UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

AVERTISSEMENT

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

Il n’a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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

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

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2016 N°

Apport du séquençage nouvelle génération au typage MLST de *Pneumocystis jirovecii* dans le contexte d'une épidémie chez des patients transplantés d'organe solide

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE DIPLÔME D'ETAT

Eléna CHARPENTIER

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement à la faculté de pharmacie de Grenoble *

Le 1er juillet 2016

Devant le jury composé de :

Présidente du jury : Madame la Professeure Murielle CORNET

Directrice de thèse : Madame le Docteur Danièle MAUBON

Membres : Monsieur le Professeur Olivier EPAULARD

Monsieur le Professeur Pierre FLORI

Madame le Docteur Sylvie LARRAT

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

UFR de Pharmacie

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

Doyen : SEVE Michel
Vice-doyenne : DEMEILLIERS Christine

Année 2015-2016

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MARTIN	Donald	Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UJF-CNRS)
MOINARD	**Christophe**	LABFA (U Inserm 1055)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEURS EMERITES

CALOP	Jean
GRILLOT	Renée
ROUSSEL	Anne-Marie

Dernière mise à jour : NM 16/02/2016

UFR de Pharmacie

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
OUKACINE	Farid	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 76 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

UFR de Pharmacie

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

MAITRES DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

BEDOUCH	Pierrick	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I)

PROFESSEURS CERTIFIES

FITE	Andrée
GOUBIER	Laurence

PROFESSEURS ET MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES (PAST/MAST)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

PROFESSEURS AGREGES (PRAG)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : NM 16/02/2016

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 76 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Murielle Cornet,

Pour me faire l'honneur de présider ce jury. Merci également pour avoir partagé vos larges connaissances en Mycologie et m'avoir fait découvrir et apprécier la recherche en biologie moléculaire à travers le projet Amarcand.

A Madame le Docteur Danièle Maubon,

Pour avoir accepté de m'encadrer pour ce projet de thèse ainsi que pour le Master 2. Merci pour ta grande disponibilité, ton écoute, et ta bonne humeur : un plaisir et un honneur de travailler avec toi. Merci pour tes encouragements qui ont beaucoup compté au cours de cette année bien remplie. Merci également pour tout ce que tu m'as appris, aussi bien dans le domaine de la recherche, que de la Mycologie/Parasitologie clinique.

A Madame le Docteur Sylvie Larrat,

Pour avoir accepté de juger ce travail et pour ce que vous pourrez apporter par votre expérience des technologies moléculaires. Merci pour vos précieux conseils lors des manipulations sur le GS junior, notamment les moins fructueuses. Merci également pour vos enseignements durant mes semestres en Virologie.

A Monsieur le Professeur Olivier Epaulard,

Pour avoir accepté de juger ce travail et pour ce que vous pourrez apporter par votre expérience clinique de la pneumocystose, notamment au cours de cette épidémie.

A Monsieur le Professeur Pierre Flori,

Pour avoir accepté de juger ce travail et de faire le déplacement de St Etienne pour la soutenance. Merci pour ce que vous pourrez apporter à ce travail grâce votre expertise en mycologie.

A tous ceux qui ont participé à ce projet :

Cécile Garnaud, Pour tous tes nombreux conseils techniques et généraux sur ce travail. Merci également pour tes encouragements et ton soutien au cours de cette année.

Katia Fusillier, Pour ton aide précieuse avec le GS junior, pour ta disponibilité et pour tous tes sourires, très appréciés !

Claire Wintenberger, Pour cette collaboration très agréable entre le service d'infectiologie et le laboratoire.

Sébastien Bailly, Pour ton aide précieuse avec les heatmaps !

John Rendu et Joëlle Lerale, Pour le séquençage Sanger.

Gladys, Pour ces moments difficiles partagés en parallèle et pour ton aide aux différentes étapes des manips.

Aurélie Aimé-Blanc, Pour avoir géré toutes les commandes et ce, avec le sourire !

A l'équipe technique de Roche, notamment François Collyn et Carole Donne Gousse, Pour votre aide et votre grande réactivité tout au long de ce projet.

A Monsieur le Professeur Hervé Pelloux,

Pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Parasitologie-mycologie durant trois semestres. Merci pour vos conseils aux différentes étapes de mon parcours spécialisé et concernant mon futur professionnel.

A l'ensemble des biologistes de parasitologie-mycologie, ceux que j'ai déjà cités ci-dessus, Marie-Pierre Brenier Pinchart, Odile Cognet, Hélène Fricker-Hidalgo, Céline Dard,

Merci pour l'accueil chaleureux que vous m'avez réservé au sein de votre équipe. Merci pour tous vos enseignements et le partage de votre passion. Enfin merci pour la confiance que vous avez su m'accorder.

A l'ensemble des techniciens de parasitologie-mycologie,

Pour votre accueil, le partage de vos connaissances et pour tous ces bons moments partagés aux paillasses ou en salle de pause.

A l'ensemble des biologistes et des techniciens de l'IBP, ainsi qu'aux biologistes et techniciens du laboratoire du CH de Chambéry,

Pour votre accueil et pour avoir participé à ma formation de biologiste médical.

