón EJ, Rivero L, Respaldiza N *et al.*. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin. Infect. Dis.* 2007 Jul 15;45(2):e17-19.
87. Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clin. Infect. Dis.* 2010 Fév 1;50(3):347-353.
88. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 2001 Nov;39(11):3877-3882.
89. Dumoulin A, Mazars E, Seguy N *et al.*. Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000 Sep;19(9):671-678.
90. Cushion M. *Pneumocystis carinii*. Dans: Collier L, Balows A, Sussman M, eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, v. 4. New York: Oxford University Press; 1998:645-683.
91. de Boer MGJ, Bruijnesteijn van Coppenraet LES, Gaasbeek A *et al.*. An outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia with 1 predominant genotype among renal transplant recipients: interhuman transmission or a common environmental source? *Clin. Infect. Dis.* 2007 Mai 1;44(9):1143-1149.
92. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings* 2007.

93. Schmoldt S, Schuegger R, Wendler *et al.*. Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. *J. Clin. Microbiol.* 2008 Mar;46(3):966-971.
94. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, Centre Technique National des Infections Nosocomiales, Société Française d'hygiène Hospitalière, Recommandations d'isolement septique en établissement de soin. 1998;
95. Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP *et al.*. Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *J. Infect. Dis.* 1996 Jul;174(1):141-156.
96. Totet A, Duwat H, Magois E *et al.*. Similar genotypes of *Pneumocystis jirovecii* in different forms of *Pneumocystis* infection. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 2004 Mai;150(Pt 5):1173-1178.
97. Li J, Edlind T. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* based on beta-tubulin sequence. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1994 Oct;41(5):97S.
98. Gianella S, Haeberli L, Joos B *et al.*. Molecular evidence of interhuman transmission in an outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2010 Fév;12(1):1-10.
99. Höcker B, Wendt C, Nahimana A *et al.*. Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. *Emerging Infect. Dis.* 2005 Fév;11(2):330-332.
100. Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G *et al.*. Restriction fragment length polymorphism typing demonstrates substantial diversity among *Pneumocystis jirovecii* isolates. *J. Infect. Dis.* 2009 Nov 15;200(10):1616-1622.
101. Lu JJ, Bartlett MS, Shaw MM *et al.*. Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 1994 Déc;32(12):2904-2912.
102. Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998 Jan;36(1):90-93.
103. Tsolaki AG, Miller RF, Wakefield AE. Oropharyngeal samples for genotyping and monitoring response to treatment in AIDS patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Med. Microbiol.* 1999 Oct;48(10):897-905.
104. Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X *et al.*. Update on *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 1998 Mar;36(3):734-741.
105. van Hal SJ, Gilgado F, Doyle T *et al.*. Clinical significance and phylogenetic relationship of novel Australian *Pneumocystis jirovecii* genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2009 Jun;47(6):1818-1823.
106. Gupta R, Mirdha BR, Guleria R *et al.*. Genotyping and phylogenetic analysis of *Pneumocystis jirovecii* isolates from India. *Infect. Genet. Evol.* 2010 Aoû;10(6):712-719.

