



HAL
open science

**Évaluation diagnostique et intérêt en pratique clinique
de la PCR temps réel pour différencier colonisation et
maladie chez des patients avec PCR positive à
Pneumocystis jirovecii : une étude prospective
monocentrique**

Thomas Fauchier

► **To cite this version:**

Thomas Fauchier. Évaluation diagnostique et intérêt en pratique clinique de la PCR temps réel pour différencier colonisation et maladie chez des patients avec PCR positive à *Pneumocystis jirovecii* : une étude prospective monocentrique. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01260202

HAL Id: dumas-01260202

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01260202>

Submitted on 21 Jan 2016

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

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

UNIVERSITÉ DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS
FACULTÉ DE MÉDECINE

Année 2014 N°

THESE

Présentée et soutenue publiquement :

Le 13 octobre 2014

Par

Thomas FAUCHIER

Né le 07 octobre 1983 à Ollioules

Pour l'obtention du diplôme d'état de Docteur en médecine

Evaluation diagnostique et intérêt en pratique clinique de la
PCR temps réel pour différencier colonisation et maladie
chez des patients avec PCR positive à *Pneumocystis jirovecii*:
une étude prospective monocentrique.

Jury de thèse :

Président : Professeur Pierre MARTY

Assesseurs :

Professeur Christian PRADIER

Professeur Pierre Simon ROHRLICH

Directeur de thèse : Docteur Christelle POMARES

Co-Directeur de thèse : Docteur Lilia HASSEINE

UNIVERSITÉ DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE

Liste des professeurs au **1er novembre 2013** à la Faculté de Médecine de Nice

Doyen

M. BAQUÉ Patrick

Assesseurs

M. CARLES Michel
Mme BREUIL Véronique
M. ESNAULT Vincent
M. MARTY Pierre

Conservateur de la bibliothèque

M. SCALABRE Grégory

Chef des services administratifs

Mme CALLEA Isabelle

Doyens Honoraires

M. AYRAUD Noël
M. RAMPAL Patrick
M. BENCHIMOL Daniel

Professeurs Honoraires

M. BALAS Daniel
M. BLAIVE Bruno
M. BOQUET Patrice
M. BOURGEON André
M. BOUTTÉ Patrick
M. BRUNETON Jean-Noël
Mme BUSSIERE Françoise
M. CHATEL Marcel
M. COUSSEMENT Alain
M. DAR COURT Guy
M. DELMONT Jean
M. DEMARD François
M. DOLISI Claude
M. FREYCHET Pierre
M. GÉRARD Jean-Pierre
M. GILLET Jean-Yves
M. GRELLIER Patrick
M. HARTER Michel

M. INGLES AKIS Jean-André
M. LALANNE Claude-Michel
M. LAMBERT Jean-Claude
M. LAPALUS Philippe
M. LAZDUNSKI Michel
M. LEFEBVRE Jean-Claude
M. LE BAS Pierre
M. LE FICHOUX Yves
M. LOUBIERE Robert
M. MARIANI Roger
M. MASSEYEFF René
M. MATTEI Mathieu
M. MOUIEL Jean
Mme MYQUEL Martine
M. OLLIER Amédée
M. ORTONNE Jean-Paul
M. SCHNEIDER Maurice
M. TOUBOL Jacques

M. TRAN Dinh Khiem
M. ZIEGLER Gérard

M.C.A. Honoraire

Mlle ALLINE Madeleine

M.C.U. Honoraires

M. ARNOLD Jacques
M. BASTERIS Bernard
Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie
M. EMILIOZZI Roméo
M. GASTAUD Marcel
M. GIRARD-PIPAU Fernand
M. GIUDICELLI Jean
M. MAGNÉ Jacques
Mme MEMRAN Nadine
M. MENGUAL Raymond
M. POIRÉE Jean-Claude
Mme ROURE Marie-Claire

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. AMIEL Jean	Urologie (52.04)
M. BENCHIMOL Daniel	Chirurgie Générale (53.02)
M. CAMOUS Jean-Pierre	Thérapeutique (48.04)
M. DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M. DELLAMONICA Pierre	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M. DESNUELLE Claude	Biologie Cellulaire (44.03)
Mme EULLER-ZIEGLER Liana	Rhumatologie (50.01)
M. FENICHEL Patrick	Biologie du Développement et de la Reproduction (54.05)
M. FRANCO Alain	Gériatrie et Biologie du vieillissement (53.01)
M. FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M. GASTAUD Pierre	Ophtalmologie (55.02)
M. GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M. GRIMAUD Dominique	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M. HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M. HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M. HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M. LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénéréologie (50.03)
Mme LEBRETON Élisabeth	Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthétique (50.04)
M. MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M. PRINGUEY Dominique	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M. QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M. SANTINI Joseph	O.R.L. (55.01)
M. THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M. VAN OBBERGHEN Emmanuel	Biochimie et Biologie Moléculaire (44.01)

PROFESSEURS PREMIERE CLASSE

M. BATT Michel	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M. BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)

M.	BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
M.	BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
Mme	CRENESSE Dominique	Physiologie (44.02)
M.	DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M.	DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M.	ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
M.	FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M.	GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M.	GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
Mme	ICHAÏ Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M.	MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M.	MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M.	MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
M.	PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
Mme	PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M.	RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
Mme	RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M.	ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M.	SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M.	TRAN Albert	Hépatogastro-entérologie (52.01)

PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

M.	ALBERTINI Marc	Pédiatrie (54.01)
Mme	ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M.	BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
M.	BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M.	BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M.	BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
Mme	BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie - Génétique (47.02)
M.	BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
Mlle	BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M.	CANIVET Bertrand	Médecine Interne (53.01)
M.	CARLES Michel	Anesthésiologie Réanimation (48.01)
M.	CASSUTO Jill-Patrice	Hématologie et Transfusion (47.01)
M.	CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
M.	CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	DUMONTIER Christian	Chirurgie plastique
M.	FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
M.	FREDENRICH Alexandre	Endocrinologie, Diabète et Maladies métaboliques (54.04)
Mlle	GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
M.	GUÉRIN Olivier	Gériatrie (48.04)
M.	HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)

M. JOURDAN Jacques	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
M. LEVRAUT Jacques	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M. PASSERON Thierry	Dermato-Vénérologie (50.03)
M. PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
M. PRADIER Christian (46.01)	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention
M. ROGER Pierre-Marie	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M. ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M. RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
M. SADOUL Jean-Louis (54.04)	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques
M. STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M. THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)
M. TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M. VENISSAC Nicolas	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS

M. SAUTRON Jean-Baptiste	Médecine Générale
--------------------------	-------------------

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme ALUNNI-PERRET Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M. AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M. BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
Mme BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M. DELOTTE Jérôme	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
M. DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
Mme DONZEAU Michèle (54.05)	Biologie du Développement et de la Reproduction
M. FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M. FRANKEN Philippe	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M. GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
Mlle LANDRAUD Luce	Bactériologie-Virologie (45.01)
Mme LEGROS Laurence	Hématologie et Transfusion (47.01)
Mme MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
Mme MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M. NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
M. PHILIP Patrick	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
Mlle PULCINI Céline	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M. ROUX Christian	Rhumatologie (50.01)

M. TESTA Jean (46.01)	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention
M. TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

PROFESSEURS ASSOCIÉS

M. DIOMANDE Mohenou Isidore	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M. HOFLIGER Philippe	Médecine Générale
M. MAKRIS Démosthènes	Pneumologie
M. PITTET Jean-François	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale
Mme POURRAT Isabelle	Médecine Générale

MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Mme CHATTI Kaouthar	Biophysique et Médecine Nucléaire
M. GARDON Gilles	Médecine Générale
Mme MONNIER Brigitte	Médecine Générale
M. PAPA Michel	Médecine Générale

PROFESSEURS CONVENTIONNÉS DE L'UNIVERSITÉ

M. BERTRAND François	Médecine Interne
M. BROCKER Patrice	Médecine Interne Option Gériatrie
M. CHEVALLIER Daniel	Urologie
Mme FOURNIER-MEHOUAS Manuella	Médecine Physique et Réadaptation
M. QUARANTA Jean-François	Santé Publique

Remerciements :

A Monsieur le Professeur Marty,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail.

Je vous remercie de m'avoir accepté dans votre stage en tant que hors-filière, d'avoir cru en un interne de santé publique, de m'avoir fait confiance pour mener à bien cette étude, et, dans une certaine mesure, de veiller à la transversalité des disciplines médicales. La santé publique doit être une discipline qui, par sa rigueur et sa méthode, doit aider les autres spécialités à effectuer des travaux scientifiques dans le but de faire avancer la recherche et la médecine.

Je vous remercie de contribuer à l'épanouissement intellectuel des internes de toute spécialité.

Sachez que je garde un excellent souvenir de mon passage dans votre service, si bien que je passe ma thèse avec vous !

Recevez ma plus grande considération.

A Monsieur le Professeur Pradier,

Vous me faites l'honneur de votre participation au jury de cette thèse.

Je vous remercie d'évaluer la qualité de ce travail, en tant que professeur de Santé Publique.

Soyez assuré de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Rohrlich,

Vous me faites un grand honneur en siégeant dans ce jury.

Je vous remercie d'avoir accepté si spontanément de juger mon travail de thèse.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Pomares,

Tu me fais l'honneur d'avoir été ma directrice de thèse.

Je te remercie de l'accueil que tu m'as fait dans votre service, il y a 3 ans de cela... Cela passe si vite !

Je te remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir confié ce travail qui m'a suivi jusqu'au bout du monde, dans un lagon paradisiaque, et qui a continué sous la grisaille de Paris après une escale à Nice, pour aujourd'hui se présenter en tant que thèse de médecine.

Merci pour tous tes conseils, pour nos heures de discussions téléphoniques et de réécriture !

Reçois ma plus grande considération.

A Madame le Docteur Hasseine

Merci de m'avoir soutenu, de m'avoir expliqué les différentes techniques de mycologie (pas très évidentes !).

Sois assurée de ma sincère gratitude.

A Virginie, sans qui l'ébauche de cette thèse n'aurait pu voir le jour. Merci, un grand merci pour ton aide !!!!!

A mes Professeurs de Santé Publique, Messieurs Pradier, Quaranta et Staccini, pour la qualité de leur enseignement et leur pédagogie.

A Monsieur le Docteur Fosse, à Mesdames les Docteurs Berrouane et Veyres, pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre compétence pour m'avoir fait aimer l'hygiène hospitalière ... j'espère vous revoir bientôt.

A Madame le Docteur Mirabel, pour avoir cru en moi et m'avoir fait confiance, pour avoir fait la tournée des dispensaires de Nouvelle-Calédonie, et m'avoir aidé dans mon épanouissement personnel et professionnel.

Aux équipes du laboratoire de parasitologie-mycologie, équipe d'hygiène hospitalière Dr Gari-Toussaint, Dr Delaunay (aaaah... les punaises de lit... j'en ai rêvé !!!), à Mme Cassar, à Mme Degus. Votre gentillesse et votre accueil ont été très importants pour moi dans les services... la preuve par les gâteaux !! (Larmes !).

A l'équipe du DIM (la DIM TEAM), à nos discussions sur la nourriture (surtout après les repas... oui le codage c'était dur en postprandial), Dr Bourdais-Manonne, Dr Gycquel, Mmes Bloquet Rasson....

A l'ASSNC, Weena, Agnès, Claire, Dr Rouchon... aaah, les cocotiers, le lagon (soupir !)
A tous mes amis de Nouvelle Calédonie, mes anciens co-internes : mes nièces, papa, maman, papy, mamy, à nos moments inoubliables sur le Caillou !!!

A tous mes co-internes de Santé Publique qui se reconnaîtront.

A mes amis Co-internes de Nissa la Bella : Linda (mi- parisienne mi- niçoise), Christine, Caroline (ouais ouais ouais bien bien bien), Géraldine (et nos discussions très intéressantes à l'internat).

Et il n'y a pas que la médecine et les statistiques dans la vie...

A mes amis : Mickael, Lambert, Lilian, Célia, Constance, Canardia (où es-tu ?), Canard Xavier, Morgane, Valérie (le délire plein), Jérôme, Mickey, Poum-Poum.

A ma famille. Merci Papa et Maman de m'avoir soutenu dans ces années difficiles qu'est l'externat. Merci d'avoir cru en moi. Merci de votre amour et de me supporter depuis 30 ans...

A ceux qui n'en sont allés et ne sont plus là aujourd'hui pour me voir... A mes grands-parents, qui me manquent...

Table des matières

Abréviations.....	14
Introduction.....	15
Pathologie et espèce incriminée :.....	15
Historique :	15
Description initiale de la pathologie :	15
Pneumocystose chez le patient VIH :.....	16
Pneumocystose chez les non VIH après l'arrivée des trithérapies :	16
Découverte de patients 'colonisés' par <i>Pneumocystis jirovecii</i>	17
La colonisation asymptomatique remise en question :	17
Biologie du champignon :	17
Habitat :.....	17
Cycle du champignon :	18
Techniques diagnostiques :	19
Microscopie et coloration :.....	19
Immunofluorescence indirecte et PCR :.....	19
Techniques PCR utilisées :	20
Détection des β 1,3-D-glycanes sériques:.....	20
Problématiques actuelles :	21
Problématique diagnostique :	21
Problématique clinique :	21
Problématique thérapeutique :.....	22
Objectifs de l'étude :	22
Matériel et Méthode.....	23
Type d'étude :.....	23
Critères d'inclusion :	23
Provenance des patients :	23
Modalité de recueil clinique :	24
Les données recueillies :.....	24
Méthode de Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR) :	28
Définition du cycle seuil (CT) :	29
Méthode d'examen direct (microscopie) :.....	29
Etude réalisée en aveugle :.....	29

Relecture des dossiers :	30
Analyses statistiques :	30
Résultats	31
Échantillon de l'étude avec l'ensemble des qPCR positives	32
Analyse du sous échantillon de patients avec Pneumocystose maladie PJP+ versus colonisation PJP-	37
Les cycles seuils de la qPCR <i>Pneumocystis</i> : un outil pour distinguer Pneumocystose maladie (PJP+) et colonisation (PJP-)	46
Discussion	58
Critère principal de jugement	58
Critères secondaires de jugement :	60
Caractéristiques de l'échantillon qPCR+ :	60
Forces et faiblesses de l'étude :	66
Puissance et implications pratiques :	67
Conclusion	68
Résumé	69
Bibliographie	71

Abréviations

CHU : Centre hospitalier universitaire

CD4 : lymphocyte cluster de différenciation 4

CD8 : lymphocyte cluster de différenciation 8

Courbe ROC : courbes d'analyse de la sensibilité et de la spécificité d'un examen par rapport à un examen de référence.

CT : cycles de seuil

DIM : département d'informatique médical

LBA : liquide broncho-alvéolaire

IC : intervalle de confiance

IQR : intervalle interquartile

Odd (Côte) : rapport du nombre d'exposés sur le nombre de non exposés. Ex : rapport des PJP+ sur les PJP-.

Odds ratio (OR) : rapport des Odds (rapport des côtes).

Patient PJP- : patient du groupe considéré colonisé ou porteur

Patient PJP+ : patient du groupe considéré malade

Patient VIH : patient souffrant du VIH

Patient non VIH : patient ne souffrant pas du VIH

PCR : polymérase chain reaction

qPCR : PCR en temps réel

PJP : *Pneumocystis jirovecii pneumonia* : pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii*

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

ROC : Receiver operating characteristic.

VIH : virus de l'immunodéficience humain.

VPN : valeur prédictive négative.

VPP : valeur prédictive positive.

Introduction

Pathologie et espèce incriminée :

La pneumocystose (*Pneumocystis jirovecii* pneumonia ou PJP) est une pathologie respiratoire aiguë potentiellement mortelle en l'absence de traitement. L'agent pathogène incriminé est un champignon dénommé *Pneumocystis jirovecii* (ex *carinii*) (1) appartenant au règne des fungi. Cette pathologie touche exclusivement les patients immunodéprimés. Il n'est pas cultivable et son identification reste problématique, par méthode directe ou indirecte (2-5).

Historique :

Description initiale de la pathologie :

Décrit par Antonio Carini dans les poumons de rat en 1910, un an après la découverte du pathogène par Carlos Chagas, la communauté scientifique a baptisé ce pathogène *Pneumocystis carinii*. Otto Jirovec a identifié ce micro-organisme dans l'espèce humaine chez des enfants malnutris souffrant de pneumopathies interstitielles et l'a classé dans le règne des protozoaires(2). Aujourd'hui après l'analyse du génome, *Pneumocystis* est classé dans le règne des fungi et a été rebaptisé *Pneumocystis jirovecii* (3-4). Chaque espèce semble hôte-spécifique (5) et était jusqu'à peu de temps décrite uniquement chez les mammifères, notamment le rat (6) mais certaines études semblent contredire cette affirmation. On a ainsi pu détecter *Pneumocystis* parmi les volailles et, si le champignon semble spécifique à l'espèce infectée, une étude a montré le passage d'un *Pneumocystis* humain à la volaille (7). Néanmoins, il n'y a pas eu de preuve de passage de *Pneumocystis* des animaux à l'Homme(7).

Pneumocystose chez le patient VIH :

D'épidémies localisées dans des collectivités d'enfants défavorisés dans les années 50 (1, 8), la maladie est devenue endémique avec l'épidémie de SIDA au début des années 80. Cette maladie se présentait alors chez de jeunes gens immunodéprimés par le VIH par une triade fièvre/dyspnée/toux, d'apparition frustrée, d'évolution insidieuse et fatale sans traitement en quelques semaines (8). Le risque était particulièrement élevé lorsque le taux de lymphocytes sanguins CD4+ était en dessous de 200 éléments/mm³ (9). La PJP représentait la plus fréquente des maladies opportunistes classant les patients infectés par le VIH en stade SIDA (25 à 30% des cas (10,11)). Une étude a estimé l'incidence d'un premier épisode de PJP à 3,9 cas pour 1000 patients-années chez des patients VIH de 2003 à 2007 (12).