A l'ensemble de mes co-internes,

Pour avoir partagé avec moi ces 4 belles années d'internat.

Et en particulier : Aurélie, Caroline, Dany, Julie, Zine-Eddine, Clémentine et Gladys.

Pour tous ces bons moments partagés, au labo et ailleurs, qui ne seront pas oubliés, et pour tous ceux à venir. Merci d'avoir accueilli si chaleureusement la petite lyonnaise que je suis!

A mes amis de la fac et d'ailleurs : **Chich, Julie Joug, Alexandra, Milou-Laï, Mika, Lolo, Claire, Junior, Sam, Sand, Mich, Kim, Nellz, Eric, Yanis.**

Pour toutes ces belles aventures partagées partout dans le monde, et pour toutes celles à venir !

A Papa et Maman,

Pour votre écoute (presque toujours attentive) et pour votre soutien inconditionnel. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et pour tout l'amour que vous m'avez apporté et continuez de m'apporter tous les jours. J'espère vous en donner tout autant.

A Fanny et Mathias :

Pour votre soutien et vos encouragements tout au long de cette année! Pour tous les moments partagés qui me redonnent le sourire et pour tous ceux à venir. Merci d'être toujours là.

Au reste de ma famille,

Merci pour votre soutien et votre grand intérêt pour le *Pneumocystis* cette année !

A Paule et Papi,

Pour votre soutien au cours de mes études et pour tous les souvenirs gravés.

A Alexandre,

Merci d'être à mes côtés au quotidien malgré la distance qui nous sépare pour l'instant. Merci pour ces six belles années, et pour tout ce qu'il nous reste à découvrir ensemble.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS **10**

TABLE DES ABREVIATIONS : **12**

INTRODUCTION **13**

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES **15**

1. *Pneumocytis jirovecii* et Pneumocystose pulmonaire 15

1.1.*Pneumocystis jirovecii* *15*

1.1.1. Le genre *Pneumocystis* 15

1.1.2. Du parasite *Pneumocystis carinii* au champignon *Pneumocystis jirovecii* 16

1.1.3. Cycle de *P .jirovecii* 17

1.1.4 Le génome de *P. jirovecii* 19

1.2. La pneumocystose pulmonaire *21*

1.2.1. Epidémiologie de la PCP 21

1.2.2. Transmission et physiopathologie 22

- La transmission 22
- La physiopathologie 23

1.2.3. Clinique et imagerie 23

1.2.4. Le diagnostic biologique 24

- Examen direct 24
- Techniques moléculaires 25
- Dosage de β(1-3)-D-glucanes 26

1.2.5. Traitement et Prophylaxie 26

- Traitement de première ligne : Cotrimoxazole 27
- Traitements de seconde ligne 27
- Prophylaxie 28

2. Epidémies de *Pneumocystis jirovecii* 29

2.1. Description des épidémies de PCP 29

2.2. Techniques de typage appliquées à l'étude des souches de *P .jirovecii* 32

2.2.1. PCR-SSCP : PCR Single Strand Conformation Polymorphism 32

2.2.2. Etude des polymorphismes de longueur des fragments de restriction après amplification: PCR-RFLP 34

- PCR-RFLP du gène *DHPS* 34

- PCR-RFLP du gène *MSG*....34

2.2.3. Analyse des microsatellites....35

- Etude des variations des microsatellites de l'intron du gène *MSG*....35
- Etude de short tandem repeats....36

2.2.4. Séquençage de loci et typage MLST....37

- Séquençage de loci : Analyse des SNP....37
- Typage MLST....38

2.3. Infections mixtes à *P. jirovecii* *41*

3. séquencage nouvelle génération et application en épidémiologie....43

3. 1. Le séquençage classique de Sanger....43

3. 2. Le séquençage nouvelle génération....44

3.2.1. Séquençage 2ème génération....44

3.2.2. La technologie 454 Roche : Un brin = une bille = une séquence....45

3.2.3. Séquenceurs de 3ème et 4ème génération : Next generation sequencing....47

3.3. Applications du séquençage nouvelle génération en épidémiologie....*48*

3.3.1 Séquençage génome entier par shotgun....48

3.3.2 Mise en évidence de variants minoritaires résistants....49

3.3.3. NGMLST: Next Generation Multi Locus Strain Typing....49

RESUME DU TRAVAIL PERSONNEL EXPERIMENTAL....51

1. Problématique....51

2. Méthodologie....52

2.1. Choix du panel de patients....52

2.2. Choix des loci et des amorces....52

2.3. Choix d'une stratégie d'amplification en deux étapes : « universal tail»....53

2.4. Le séquençage nouvelle génération....54

3. Résultats et Discussion....55

4. Conclusion et perspectives....56

ARTICLE....58

CONCLUSION....88

BIBLIOGRAPHIE....90

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures :

Figure 1 : Description du kyste de *P. jirovecii* 16
Figure 2 : Classification phylogénétique de *P. jirovecii* 17
Figure 3 : Cycle putatif de *P. jirovecii* 18
Figure 4: Cycle putatif de *P. jirovecii* 19
Figure 5: Ploïdie de *P. jirovecii.* 19
Figure 6 Génomes mitochondriaux de *Pneumocystis* 21
Figure 7: Génomes nucléaires de *Pneumocystis* 21
Figure 8: Colorations permettant la mise en évidence de *Pneumocystis* à l'examen direct. 25
Figure 9: Recommandations pour le traitement et la prophylaxie de *P. jirovecii* 26
Figure 10: Cibles du cotrimoxazole. 27
Figure 11: Formule de Simpson, permettant le calcul de l'index de Hunter 32
Figure 12: Typage par PCR-SSCP 33
Figure 13: Typage par PCR-RFLP *MSG* 35
Figure 14 : Typage par étude du microsatellite de la région UCS 36
Figure 15: Associations de loci pour le typage MLST. 38
Figure 16: Principe du séquençage Sanger 43
Figure 17: Automates de paillasse pour le séquençage deuxième génération 44
Figure 18: séquences "clés" à ajouter lors de la préparation de la librairie 45
Figure 19: Amplification clonale par la technologie 454 de Roche 46
Figure 20: Principe du pyroséquençage. 47
Figure 21: Principe du séquençage shotgun 48
Figure 22: Comparaison séquençage Sanger et séquençage NGS 49
Figure 23: Comparaison des typages MLST et NGMLST 50
Figure 24: Nombre de PCP diagnostiquées au CHU Grenoble Alpes de 2011 à 2015, et contexte clinique. 51
Figure 25: Amplification en 2 étapes, selon la stratégie "universal tail". 53
Figure 26: Stratégie expérimentale de l'étude avec séquençage GS junior +®. 54
Figure 27: Nouveaux polymorphismes observés. 55

Liste des tableaux :

Tableau I : Clusters de PCP décrits incluant un génotypage des souches. 31
Tableau II : Les différentes techniques de typage moléculaire de *P. jirovecii*. 40
Tableau III : Comparaison des polymorphismes observés avec les techniques NGS et Sanger. 56

TABLE DES ABREVIATIONS :

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

ARNt: Acide ribonucléique de transfert

ASP-PCR: Allele Specific Primer PCR

BG: β(1-3)-D-glucanes

dNTP: desoxiribonucléotide

ddNTP: didésoxyribonucléotide

emPCR: PCR en émulsion

InVS: Institut de veille sanitaire

MLST: Multilocus Sequence Typing

MNP: Multinucleotide Polymorphism

NGS: Next Generation Sequencing

NG MLST: Next Generation MultiLocus Sequence Typing

PCP: Pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* (ou pneumocystose pulmonaire)

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCR-RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism - PCR

PCR-SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism – PCR

SIDA: Syndrôme de l'immunodéficience acquise

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SNuPE: Single Nucleotide Primer Extesion

TOS : Transplanté d'organe solide

UDPS: Ultra deep pyrosequencing

INTRODUCTION

La pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* (PCP), ou pneumocystose, est une maladie opportuniste potentiellement mortelle, menaçant particulièrement les patients d'onco-hématologie, transplantés d'organes ou ceux infectés par le VIH au stade SIDA. Au cours des vingt dernières années, parallèlement aux progrès réalisés dans le domaine de la transplantation d'organe, l'incidence de la PCP a augmenté chez les patients receveurs immunodéprimés (1,2).

Ces dernières années, de nombreuses équipes ont rapporté des cas groupés de PCP chez leurs patients transplantés d'organes solides (TOS). Une clonalité et une transmission nosocomiale des souches étaient également fréquemment décrites (3,4). Ces premières épidémies ont permis d'avancer l'hypothèse d'une transmission de personne à personne *de P. jirovecii* (4,5).

De plus, des études épidémiologiques ont rapidement mis en évidence la présence concomitante de différentes souches (variants) de *P. jirovecii* au cours de l'infection. La proportion de ces infections « mixtes », ou « co-infections », varie de 15 à 92%, en fonction des études et de la technique utilisée pour le typage (6–9). En effet, la sensibilité de détection de ces variants est très dépendante de la technique utilisée (6,10). Les études les plus récentes décrivent une proportion de ces infections mixtes autour de 70%, dont la moitié avec plus de deux populations différentes de *P. jirovecii* (9–12).

Le Multilocus Sequence Typing (MLST), précis, reproductible et discriminant, est la technique de référence pour le typage des souches, mais l'utilisation du séquençage Sanger limite la détection des souches minoritaires à celles représentant plus de 20% du matériel génétique global (13,14).

Développées à la fin des années 2000, les techniques de séquençage nouvelle génération (NGS), basées sur une miniaturisation et une parallélisation des réactions de séquençage, permettent l'étude de milliers de séquences à la fois et une cartographie précise des souches majoritaires et minoritaires présentes au sein d'un échantillon (13,15).