107. Nevez G, Totet A, Jounieaux V *et al.*. *Pneumocystis jirovecii* internal transcribed spacer types in patients colonized by the fungus and in patients with pneumocystosis from the same French geographic region. *J. Clin. Microbiol.* 2003 Jan;41(1):181-186.
108. Helweg-Larsen J, Lee CH, Jin S *et al.*. Clinical correlation of variations in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes in *Pneumocystis carinii f.sp. hominis*. *AIDS.* 2001 Mar 9;15(4):451-459.
109. Kasuga T, White TJ, Taylor JW. Estimation of nucleotide substitution rates in Eurotiomycete fungi. *Mol. Biol. Evol.* 2002 Déc;19(12):2318-2324.
110. Miller RF, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* genotypes and severity of pneumonia. *Lancet.* 1999 Jun 12;353(9169):2039-2040.
111. Matos O, Lee C, Jin S *et al.*. *Pneumocystis jirovecii* in Portuguese immunocompromised patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. *Infect. Genet. Evol.* 2003 Nov;3(4):281-285.
112. Cheung YF, Chan CF, Lee CW, Lau YL. An outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in children with malignancy. *J Paediatr Child Health.* 1994 Avr;30(2):173-175.
113. Ong YL, Jones FG. A cluster of suspected *Pneumocystis carinii* Pneumonia following intensive chemotherapy in a Belfast haematology unit. *Ulster Med J.* 1998 Nov;67(2):104-109.
114. Helweg-Larsen J, Tsolaki AG, Miller RF *et al.*. Clusters of *Pneumocystis carinii* pneumonia: analysis of person-to-person transmission by genotyping. *QJM.* 1998 Déc;91(12):813-820.
115. Olsson M, Eriksson BM, Elvin K *et al.*. Genotypes of clustered cases of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Scand. J. Infect. Dis.* 2001;33(4):285-289.
116. Rabodonirina M, Vanhems P, Couray-Targe S *et al.*. Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. *Emerging Infect. Dis.* 2004 Oct;10(10):1766-1773.
117. Goesch TR, Götz G, Stellbrinck KH *et al.*. Possible transfer of *Pneumocystis carinii* between immunodeficient patients. *Lancet.* 1990 Sep 8;336(8715):627.
118. Mori S, Cho I, Sugimoto M. A cluster of *Pneumocystis jirovecii* infection among outpatients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2010 Jul;37(7):1547-1548.
119. Hardy AM, Wajszczuk CP, Suffredini AF *et al.*. *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and steroids. *J. Infect. Dis.* 1984 Fév;149(2):143-147.
120. Bensousan T, Garo B, Islam S *et al.*. Possible transfer of *Pneumocystis carinii* between kidney transplant recipients. *Lancet.* 1990 Oct 27;336(8722):1066-1067.
121. Chave JP, David S, Wauters JP *et al.*. Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients: a cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. *AIDS.* 1991 Aoû;5(8):927-932.

122. Hennequin C, Page B, Roux P *et al.*. Outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a renal transplant unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1995 Fév;14(2):122-126.
123. Arichi N, Kishikawa H, Mitsui Y *et al.*. Cluster outbreak of *Pneumocystis* pneumonia among kidney transplant patients within a single center. *Transplant. Proc.* 2009 Fév;41(1):170-172.
124. Rodriguez M, Fishman JA. Prevention of infection due to *Pneumocystis spp.* in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004 Oct;17(4):770-782, table of contents.
125. Martin SJ, Fishman JA. *Pneumocystis* pneumonia in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 2009 Déc;9 Suppl 4:S227-233.
126. Branten AJ, Beckers PJ, Tiggeler RG, Hoitsma AJ. *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1995;10(7):1194-1197.
127. Lufft V, Kliem V, Behrend M *et al.*. Incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia after renal transplantation. Impact of immunosuppression. *Transplantation.* 1996 Aoû 15;62(3):421-423.
128. EBPG Expert Group on Renal Transplantation. European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: Long-term management of the transplant recipient. IV. 7.1 Late infections. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17(suppl 4):36.
129. *Pneumocystis jiroveci* (formerly *Pneumocystis carinii*). *Am. J. Transplant.* 2004 Nov;4 Suppl 10:135-141.
130. Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD *et al.*. Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: a phase II trial. Rapamune Study Group. *Transplantation.* 1999 Nov 27;68(10):1526-1532.
131. Dominguez J, Mahalati K, Kiberd B *et al.*. Conversion to rapamycin immunosuppression in renal transplant recipients: report of an initial experience. *Transplantation.* 2000 Oct 27;70(8):1244-1247.
132. Morelon E, Stern M, Kreis H. Interstitial pneumonitis associated with sirolimus therapy in renal-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 2000 Jul 20;343(3):225-226.
133. Oz HS, Hughes WT. Novel anti-*Pneumocystis carinii* effects of the immunosuppressant mycophenolate mofetil in contrast to provocative effects of tacrolimus, sirolimus, and dexamethasone. *J. Infect. Dis.* 1997 Avr;175(4):901-904.
134. O'Gara MJ, Lee CH, Weinberg GA *et al.*. IMP dehydrogenase from *Pneumocystis carinii* as a potential drug target. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997 Jan;41(1):40-48.
135. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation.* 1995 Aoû 15;60(3):225-232.
136. Browne BJ. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Trial. *Transplantation.* 1996 Déc 15;62(11):1697.

137. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Lancet*. 1995 Mai 27;345(8961):1321-1325.
138. Yale SH, Limper AH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clinic Proceedings*. 1996 Jan 1;71(1):5-13.
139. Arend SM, Westendorp RG, Kroon FP *et al.*. Rejection treatment and cytomegalovirus infection as risk factors for *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. *Clin. Infect. Dis*. 1996 Jun;22(6):920-925.
140. Gordon SM, LaRosa SP, Kalmadi S *et al.*. Should prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in solid organ transplant recipients ever be discontinued? *Clin. Infect. Dis*. 1999 Fév;28(2):240-246.
141. Radisic M, Lattes R, Chapman JF *et al.*. Risk factors for *Pneumocystis carinii* pneumonia in kidney transplant recipients: a case-control study. *Transpl Infect Dis*. 2003 Jun;5(2):84-93.
142. Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R *et al.*. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann. Intern. Med*. 1989 Aoû 1;111(3):223-231.
143. Fishman JA. Prevention of infection caused by *Pneumocystis carinii* in transplant recipients. *Clin. Infect. Dis*. 2001 Oct 15;33(8):1397-1405.
144. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N. Engl. J. Med*. 2007 Déc 20;357(25):2601-2614.
145. Hagerty JA, Ortiz J, Reich D, Manzarbeitia C. Fungal infections in solid organ transplant patients. *Surg Infect (Larchmt)*. 2003;4(3):263-271.
146. Robberts FJL, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Genotyping and Coalescent Phylogenetic Analysis of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *J. Clin. Microbiol*. 2004 Avr 1;42(4):1505-1510.

Table des matières

I.	Un peu d'histoire.....	15
II.	Pneumocystis jirovecii.....	16
A.	Morphologie.....	16
B.	Cycle biologique hypothétique dans l'alvéole pulmonaire.....	17
C.	Physiopathologie.....	18
D.	Diagnostic clinique :	19
1.	Pneumocystose pulmonaire.....	20
2.	Formes extrapulmonaires :	21
E.	Diagnostic mycologique :.....	21
1.	Les prélèvements	22
2.	Examen direct.....	23
3.	Diagnostic indirect.....	24
4.	Biologie moléculaire	25
F.	Prophylaxie et traitement :	26
1.	Traitement prophylactique :	26
2.	Traitement curatif :	28
3.	Résistance aux traitements	30
G.	Epidémiologie.....	31
1.	Notion d'épidémiologie de base	31
2.	Notion de colonisation et de transmission inter-humaine	31
H.	Prévention de la transmission.....	35
I.	Génotypage de <i>P. jirovecii</i>	36
1.	Méthodes de génotypage	36
2.	Génotypage des ITS.....	37
3.	Signification clinique des génotypes de <i>P. jirovecii</i>	38
III.	Revue de la littérature des cas groupés de pneumocystose.....	39

IV.	Pneumocystis et transplantation rénale	44
A.	Pneumocystose et transplantation d'organe	44
B.	Immunosuppression en transplantation rénale.....	44
C.	Facteurs de risques.....	45
1.	Thérapeutiques immunosuppressives	45
2.	Facteurs cliniques	46
	Cas groupés de pneumocystose dans le service de Néphrologie	47
I.	Alerte	48
II.	Investigation	48
III.	Matériels et méthodes	49
A.	Contexte	49
B.	Génotypage des séquences ITS	50
C.	Enquête épidémiologique	55
1.	Données microbiologiques.....	55
2.	Données cliniques	55
3.	Données administratives.....	55
IV.	Résultats	56
A.	Enquête rétrospective : Pneumocystose au CHU de Limoges	56
1.	Evolution du diagnostic	56
2.	L'évolution du nombre de cas de pneumocystose.....	57
B.	Les patients.....	59
1.	Définition d'un cas.....	59
2.	Descriptions des cas	59
3.	Caractéristiques générales de la population de l'étude.....	67
C.	Enquête épidémiologique	72
1.	Etudes des contacts entre les patients.....	72
2.	Synoptique.....	73
D.	Génotypage	76