Pneumocystose chez les non VIH après l'arrivée des trithérapies :

Au cours des années 90, l'arrivée des trithérapies et une meilleure prise en charge des personnes séropositives a fait reculer cette pathologie souvent inaugurale de la phase SIDA(13,14), tout en restant la manifestation la plus fréquente (337 PJP sur 1510 cas de SIDA déclarés à l'Institut de veille sanitaire (InVS) soit 25% (15). En revanche, la mise sur le marché de chimiothérapies anti-cancéreuses plus agressives pour les cancers, les hémopathies malignes, les thérapies immunosuppressives pour des pathologies auto-immunes (15), ont fait émerger de nouveaux facteurs de risque de pneumocystose chez des patients historiquement non concernés par cette maladie (16-21). De plus, les syndromes décrits chez ces nouveaux immunodéprimés (patients non VIH) divergent de la pneumocystose habituellement décrite chez les patients VIH (22) avec une apparition brutale des symptômes, des désaturations plus fréquentes et une évolution rapide et fatale en l'absence de traitement (23). Ces symptômes peuvent être causés par une réaction immunitaire plus forte(24). Le nombre absolu de PJP dans la population non VIH n'est pas connu car il n'y a pas de système national de déclaration pour cette population (5), néanmoins des études ont montré une prévalence de 2 à 45% (25).

Découverte de patients 'colonisés' par *Pneumocystis jirovecii*

Dans les années 2000, de nouvelles techniques diagnostiques ont montré la présence de *Pneumocystis* chez des individus immunocompétents(26) et chez des enfants (27,28).

La colonisation asymptomatique remise en question :

L'innocuité du pathogène chez des patients apparemment non immunodéprimés commence à être remise en question, notamment chez les nourrissons et la mort subite inexplicée (29-31) ou les patients atteints de pathologies pulmonaires chroniques comme la broncho-pneumopathie obstructive (32-34), la sarcoïdose, la mucoviscidose (35,36) ou la dilatation des bronches (26,37). On retrouve même ce pathogène dans la population générale après autopsie (38). Les prévalences de la maladie dans différentes sous-populations commencent à être étudiées (29,39), ainsi certaines études ont montré une prévalence de 27% chez les sujets VIH en Afrique (40) et une étude chilienne a montré une prévalence de 83,5% chez les enfants victimes de mort inexplicée du nourrisson (29) même si on n'a pu en démontrer la responsabilité (41). Les conséquences individuelles d'une colonisation par *Pneumocystis* restent mal évaluées par manque d'études suivies des sujets colonisés

Biologie du champignon :

Habitat :

Pneumocystis se développe dans les alvéoles pulmonaires en contact étroit avec les pneumocytes de type I, d'où son nom, tout en restant extracellulaire (42). Les alvéoles pulmonaires sont les seuls lieux de multiplication connus. L'Homme infecté est son propre réservoir et la principale source de *P.jirovecii* (43). La transmission interhumaine en milieu hospitalier a été évoqué dans un contexte de cas groupés de PJP (44,45).

Cycle du champignon :

Le cycle de *Pneumocystis jirovecii* reste méconnu dans l'alvéole pulmonaire. Il existe des formes trophiques et des formes kystiques. Les kystes matures contiennent huit corps intrakystiques qui donnent des petites formes trophiques après libération et selon un cycle hypothétique. Ces formes trophiques sont très adhérentes entre elles ainsi qu'à la surface des pneumocystes de type I (42). Le schéma 1 présente une hypothèse de cycle. La paroi des prékystes intermédiaires, tardifs et matures, contient des β -1,3-D-glycanes (46).

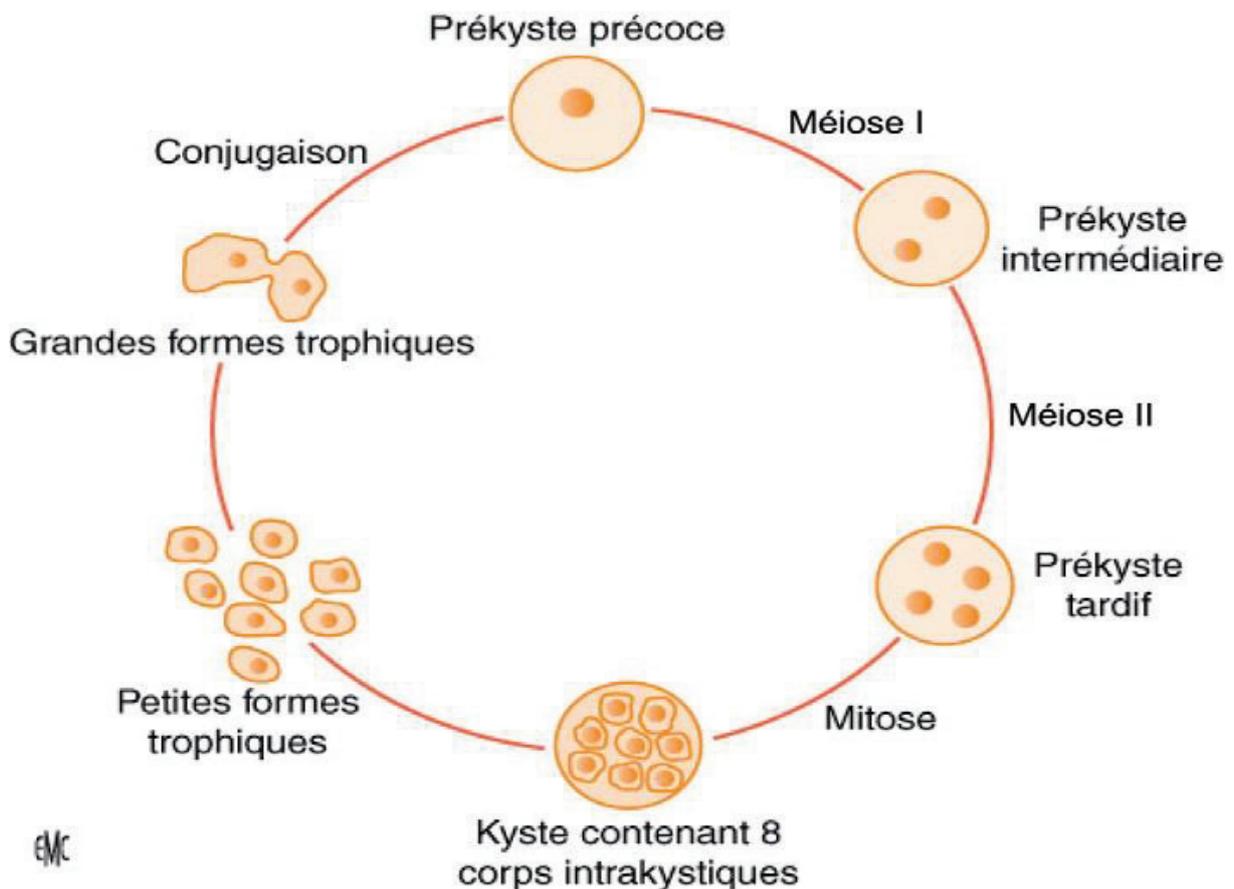


Schéma 1 : cycle hypothétique de *Pneumocystis jirovecii* dans l'alvéole pulmonaire. Source :Le Gal S, Damiani C, Totet A, Nevez G. *Pneumocystis : diagnostic biologique des infections à Pneumocystis jirovecii*. EMC-Biologie médicale 2012 ;0(0) :1-8[Article 90-35-0098-A]

Techniques diagnostiques :

Microscopie et coloration :

La culture s'avérant impossible (39,47), le diagnostic s'est initialement fait par examen direct après prélèvement pulmonaire distal (examen microscopique après coloration de Giemsa, de Chalvardjian (Bleu de Toluidine O), ou de Gomori Gocrott). Ces différentes colorations présentent des avantages et des inconvénients : Giemsa permet de détecter les formes trophiques et kystiques alors que Chalvardjian ne permet d'observer que les formes kystiques (48) et Gomori Gocrott les formes kystes plus rapidement (49). En revanche, ces colorations très spécifiques permettent de diagnostiquer les pneumocystoses avec une charge fongique très élevée typique des patients VIH.

Immunofluorescence indirecte et PCR :

Au milieu des années 1980 la production d'anticorps monoclonaux spécifiques de *Pneumocystis* a permis de développer des techniques d'immunodétection par immunofluorescence indirecte (42,50,51) mais c'est surtout la polymérase chain reaction (PCR) qui a permis d'augmenter la sensibilité des examens en détectant la présence d'ADN de *Pneumocystis jirovecii* chez des patients immunocompétents apparemment sains (38,52). En effet, une méta-analyse de dix ans a trouvé une sensibilité de 99,1%, une spécificité de 92,6% sur des LBA (53). Si la PCR a permis l'identification de patients colonisés présentant ou non des symptômes pulmonaires, elle ne distingue pas une simple colonisation d'une véritable maladie (54). Cette méthode qualitative ne présageait pas non plus de la charge fongique allant de pair avec le statut colonisation ou maladie. En effet, plusieurs études démontrent que la charge fongique est corrélée au statut colonisation ou maladie (plus la charge fongique est élevée et plus la probabilité d'infection s'accroît) (55,56). Une nouvelle technique PCR quantitative en temps réel (qPCR) permet grâce à l'amplification au-delà d'une valeur appelée cycle de seuil (CT), valeur proportionnelle à la charge fongique, de quantifier la concentration fongique dans les prélèvements. Plusieurs études ont tenté d'obtenir des seuils de sensibilité et de spécificité en prenant

comme examen de référence la microscopie et surtout l'immunofluorescence indirecte pour distinguer la colonisation de la maladie en fonction de la charge fongique (56,57).

Techniques PCR utilisées :

- PCR conventionnelle : c'est une PCR qualitative : elle détecte la présence ou l'absence du pathogène recherché dans le prélèvement. Elle ne quantifie pas la concentration de l'agent recherché et ne peut déterminer une charge fongique.
- PCR quantitative : real-time PCR ou PCR temps réel : c'est une PCR quantitative : elle détecte l'absence ou la présence du pathogène recherché dans le prélèvement et amplifie au-delà d'un seuil le produit de la PCR. Ce signal seuil est appelé cycle seuil ou CT (Cycle threshold). Le moment d'apparition de ce cycle de seuil est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le CT calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal (\log_{10}) du nombre de copies initiales. Il apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR. Elle permet donc une quantification. Dans la technique de PCR en temps réel, il existe plusieurs variantes utilisant différentes sondes. Dans notre cas, nous utilisons une sonde Taqman (hydrolyse des sondes)

Détection des β 1,3-D-glycanes sériques:

La détection des β 1,3-D-glycanes sériques pour le diagnostic des infections fongiques profondes a été développée. Un taux supérieur à 80-100 pg/ml est en faveur d'une infection à *Pneumocystis jirovecii* si le patient ne présente pas d'autre infection fongique invasive (58,59). Cette méthode de référence reste en seconde intention après microscopie et PCR.

Problématiques actuelles :

Problématique diagnostique :

Plus la charge fongique est élevée, plus la probabilité d'avoir une PJP s'accroît. Néanmoins, la charge fongique chez les patients immunodéprimés non VIH avec PJP est plus basse que la charge fongique chez les patients VIH avec PJP et pourrait se confondre avec des colonisations (16).

Le diagnostic de colonisation et sa distinction de la maladie lorsqu'il existe une symptomatologie pulmonaire est une problématique pour le clinicien actuel. De plus, l'innocuité de la colonisation pourrait être remise en cause et nécessiter un diagnostic supplémentaire de 'colonisation par *Pneumocystis jirovecii* à surveiller', notamment chez les patients souffrants de pathologies pulmonaires chroniques ou immunodéprimés.

Problématique clinique :

La présentation clinique chez les patients malades présentant la maladie varie en fonction de la pathologie sous-jacente ; ainsi les patients VIH ont une présentation clinique différente des patients non VIH, du fait de la charge fongique et d'une réaction immunitaire plus sévère chez les patients non VIH. Les patients VIH ont une charge fongique plus importante avec une dyspnée progressive, une toux d'apparition insidieuse, une fièvre et une évolution frustrée sur plusieurs semaines contrastant avec la présentation de la maladie chez les patients non VIH avec une charge fongique beaucoup plus faible, une dyspnée brutale avec désaturation rapide, une toux d'installation rapide pouvant être accompagnée de forte fièvre (5). De plus, la PJP peut être confondue avec d'autres pathologies respiratoires infectieuses ou inflammatoires comme des pneumopathies virales ou des pneumopathies de sensibilité ou médicamenteuses. Etablir des seuils de détection différents entre patients VIH et non VIH pourraient faciliter le diagnostic et améliorer la prise en charge des patients malades, notamment chez les patients non VIH chez qui la maladie demeure moins connue.

Problématique thérapeutique :

Alors que les patients VIH (60) et dans certains cas chez les patients non VIH (granulomatose de Wegener ou transplantés rénaux) disposent de recommandations (17,18,61) pour la prévention de la PJP, la prévention chez d'autres patients non VIH reste à définir (16,62,63), notamment chez les patients recevant une immunosuppression par corticoïdes (maladies auto-immunes, chimiothérapies) (64).

De plus, plusieurs problèmes sont rencontrés à cause des molécules utilisées : la toxicité des traitements (sulfadiazine-triméthoprim et en second recours : pentadimine , clindamycine-primaquine ou atovaquone (65,66)) et l'émergence de résistance (16) préconisent une diminution des posologies des traitements (67)) ainsi qu'un meilleur diagnostic pour une meilleure prescription des molécules antipneumocystoses (39). Néanmoins, la question de traiter ou non les colonisations est posée car il semble que les colonisations ne soient pas sans risque (8,21,26).

Objectifs de l'étude :

Il y a plusieurs objectifs à différencier dans cette étude, l'objectif principal étant d'obtenir des valeurs de cycles de seuil (CT) pour distinguer la colonisation de la maladie. Nous avons voulu aussi décrire l'échantillon de patients avec qPCR positive et étudier ses caractéristiques. Les trois grands points sont définis ci-après :

-Description de l'échantillon des patients avec qPCR positif à *Pneumocystis jirovecii* par rapport à la décision clinique (valeur de référence).

-Critère principal : Obtenir des valeurs-seuils de cycles de seuil (CT) de la qPCR avec des sensibilités et spécificités pertinentes pour distinguer colonisation de la maladie chez des patients avec un lavage broncho-alvéolaire (LBA) positif pour *Pneumocystis* par la technique qPCR.

-Critère secondaire : Obtenir des valeurs-seuils de CT de la qPCR avec des sensibilités et spécificités pertinentes pour des patients suspects de pneumocystose en fonction de leur statut sérologique pour le VIH.

Matériel et Méthode

Type d'étude :

Il s'agissait d'une étude de cohorte prospective monocentrique non interventionnelle diagnostique en aveugle au Centre Hospitalier Universitaire de Nice (CHU), France. L'étude était en simple aveugle. L'inclusion a commencé au 1^{er} avril 2008 pour se terminer le 1^{er} octobre 2013. La date de fin d'étude était le 1^{er} janvier 2014, soit trois mois après la date de fin d'inclusion.

Critères d'inclusion :

Les qPCR *Pneumocystis* étaient systématiquement réalisées sur tout prélèvement respiratoire (LBA, crachats, expectorations induites).

Nous avons inclus toutes les qPCR positives à *Pneumocystis jirovecii*.

Pour l'étude de la sensibilité et spécificité de la qPCR, seuls les liquides broncho-alvéolaires (LBA) ont été retenus : en effet, les LBA étaient les prélèvements les plus pertinents pour le diagnostic de PJP, notamment chez les patients VIH (68)

Provenance des patients :

Les patients provenaient des hôpitaux des Alpes-Maritimes et du Var-est, région Provence-Alpes-Côte-D'azur Est (PACA Est) pour laquelle le Centre Hospitalier Universitaire de Nice est au centre du réseau de soin. Les qPCR positives ont concerné les prélèvements des patients des hôpitaux du CHU de Nice (Alpes-Maritimes), le Centre Antoine Lacassagne (Nice, Alpes-Maritimes), le Centre hospitalier d'Antibes (Alpes-Maritimes) et le Centre hospitalier de Fréjus-Saint-Raphaël (Var). Seul le CHU de Nice disposait d'une technique de diagnostic par qPCR dans la région, ce qui fait que le CHU

de Nice avait l'exhaustivité des cas de colonisation ou de maladie à *Pneumocystis* de la région.

Modalité de recueil clinique :

L'identité du patient était connue grâce à un numéro d'identification donné par le logiciel de laboratoire GLIMS®. Par la suite, on recueillait les données cliniques, biologiques et radiologiques du patient avec le logiciel CLINICOM® (INTERSYSTEM®). L'évolution et la décision clinique ont été recueillies grâce aux comptes rendus disponibles sur CLINICOM® et les diagnostics principaux et secondaires retenus par le département d'informatique médical (DIM).

Les données recueillies :

Une fiche de collecte était réalisée avec comme données recueillies :

-le sexe, l'âge de la personne (date de naissance) et la date de prélèvement.

-des données cliniques :

*le contexte clinique ayant motivé la recherche de *Pneumocystis jirovecii* (69)

- fièvre
- dyspnée
- toux,
- autres symptômes moins spécifiques comme hémoptysie, œdème aigu du poumon, etc....

* antécédents médicaux à risque de pneumocystose, classées en 6 catégories.

- pathologies immunodépressives
- auto-immunes
- cancers
- hémopathies malignes,
- statut sérologique VIH

- les autres comorbidités étaient répertoriées dans la catégorie « autre ».

*le service demandeur

Les services demandeurs étaient soit des services du CHU, soit des services provenant d'hôpitaux extérieurs au CHU. Du fait de la complexité du prélèvement, le prélèvement respiratoire se faisait dans des services avec plateaux techniques adéquats (service de pneumologie ou de réanimation). Dans le cadre des autres services, les patients étaient transférés en ambulatoire dans les services de pneumologie afin de pratiquer le prélèvement.

Dans la fiche de collecte, le service demandeur restait le service pour lequel l'hospitalisation principale avait été demandée.

Pour plus de commodités, les services demandeurs ont été regroupés et classés dans 6 disciplines :

- hématologie/cancérologie
- réanimation
- pneumologie
- médecine interne
- infectiologie
- les autres services étaient regroupés dans la catégorie « autre ».

*le traitement au long cours pour rechercher des traitements à risque (thérapies immunosuppressives) ou des traitements préventifs antipneumocystoses.