Entre mai 2014 et août 2015, douze cas de PCP ont été diagnostiqués chez des patients transplantés d'organes solides au Centre Hospitalo-Universitaire de Grenoble. L'objectif de cette thèse était d'évaluer l'intérêt d'un typage MLST par séquençage nouvelle génération, dans un contexte épidémique de PCP. A notre connaissance, l'utilisation d'une stratégie NG-MLST dans un contexte d'épidémie de PCP n'a jamais été décrite à ce jour.

Ce manuscrit se compose de trois parties. Une première partie présentant des rappels bibliographiques sur *P. jirovecii*, les épidémies de PCP, les méthodes de typage, et les techniques de séquençage nouvelle génération. Une seconde partie résume en français la problématique, les méthodes et les principaux résultats de notre étude. Enfin, la troisième partie présente l'ensemble du travail sous forme d'article scientifique en anglais.

1. *Pneumocytis jirovecii* et Pneumocystose pulmonaire

Malgré sa description il y a plus d'un siècle, les connaissances sur *Pneumocystis jirovecii* demeurent limitées. Ceci est principalement lié à l'impossibilité de cultiver ce champignon *in vitro.* Ce micromycète est responsable de pneumopathie sévère chez des patients immunodéprimés et il demeure en France une des infections opportunistes classant au stade SIDA les plus fréquentes. Il est aussi devenu une source importante de morbi-mortalité chez les patients transplantés et les patients traités par chimiothérapie.

1.1. *Pneumocystis jirovecii*

1.1.1. Le genre *Pneumocystis*

Le genre *Pneumocystis* appartient au règne des champignons, au phylum des ascomycètes. Il a été isolé des poumons de la quasi-totalité des espèces mammifères terrestres testées et sur tous les continents, à l'exception des continents polaires non étudiés jusqu'à maintenant. Il s'agit d'un organisme biotrophe obligatoire, comme le montre la perte de certains gènes nécessaires à la croissance et à la reproduction du champignon (16). Plus précisément, une étude récente de l'équipe américaine des Dr Cuomo et Kovacs a montré que le métabolisme du champignon était en fait adapté au parasitisme des mammifères (17).

D'abord décrit comme une unique espèce pouvant infecter différents mammifères, des études génétiques ont mis en évidence l'existence de différentes espèces avec une spécificité d'hôte pour chacune d'entre elles (18). L'hypothèse évolutive est basée sur l'existence d'un ancêtre commun à l'ensemble du genre *Pneumocystis*, et sur l'émergence des diverses espèces par un mécanisme de co-évolution au sein de leur hôte. Cinq espèces sont aujourd'hui bien définies. *Pneumocystis jirovecii* est le pathogène strict de l'Homme. *Pneumocystis carinii* et *Pneumocystis wakefieldae* parasitent le rat alors que *Pneumocystis murina* et *Pneumocystis oryctalogi* ont pour hôtes respectifs, la souris et le lapin.

1.1.2. Du parasite *Pneumocystis carinii* au champignon *Pneumocystis jirovecii*

P. jirovecii est observé pour la première fois au début du XXème siècle au Brésil. En 1909, Carlos Chagas découvre la forme kystique au microscope dans des poumons de modèles porcins infectés par *Trypanosoma cruzi* (19). Un an plus tard, Alexandre Carinii, alors directeur de l'institut Pasteur de Sao Paulo, observe à son tour cette nouvelle morphologie dans des poumons de rats infectés par *Trypanosoma lewisi* (20). Tous deux pensent alors avoir mis en évidence la forme schizogonique du genre Trypanosome.

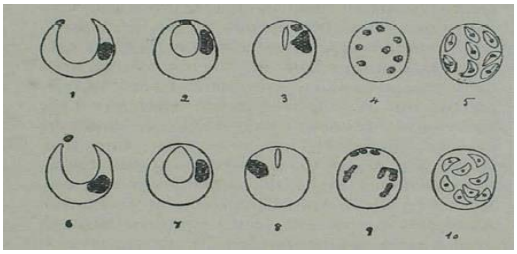


Figure 1 : Description du kyste de *P. jirovecii (* d'après C. Chagas, 1909).

En 1912, à l'institut Pasteur de Paris, les époux Delanoë retrouvent cette forme décrite par leur confrère A. Carinii, dans des poumons de rats d'égouts. Ces rats ne pouvant être atteints de trypanosomose, ils associent pour la première fois cette morphologie à un nouveau parasite. Ils le nomment *Pneumocystis carinii* (21). "Pneumo-" pour rappeler le tropisme particulier du germe pour les poumons, "-cystis" pour la forme de kyste observée.

Le genre *Pneumocystis* est, à ses débuts, rattaché au règne des protozoaires en raison de ses caractéristiques morphologiques qui rappellent les formes trophiques et les formes kystiques. Cependant, dans la seconde moitié du XXème siècle, cette classification est remise en cause par des études ultrastructurales du microorganisme, qui montrent notamment une paroi trilamellaire riche en chitine et en Beta-D-glucanes (1-3), le rapprochant d'avantage des champignons (22). Plus tard, des études moléculaires portant sur l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique (ARNr 18s) suggèrent son appartenance aux espèces fongiques (23). Les études génétiques postérieures et plus étendues confirmeront ces données.