1. Le géotypage des patients de néphrologie	76
2. Les patients contrôles	76
3. Arbre phylogénétique (figure 9).....	77
E. Mesures mises en places.....	78
V. Discussion.....	79
A. Discussion générale.....	79
B. Les patients.....	80
C. Les facteurs de risques	81
D. Les prélèvements	82
E. Hypothèse de transmission	85
F. Géotypage	83

Table des illustrations

Figure 1 : Cycle hypothétique de <i>Pneumocystis</i> spp. dans l'alvéole pulmonaire.....	18
Figure 2 : Détection de <i>Pneumocystis</i> par des différentes techniques de coloration.....	24
Figure 3 : Représentation schématique du gène des ARNr. En rose : les ITS.	37
Figure 4 : Evolution du nombre de cas de prélèvements positifs pour <i>P. jirovecii</i> au CHU de Limoges entre 1987 et 2010.....	57
Figure 5 : Evolution du nombre de prélèvements positifs pour <i>P. jirovecii</i> dans le service de néphrologie de 1987 à 2010.	58
Figure 6 : Evolution trimestrielle du nombre de prélèvements positifs pour <i>P. jirovecii</i> au CHU de Limoges de 2006 à 2010.....	58
Figure 7 : Synoptique des mouvements des patients.	75
Figure 8 : Répartition dans le temps des patients contrôles par rapport aux patients de néphrologie.	77
Figure 9 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences des ITS.	77

Table des tableaux

Tableau 1 : Molécules utilisées dans le traitement curatif de la pneumocystose.....	29
Tableau 2 : Variation des pourcentages de colonisation selon les populations étudiées et les études. Synthèse réalisée d'après une revue de la littérature de Morris (85).....	33
Tableau 3 : Publications rapportant des cas groupés de pneumocystose hors transplantés rénaux.....	40
Tableau 4 : Publications rapportant des cas groupés de pneumocystose chez des transplantés rénaux.	43
Tableau 5 : Description des patients.....	66
Tableau 6 : Caractéristiques des patients *sexe ratio.....	67
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des prélèvements et des résultats microbiologiques des cas.	68
Tableau 8 : Délais entre transplantation rénale et pneumocystose.....	69
Tableau 9 : Les traitements immunosuppresseurs.....	70
Tableau 10 : Les cofacteurs : Taux de CD4 et infection à CMV.....	71
Tableau 11 : Contacts entre patient potentiellement en incubation de la maladie.....	73
Tableau 12 : Caractéristiques et génotypes des patients contrôles.....	76

Annexe 1 : Questionnaire général

Questionnaire général

- Quel est le nombre de cas diagnostiqués dans votre centre entre janvier 2008 et février 2010 ? _ _ _ _ _
- Avez-vous noté une augmentation du nombre de cas par rapport aux années précédentes ? (nbre total de cas entre janvier 1998 et décembre 2007) _ _ _ _ _
- Méthode utilisée pour le diagnostic de Pneumocystose :
 - Pour les PCR : quel est le gène amplifié : _ _ _ _ _ ?
 - Pour les Examens directs : quelle est la technique utilisée :
 - coloration laquelle : _ _ _ _ _ ?
 - immunofluorescence
- Quelle est la durée de la prophylaxie anti-pneumocystis dans votre centre ? _ _ _ _ _
- Reprenez-vous la prophylaxie systématiquement en cas de majoration du traitement immunosuppresseur (traitement d'un rejet) ? : Oui Non
- Contrôlez-vous les sous-populations lymphocytaires ? Oui Non
Si oui à quel rythme ? _ _ _ _ _
- Devant l'augmentation des cas de Pneumocystose , avez -vous adopté des mesures d'isolement dans la salle d'attente de consultation ?
 - Lesquelles ? _ _ _ _ _
 - Préconisez-vous par exemple le port du masque pour les patients dans la salle d'attente ? Oui Non
- Quelles sont les mesures d'isolement du patient présentant une pneumonie à Pneumocystis :
 - chambre seule ? _ _ _ _ _
 - Type de Masque patient ? _ _ _ _ _
 - type de masque personnel soignant ? _ _ _ _ _