On considérait traitement au long cours tout traitement curatif, préventif ou prophylactique d'une pathologie chronique. Nous portions plus particulièrement notre attention sur les thérapies immunosuppressives (chimiothérapie, corticothérapie, immunothérapie) de pathologies chroniques (cancers, hémopathies malignes, maladies auto-immunes) ou les traitements antirétroviraux chez les patients VIH.

Il était également noté les mises sous traitement préventif par sulfadiazine-triméthoprime chez les patients immunodéprimés (immunodépression par le VIH, etc.).

Nous avons considéré quatre classes thérapeutiques :

- immunodépresseurs, comprenant immunosuppresseurs et corticothérapie.

- antirétroviraux
- prévention antipneumocystose
- autres traitements au long cours

Les combinaisons de ces associations thérapeutiques (bithérapies) étaient également étudiées.

*la décision clinique de considérer la qPCR positive comme Pneumocystose maladie ou comme simple colonisation à *Pneumocystis jirovecii*.

* Traitement curatif de l'épisode aigu :

On considérait comme traitement curatif le traitement principal entrepris pour l'épisode ayant motivé la demande de recherche de *Pneumocystis* :

- traitement par sulfadiazine-triméthoprime curative
- traitement par antibiotique
- traitement par corticothérapie
- autre traitement, etc...

Un traitement secondaire était inscrit en cas de corticothérapie associée à un traitement curatif de la pneumocystose dans le cas d'une pneumocystose grave (si Pression en oxygène < 75 mmHg nécessitant une ventilation invasive (70)).

*l'évolution

- favorable : amélioration ou amendement des symptômes ayant motivé la demande
- défavorable : passage à une chronicité des symptômes comme par exemple dans une pneumopathie d'hypersensibilité, une granulomatose, etc...

*le décès, sa date et sa cause et si le décès était imputable à l'épisode respiratoire ayant motivé la demande.

-les données paracliniques :

*radiologie : une imagerie médicale (radiographie, scanner, imagerie par résonance magnétique) était systématiquement recherchée pour chaque patient inclus. On recherchait dans les comptes rendus d'imagerie les notions « d'opacité en verre dépoli » (71), la conclusion diagnostique du praticien radiologue était aussi prise en compte.

*biologie :

- lymphopénie
- charge virale VIH en cas de séropositivité au VIH
- taux de CD4
- le rapport CD4/CD8. Le rapport CD4/CD8 était exprimé en variable semi-quantitative avec trois seuils (<0,1, <1 et >1)

On prenait la valeur de ces variables à plus ou moins quinze jours date de la demande de recherche de *Pneumocystis*.

- résultat de la recherche de *Pneumocystis* :

- Examen direct microscopique par coloration de Charlvardjian et de May Grünwald Giemsa (MGG), technique qualitative.
- qPCR *Pneumocystis*. Précision du type de prélèvement (LBA, crachat ou expectoration induite) et de la valeur de cycle de seuil (CT).

*Recherche des perdus de vue :

En cas de perdu de vue, les services cliniques et les départements d'informatique médicaux (DIM) étaient contactés. La date de point choisi était de trois mois après la dernière inclusion, ce délai étant le délai de suivi retrouvé dans d'autres études cliniques pour cette pathologie (72) .

Pour tous les patients non décédés à la date de point, une date de dernière nouvelle ultérieure avait été recherchée.

Méthode de Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR) :

L'extraction des prélèvements respiratoires a été réalisée par le kit QIAamp® DNA mini-kit (Qiagen, Courtabœuf, France), selon le protocole 'sang petit volume et fluides corporels'. Un volume de 2ml était extrait à chaque fois qu'il s'agissait d'un LBA. Lorsqu'il s'agissait d'autres prélèvements respiratoires, la totalité du prélèvement était prise. L'échantillon était centrifugé à 3000 tours/minute pendant cinq minutes. L'extraction était réalisée sur le culot. Enfin, le volume d'élution était de 100 µl.

Nous avons utilisé la qPCR de Meliani (73), servant de référence pour les qPCR. La cible amplifiée était le gène 1 de la sous unité large de l'ARN mitochondrial (mtLSUrRNA). Ce gène est la cible la plus fréquemment choisie pour le diagnostic de PJP (56,73,74) Les amorces utilisées étaient les suivantes : PCW3 : CTTAAAATAAATAATCAGACTATGTGCGATAAG et PCW4 : GGAGCTTTAATTACTGTTCTGGGC. La sonde utilisée était une sonde Taqman (FAM6-AGATAGTCGAAAGGGAAC-TAMRA).

La qPCR était réalisée à partir 5 µl d'extrait d'ADN à partir des 100 µl auquel on ajoutait les réactifs de PCR : 2 µl Mix LC (Ligh cycler Fast Start DNA Master Hybrobes 10X, Roche Applied Science), 4µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de chaque amorce (10 µM), 0.25 µl de la sonde (20 µM), 0.25 µl d'UNG (Uracyl DNA glycosylase, Invitrogen 1U/µl) et qsp H₂O pour un volume final de 20µl.

Le protocole d'amplification sur Light Cycler 2.0 e comprend une étape d'activation de l'UNG à 50C° pendant deux minutes suivie d'une phase d'activation de la Taq polymérase de 10 min à 95°C puis la phase d'amplification de cinquante cycles :

- Dénaturation 10 s à 95°C
- Hybridation 45 s à 60°C
- Elongation 1 s à 72°C

Il se termine par une phase de refroidissement (30 s à 40°C)

Définition du cycle seuil (CT) :

Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou quantifier un échantillon par PCR en temps réel, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable.

Méthode d'examen direct (microscopie) :

L'examen direct était réalisé par la lecture au microscope d'étalement sur lame suite à la centrifugation par cytopspin d'un culot du prélèvement. Les lames étaient colorées au May-Grünwald-Giemsa (MGG) et par la coloration de Chalvardjan (bleu de toluidine).

Des kystes et des formes végétatives de *Pneumocystis* étaient recherchés. Les résultats étaient communiqués sous forme qualitative (positif ou négatif).

Etude réalisée en aveugle :

La décision clinique de considérer le patient en Pneumocystose maladie (PJP+) ou en colonisation à *Pneumocystis* (PJP-) était prise indépendamment du résultat quantitatif (cycle de seuil) de la qPCR. Le clinicien avait cependant la connaissance du résultat qualitatif (positif ou négatif).

Définition PJP+ :

Dans notre étude, la référence était constituée par la décision du clinicien qui considérait le patient en Pneumocystose maladie (PJP+) ou colonisation (PJP-). La caractéristique PJP+ était définie dans les comptes rendus médicaux par le diagnostic de pneumocystose plus un traitement antipneumocystose à dose curative (sulfadiazine-triméthoprime BACTRIM® ou atovaquone WELLVONE®).

La décision de considérer le patient en Pneumocystose maladie et de mettre un traitement anti *Pneumocystis* dépendait donc des antécédents du patient, du résultat de l'examen direct, du résultat qualitatif de la qPCR, de la symptomatologie, de la radiologie, des traitements au long cours, du degré d'immunodépression et de la présomption du clinicien.

Définition PJP- :

En cas de qPCR *Pneumocystis* positive, tout autre diagnostic, toute suspicion infirmée ou le maintien d'un traitement à dose préventive sans diagnostic de pneumocystose étaient considérés PJP-.

Relecture des dossiers :

A la date de l'arrêt de l'étude, tous les dossiers médicaux ont été revus afin de détecter les éventuels diagnostics réfutés *a posteriori*. Les diagnostics de PJP+ infirmés *a posteriori* ont été reconsidérés PJP- et inclus dans les analyses statistiques et dans les résultats comme PJP-.

Analyses statistiques :

Les analyses statistiques ont été faites par le logiciel S.A.S version 9.3. Tous les résultats ont été analysés avec un risque alpha de 0,05. Les variables quantitatives suivant une loi Normale ont été analysées avec des tests paramétriques (test de Student). Les variables quantitatives ne suivant pas une loi Normale ont été analysées par les tests de Mann Whitney. Pour les variables qualitatives, les tests du chi-deux et le test exact de Fisher ont été utilisés. Les analyses de survie utilisaient le modèle du Logrank. Les analyses univariées et multivariées ont été utilisées pour prendre en charge les facteurs de confusion éventuels et les Odds Ratio calculés dans cette occasion. Pour les sensibilités et spécificités, des seuils de CT ont été calculés grâce aux courbes ROC en prenant comme référence la décision clinique, la microscopie étant jugée trop peu sensible pour pouvoir servir de référence (75).

Les seuils de CT ont été déterminés pour obtenir des seuils de sensibilité et de spécificité de 80% pour chacun des sous-groupes.

Du fait de la rareté de la maladie, d'une incidence très faible et de données sur la colonisation peu informatives, nous n'avons pu calculer un nombre de sujets nécessaires avant de commencer l'étude. Mais nous avons réalisé une analyse intermédiaire en 2011 qui montrait des résultats significatifs concernant les groupes malades et non malades ce qui nous a fait poursuivre l'étude (22).

Résultats.

Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire de Nice a réalisé entre le 1^{er} avril 2008 et le 1^{er} octobre 2013 1964 qPCR correspondant à 986 patients à la recherche de *Pneumocystis jirovecii*. Il y a eu 226 (11,5%) patients avec des qPCR positives (qPCR+) à *Pneumocystis jirovecii*. Un seul patient a été considéré perdu de vue et a donc été exclu. Soixante-treize patients (33,77%) dont les prélèvements étaient positifs ont été considérés selon les critères clinico-biologiques comme malades (PJP+).

Au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice, les infections fongiques invasives y compris les cas de PJP sont déclarés au RESSIF (Réseau de surveillance des infections fongiques invasives) géré par l'Institut Pasteur. A partir de ces fichiers, nous avons vérifié qu'aucun patient PJP+ n'a eu de qPCR négative.

Du fait des multiples paramètres de l'étude nous avons considéré plusieurs sous-échantillons qui seront détaillés par la suite :

- un sous-échantillon PJP+ versus PJP- pour comparer la population de patients en Pneumocystose maladie (PJP+) aux patients colonisés (PJP-).
- un sous-échantillon de patients PJP+ versus PJP- avec qPCR réalisée sur LBA pour comparer les valeurs des CT entre ces deux échantillons.
- un sous-échantillon de patients VIH versus non-VIH (autres comorbidités) avec qPCR réalisées sur LBA pour comparer les cycles de seuil entre ces sous-groupes parmi les échantillons de patients PJP+ et PJP-.

Le diagramme de flux est présenté dans la figure 1.

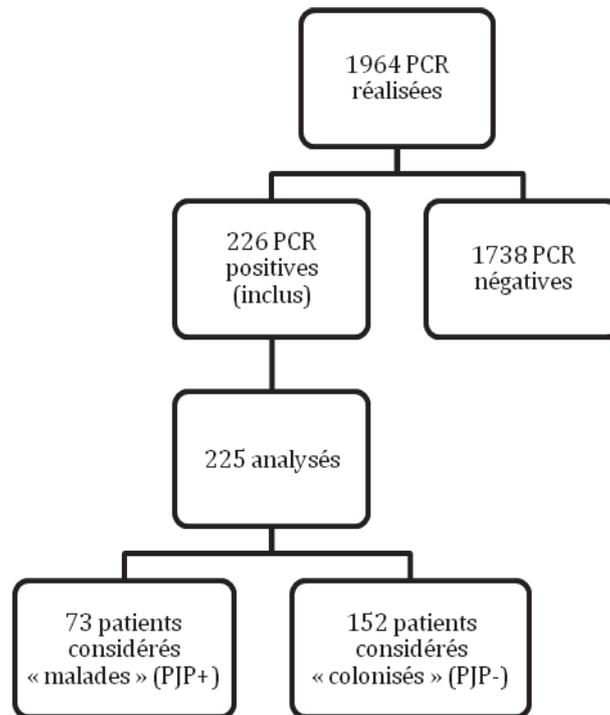


Figure 1 : Diagramme de flux de l'étude

Échantillon de l'étude avec l'ensemble des qPCR positives

Caractéristiques de l'échantillon avec qPCR Pneumocystis positive (qPCR+).

La description de l'échantillon des patients qPCR+ figure dans le tableau 1. L'échantillon de patients qPCR+ avait une nette prédominance masculine (sexe ratio 1,74) avec 143 individus de sexe masculin. L'âge moyen pour cet échantillon était de 59 ans et demi (Intervalle de confiance IC 95% [57,39 ; 61,91]).

Caractéristique de l'échantillon	n, (%)		
Effectif	225		
Sexe Ratio	1,74 (143 hommes pour 82 femmes)		
Age (moyenne, IC95%)	59,65[57,39;61,91]		
Statut sérologique VIH positif	45 (19,91)		
Si VIH positif: charge virale (médiane, IQR)	5,11 log10 [3,23 log10;6,99]		
Lymphocytémie (22 données manquantes) hors aplasiques médiane, IQR	1000 [600; 1700]		
Rapport CD4/CD8 (133 données manquantes)	CD4 >1	CD4[0,1 ;1]	CD4<0,1
	40 (43,48)	30 (32,61)	22 (23,91)
Services			
Pneumologie	63 (28,00)		
Infectiologie	39 (17,33)		
Réanimation	38 (16,89)		
Autres	36 (16,00)		
Médecine Interne	29 (12,89)		
Hématologie/Cancérologie	20 (8,89)		
Comorbidités			
Hémopathie maligne	47 (20,89)		
Maladies auto-immunes	43 (19,11)		
VIH (si absence autres comorbidités)*	44 (19,56) (* 1 VIH classé en cancer)		
Maladies respiratoires	37 (16,44)		
Cancer	30 (13,33)		
Autres	14 (6,22)		
Transplantation	10 (4,44)		

Tableau 1 : Description de l'échantillon de patient ayant une qPCR *Pneumocystis* positive.

Services demandeurs :

Une majorité (28,00%) de patients ayant une qPCR *Pneumocystis* positive venait des services de pneumologie des différents hôpitaux de la région, puis des services d'infectiologie (17,33%) et ensuite des services de réanimation (16,89%). En revanche, les services d'onco-hématologie étaient peu demandeurs. Ces résultats pouvaient s'expliquer par la facilité de certains services à effectuer plus de LBA que d'autres, car disposant d'un plateau technique adéquat (services de pneumologie ou de réanimation par exemple). De plus, les services de pneumologie et d'infectiologie pouvaient être plus

sensibles à la symptomatologie respiratoire (dyspnée et toux) d'autant plus chez des patients VIH dans les services d'infectiologie.

Immunodépression dans la population qPCR positives :

Quarante-cinq (19,92%) patients étaient séropositifs pour le VIH (phase SIDA, maladie connue ou de découverte récente) avec une charge virale médiane de 5,11 log₁₀. Deux autres catégories de patients ressortaient parmi les comorbidités : les hémopathies malignes (20,89%) et les pathologies auto-immunes (19,11%).

Les patients avec qPCR+ étaient immunodéprimés avec une lymphocytémie basse. Nous avons pu recueillir les rapports CD4/CD8 chez 92 sujets. Ce rapport était inférieur ou égal à 1 chez 56,52% des patients

Traitement au long cours et données manquantes :

L'ensemble des patients de l'échantillon qPCR+ souffrait de pathologies chroniques (comorbidités). La distribution des traitements pour ces pathologies chroniques se répartissait de la manière suivante :

- 73,98% prenaient des immunodépresseurs en monothérapie ou en association (corticothérapie, immunosuppresseurs, biothérapie)
- 13,82% avaient une thérapie antirétrovirale en cours
- 4,07% une association d'immunosuppresseurs et une prévention antipneumocystose,
- et 1,63% une association d'antirétroviraux et de prévention antipneumocystose.

Au total, six patients ont eu une qPCR positive malgré un traitement préventif contre la pneumocystose et ont été considérés PJP+ dans un premier temps (Tableau 2).

Contexte clinique	CT	Microscopie	Décès	Remarque	Statut final
Myosite	26	négatif	non		PJP+
Transplantation hépatique	26	négatif	non		PJP+
Mucoviscidose	25	négatif	non		PJP+
VIH stade SIDA	absence	positif	non		PJP+
BPCO	36	négatif	non	Diagnostic réfuté <i>a posteriori</i>	PJP-
Cirrhose	35	négatif	non	Diagnostic réfuté <i>a posteriori</i>	PJP-

Tableau 2 : Caractéristiques des six patients traités contre la pneumocystose malgré un traitement préventif.

Le patient avec myosite était sous immunosuppresseurs et corticoïdes et présentait une infection pulmonaire avec une lymphopénie à 1000 et un rapport CD4/CD8<1. Le patient s'est amélioré sous traitement curatif. Il n'y avait pas d'imagerie disponible.

Le patient avec décompensation hépatique avait une cirrhose mixte et présentait une dyspnée, de la toux et une lymphopénie à 600/mm³. Son imagerie montrait un épanchement sans foyer de verre dépoli. Il était sous immunosuppresseurs et corticoïdes. Le patient s'est amélioré sous traitement curatif.

Le jeune patient ayant une mucoviscidose a présenté une décompensation respiratoire aiguë. Le patient s'est amélioré sous traitement curatif.

Le patient VIH était en phase SIDA (charge virale 4,5 log₁₀) présentait une dyspnée et son imagerie montrait des foyers en verre dépoli diffus. Il avait un antécédent de pneumocystose.

Les deux patients réfutés étaient :

- un patient séropositif pour le VIH avec une charge virale indétectable mais lymphopénique à 1000/mm³, le diagnostic retenu était celui d'exacerbation de Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

- un patient avec BPCO, lymphopénique à 700 présentant une dyspnée. Son diagnostic initial a été réfuté devant sa séronégativité pour le VIH, la microscopie *Pneumocystis* négative et l'absence d'hémopathie maligne.

Pour cent deux patients ayant une qPCR positive, il n'était pas documenté de traitement au long cours. Parmi ces patients, vingt-six étaient séropositifs pour le VIH. Douze étaient sans traitement VIH (découverte de séroposivité VIH ou rupture de traitement). Neuf de ces douze patients étaient PJP+ et on a observé chez ces neuf patients sans traitement VIH deux décès.