Ainsi en 1988, huit décennies après sa découverte, le genre *Pneumocystis* est reclassé dans le règne des champignons. Il est inclus dans le phylum des Ascomycètes, proche de *Saccharomyces cerevisiae* et de la "levure à fission", *Schizosaccharomyces pombe*.

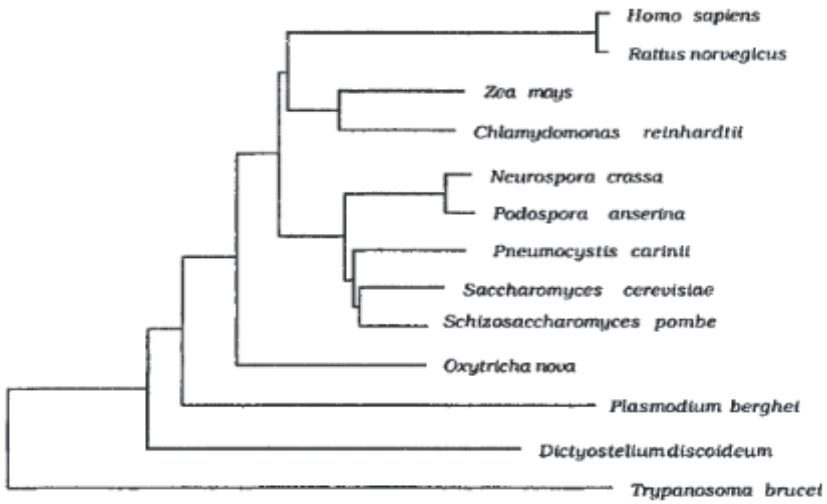


Figure 2 : Classification phylogénétique de P. jirovecii (d'après Edman et al, Nature, 1988).

Sur cette période, le champignon est décrit non seulement chez les humains mais aussi dans de nombreuses espèces mammifères. Après la démonstration de la spécificité d'hôte pour chaque espèce, l'espèce retrouvée chez l'homme est rebaptisée en 2002 *Pneumocystis jirovecii,* pour honorer le travail du Pr. Otto Jirovec sur la pneumocystose pulmonaire (24). *Pneumocystis carinii* désigne alors l'espèce parasitant le rat.

1.1.3. Cycle de *P. jirovecii*

Deux formes principales de *Pneumocystis* sont aujourd'hui décrites d'après leur morphologie : une forme ascospore et une forme asque, contenant 8 ascospores. Même si ces termes de mycologie doivent aujourd'hui être adoptés, en pratique, l'ancienne dénomination (trophozoïte et kyste) reste très utilisée en laboratoire.

La forme ascospore ("trophozoïte" ou forme végétative) est uninuclée, amiboïde de taille variable (2 à 8 µm) avec une paroi fine. Elle émet de nombreux filopodes qui lui offrent une bonne adhérence aux cellules alvéolaires pulmonaires au contact desquelles elle se multiplie activement. La forme asque ou sporocyste mature ("kystique") mesure 4 à 6 µm et est entourée d'une paroi épaisse, sans filopodes. Elle contient 8 ascospores bien délimitées qui seront libérées au cours du

cycle. Le kyste, une fois vidé, a une forme de "ballon dégonflé" ou "peau de raisin" caractéristique. L'asque correspondrait à la forme de résistance du champignon.

Entre ces deux principaux stades, il existe des formes intermédiaires, correspondant à la maturation progressive du sporocyste : les sporocystes précoces, intermédiaires et tardifs. Ils comportent respectivement 1, 2-4 et 4-8 noyaux avec une paroi de plus en plus épaisse.

L'ensemble de ces stades sont retrouvés dans le poumon de l'hôte infecté, toujours sous forme extracellulaire. Au sein d'un individu atteint, la forme ascospore est la plus fréquemment retrouvée, représentant 90 à 95% des formes infestantes (25).