Annexe 2 : Questionnaire patient

Initiales Patient : _____

Date de naissance : __/__/__

Sexe : M FAntécédents maladie bronchopulmonaire chronique : Oui NonVIH : Oui Non**Date de greffe :** __/__/__

n° greffe : _____

induction : Oui Non AntiR112 ATG

Traitement immunosuppresseur avant la pneumonie à Pneumocystis : -

Traitement Immunosuppresseur	
	<input type="checkbox"/> stéroïdes
	Posologie des stéroïdes :
	<input type="checkbox"/> CsA
	<input type="checkbox"/> Tacrolimus
	<input type="checkbox"/> sirolimus
	<input type="checkbox"/> everolimus
	<input type="checkbox"/> MPA
	<input type="checkbox"/> Autre : _____

Date arrêt des stéroïdes : __/__/__**Prévention Pneumocystose post greffe immédiate**aérosol pentamidine Oui Nontriméthoprime-sulfaméthoxazole Oui Non

Date arrêt prévention : __/__/__

Initiales Patient : _ _ _ _ _

Episodes de rejet :

date de rejet			
cellulaire			
humoral			
ttt			
ttt par anti CD 20			
Reprise prévention pneumocystose			
Durée ttt si reprise prévention			

Immunologie

Sous population lymphocytaire quelques semaines ou mois avant l'infection :

- date du prélèvement __ / __ / __
- CD4 ____ /mm³ CD19 ____ /mm³

Sous population lymphocytaire au moment du diagnostic de l'infection

- date du prélèvement __ / __ / __
- CD4 ____ /mm³ CD19 ____ /mm³

Taux des gammaglobulines avant l'infection

- date du prélèvement __ / __ / __
- taux : ____ g/l

Initiales Patient : _____

Date de diagnostic __/__/__

Présentation clinique :

Toux Oui Non
 hyperthermie Oui Non
 dyspnée Oui Non
 asthénie Oui Non
 autre :

Biologie à l'admission :

CRP : _____mg/l
 Leucocytes : _____
 LDH _____ UI/l
 Créatinine _____ $\mu\text{mol/l}$ clairance MDRD : _____
 Créatinine de référence _____ $\mu\text{mol/l}$ clairance MDRD : _____

Gazométrie air ambiant sous O₂

- pH : _____

- PaO₂: _____mmHg- PCO₂ : _____mmHg

- Sat : _____%

Méthodes diagnostiques :

Examen :

LBA Oui Non
 expectoration induite Oui Non

technique biologique pour le diagnostic de Pneumocystose :

PCR positive Négative Non faiteExamen microscopique (kystes à l'examen direct) positive Négative

Si LBA : résultat de la cytologie : _____

autre recherche étiologique

grippe positive Négative Non faite
 adénovirus positive Négative Non faite
 métapneumovirus positive Négative Non faite
 VRS positive Négative Non faite
 CMV positive Négative Non faite

Ag pneumococcique urinaire positif Négative Non faitAg légionnelle urinaire positif Négative Non faitAntigénémie aspergillaire positive Négative Non faiteSérologie aspergillaire positive Négative Non faite

Initiales Patient : _ _ _ _ _

Imagerie

radiographie pulmonaire : normale
 syndrome interstitiel localisation de l'infiltrat : : _ _ _ _ _
 autre lésions