Traitement curatif de l'épisode respiratoire à l'origine de la demande de recherche de *Pneumocystis* dans la population qPCR *Pneumocystis* positive :

Au niveau des traitements curatifs pour l'épisode respiratoire, nous avons pu recueillir 143 données. Il consistait en :

- 82 (57,34%) traitements par sulfadiazine-triméthoprime :
 - 73 chez les PJP+ soit 100% des PJP+
 - 9 PJP- (5,92% des PJP-),
- 30,77% des patients avaient un traitement antibiotique autre (bêta-lactamines, fluoroquinolones...)
- 8,39% un traitement non anti-infectieux.
- et 3,50% un traitement par corticoïdes,

Critères cliniques, paracliniques et biologiques de l'échantillon qPCR +.

Concernant les critères cliniques qui ont amené les cliniciens à effectuer un prélèvement pour le Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, on retrouvait un épisode de fièvre chez 77 individus (34,22%), de toux chez 68 individus (30,22%) et de dyspnée chez 125

individus (55,56%). L'association de deux critères se retrouvait chez 76 individus (33,78%) et la triade fièvre-toux-dyspnée caractéristique de la Pneumocystose chez 27 individus (12,00%).

Nous avons pu recueillir les comptes rendus de 162 imageries avec 47,53% en aspect de verre dépoli, caractéristique non pathognomonique de la pneumocystose.

L'examen direct du prélèvement respiratoire montrait une positivité après coloration au Chalvardjan chez trente patients soit 13,33%. Ces 30 patients ont été considérés PJP+.

Pour treize patients (5,78%) au moins deux qPCR *Pneumocystis* ont été réalisées à différents temps. Il a été constaté pour ces patients un changement de statut avec une qPCR positive qui se négative sur le prélèvement suivant et réciproquement sans différence statistique entre les patients malades et les patients colonisés. Ces données sont non contributives pour l'étude mais confirment le caractère réversible de la colonisation. Pour ces treize patients, cinq étaient PJP+ et huit étaient PJP-, sans différence significative.

Analyse du sous échantillon de patients avec Pneumocystose maladie PJP+ versus colonisation PJP-.

Il y avait ainsi 73 malades PJP+ et 152 non malades PJP- parmi les 225 qPCR *Pneumocystis* positives (cf. figure 2).

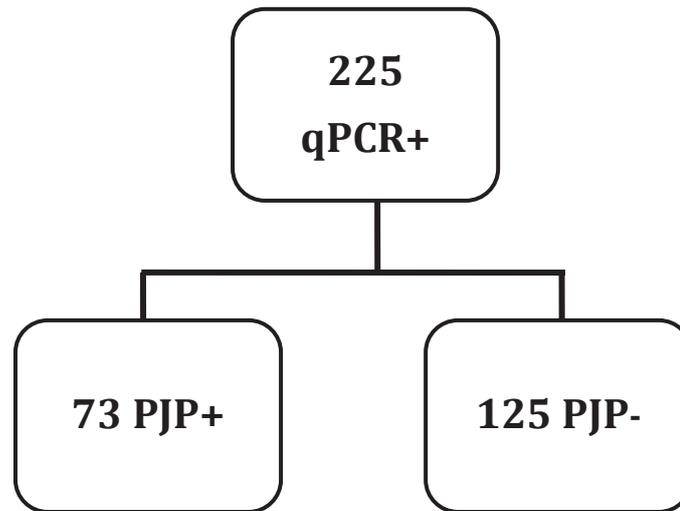


Figure2 : Répartition de l'échantillon qPCR+ en fonction de PJP+ et de PJP-

Caractéristiques des échantillons :

La description de l'échantillon figure dans le tableau 3. La prédominance masculine se retrouvait dans les deux groupes PJP+ et PJP- . En revanche, le groupe de patients malades PJP+ était significativement plus jeune (55,40 ans versus 61,70 ans, $p=0,01$). Le statut sérologique VIH était aussi significativement différent, les patients PJP+ étant plus à risque d'être séropositif au VIH (41,10% versus 9,87%, $p<0,037$ en régression logistique multivariée). Le statut sérologique VIH est donc un facteur de risque de PJP+. La charge virale était plus importante chez les PJP+ que chez les PJP- et la lymphocytémie était plus profonde chez les malades que chez les patients colonisés. En régression logistique multivariée, un rapport CD4/CD8 fortement abaissé (inférieur à 0,1) était un facteur de risque de la pneumocystose, (régression logistique multivariée OR= 6,31, IC95% [1,92 ; 20,76], $p=0,002$) alors qu'avec un rapport CD4/CD8 compris entre 0,1 et 1, on avait qu'une tendance non significative (OR= 2,43, IC95% [0,92 ; 6,41], $p=0,07$).

En conclusion, deux facteurs de risques ont été identifiés : séropositivité VIH et rapport $CD4/CD8 < 0,1$.

Caractéristique de l'échantillon	PJP+ n,(%)			PJP- n,(%)			P univarié
Effectif	73 (32,44)			152 (67,56)			
Sexe Ratio Homme/femme	1,92			1,66			0,63
Age (moyenne, IC95%)	55,40 [51,21; 59,58]			61,70 [59,04;64,38]			0,01
Statut sérologique VIH positif	30 (41,10)			15 (9,87)			<10 ⁻³
Si VIH positif: charge virale (médiane, IQR)	5,71 log ₁₀ [5,31 log ₁₀ ;5,91 log ₁₀]			4,73 log ₁₀ [3,81 log ₁₀ ; 5 log ₁₀]			0,01
Lymphocytémie (22 données manquantes) hors aplasiques médiane, IQR	800 (500 ; 1300)			1100 (700 ; 1800)			0,03
Rapport CD4/CD8 (133 données manquantes)	CD4>1	CD4[0,1 ;1]	CD4<0,1	CD4>1	CD4[0,1;1]	CD4<0,1	0,003
	14 (29,16)	17 (35,42)	17 (35,42)	26 (59,09)	13 (29,55)	5 (11,36)	

Tableau 3 : Comparaison des caractéristiques des patients PJP+ et PJP-.

Saisonnalité de la pneumocystose :

Le laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Nice étant le seul centre de la région à pratiquer des qPCR *Pneumocystis* et des examens directs à la recherche de *Pneumocystis jirovecii*, nous avons l'exhaustivité des cas de pneumocystoses dans la région de Nice. Nous avons pu alors étudier sur une période de cinq ans l'hypothèse d'un caractère saisonnier de la pneumocystose sans en montrer une tendance significative en analyse univariée ou multivariée.

Pathologies chroniques, traitements au long cours et services demandeurs :

L'ensemble de ces données sont décrites dans le tableau 4.

Caractéristique de l'échantillon	PJP+ n,(%)	PJP- n,(%)	p univarié
Services			<10-4
<i>Infectiologie</i>	20 (27,40)	19 (12,50)	
<i>Médecine Interne</i>	18 (24,66)	11 (7,24)	
<i>Réanimation</i>	10 (13,70)	28 (18,42)	
<i>Hématologie/Cancérologie</i>	10 (13,70)	10 (6,58)	
<i>Pneumologie</i>	8 (10,96)	55 (36,18)	
<i>Autres</i>	7 (9,59)	29 (19,08)	
Comorbidités			<10-4
<i>VIH (si absence autres comorbidités)*</i>	30 (41,10)	14 (9,21)	
<i>Hémopathie maligne</i>	19 (26,03)	28 (18,42)	
<i>Maladies auto-immunes</i>	11 (15,07)	132 (21,05)	
<i>Cancer</i>	6 (8,22)	24 (15,79)	
<i>Transplantation</i>	3 (4,11)	7 (4,61)	
<i>Maladies respiratoires</i>	3 (4,11)	34 (22,37)	
<i>Autres</i>	1 (1,37)	13 (8,55)	
Traitements au long cours (102 données manquantes)	46	77	=0,06
<i>Association d'immunosuppresseurs</i>	34 (76,09)	56 (72,73)	
<i>Traitement antirétroviral</i>	6 (13,04)	11 (14,29)	
<i>Traitement préventif de la pneumocystose</i>	1 (2,17)	0 (0,00)	
<i>Autres traitement en monothérapie</i>	0 (0,00)	5 (6,49)	
<i>Association Immunosuppresseurs et prévention pneumocystose</i>	2 (4,34)	4 (6,49)	
<i>Association antiVIH et prévention pneumocystose</i>	2 (4,34)	0 (0,00)	
<i>Association autres traitements et prévention pneumocystose</i>	1 (2,17)	1 (1,62)	
Total prévention pneumocystose	6 (13,02)	5 (8,11)	

Tableau 4 : Comparaison des pathologies chroniques, traitements au long cours et services demandeurs entre les patients PJP+ et PJP-. Les valeurs des p univariés sont données par catégories (Services, Comorbidités et Traitements au long cours) et non pour les sous-catégories.

Services demandeurs :

Alors qu'on s'attendait à une côte (Odd) de 1 pour 2 dans les services (73 PJP+ pour 152 PJP-, soit 1PJP+ pour 2 PJP-), on constatait une distribution différente ($p=0.001$) au sein des services étudiés. Ces résultats suggéraient une différence entre la demande des services demandeurs de qPCR qui s'avérait positive à la présence de *Pneumocystis jirovecii* (qPCR+) et le fait d'être malade (PJP+) : les services de pneumologie avaient moins de risque d'avoir un patient malade (PJP+) avec une qPCR+ (Odd de 1 pour 7), tout comme la réanimation (Odd de 1 pour 3), alors que les services d'infectiologie et d'hématologie/cancérologies avaient un Odd de 1 pour 1 et que la médecine interne avait un Odd inversé de 1,63 pour 1. Ces résultats suggéraient qu'il existait des services 'à risque' où en cas de qPCR positive, la pneumocystose était plus probable du fait des facteurs de risques des patients hébergés. Les services à risque décrits ci-avant accueillaient des patients immunodéprimés avec maladies auto-immunes sous corticothérapies, des patients sous chimiothérapies pour cancers ou hémopathies malignes ou des patients séropositifs au VIH. Ces patients étaient à haut risque de pneumocystose à cause de leur immunodépression. Au contraire, certains services comme la pneumologie qui accueillaient des patients avec des pathologies respiratoires diverses non corrélées à de l'immunodépression étaient moins à risque.

Comorbidités :

Les pathologies chroniques pour lesquelles les patients pouvaient avoir ou non un traitement au long cours, immunodépresseurs ou préventif de la PJP, constituaient les comorbidités du patient. La distribution de ces comorbidités était significativement différente entre les malades PJP+ et les non-malades PJP- ($p<10^{-4}$). Seule la comorbidité VIH ressortait comme facteur de risque de pneumocystose comme décrit dans le

paragraphe précédent en analyses uni et multivariée. En analyses descriptives, alors que l'Odd PJP+/PJP- était de 1 pour 2, la distribution chez les patients séropositifs au VIH était inversée (Odd de 2,14 pour 1). Pour les autres comorbidités les rapports n'étaient pas inversés mais variaient (Odd de 1 pour 1,47 chez les Hémopathies malignes, 1 pour 2,33 chez les transplantés, 1 pour 2,9 chez les patients souffrant pathologies auto-immunes, 1 pour 4 chez les cancers solides). Les écarts les plus importants étaient observés dans les catégories 'pathologies respiratoires' (Odd de 1 pour 11,33 et 'autres' (Odd de 1 pour 13)).

Traitements au long cours :

Les traitements au long cours étaient corrélés aux comorbidités. Pour plus de facilité, nous avons distingué quatre groupes (prévention pneumocystose, traitements immunosuppresseurs, traitement antirétroviral et autres traitements) et étudié les différentes associations. Au total nous avons pu établir sept classes *a posteriori* (les quatre groupes initiaux et trois associations). Les résultats sont dans le tableau 4. Concernant la distribution des traitements au long cours, il n'y avait pas de différence significative entre les groupes PJP+ et PJP-, bien que tendant vers la différence significative ($p=0,06$), sous-entendant que les traitements au long cours étaient indépendant de l'apparition de la maladie, a contrario des comorbidités (en particulier du VIH).

Traitements curatifs :

Les traitements curatifs sont présentés dans le tableau 5. La différence entre les deux groupes PJP+ et PJP- était statistiquement significative ($p<10^{-4}$). Parmi ces 73 patients seuls deux (2,74%) ont reçu également une corticothérapie adjuvante. Ces deux patients étaient VIH+. Parmi l'échantillon PJP-, neuf patients (14,08%) ont reçu un traitement par sulfadiazine-triméthoprime pour une pneumocystose. Cependant, cinq patients ont vu leur diagnostic infirmé et cinq autres ont bénéficié d'un traitement préventif renforcé. Les caractéristiques de ces neuf patients sont présentées dans le tableau 6.

Caractéristiques de l'échantillon	PJP+ (n,%)	PJP- (n,%)	P univariée
Décision Clinique en faveur d'une pneumocystose	73 (100,00)	0 (0,00)	
Traitement entrepris (82 données manquantes)			<10-4
Traitement antipneumocystose curatif *dont corticothérapie adjuvante	73 (100,00) *2 (2,74)	9 (14,08)	
Traitement antibiotique autre	0 (0,00)	44 (61,97)	
Corticoïdes (ligne principale de traitement)	0 (0,00)	5 (7,04)	
Antituberculeux	0 (0,00)	9 (12,68)	
Autres	0 (0,00)	9 (12,68)	

Tableau 5 : traitements curatifs entrepris pour l'épisode ayant motivé la qPCR

Contexte Clinique	Diagnostique	CT	Décès
Patient VIH	Tuberculose	40,6	Non
BPCO	Episode bactérien	37,6	Non
Dysimmunité pédiatrique	Asthme	32,3	Non
Maladie de Behçet	Grippe	34,7	Non
Wegener	Prévention	35,3	Non
Patient VIH	Lymphome à grandes cellules	36,5	Oui
Sclérodermie	HTAP	35,5	Non
Vascularite	Pneumocystose infirmée	33	Oui
Découverte SIDA	Pneumopathie à CMV	39	Oui

Tableau 6 : caractéristiques des neuf patients non malades traités par sulfadiazine-triméthoprime initialement suspects de PJP.

Critères cliniques, paracliniques et biologiques des populations PJP+/PJP-.

Nous avons évalué la symptomatologie clinique en fonction des principaux critères cliniques (fièvre, dyspnée, toux) un-à-un ainsi que leur association (deux signes parmi les trois ainsi que la triade clinique). On retrouvait de façon significative les symptômes dyspnée/fièvre/toux en analyses univariée ($p < 10^{-4}$) ou multivariée ($p < 10^{-4}$) dans le groupe PJP+ par rapport au groupe PJP-.

Concernant l'imagerie, la caractéristique du verre dépoli n'est pas retrouvée dans notre étude malgré une tendance à la significativité ($p=0,06$).

Concernant l'examen direct par microscopie les 30 microscopies positives ont toutes été considérées PJP+ (100%) mais 43 patients PJP+ (58,90%) ont eu un examen microscopique négatif. Ces résultats confirment la forte spécificité de 100% mais la faible sensibilité de l'examen (41%).

Evolution, survie et décès.

Les résultats sont présentés dans le tableau 7. On considérait comme évolution favorable l'amendement des symptômes qui avaient motivés la demande de qPCR, indépendamment de la survie ou du décès du patient. Ainsi il y avait une amélioration de la symptomatologie dans le groupe PJP+ (82,09% pour le groupe PJP+ versus 69,08% pour le groupe PJP-, $p=0,03$).

Concernant les décès, nous n'avons pu connaître le statut vivant ou décédé chez deux patients à la fin de l'étude. Ces deux patients étaient PJP-. La différence entre les délais de survie n'était pas statistiquement significative (487 jours IQR [377 ; 597] chez PJP+ versus 492 jours (IQR [423 ; 562] chez PJP-, respectivement, $p=0,15$), tout comme les décès (23,29% versus 28,95%, respectivement, $p=0,37$). La courbe de survie est présentée dans la figure 3.

Caractéristiques de l'échantillon	PJP+ (n,%)	PJP- (n,%)	P univarié
Evolution favorable de la symptomatologie	60 (82,09)	105 (69,08)	0,03
Délai de survie (jours)	487 [377; 597]	492 [423;562]	0,15
Décès.	17 (23,29)	44 (28,95)	0,37

Tableau 7 : comparaison des survies et décès dans les groupes PJP+ et PJP-

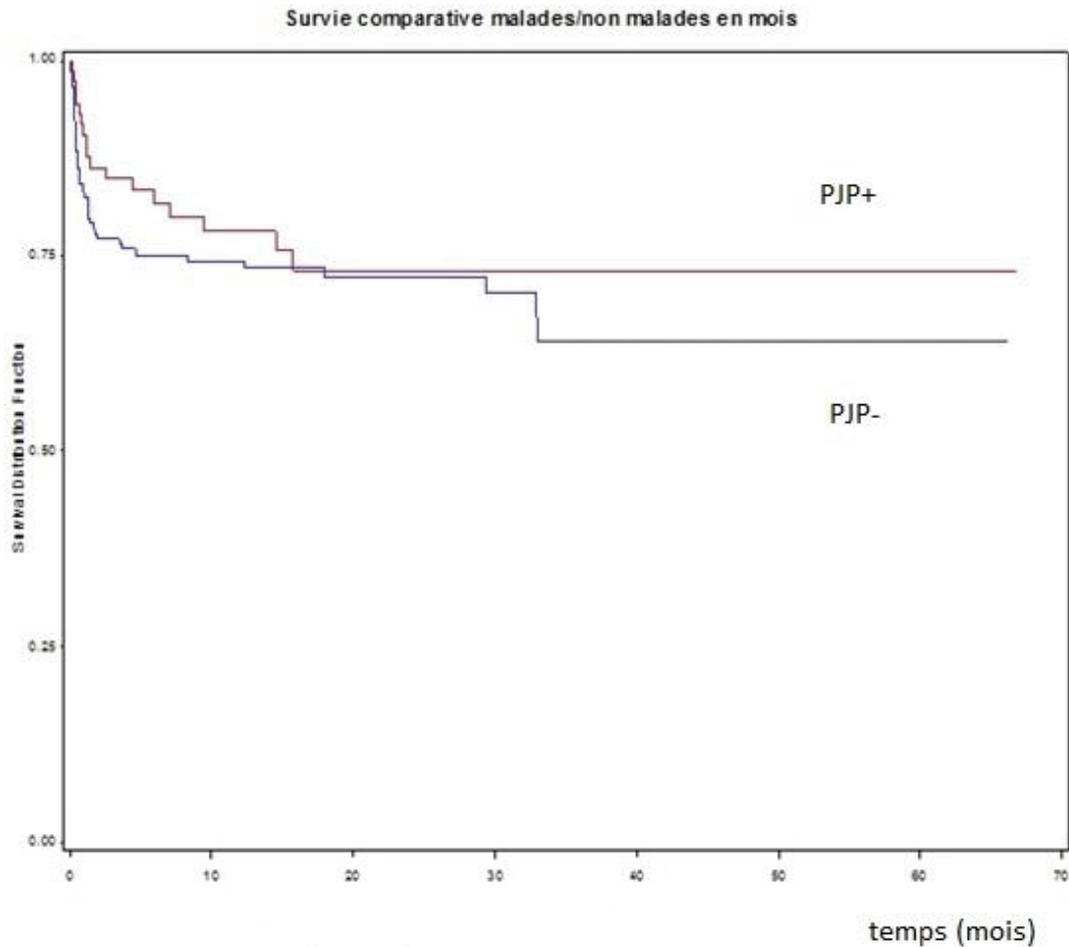


Figure 3 : survie comparative malades PJP+ /non malades PJP- (en mois). La courbe rouge correspond aux patients PJP+ et la courbe bleue PJP-.