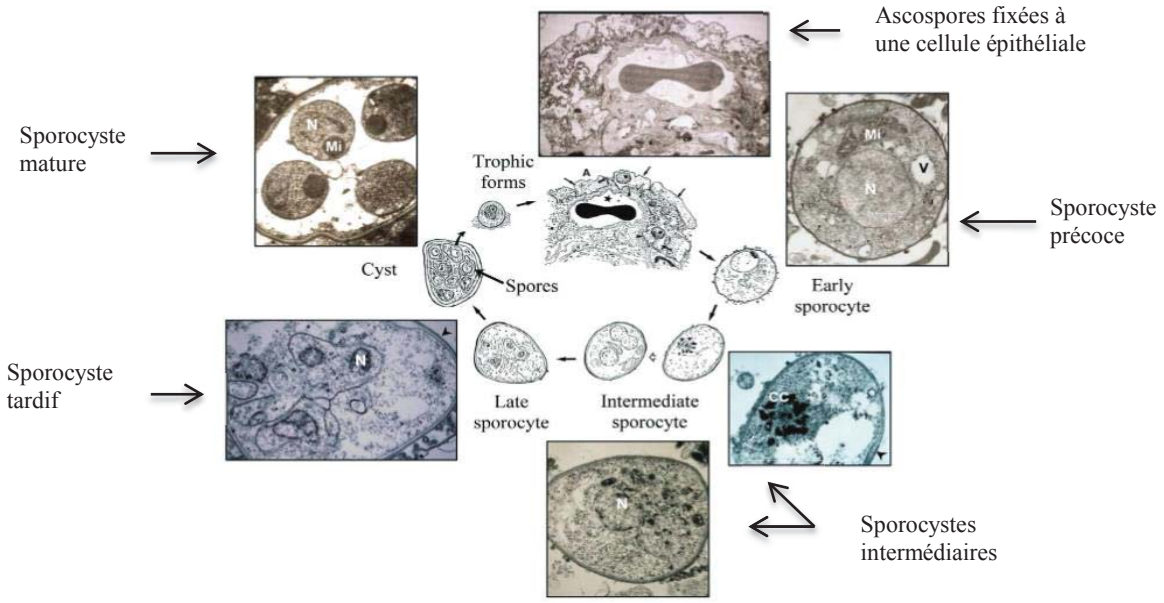


Figure 3 : Cycle putatif de *P. jirovecii* (d'après Aliouat-Denis, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2009).

N : noyau, Mi : mitochondrie, V : vacuole, Etoile : cellule épithéliale

Le cycle du champignon reste putatif. Cependant, les propositions convergent vers la coexistence d'un cycle sexué et d'un cycle asexué au sein des poumons de l'hôte infecté *(Figure 4)* : le cycle asexué consiste en une division binaire de la forme ascospore et le cycle asexué, sur le modèle des ascomycètes, comprend la fusion de deux ascospores et aboutit au développement de l'asque, qui libèrera par la suite huit ascospores (5,26).

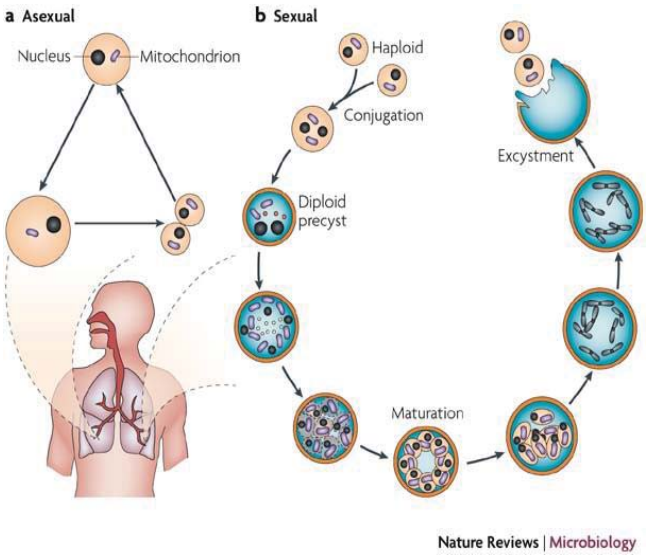


Figure 4: Cycle putatif de P. jirovecii (d'après Thomas et Limper, Nat. Rev. Microbiol, 2007).

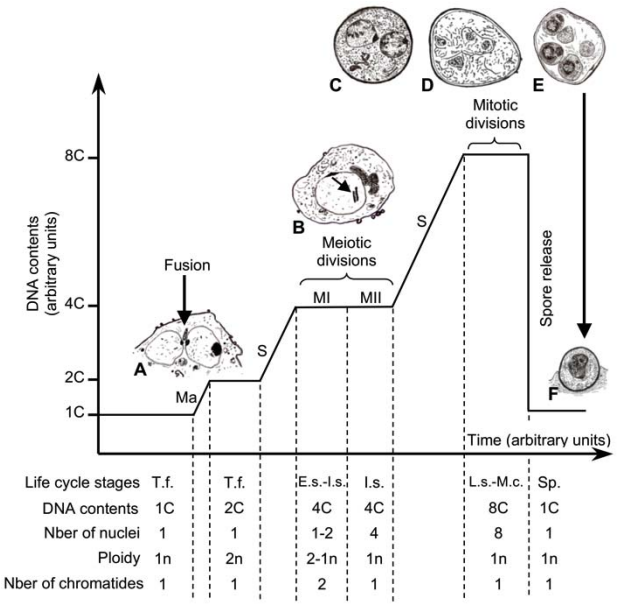


Figure 5: Ploïdie de *P. jirovecii* (d'après Aliouat-Denis, Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009).

D'après ce cycle putatif, *P. jirovecii* serait donc un champignon principalement haploïde, avec une forme de sporocyste précoce diploïde (apparaissant au moment de la caryogamie dans le cycle sexué).