Scanner thoracique : normal
 syndrome interstitiel
 localisation de l'infiltrat : : _ _ _ _ _
 autre lésions : _ _ _ _ _
 Non fait

Evolution

Ventilation assistée : Oui Non
 Durée (jours) : _ _ _ _ _

Durée oxygénodépendance (jours) _ _ _ _ _

Décès : Oui Non

Traitement :

- Lequel ? _ _ _ _ _

- Posologie : _ _ _ _ _

- Date de début __ / __ / __ Date d'arrêt __ / __ / __

Corticothérapie associée :

Oui Non

Posologie initiale et décroissance : _ _ _ _ _

Prévention secondaire :

- Laquelle ? _ _ _ _ _

- Posologie : _ _ _ _ _

- durée : _ _ _ _ _

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

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

BON A IMPRIMER N° 3330

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Yu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Investigation de cas groupés de pneumocystose dans un service de néphrologie

Résumé :

La pneumocystose est une pathologie pulmonaire, due à un champignon, touchant les individus atteints de déficits immunitaires (congénitaux, acquis ou induits par des thérapeutiques immunosuppressives). La transmission interhumaine est aujourd'hui encore controversée, pourtant la description de cas groupés de pneumocystose chez des transplantés rénaux est de plus en plus fréquemment décrite dans la littérature.

Entre novembre 2007 et février 2010, 15 cas de pneumocystose ont été diagnostiqués dans le service de néphrologie du CHU de Limoges. Cette émergence de cas groupés a donné lieu à des investigations épidémiologique (courbe épidémique, tableau synoptique), mycologique et génotypique (séquençage des régions ITS 1 et 2 (Internal Transcribed Spacer)).

Les caractéristiques cliniques des patients ainsi que leurs facteurs de risque ont été analysés. L'analyse des séjours des patients a permis de relever de nombreux croisements entre les patients (moyenne 8,2) créant ainsi de nombreuses opportunités de contamination. Le génotypage des ADN extraits des prélèvements respiratoires des patients a mis en évidence trois génotypes différents : SYD1g (13 patients), Ai (1 patient) et Eg (1 patient). La prédominance du génotype Syd1g chez les patients de l'épisode oriente vers une transmission croisée. Les mesures préventives mises en place (isolement gouttelettes des patients atteints et l'introduction d'une prophylaxie chez les patients ayant un taux de CD4 bas) ont permis de stopper l'épidémie.

La découverte d'un génotype prédominant et la grande promiscuité entre ces patients sous-tendent l'hypothèse d'une transmission interhumaine nosocomiale.

Titre en anglais : Cluster of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in a nephrology unit

Résumé en anglais:

In the past few years, clusters of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) have been reported among immunocompromised patients and especially among renal transplant recipients. Nevertheless, the interhuman transmission is still controversial.

From November 2007 through February 2010, 15 cases of PCP were detected in the nephrology unit of the Limoges teaching hospital. This emergence led to epidemiological, mycological and genotypical (sequence analysis of the internal transcribed spacer number 1 and 2 regions) investigation.

The patient's profiles were analysed. To determine contact between patients, a transmission map was constructed and revealed numerous contacts (mean 8.2 per patient). This is compatible with interhuman transmission on multiple occasions. Genotyping of the DNA extract from patients respiratory samples revealed 3 different genotypes: SYD1g (13 patients), Ai (1 patient) and Eg (1 patient). The SYD1g predominance reinforces the notion of interhuman transmission route. The introduction of isolation of the cases and prophylaxis among the more immunocompromised patients led to stop the epidemic.

The epidemiological data and the genotyping results strongly suggest a nosocomial patient to patient transmission of *P. jirovecii* as the predominant transmission route.

DISCIPLINE-SPECIALITE DOCTORALE : PHARMACIE

Mots clés : *Pneumocystis jirovecii*, cas groupés, transplantés rénaux, ITS1 et 2, pneumocystose, transmission, nosocomial, prévention

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR :

Faculté de PHARMACIE de Limoges
2, rue du Docteur Marcland
87 025 LIMOGES CEDEX