Les cycles seuils de la qPCR *Pneumocystis* : un outil pour distinguer *Pneumocystose* maladie (PJP+) et colonisation (PJP-)

Nous avons étudié par la suite les valeurs de CT pour distinguer la colonisation de la maladie. Pour ce faire nous n'avons pris que les qPCR+ issus de LBA avec CT. En effet, les conditions de recueil devaient être standardisées pour pouvoir être interprétés (volume de 2ml, prélèvement distal, etc.). L'échantillon étudié est présenté dans la figure 4.

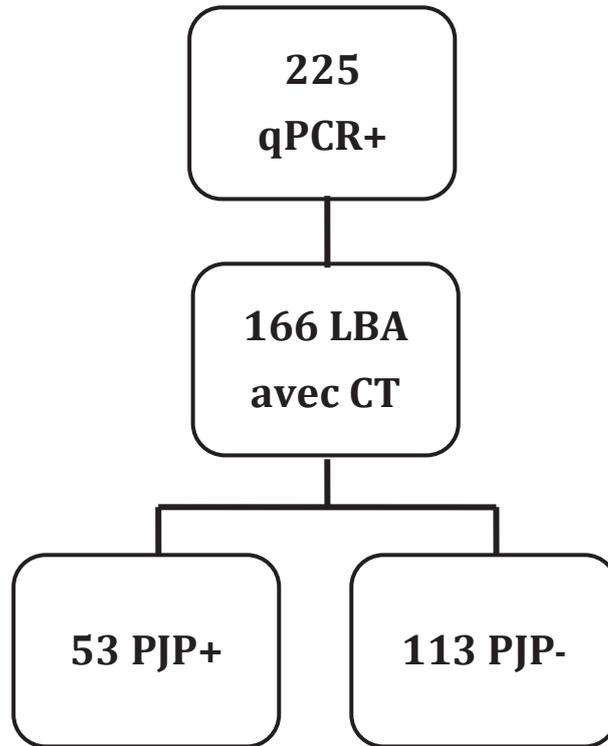


Figure 4 : diagramme de flux de l'échantillon LBA avec CT.

Analyse des sous-groupes PJP+ et PJP- :

Il y avait une différence significative pour les valeurs des cycles de seuils entre les malades PJP+ et les patients colonisés PJP- ($p < 0,001$), les valeurs de CT étant arrondies pour plus de pertinence biologique.

-PJP+ : 28 IC95% [26; 30]

-PJP- : 35 IC95% [34;36].

Ces résultats sous-entendaient que la charge fongique était plus basse chez les patients PJP- que chez les patients PJP+.

La figure 5 présente les médianes, intervalles interquartiles et extrema des deux groupes comparés.

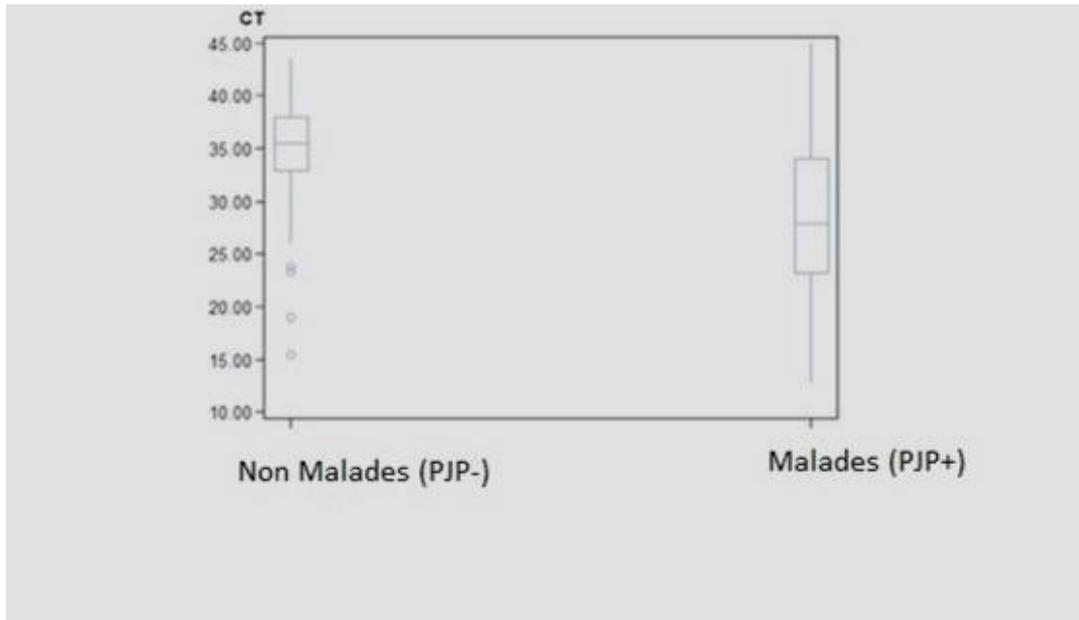


Figure 5 : comparaison des médianes, intervalles interquartiles et extrema entre les groupes PJP+ et PJP-.

A partir de ces différences, nous avons projeté une courbe ROC pour étudier la sensibilité/spécificité des CT des qPCR+ et tenté d'établir des seuils de CT à des sensibilités et spécificités acceptables (80%) pour aider le clinicien dans sa décision clinique.

La courbe ROC est présentée dans la figure 6. L'aire sous la courbe avait comme valeur 0,88. La valeur de CT pour une meilleure sensibilité et spécificité conjointes était de 32 (sensibilité 71,7%, spécificité 75%).

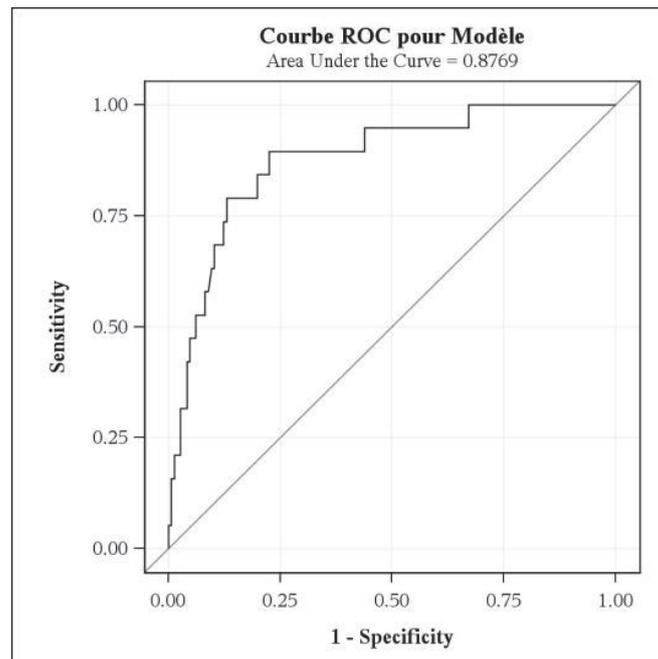
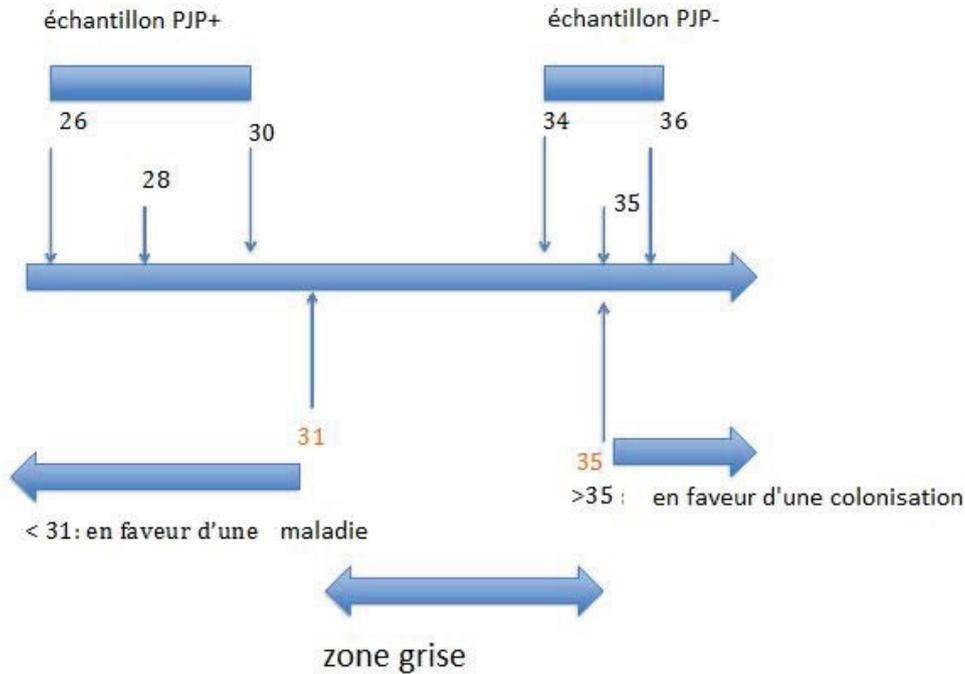


Figure 6 : courbe ROC comparant la sensibilité et la spécificité de la qPCR *Pneumocystis jirovecii* par rapport à la décision clinique (référence) dans l'échantillon de patients ayant un prélèvement réalisé sur LBA (statut VIH du patient non connu).

A partir des points de la courbe R.O.C, nous avons établi qu'un seuil de sensibilité de 80% était montré pour un seuil de $CT < 35$ et qu'un seuil de spécificité de 80% était montré pour un seuil de $CT > 31$. La figure 7 montre un résumé de la conduite à tenir pour un clinicien en fonction des seuils de CT.



CT

Figure 7 : seuils de sensibilité/spécificité des CT sans connaître le statut VIH du patient. Au-dessus de la flèche sont représentées les valeurs des CT observées dans notre population d'étude (PJP+/PJP- avec qPCR réalisée sur LBA)

-Patients PJP+ : CT 28 (IC95% [26 ; 30]).

-Patient PJP- : CT 35 (IC95% [34 ; 36])

Une sensibilité de 80% était obtenue pour un seuil de 35 et une spécificité de 80% pour un seuil de 31. Une zone grise dans laquelle nous ne pouvons exclure les diagnostics de maladie ou de colonisation existe entre les valeurs de 31 et 35. Les valeurs de CT ont été arrondies pour plus de pertinence biologique.

En prenant en compte les seuils de CT comme référence diagnostique et en se basant sur la décision clinique parmi les patients avec LBA et valeur de CT, on aurait diagnostiqué soixante-six patients comme PJP+ dont vingt faux positifs et 8 faux négatifs. Parmi ces huit faux négatifs il y avait une microscopie positive. Près de 60% des PJP+ auraient pu être diagnostiqués grâce à la qPCR lorsque l'examen microscopique était positif. La distribution de ces patients est décrite dans le schéma 2.

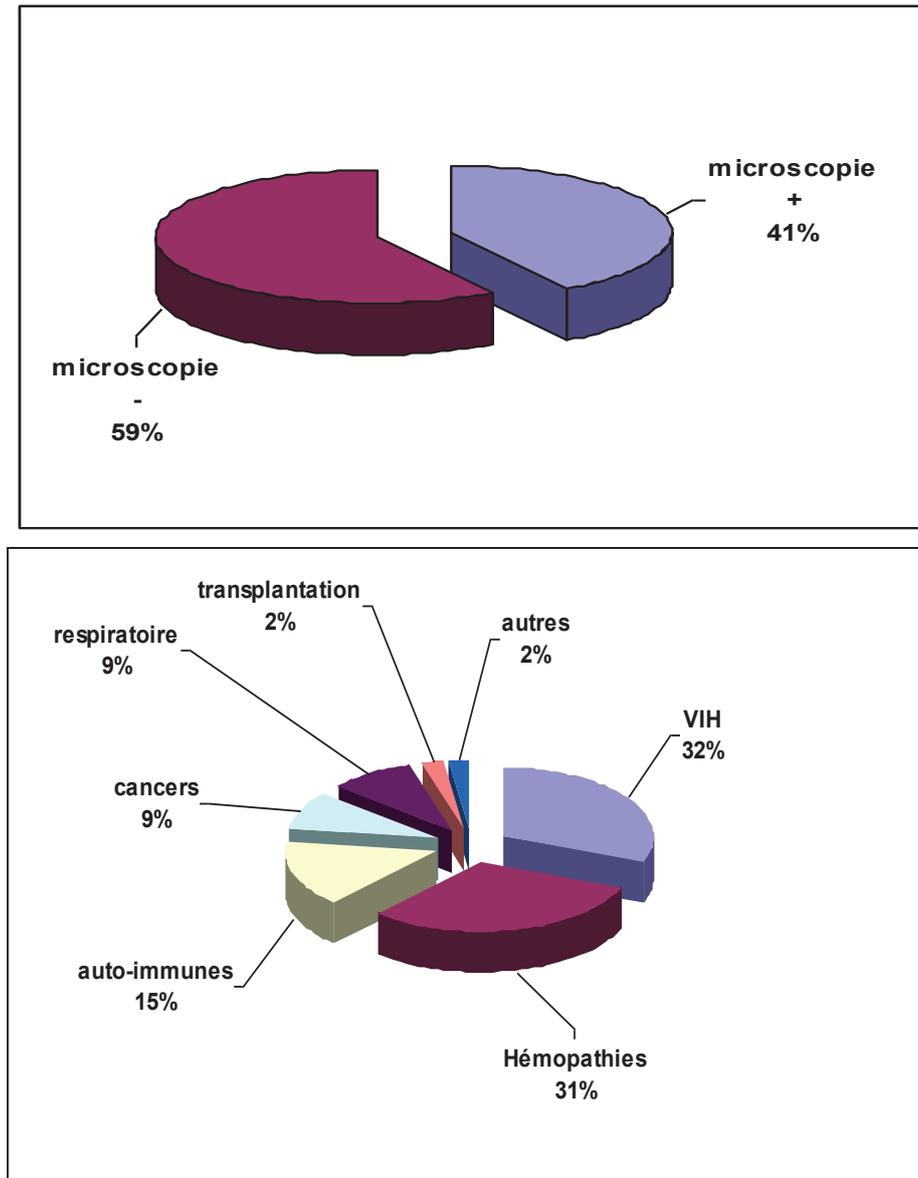


Schéma 2 : distribution des 43 patients microscopies -/ PJP+

Analyse des sous-groupes VIH/non VIH dans l'échantillon PJP+

Diagramme de flux des sous-groupes VIH et non VIH de l'échantillon PJP+

Le diagramme de flux des échantillons est représenté dans la figure 8.

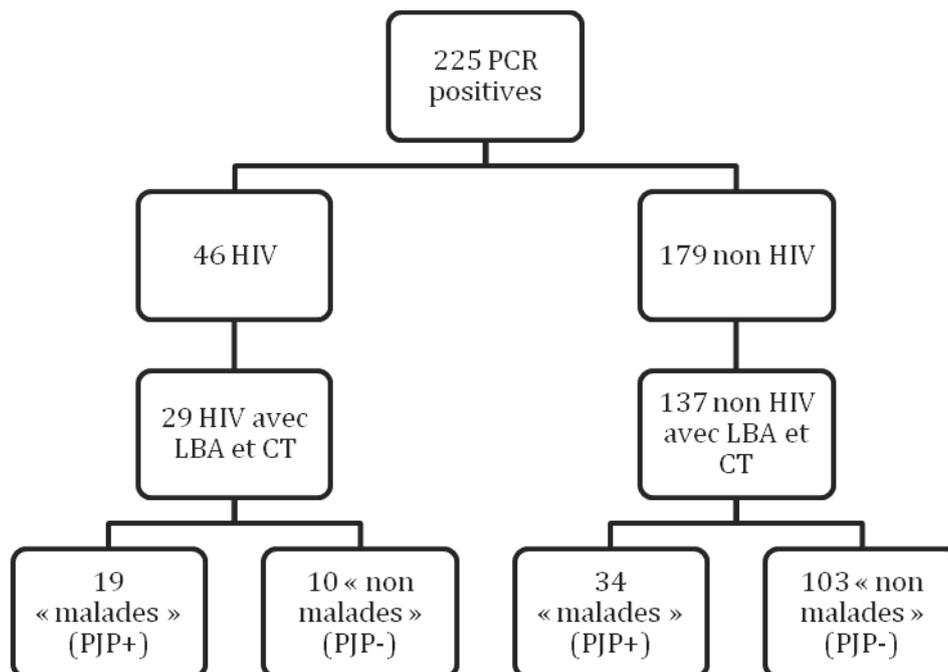


Figure 8 : diagramme de flux des sous échantillons VIH et non VIH parmi les échantillons PJP+ et PJP- de l'échantillon qPCR+ avec LBA avec CT.

Cycles de seuils des patients VIH et non VIH dans l'échantillon PJP+

De la même manière nous avons établi des seuils entre les sous-groupes VIH/non VIH dans le groupe des malades PJP+.

La différence entre les deux groupes concernant la CT était significative :

- groupe VIH : 24,5 ; IC95% [21,8;27,5]
- groupe non VIH : 30,5 ; IC95% [28,0; 32,8], p=0,004.