1.1.4 Le génome de *P. jirovecii*

P. jirovecii est un eucaryote : il possède un noyau clairement délimité au sein de la cellule, contenant le génome nucléaire du champignon. Ce génome serait composé de 7 à 8 Mb réparties sur au minimum 13 chromosomes. Il pourrait contenir autour de 3900 gènes (27). Il contient également du matériel génétique extranucléaire : le génome mitochondrial. Ce génome est circulaire et composé de 33 à 35 kb. Il aurait un unique cadre de lecture avec 14 gènes codant pour des protéines, 2 gènes ARNr et 12 à 25 gènes ARNt.

Jusqu'à récemment, seules quelques dizaines de gènes étaient caractérisés, grâce à leurs homologies de séquences avec d'autres microorganismes (28,29).

Parmi ceux-ci, certains sont d'origine mitochondriale :

- *CYTB* codant pour le cytochrome b (cible de l'atovaquone)
- *mtLSU-rRNA* (ou *MIT26S*) codant pour la grande sous-unité de l'ARN ribosomal et cible majeure du diagnostic moléculaire.
- *mtSSU-rRNA* codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal

D'autres sont d'origine nucléaire :

- *SOD* codant pour la superoxyde dismutase
- *ITS* codant pour l'Internal Transcribed Spacer
- *DHPS* codant pour la dihydroptéorate synthase (cible entre autres du cotrimoxazole)
- *DHFR* codant pour la dihydrofolate réductase (également la cible du cotrimoxazole)
- *MSG* codant pour la major surface glycoprotéine (gène multicopie)

L'absence de système de culture efficace a longtemps été un frein au séquençage du génome complet de *P. jirovecii*. En 2013, grâce aux techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) et aux nouvelles possibilités bioinformatiques (possibilité de soustraire les séquences du génome humain), **le génome complet de *P. jirovecii* est publié en 2012 par l'équipe de P.M. Hauser. Ce génome complet, obtenu à partir d'un unique lavage broncho alvéolaire de patient infecté, sert de nos jours de génome de référence pour la communauté scientifique** (30). **L'année suivante, l'équipe de L. Ma publie le séquençage complet de 4 génomes mitochondriaux de *P. jirovecii*, à partir de prélèvements respiratoires de 4 patients** (31).

La comparaison de ces 4 génomes mitochondriaux révèle une variabilité intra-espèce assez élevée (1 à 7%), avec une majorité de polymorphismes au niveau des régions non codantes, qui représentent 55% du génome mitochondrial (non soumises à la pression de sélection) (31).

En 2016, l'équipe de L. Ma publie un deuxième génome complet (nucléaire) de *P. jirovecii* et compare celui-ci au génome publié par P.M. Hauser en 2012. Les deux génomes présentent entre eux une variabilité de 0.3% (1 polymorphisme toutes les 337 bases), les polymorphismes étant surtout localisés au niveau subtélomérique (dont le gène *MSG*) (17) (*Figure 7*).

La comparaison des génomes nucléaires et mitochondriaux avec deux espèces murines montre une grande conservation des gènes, mais avec de nombreux réarrangements (17,31).

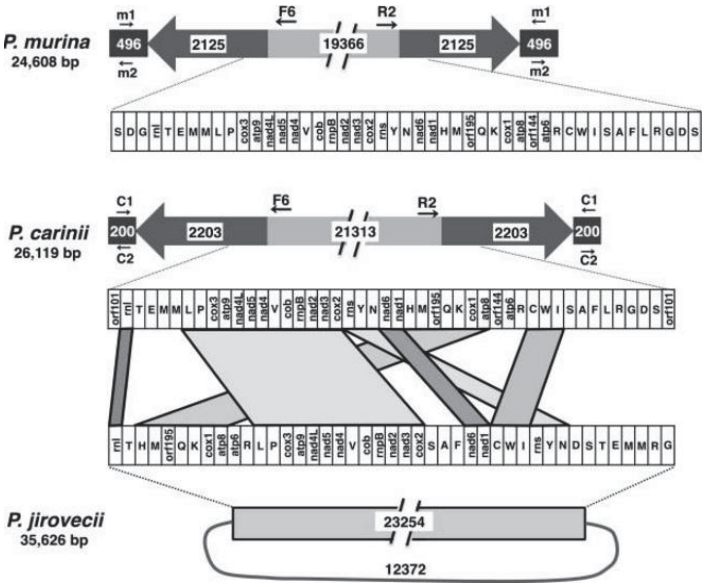


Figure 6 Génomes mitochondriaux de Pneumocystis, (d'apres MA et al, FASEB journal, 2013).