Les valeurs non arrondies sont données ici à titre indicatif. Ces résultats sous-entendaient que, malgré le statut PJP+ des patients, la charge fongique était plus basse dans le groupe VIH que dans le groupe non VIH.

La figure 8 représente les moyennes, intervalles interquartiles et extrema des valeurs de CT dans les sous-groupes non VIH et VIH du groupe PJP+.



Figure 8 : comparaison des médianes, intervalles interquartiles et extrema entre les groupes VIH et non-VIH dans l'échantillon PJP+.

Seuils de sensibilités et courbes ROC des sous-groupes VIH et non VIH dans l'échantillon PJP+ :

Dans chacun des deux groupes (Patient VIH et non-VIH), nous avons également projeté une courbe R.O.C afin d'établir des seuils de CT avec sensibilité et spécificité de 80%.

Pour le groupe VIH la courbe R.O.C est présentée dans la figure 9 A. La valeur de l'aire sous la courbe était de 0,90. La valeur de CT pour une meilleure sensibilité et spécificité conjointes était de 27 (sensibilité de 73,5%, spécificité de 100%). Pour obtenir une sensibilité proche de 80% (78,88%) on avait une CT de 30. La meilleure spécificité était pour la valeur de 27.

Pour le groupe non-VIH la courbe R.O.C est présentée dans la figure 9 B et avait comme aire sous la courbe une valeur de 0,72. La valeur de CT pour une meilleure

sensibilité et spécificité conjointes était de 35 (sensibilité de 80%, spécificité de 49,5%). Pour une spécificité de 80% on avait une CT à 31.

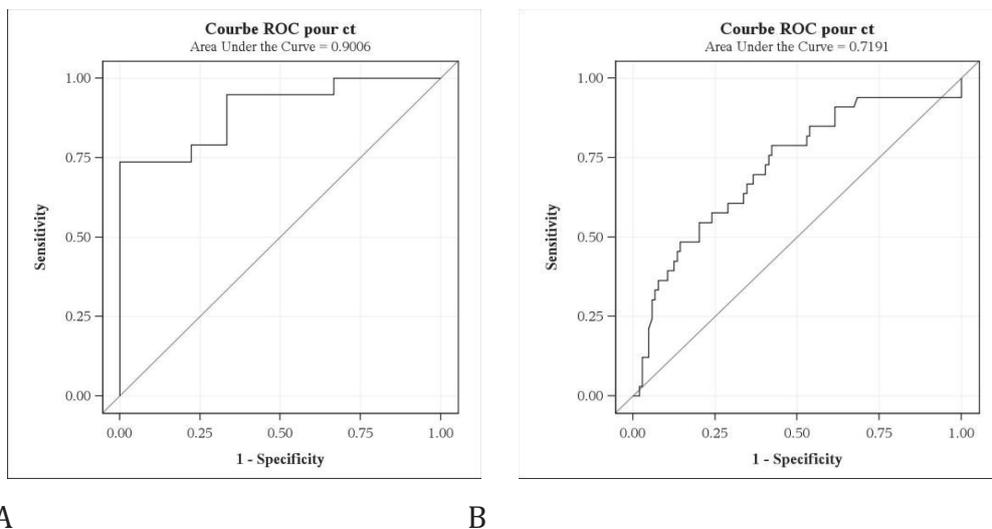
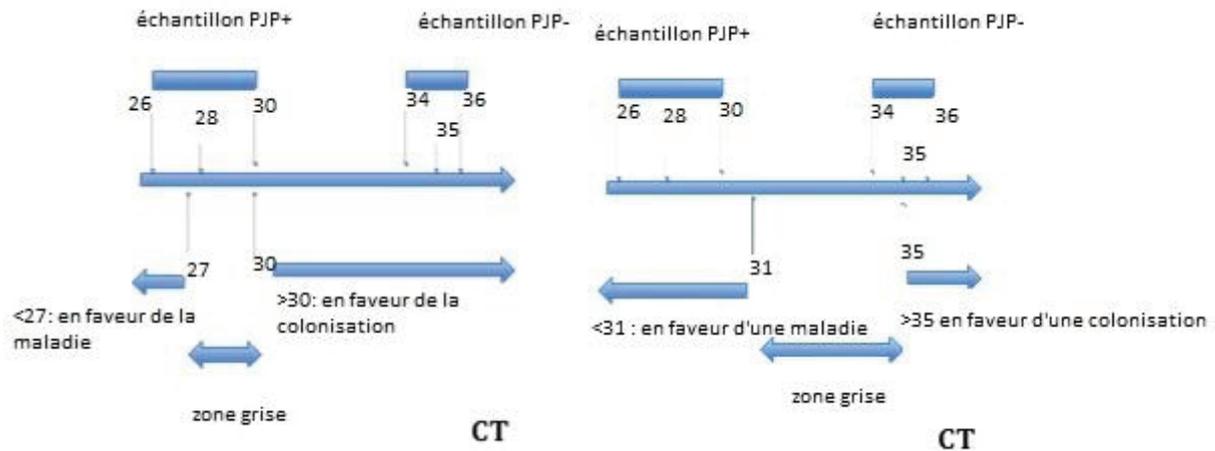


Figure 9 A : courbe ROC comparant la sensibilité et la spécificité de la qPCR *Pneumocystis jirovecii* par rapport à la décision clinique (référence) dans le groupe de patient VIH positif

Figure 9 B : courbe ROC comparant la sensibilité et la spécificité de la qPCR *Pneumocystis jirovecii* par rapport à la décision clinique (référence) dans le groupe non-VIH.

Conduite à tenir dans les sous-groupes VIH et non VIH de l'échantillon PJP+ :

En fonction du statut sérologique du patient, différentes conduites à tenir ont été établies en fonction des seuils de CT calculés à partir d'un LBA. Ces conduites à tenir sont présentées dans les figures 10 A et B.



A

B

Figure 10 A B : seuils de sensibilité/spécificité des cycles de seuil (CT) en fonction du statut VIH du patient (A : statut VIH+ ; B : statut VIH-).

A : Patient VIH +

En référence :

L'échantillon de patients PJP+ avait comme valeur de seuil de CT 28 (IC95% [26 ;30]).

L'échantillon de patient PJP- avait comme valeur de seuil de CT 30 (IC95% [34 ;36])

Pour le patient VIH

Une sensibilité de 80% et une spécificité de 80% étaient obtenues pour :

CT < 27 est en faveur d'une pneumocystose (PJP+).

CT > 30 est en faveur d'une colonisation.

Une zone grise existe entre 27 et 30.

B : Patient VIH-

En référence :

L'échantillon de patients PJP+ avait comme valeur de seuil de CT 28 (IC95% [26 ; 30]).

L'échantillon PJP- avait comme valeur de seuil de CT 35 (IC95% [34 ; 36])

Pour le patient VIH-

Une sensibilité de 80% et une spécificité de 80% étaient obtenues pour :

CT < 31 est en faveur d'une PJP+.

CT > 35 est en faveur d'une colonisation.

Une zone grise existe entre 31 et 35.

Le tableau 8 récapitule les différents seuils de sensibilité et de spécificité en fonction des statuts sérologiques des patients. Les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) sont également données.

qPCR	CT	sensibilité	spécificité	VPP	VPN
Sans connaître le statut VIH	<35	80%	63%	51%	87%
	>31	66%	80%	62%	83%
VIH+	<30	80%	79%	65%	89%
	>27	73%	100%	100%	89%
VIH-	<35	80%	50%	43%	84%
	>31	59%	80%	59%	80%

Valeurs indicatives pour la conduite à tenir en fonction de ces seuils :

Pour un patient dont le statut sérologique VIH est inconnu :

La probabilité d'être malade est de 51% si CT<35 et de 62% si CT<31.

La probabilité de ne pas être malade est de 87% si CT>35 et de 83% si CT>31.

Pour un patient dont le statut sérologique VIH est connu et VIH+ :

La probabilité d'être malade est de 65% si CT<30 et de 100% si CT<27.

La probabilité de ne pas être malade est de 89% si CT>30 et de 89% si CT>27.

Pour un patient dont le statut sérologique VIH est connu et VIH-:

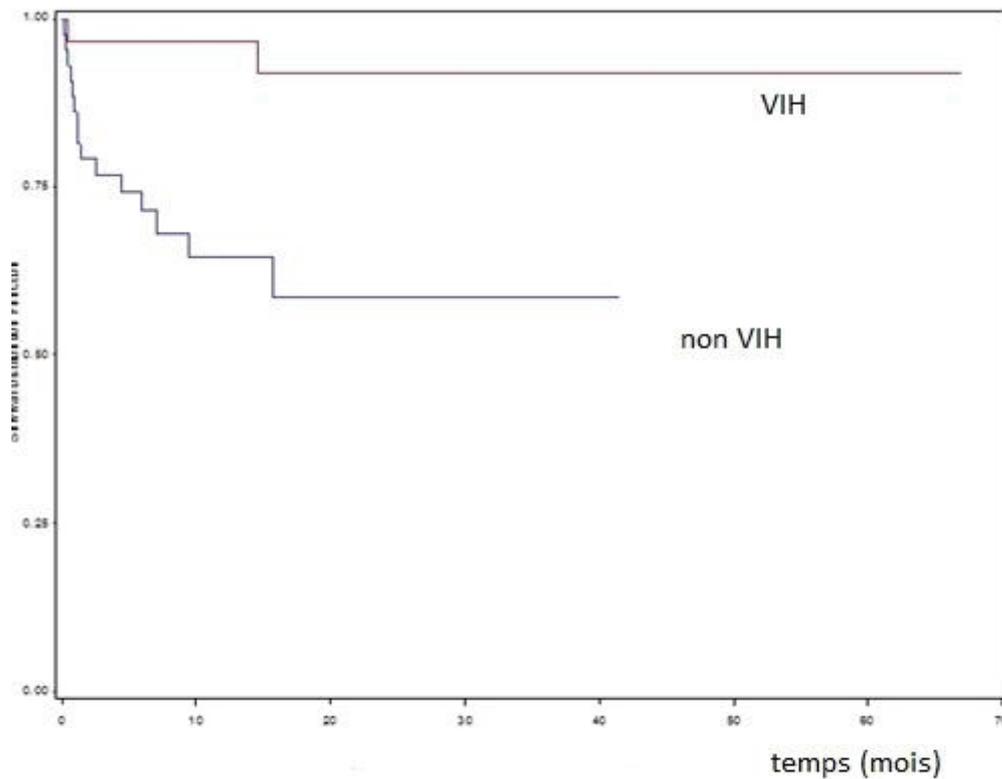
La probabilité d'être malade est de 43% si CT<35 et de 59% si CT<31.

La probabilité de ne pas être malade est de 84% si CT>35 et de 80% si CT>31.

Tableau 8: Tableau récapitulatif des sensibilités, spécificités, valeurs prédictives négatives (VPN) et positives (VPP) des qPCR temps réel en fonction des malades/colonisés (PJP+/PJP-) et des VIH+ et des VIH.

Survie des sous-groupes VIH et non VIH de l'échantillon PJP+ :

Concernant la survie il y avait une différence significative entre les VIH et les non VIH dans l'échantillon PJP+ avec significativement plus de décès chez les non-VIH que chez les VIH ($p=0,02$) avec une meilleure survie chez les VIH que chez les non-VIH. Les résultats sont présentés dans la figure 11.



Survie comparative VIH/non VIH chez PJP+ (en mois)

Figure 11 : survie entre VIH+ et VIH- dans le groupe PJP+. La courbe de survie des patients VIH+ est en rouge et celle des VIH- est en bleue.

Discussion

Notre étude a montré l'utilité de la qPCR dans le diagnostic de *Pneumocystis jirovecii*, que ce soit en terme de colonisation ou de maladie. Grâce aux notifications des cas de pneumocystoses maladies dans la région de Nice, nous n'avons eu aucun cas de PJP+ avec qPCR-. Cela montre que la technique qPCR a détecté l'exhaustivité des cas de PJP+ dans la région de Nice entre avril 2008 et octobre 2013. Le nombre important de patients colonisés dans cette étude montre que le portage asymptomatique ou non est un fait réel. L'étude de la prévalence de la colonisation n'était cependant pas possible car nous n'avions pas l'exhaustivité des cas.

Critère principal de jugement :

Notre étude a montré une différence statistiquement significative entre les CT des qPCR positives à *Pneumocystis jirovecii* entre les groupes PJP+ et PJP-. Cela suggère donc une différence significative de la valeur de CT pour distinguer les colonisations des maladies. D'autres études avaient démontré la capacité de distinguer colonisation de la maladie mais le critère de jugement n'était pas les CT (55). Nous avons réussi à définir des seuils de CT pour obtenir des sensibilités et des spécificités de l'ordre de 80% pour chacune. Les VPN des qPCR étaient toutes supérieures à 80%. Le groupe VIH avait une meilleure VPN (90%) que les non VIH (80%). La VPN était moins bonne que la PCR nichée (100%) mais cette technique de PCR ne distinguait pas la colonisation de la maladie (22). Néanmoins, les seuils permettant d'exclure une maladie et d'exclure une colonisation en cas de positivité qPCR à *Pneumocystis jirovecii* sont assez éloignés et il persiste une zone grise dans laquelle nous ne pouvons exclure les diagnostics de maladie ou de colonisation.

Ces seuils de CT vont de pair avec la charge fongique : plus la charge fongique est élevée plus le seuil de détection est bas et plus la valeur de CT sera basse. On en conclut donc

que les patients PJP+ ont une charge fongique plus élevée que les patients colonisés, ce qui est conforme avec les données de la littérature (55,56,76).

Tous les patients avec une microscopie positive ont eu une CT inférieure à la valeur en faveur du diagnostic de maladie. En prenant en référence la microscopie, il y a donc eu aucun faux négatif en qPCR dans notre cohorte de patients.

Les valeurs de CT définies dans cette étude données à titre indicatif 'en faveur d'une colonisation' ou 'en faveur d'une maladie' pourront être remises en cause par le clinicien en fonction de la symptomatologie et des antécédents du patient. En cas de microscopie positive avec une CT supérieure à la CT limite pour les maladies, le clinicien devra se fier au résultat de l'examen direct. De plus, en cas de résultat de CT en zone grise, la présomption du clinicien restera le seuil critère fiable surtout en cas de microscopie négative...

Une étude antérieure (57) avait montré des seuils de CT de valeurs plus basses (seuils de spécificité inférieurs à 22 et de sensibilité de 28) ; nos seuils plus élevés (31 et 35) favorisent une sensibilité plus forte et un risque de faux négatifs moindre.

Les valeurs de CT sont donc des éléments contributifs au diagnostic mais elles ne peuvent en aucun cas remplacer la présomption clinique et la microscopie positive. La décision clinique reste la référence diagnostique ainsi que la microscopie positive.

Les 9 cas PJP+ réfutés *a posteriori*, (cf. Tableau 6) ont tous des valeurs de CT supérieures à 31, cela signifie que ces neuf cas n'auraient pas été considérés PJP+ *a priori* si le clinicien avait eu connaissance de ces valeurs. De même, les quatre patients sous prévention antipneumocystose (Tableau 2) considérés PJP+ avaient des valeurs de CT inférieures à 35, ce qui signifie que ces quatre cas auraient été confirmés PJP+ par la qPCR.

L'échantillon PJP+ était significativement plus jeune que la population PJP-, comme l'ont montré certaines études (56). L'échantillon VIH PJP+ est plus jeune que la population non VIH PJP+, ce qu'on retrouve dans d'autres études (56), et la proportion de sujet PJP+ VIH est plus importante que la proportion de sujets PJP+ non VIH (72).

Il est important de dépister les colonisations *Pneumocystis* chez les immunodéprimés car contrairement aux immunocompétents, elles pourraient faire craindre une évolution vers une PJP ou constituer un cofacteur d'évolution des maladies pulmonaires (77).

Critères secondaires de jugement :

De même, notre étude a montré une différence statistique entre les CT des qPCR positives à *Pneumocystis jirovecii* entre les groupes VIH et non VIH parmi les patients PJP+. Les seuils sont plus bas pour distinguer colonisation de la maladie chez les VIH+ que chez les VIH-. Ces seuils vont de pair avec la charge fongique plus élevée chez les patients PJP+ VIH+ que chez les patients PJP+ VIH-. Ces résultats ont été constatés dans plusieurs études (11,56,78).

En appliquant la valeur de CT définie dans notre étude comme référence diagnostique et en la comparant avec la décision clinique pour les patients avec LBA et valeur de CT on aurait diagnostiqué parmi les patients VIH treize malades PJP+, zéro faux positifs et cinq faux négatifs (dont un avec microscopie positive). De même avec ces mêmes critères, et en prenant comme examen de référence la décision clinique, on aurait diagnostiqué parmi les patients non VIH dix-sept faux positifs et six faux négatifs (dont un avec microscopie positive). Ces résultats suggèrent que les valeurs de CT sont des éléments pouvant aider au diagnostic (79) et que la décision clinique reste la référence diagnostique. Ces résultats montrent également la difficulté diagnostique de la PJP chez les patients non VIH dont les caractéristiques cliniques, physiopathologiques sont différentes des patients VIH.

Caractéristiques de l'échantillon qPCR+ :

Distribution des cas par pathologie chronique (comorbidités), par service et par traitement au long cours :

Seule la comorbidité VIH ressortait comme facteur de risque en analyse univariée et multivariée, ce qui sous-entend l'absence de facteur de confusion pour le critère des comorbidités en dépit des différents biais possibles.

Le premier des biais possible était un biais de classement différentiel ; en effet, historiquement, les patients atteints de pneumocystose étaient des patients en phase SIDA, que la séropositivité soit connue ou non. Il est ainsi normal de penser chez un patient séropositif ou de découverte de séropositivité qu'une symptomatologie

respiratoire évoque une PJP, même si, depuis plus de 10 ans, les praticiens sont confrontés à la PJP chez les patients immunodéprimés non VIH.

Néanmoins, le suivi de ces dossiers, notamment sur la symptomatologie, et la régression ou non des symptômes lors de la prise du traitement curatif, a permis, dans certains cas où un doute diagnostique pouvait exister, de confirmer, ou d'infirmer les diagnostics. Peu de faux négatifs ou de faux positifs existent et les dossiers des décès suspects étaient réévalués *a posteriori* (trois dossiers réévalués).

Concernant la distribution des PJP parmi les services, le service d'infectiologie était le plus concerné par la PJP, suivi de la médecine interne, de la réanimation puis de l'oncologie-hématologie. Ces services sont connus pour accueillir des patients à haut risque de pneumocystose comme les séropositifs au VIH pour l'infectiologie, les pathologies auto-immunes sous corticoïdes pour la médecine interne, les hémopathies malignes pour l'hématologie et les cancers sous chimiothérapie et corticothérapie pour l'oncologie. Les services de réanimation accueillent les pathologies décompensées mettant en jeu le pronostic vital comme les désaturations en oxygène. La pneumologie, pourtant le service avec le plus de qPCR positives à *Pneumocystis jirovecii* est moins concerné par la PJP. Cela sous-entend qu'il y a beaucoup de patients colonisés et moins de malades PJP dans ce service. Ces données sont néanmoins intéressantes concernant la colonisation parmi les patients de pneumologie car certaines études ont montré le portage chez des patients atteints de BPCO, de mucoviscidose ou d'autres pathologies pulmonaires (26,80). La connaissance de cette colonisation pourrait expliquer des épisodes respiratoires aigus comme des exacerbations de BPCO (26) et pourrait redéfinir les conduites à tenir vis-à-vis de la colonisation de certains patients, d'autant plus que ces patients colonisés souffraient de pathologie respiratoire, un examen diagnostique ayant été demandé (LBA, expectoration induite, etc...).

Concernant les traitements au long cours, trente-deux patients étaient certains de ne pas avoir de traitements au long cours devant le caractère inaugural de l'épisode respiratoire ou de la pathologie chronique. Ces patients étaient une part importante de VIH de découverte récente ou en rupture de traitement. Cela souligne encore de nos jours la découverte de SIDA à des stades avancés avec des infections opportunistes. La pneumocystose demeure encore un mode de découverte de SIDA. De plus, cette découverte de SIDA au cours d'une PJP était associée aux seuls deux patients décédés de

la pneumocystose dans le groupe VIH. L'ignorance d'une séropositivité au VIH associé à une errance diagnostique de la pneumocystose peut compromettre le pronostic de la maladie (81). Le premier patient avait un lymphome à grandes cellules et est décédé le jour du prélèvement ; le second était un patient avec des comorbidités et est décédé quinze jours après le prélèvement.

Des études ont montré que les traitements au long cours pouvaient influencer sur l'apparition ou non de la PJP (79, 82-84), notamment avec les corticoïdes. Dans notre étude, nous ne retrouvons pas l'association PJP+/corticoïdes du fait du regroupement des corticoïdes dans la catégorie immunosuppresseurs.

Gravité des pneumocystoses :

Certaines études associent en cas de pneumocystose grave (avec décompensation respiratoire par exemple) une corticothérapie (22).

Seules deux PJP avaient une corticothérapie associée au traitement curatif antipneumocystose. Elles concernaient un patient avec cancer de la prostate métastatique (PCR=35) et un patient avec découverte de VIH (charge virale 4,79 log10) avec PCR=25. Ces résultats suggèrent que la majorité des pneumocystoses traitées n'avaient donc pas de facteurs de gravité, au contraire de certains exemples de la littérature (16).

Concernant le groupe non VIH et la PJP, les diagnostics réfutés *a posteriori*, les caractéristiques cliniques atypiques et les microscopies souvent négatives font que le diagnostic de PJP reste difficile dans ce type de population. La question d'un traitement préventif par sulfadiazine-triméthoprime (BACTRIM® ou WELLVONE®) se pose en fonction des bénéfices et risques d'un tel traitement chez des patients non VIH (pathologie chronique, toxicité des molécules et risques d'émergence de résistances) (39,85,86).

Un échantillon lymphopénique :

Il est nécessaire de nuancer ces résultats par un facteur essentiel qu'est l'immunodépression. En effet, toutes les études sur la PJP concernent des patients immunodéprimés, que ce soit par le VIH (13,87,88) ou par des pathologies avec immunosuppresseurs (89–93), et la lymphopénie est une cause d'immunodépression. La seconde conséquence est qu'on sélectionne déjà un échantillon à risque car lymphopénique, ce qui augmente la prévalence de la maladie dans l'échantillon. Néanmoins, l'objectif de l'étude n'était pas de faire un dépistage de masse, ce que la qPCR fait de façon qualitative, en objectivant l'absence ou la présence de *Pneumocystis jirovecii*, mais d'objectiver le caractère pathogène ou colonisateur du *Pneumocystis jirovecii*, or ce caractère est influé par l'immunodépression. Certaines études ont montré que les lymphocytes CD4 jouaient un rôle dans la protection contre la pneumocystose (1,3,87), ce qui sous-entend que la profondeur de la lymphopénie CD4 chez des patients même colonisés pourraient être à risque de PJP+. Malheureusement, si nous avons pu recueillir un grand nombre de lymphocytémies chez les patients PJP+ et PJP-, nous n'avons pu avoir le même succès pour les taux de CD4/CD8. Le taux était plus facilement obtenu chez les patients VIH que chez les patients non VIH. De ce fait nous avons beaucoup de données manquantes, ce qui explique la taille des intervalles de confiance était à la limite de la significativité. Ces résultats montrent qu'en cas de PJP il faut rechercher une immunodépression profonde en facteur de risque.

Autres paramètres cliniques, radiologiques, microbiologiques :

Radiologie.

A la vue de sa mauvaise sensibilité et spécificité, l'imagerie semble ne pas être un bon examen diagnostique de la pneumocystose dans notre étude. Il y a néanmoins des limites à cette analyse à cause des données manquantes. Le cliché radiologique est complémentaire à la qPCR, à la microscopie et à la clinique et pourrait offrir des perspectives intéressantes notamment les imageries tomodensitométriques. Une étude a montré que la PJP chez les non VIH était sectorisée à la différence de la PJP chez les VIH où elle était diffuse et panlobulaires (16).

Microscopie et examen direct.

La positivité de la microscopie a probablement influencé le clinicien dans sa décision de considérer ou non le patient avec qPCR+ comme un patient PJP+ car aucun patient PJP- n'a d'examen microscopique positif. La spécificité de ce test est de 100% mais la sensibilité est médiocre. Cette notion n'est pas nouvelle et de nombreuses études recherchent d'autres moyens diagnostiques dont la qPCR(94). Néanmoins, cette technique est intéressante car nous avons vu que certaines valeurs de CT de PJP+ au-delà des seuils obtenus ont une microscopie positive. L'association microscopie et qPCR s'avère intéressante et la qPCR pourrait prendre le relai diagnostique lorsque la microscopie s'avère négative.

Absence de saisonnalité :

Nous n'avons pu détecter une quelconque saisonnalité de la pathologie PJP. Aucune étude n'a par ailleurs montré une saisonnalité dans la PJP, ce qui conforte l'idée d'un portage et d'un mode de transmission interhumain indépendant des conditions climatiques (86).

Evolution favorable, décès et causes de décès :

Le groupe PJP+ avait une évolution favorable au point de vue de la symptomatologie respiratoire par rapport au groupe PJP- car si la pneumocystose est fatale en l'absence de traitement, elle reste un épisode aigu résolutif sous traitement. Cela n'est pas le cas des pathologies respiratoires PJP- qui peuvent être des pathologies chroniques à aggravation plus ou moins rapide (pathologies auto-immunes, cancéreuses ou des hémopathies malignes). Il ne ressortait pas en revanche de différence significative concernant la survie entre les groupes PJP+ et PJP-. Cela sous-entend que la pneumocystose, épisode aigu, n'aggraverait pas le pronostic vital d'une population lymphopénique avec des comorbidités. L'analyse de survie par sous-groupe a montré une mortalité augmentée dans le groupe non VIH par rapport au groupe VIH. Ces

résultats déjà décrits dans la littérature suggèrent que la symptomatologie est plus grave chez les patients non VIH (62,95,96) chez qui la réponse inflammatoire exacerbée aurait plus de conséquences néfastes que chez les patients VIH (23) et que la PJP serait un facteur précipitant d'aggravation de la pathologie chronique. Alors que certaines études estiment la mortalité par PJP chez les patients infectés par VIH entre 7 et 10% (97), d'autres études chez les non VIH estiment la mortalité à 10% chez les transplantés rénaux (98) et jusqu'à 50% en cas de cancers (99). En revanche, chez les patients VIH, l'épisode aigu de PJP est un caractère réversible et curable. De plus, les patients non VIH ont de lourdes comorbidités avec une prise en charge différente qu'une restauration de l'immunité par antirétroviraux chez les VIH. Cette prise en charge différente est souvent même facteur de risque de pneumocystose à cause de thérapies immunodépressives. Une prévention chez les patients non VIH est donc également nécessaire pour les pathologies qui n'ont pas de prophylaxie. La liste des pathologies reste à définir.

Une maladie/colonisation non immunisante et réversible :

Nous avons eu au cours de notre étude plusieurs patients dont la qPCR était négative avant de se positiver, que ce soit pour des patients PJP+ (5 patients) ou PJP- (8 patients). Nous avons également eu des patients qPCR+ qui se sont négativés au cours d'une nouvelle demande de qPCR. De même certains patients avec antécédents de pneumocystose sont redevenus qPCR+ qu'ils soient considérés PJP+ (5 patients) ou PJP- (2 patients). Ces résultats suggèrent que la pneumocystose n'est pas une maladie immunisante et que les 'rechutes' seraient plus des réinfections que des réactivations de la maladie (31,100).

Forces et faiblesses de l'étude :

Choix du critère de référence :

Alors que d'autres études ont choisi comme critère de référence la microscopie par immunofluorescence indirecte (55), la microscopie par coloration Giemsa, (101), la PCR qualitative, nous avons choisi comme certaines études (57) un critère de référence basé sur la décision du clinicien. Contrairement à certaines études où on classait le diagnostic en probabilité forte ou faible (56), le clinicien a pris la décision clinique de traiter le patient ou non. Il a ainsi classé en PJP+ (maladie) ou PJP- (colonisation) selon des arguments cliniques, biologiques, radiologiques, microscopiques et indépendamment du seuil de CT. L'étude n'a pas impacté l'avis clinique du praticien quant à sa pratique médicale. Chaque dossier suspect était réexaminé *a posteriori* et il y a eu peu de diagnostics PJP+ ou PJP- réfutés *a posteriori*. De plus, les dossiers réfutés ont été analysés selon leur nouveau diagnostic. Par conséquent la décision clinique était un bon critère de référence. Il peut toutefois être remis en cause car réunissant un faisceau d'arguments cliniques et paracliniques et non être un examen permettant une réponse dichotomique. La possibilité d'un biais de recrutement était exclue car le critère d'inclusion était biologique (qPCR positive) et non clinique.

Forces de l'étude :

L'inclusion s'est déroulée sur cinq ans et demi pour une pathologie rare avec exhaustivité des cas de PJP+ dans la région de Nice. Il n'y a eu qu'un perdu de vue, et nous avons retrouvé la totalité du statut vivant ou décédé, sauf chez deux patients PJP-. La référence diagnostique était clinique et la méthode étudiée (qPCR) était un examen de routine déjà en place au CHU de Nice. L'aveugle a permis d'éviter le biais d'évaluation et a permis de maintenir une indépendance des résultats.

Faiblesses de l'étude :

Il y a une relative perte de puissance de l'étude causée par des données manquantes (LBA sans CT), et l'impossibilité d'utiliser les prélèvements autres que LBA. De ce fait même si les résultats sont significatifs, nous avons des intervalles de confiance assez larges. Nous aurions pu exclure les prélèvements autres que LBA mais il nous a apparu

intéressant d'étudier les caractéristiques de la population qPCR+ et de la population PJP+. Il était intéressant de noter que ces populations étaient lymphopéniques avec différents types d'immunodépression, et que seul le statut VIH et le rapport CD4/CD8 <0,1 ressortaient en facteur de risque. Par manque de puissance probablement, le rapport CD4/CD8<1 ne ressortait pas. De même nous avons des sous-groupes avec effectifs faibles (VIH+/PJP+ par exemple) pouvant aussi induire une perte de puissance.

Validité externe :

Les conditions de l'étude avec l'absence d'influence des résultats sur la prise en charge clinique des patients, l'exhaustivité des cas de PJP+ dans la région de Nice, l'analyse des qPCR+ en PJP- lorsque le diagnostic de pneumocystose était réfuté, permettent de penser que la validité externe est bonne et que les résultats de cette étude sont extrapolables à des conditions réelles de diagnostic.

Puissance et implications pratiques :

Du fait de sa pratique quotidienne dans les laboratoires, la qPCR est désormais un outil d'aide au diagnostic de PJP. Elle pourrait faire partie de l'arbre décisionnel de cette pathologie car ces CT permettent de distinguer des valeurs en faveur d'une colonisation ou d'une maladie. Elle serait même une aide au diagnostic en cas de microscopie négative.

Conclusion

Cette étude montre une réelle différence statistique des seuils de CT entre patients PJP+ et PJP- ainsi qu'entre les patients VIH et non VIH du groupe PJP+, en prenant comme référence la décision clinique du praticien prenant en charge le patient avec une qPCR positive. Les seuils définis sont toutefois à manipuler avec précaution et la présomption clinique reste la décision du praticien. La qPCR est une aide précieuse pour le diagnostic de PJP car elle quantifie des seuils pour distinguer la colonisation de la maladie, d'autant plus si on connaît le statut sérologique du patient concernant le VIH. La microscopie en cas de positivité reste par sa spécificité l'examen de référence mais la qPCR en cas de microscopie négative permet d'orienter le clinicien pour la conduite à tenir. De même la qPCR permet de connaître des patients colonisés qui dans un contexte d'immunodépression sont à risque d'exacerbation de pathologies pulmonaires autres.

Résumé

Titre : Evaluation diagnostique et intérêt en pratique clinique de la PCR temps réel pour différencier colonisation et maladie chez des patients avec PCR positive à *Pneumocystis jirovecii*: une étude prospective monocentrique.

Introduction :

Distinguer colonisation de la maladie chez des patients avec qPCR positive en établissant des valeurs de cycle de seuil (CT) dans un échantillon de patients avec qPCR positif à *Pneumocystis jirovecii*.

Matériel et Méthode :

Tout prélèvement positif à qPCR *Pneumocystis jirovecii* fut inclus dans une étude prospective monocentrique entre avril 2008 et octobre 2013. Les données complémentaires (âge, sexe, antécédents médicaux, traitements au long cours, sérologie VIH, lymphocytémie...) ont été recueillies dans le logiciel CLINICOM®. La décision clinique, les traitements entrepris, les résultats d'examens paracliniques ont été recherchés. Pour l'étude des cycles de seuil, seuls les prélèvements LBA avec CT ont été inclus. Deux groupes malades (PJP+) et colonisés (PJP-) ont été étudiés en critère principal et deux sous-groupes (VIH et non-VIH) ont été étudiés à partir du groupe PJP+ en critère secondaire.

Résultats :

Nous avons inclus et analysés 225 patients avec qPCR positive, dont 116 LBA avec CT (53 PJP+ et 113 PJP-). Parmi les 53 PJP+, il y avait 19 VIH et 34 non VIH. L'échantillon qPCR+ était lymphopénique (médiane=1000 ; IQR [600 ; 1700]) avec une différence significative entre les patients PJP+ (800 ; IQR [500 ; 1300]) et les patients PJP- (1100 ; IQR [700 ; 1800]), $p=0,03$. Il y avait une différence de distribution pour les patients PJP+ parmi les services ($p=10^{-4}$) et pour les comorbidités ($p=10^{-4}$) mais seule la comorbidité VIH ressortait en régression logistique multivariée ($p=0,037$) ; de même un rapport $CD4/CD8 < 0,1$ était associé à un facteur de risque de PJP+ (OR=6,31 ; IC95% [1,92, 20,76], $p=0,002$). Le groupe PJP+ avait une charge virale plus élevée que le groupe PJP-

(5,71 log₁₀ ; IQR [5,31 log₁₀; 5,91 log₁₀] vs 4,73 log₁₀ ; IQR [3,81 log₁₀; 5 log₁₀], p=0,01). Au niveau des CT les valeurs de cycles de seuil étaient significativement différentes, les seuils du groupe PJP+ étant plus bas (28 ; IC95% [26 ; 30]) que ceux du groupe PJP- (35 IC95% [34 ; 36], p<0,01). De même dans les sous-groupes VIH et non VIH de l'échantillon PJP+ les seuils étaient significativement différents, les valeurs de seuils du sous-groupe VIH étant plus basses (24,5 ; IC95% [21,8;27,5]) que celles du sous-groupe non VIH (30,5 ; IC95% [28,0; 32,8]), p=0,004. Nous avons pu déterminer des valeurs de CT pour une sensibilité de 80% et une spécificité de 80% en fonction de la connaissance du statut sérologique du malade : en cas de statut VIH inconnu ou statut séronégatif, une CT<31 étant en faveur d'une maladie et une CT>35 en faveur d'une colonisation ; en revanche pour un statut VIH séropositif une CT<27 était en faveur d'une maladie et une CT>30 en faveur d'une colonisation. Les survies entre PJP+ et PJP- n'étaient pas significativement différentes alors que la survie entre VIH+ et VIH- du groupe PJP+ était significativement différente (p=0,02) en faveur des patients VIH+.

Conclusion : cette étude a permis l'obtention de valeur de CT pour distinguer colonisation de la maladie entre patients séropositifs et séronégatifs pour le VIH dans le diagnostic de pneumocystose et pourra être utilisé par le clinicien comme aide complémentaire au diagnostic de cette pathologie.

Mots-clefs : Pneumocystose, quantitative Polymerase Chain Reaction, Cycle de Seuil (CT), Virus de l'Immunodéficience Humaine, Colonisation, Maladie.

Bibliographie

1. Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis pneumonia*. N Engl J Med. 10 juin 2004;350(24):2487-98.
2. Thomas CF, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. Nat Rev Microbiol. avr 2007;5(4):298-308.
3. Beck JM, Cushion MT. *Pneumocystis* workshop: 10th anniversary summary. Eukaryot Cell. avr 2009;8(4):446-60.
4. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis. sept 2002;8(9):891-6.
5. Damiani C, Le Gal S, Nevez G, Totet A. Infections à *Pneumocystis jirovecii*: biologie et clinique [Internet]. [cité 15 sept 2014].
6. Cushion MT, Keely SP, Stringer JR. Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. Mycologia. juin 2004;96(3):429-38.
7. Riebold D, Mohr E, Sombetzki M, Fritzsche C, Loebermann M, Reisinger EC. *Pneumocystis* species in Brown Leghorn laying hens--a hint for an extra-mammalian reservoir. Poult Sci. août 2012;91(8):1813-8.
8. Cushion MT. Are members of the fungal genus *Pneumocystis* (a) commensals; (b) opportunists; (c) pathogens; or (d) all of the above? PLoS Pathog. 2010;6(9):e1001009.
9. Phair J, Muñoz A, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A. The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group. N Engl J Med. 18 janv 1990;322(3):161-5.
10. Centers for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS surveillance report. 1993.p. 1-23.
11. Réseau national de santé publique. Surveillance du SIDA en France. Situation au 30 juin 1997. Bull Epidemiol Hebd 1997; (37-38): 165-73.
12. Buchacz K, Baker RK, Palella FJ, Chmiel JS, Lichtenstein KA, Novak RM, et al. AIDS-defining opportunistic illnesses in US patients, 1994-2007: a cohort study. AIDS Lond Engl. 19 juin 2010;24(10):1549-59.
13. Pulvirenti J, Herrera P, Venkataraman P, Ahmed N. *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients in the HAART era. AIDS Patient Care STDs. juin 2003;17(6):261-5.

14. Carmona EM, Limper AH. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. *Ther Adv Respir Dis*. févr 2011;5(1):41-59.
15. Lot F, Pillonel J, Pinget R, Cazein F, Bernillon P, Leclerc M, et al. Les pathologies inaugurales de sida, France, 2003-2010. *Bull Epidemiol Hebd* 2011; (43-44): 454-8.
16. Tasaka S, Tokuda H. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. déc 2012;18(6):793-806.
17. Goto N, Oka S. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in kidney transplantation. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. déc 2011;13(6):551-8.
18. Ognibene FP, Shelhamer JH, Hoffman GS, Kerr GS, Reda D, Fauci AS, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a major complication of immunosuppressive therapy in patients with Wegener's granulomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. mars 1995;151(3 Pt 1):795-9.
19. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg Infect Dis*. juill 2014;20(7):1149-55.
20. Reid AB, Chen SC-A, Worth LJ. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients: new risks and diagnostic tools. *Curr Opin Infect Dis*. déc 2011;24(6):534-44.
21. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev*. avr 2012;25(2):297-317.
22. Helweg-Larsen J, Jensen JS, Dohn B, Benfield TL, Lundgren B. Detection of *Pneumocystis* DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia--a case-control study. *BMC Infect Dis*. 25 nov 2002;2:28.
23. Enomoto T, Azuma A, Kohno A, Kaneko K, Saito H, Kametaka M, et al. Differences in the clinical characteristics of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromized patients with and without HIV infection. *Respirol Carlton Vic*. janv 2010;15(1):126-31.
24. 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*. nov 1989;140(5):1204-9.
25. Hughes WT, Feldman S, Aur RJ, Verzosa MS, Hustu HO, Simone JV. Intensity of immunosuppressive therapy and the incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Cancer*. déc 1975;36(6):2004-9.

26. Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, Pepperell JCT, Wakefield AE, Miller RF, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax*. juill 2003;58(7):594 - 7.
27. Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, et al. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 mars 2001;32(6):855 - 61.
28. Chintu C, Mudenda V, Lucas S, Nunn A, Lishimpi K, Maswahu D, et al. Lung diseases at necropsy in African children dying from respiratory illnesses: a descriptive necropsy study. *Lancet*. 28 sept 2002;360(9338):985 - 90.
29. Vargas SL, Ponce CA, Gallo M, Pérez F, Astorga J-F, Bustamante R, et al. Near-universal prevalence of *Pneumocystis* and associated increase in mucus in the lungs of infants with sudden unexpected death. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. janv 2013;56(2):171 - 9.
30. Vargas SL, Ponce CA, Hughes WT, Wakefield AE, Weitz JC, Donoso S, et al. Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. déc 1999;29(6):1489 - 93.
31. Morgan DJ, Vargas SL, Reyes-Mugica M, Walterspiel JN, Carver W, Gigliotti F. Identification of *Pneumocystis carinii* in the lungs of infants dying of sudden infant death syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. mars 2001;20(3):306 - 9.
32. Nevez G, Magois E, Duwat H, Gouilleux V, Jounieaux V, Totet A. Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 juin 2006;42(11):e99 - 101.
33. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *J Infect Dis*. 1 janv 2008;197(1):10 - 7.
34. Totet A, Gresillon K, Matos O, Lundgren B, Larsen HH, Roux P, et al. *Pneumocystis jirovecii* genotypes in European patients with chronic obstructive pulmonary diseases. *J Eukaryot Microbiol*. 2006;53 Suppl 1:S102 - 3.
35. Gal SL, Héry-Arnaud G, Ramel S, Virmaux M, Damiani C, Totet A, et al. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France. *Scand J Infect Dis*. mars 2010;42(3):225 - 7.
36. Calderón EJ, Friaza V, Dapena FJ, de La Horra C. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis. *Med Mycol*. nov 2010;48 Suppl 1:S17 - 21.
37. Norris KA, Morris A. *Pneumocystis* infection and the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol Res*. août 2011;50(2-3):175 - 80.
38. Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 févr 2010;50(3):347 - 53.

39. Taylor SM, Meshnick SR, Worodria W, Andama A, Cattamanchi A, Davis JL, et al. Low prevalence of *Pneumocystis* pneumonia (PCP) but high prevalence of *Pneumocystis* dihydropteroate synthase (dhps) gene mutations in HIV-infected persons in Uganda. *PloS One*. 2012;7(11):e49991.
40. Hartung TK, Chimbayo D, van Oosterhout JJG, Chikaonda T, van Doornum GJJ, Claas ECJ, et al. Etiology of suspected pneumonia in adults admitted to a high-dependency unit in Blantyre, Malawi. *Am J Trop Med Hyg*. juill 2011;85(1):105-12.
41. Vargas SL, Ponce CA, Gálvez P, Ibarra C, Haas EA, Chadwick AE, et al. *Pneumocystis* is not a direct cause of sudden infant death syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. janv 2007;26(1):81-3.
42. Le Gal S, Damiani C, Totet A, Nevez G. *Pneumocystis*: diagnostic biologique des infections à *Pneumocystis jirovecii* [Internet]. [cité 15 sept 2014].
43. Stringer JR. *Pneumocystis*. *Int J Med Microbiol IJMM*. oct 2002;292(5-6):391-404.
44. Nevez G, Chabé M, Rabodonirina M, Virmaux M, Dei-Cas E, Hauser PM, et al. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite Paris Fr*. sept 2008;15(3):359-65.
45. De Boer MGJ, de Fijter JW, Kroon FP. Outbreaks and clustering of *Pneumocystis* pneumonia in kidney transplant recipients: a systematic review. *Med Mycol*. oct 2011;49(7):673-80.
46. Dei-Cas E, Fleurisse L, Aliouat EM, Bahon-Le Capon J, Cailliez JC, Creusy C. Morphological and ultrastructural methods for *Pneumocystis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. sept 1998;22(1-2):185-9.
47. Merali S, Frevert U, Williams JH, Chin K, Bryan R, Clarkson AB. Continuous axenic cultivation of *Pneumocystis carinii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 mars 1999;96(5):2402-7.
48. Chalvardjian AM, Grawe LA. A NEW PROCEDURE FOR THE IDENTIFICATION OF *PNEUMOCYSTIS CARINII* CYSTS IN TISSUE SECTIONS AND SMEARS. *J Clin Pathol*. juill 1963;16:383-4.
49. Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol*. août 1955;25(8):975-9.
50. Dournon E, Rajagopalan P, Albert F, Camus F, Marche C, McLauchlin J, et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by non-experts. *Lancet*. 14 janv 1989;1(8629):107-8.
51. Kovacs JA, Gill V, Swan JC, Ognibene F, Shelhamer J, Parrillo JE, et al. Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet*. 5 juill 1986;2(8497):1-3.

52. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, et al. *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis.* févr 2005;11(2):245-50.
53. Helweg-Larsen J. *Pneumocystis jirovecii*. *Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis.* *Dan Med Bull.* août 2004;51(3):251-73.
54. Fujisawa T, Suda T, Matsuda H, Inui N, Nakamura Y, Sato J, et al. Real-time PCR is more specific than conventional PCR for induced sputum diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised patients without HIV infection. *Respirol Carlton Vic.* mars 2009;14(2):203-9.
55. Botterel F, Cabaret O, Foulet F, Cordonnier C, Costa J-M, Bretagne S. Clinical significance of quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* févr 2012;50(2):227-31.
56. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* oct 2011;17(10):1531-7.
57. Fillaux J, Malvy S, Alvarez M, Fabre R, Cassaing S, Marchou B, et al. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Microbiol Methods.* oct 2008;75(2):258-61.
58. Desmet S, Van Wijngaerden E, Maertens J, Verhaegen J, Verbeken E, De Munter P, et al. Serum (1-3)-beta-D-glucan as a tool for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy. *J Clin Microbiol.* déc 2009;47(12):3871-4.
59. Shimizu Y, Sunaga N, Dobashi K, Fueki M, Fueki N, Makino S, et al. Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. *BMC Infect Dis.* 2009;9:47.
60. Jung AC, Paauw DS. Management of adverse reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole in human immunodeficiency virus-infected patients. *Arch Intern Med.* 14 nov 1994;154(21):2402-6.
61. De Castro N, Xu F, Porcher R, Pavie J, Molina J-M, Peraldi M-N. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients occurring after discontinuation of prophylaxis: a case-control study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* sept 2010;16(9):1375-7.
62. Sepkowitz KA, Brown AE, Armstrong D. *Pneumocystis carinii* pneumonia without acquired immunodeficiency syndrome. More patients, same risk. *Arch Intern Med.* 12 juin 1995;155(11):1125-8.

63. Godeau B, Coutant-Perronne V, Le Thi Huong D, Guillevin L, Magadur G, De Bandt M, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the course of connective tissue disease: report of 34 cases. *J Rheumatol.* févr 1994;21(2):246-51.
64. Yale SH, Limper AH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin Proc.* janv 1996;71(1):5-13.
65. Helweg-Larsen J, Benfield T, Atzori C, Miller RF. Clinical efficacy of first- and second-line treatments for HIV-associated *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a tri-centre cohort study. *J Antimicrob Chemother.* déc 2009;64(6):1282-90.
66. Rodriguez M, Fishman JA. Prevention of infection due to *Pneumocystis spp.* in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* oct 2004;17(4):770-82, table of contents.
67. Thomas M, Rupali P, Woodhouse A, Ellis-Pegler R. Good outcome with trimethoprim 10 mg/kg/day-sulfamethoxazole 50 mg/kg/day for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV infected patients. *Scand J Infect Dis.* 2009;41(11-12):862-8.
68. Ognibene FP, Shelhamer J, Gill V, Macher AM, Loew D, Parker MM, et al. The diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome using subsegmental bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis.* juin 1984;129(6):929-32.
69. Kales CP, Murren JR, Torres RA, Crocco JA. Early predictors of in-hospital mortality for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med.* août 1987;147(8):1413-7.
70. Ko Y, Jeong B-H, Park HY, Koh W-J, Suh GY, Chung MP, et al. Outcomes of *Pneumocystis pneumonia* with respiratory failure in HIV-negative patients. *J Crit Care.* juin 2014;29(3):356-61.
71. DeLorenzo LJ, Huang CT, Maguire GP, Stone DJ. Roentgenographic patterns of *Pneumocystis carinii* pneumonia in 104 patients with AIDS. *Chest.* mars 1987;91(3):323-7.
72. Roembke F, Heinzow HS, Gosseling T, Heinecke A, Domagk D, Domschke W, et al. Clinical outcome and predictors of survival in patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia--results of a tertiary referral centre. *Clin Respir J.* janv 2014;8(1):86-92.
73. Meliani L, Develoux M, Marteau-Miltgen M, Magne D, Barbu V, Poirot J-L, et al. Real time quantitative PCR assay for *Pneumocystis jirovecii* detection. *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50 Suppl:651.

74. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet*. 25 août 1990;336(8713):451-3.
75. Robberts FJL, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. *Diagn Microbiol Infect Dis*. août 2007;58(4):385-92.
76. Matsumura Y, Ito Y, Iinuma Y, Yasuma K, Yamamoto M, Matsushima A, et al. Quantitative real-time PCR and the (1→3)- β -D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. juin 2012;18(6):591-7.
77. Morris A, Sciruba FC, Lebedeva IP, Githaiga A, Elliott WM, Hogg JC, et al. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis colonization*. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 août 2004;170(4):408-13.
78. Huggett JF, Taylor MS, Kocjan G, Evans HE, Morris-Jones S, Gant V, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax*. févr 2008;63(2):154-9.
79. Mühlethaler K, Bögli-Stuber K, Wasmer S, von Garnier C, Dumont P, Rauch A, et al. Quantitative PCR to diagnose *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised non-HIV patients. *Eur Respir J*. avr 2012;39(4):971-8.
80. Kameda H, Tokuda H, Sakai F, Johkoh T, Mori S, Yoshida Y, et al. Clinical and radiological features of acute-onset diffuse interstitial lung diseases in patients with rheumatoid arthritis receiving treatment with biological agents: importance of *Pneumocystis pneumonia* in Japan revealed by a multicenter study. *Intern Med Tokyo Jpn*. 2011;50(4):305-13.
81. Grant PM, Komarow L, Sanchez A, Sattler FR, Asmuth DM, Pollard RB, et al. Clinical and immunologic predictors of death after an acute opportunistic infection: results from ACTG A5164. *HIV Clin Trials*. août 2014;15(4):133-9.
82. Catherinot E, Lanternier F, Bougnoux M-E, Lecuit M, Couderc L-J, Lortholary O. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Infect Dis Clin North Am*. mars 2010;24(1):107-38.
83. Gea-Banacloche JC. Rituximab-associated infections. *Semin Hematol*. avr 2010;47(2):187-98.
84. Sillaber C, Herrmann H, Bennett K, Rix U, Baumgartner C, Böhm A, et al. Immunosuppression and atypical infections in CML patients treated with dasatinib at 140 mg daily. *Eur J Clin Invest*. déc 2009;39(12):1098-109.

85. Rabodonirina M, Vaillant L, Taffé P, Nahimana A, Gillibert R-P, Vanhems P, et al. *Pneumocystis jirovecii* genotype associated with increased death rate of HIV-infected patients with pneumonia. *Emerg Infect Dis.* janv 2013;19(1):21-8; quiz 186.
86. Hauser PM, Nahimana A, Taffe P, Weber R, Francioli P, Bille J, et al. Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 août 2010;51(4):e28-33.
87. Huang L, Crothers K, Morris A, Groner G, Fox M, Turner JR, et al. *Pneumocystis* colonization in HIV-infected patients. *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50 Suppl:616-7.
88. Lee SH, Kim K-H, Lee SG, Chen DH, Jung DS, Moon CS, et al. Trends of mortality and cause of death among HIV-infected patients in Korea, 1990-2011. *J Korean Med Sci.* janv 2013;28(1):67-73.
89. Mori S, Cho I, Sugimoto M. A followup study of asymptomatic carriers of *Pneumocystis jiroveci* during immunosuppressive therapy for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* août 2009;36(8):1600-5.
90. Roblot F, Godet C, Le Moal G, Garo B, Faouzi Souala M, Dary M, et al. Analysis of underlying diseases and prognosis factors associated with *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised HIV-negative patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* juill 2002;21(7):523-31.
91. Tokuda H, Sakai F, Yamada H, Johkoh T, Imamura A, Dohi M, et al. Clinical and radiological features of *Pneumocystis pneumonia* in patients with rheumatoid arthritis, in comparison with methotrexate pneumonitis and *Pneumocystis pneumonia* in acquired immunodeficiency syndrome: a multicenter study. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2008;47(10):915-23.
92. Bollée G, Sarfati C, Thiéry G, Bergeron A, de Miranda S, Menotti J, et al. Clinical picture of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in cancer patients. *Chest.* oct 2007;132(4):1305-10.
93. Samuel CM, Whitelaw A, Corcoran C, Morrow B, Hsiao N-Y, Zampoli M, et al. Improved detection of *Pneumocystis jirovecii* in upper and lower respiratory tract specimens from children with suspected *Pneumocystis pneumonia* using real-time PCR: a prospective study. *BMC Infect Dis.* 2011;11:329.
94. McTaggart LR, Wengenack NL, Richardson SE. Validation of the MycAssay *Pneumocystis* kit for detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage specimens by comparison to a laboratory standard of direct immunofluorescence microscopy, real-time PCR, or conventional PCR. *J Clin Microbiol.* juin 2012;50(6):1856-9.

95. Torres HA, Chemaly RF, Storey R, Aguilera EA, Nogueras GM, Safdar A, et al. Influence of type of cancer and hematopoietic stem cell transplantation on clinical presentation of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* juin 2006;25(6):382-8.
96. Sepkowitz KA, Brown AE, Telzak EE, Gottlieb S, Armstrong D. *Pneumocystis carinii* pneumonia among patients without AIDS at a cancer hospital. *JAMA J Am Med Assoc.* 12 févr 1992;267(6):832-7.
97. Walzer PD, Evans HER, Copas AJ, Edwards SG, Grant AD, Miller RF. Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985-2006. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 févr 2008;46(4):625-33.
98. Arend SM, Kroon FP, van't Wout JW. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without AIDS, 1980 through 1993. An analysis of 78 cases. *Arch Intern Med.* 11 déc 1995;155(22):2436-41.
99. Sepkowitz KA. Antibiotic prophylaxis in patients receiving hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* mars 2002;29(5):367-71.
100. Keely SP, Stringer JR. Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. *J Clin Microbiol.* nov 1997;35(11):2745-7.
101. Fily F, Lachkar S, Thiberville L, Favennec L, Caron F. *Pneumocystis jirovecii* colonization and infection among non HIV-infected patients. *Médecine Mal Infect.* oct 2011;41(10):526-31.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.

Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances.

Je ne prolongerai pas abusivement les agonies.

Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences.

Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.