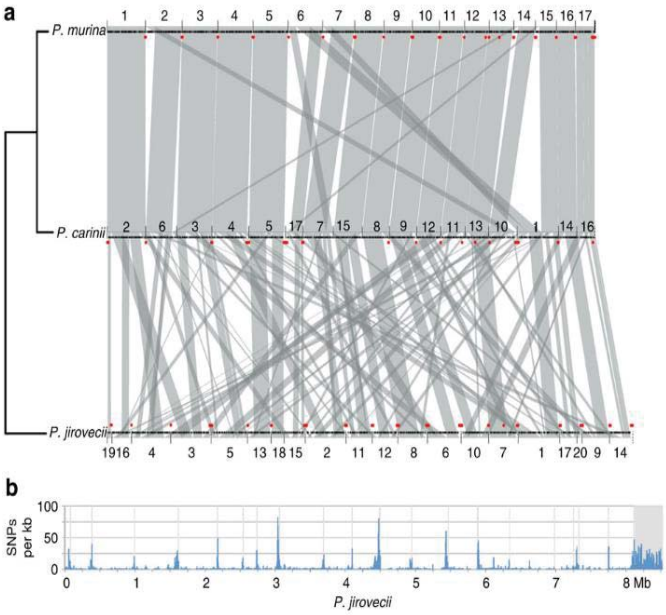


Figure 7: Génomes nucléaires de Pneumocystis (d'après Ma et al., Nature, 2016).

1.2. La pneumocystose pulmonaire

Ce n'est que 40 ans après sa première description, que la présence de *P. jirovecii* dans les prélèvements pulmonaires est associée à une pathologie pulmonaire. Les premiers cas de pneumocystose pulmonaire (PCP) sont décrits chez des enfants prématurés et des orphelins malnutris, par Varek et Jirovec, après la seconde guerre mondiale, en Europe de l'Est (32). Dans les années 80, la PCP devient une des infections opportunistes les plus fréquemment associées au syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA).

1.2.1. Epidémiologie de la PCP

La PCP est une maladie opportuniste cosmopolite. Elle atteint des patients qui présentent différents terrains à risque :

- SIDA ayant généralement un taux de lymphocytes CD4 inférieur à 200/mm3
- traitement immunosuppresseur suite à une transplantation d'organe solide
- cancers hématologiques de la lignée lymphoïde

- greffe de cellules souches hématopoïétiques
- déficits immunitaires héréditaires
- chimiothérapies myélotoxiques
- corticothérapie à forte dose (>0,5mg/kg/j) au long cours
- méthotrexate à haute dose (> 1 g/m2)
- pathologies inflammatoires traitées par biothérapie
- maladies auto-immunes

La PCP représente toujours la pathologie classant SIDA la plus fréquente (BEH 43-44, 2011). Malgré une nette diminution de l'incidence du VIH en France depuis la mise en place des trithérapies antirétrovirales, les patients infectés par le VIH constituent 40% des cas de PCP en France (1). Aujourd'hui, la PCP touche fréquemment les patients fragilisés d'onco-hématologie et les transplantés d'organes solides en post-greffe précoce et plus rarement tardive (19–21). La PCP est diagnostiquée de façon plus sporadique chez les patients souffrant de pathologies inflammatoires chroniques ou de maladies auto-immunes (33,34).

P. jirovecii colonise également les poumons de sujets sains. En fonction des études et des populations étudiées cette colonisation varie de 0 à 23% chez les adultes et de 3 à 32% chez les enfants (35). Ce chiffre pourrait être plus élevé chez des patients sensibles immunodéprimés, ou dans des populations plus exposées au quotidien, comme les personnels médicaux (36).

Des études sérologiques ont montré que l'immunité contre *P. jirovecii* se développe au cours des premières années de vie, témoignant de la fréquence de contact avec ce champignon au cours du temps (35,37).

1.2.2. Transmission et physiopathologie

- **La transmission**

Les mécanismes de transmission de *P. jirovecii* restent putatifs et sont extrapolés d'études sur modèles rongeurs. La voie de transmission est aéroportée : *P. jirovecii* pénètre dans l'organisme humain par les voies aériennes supérieures avant d'atteindre les alvéoles pulmonaires. De par leur petite taille, les spores aéroportées étaient pressenties comme agent de transmission du pathogène, mais de nouvelles études impliqueraient plutôt la forme kystique (38). Aujourd'hui, il existe des arguments en faveur d'une transmission de personne à personne (cas groupés), et des

arguments en faveur de réservoirs environnementaux (détection de *P. jirovecii* dans des prélèvements d'air et d'eaux stagnantes). Il n'est donc pas exclu que la transmission du champignon résulte de ces deux mécanismes (35,39,40).

Par ailleurs, les études génotypiques montrent qu'une infection ou une colonisation *de novo* est probable. La présence de « clusters » (cas groupés) présents de façon concomitante chez plusieurs patients, ainsi que des approches épidémiologiques à grande échelle, appuient cette hypothèse (35,41).

Enfin, il existe également une suspicion de transmission verticale, avec des cas de PCP chez les prématurés et du *P. jirovecii* retrouvé chez des fœtus animaux et humains (42,43).

- **La physiopathologie**

Une fois dans l'organisme, le champignon a un fort tropisme pour les poumons où les ascospores adhèrent aux cellules alvéolaires de type 1. La pathogénicité de *P. jirovecii* dépend alors de deux facteurs :

1- la croissance du champignon à la surface des alvéoles pulmonaires limite les échanges gazeux entre le lumen et les vaisseaux sanguins.

2- le syndrome inflammatoire localisé entraîné par une réponse immune inefficace et dérégulée est nocif pour le tissu alvéolaire et le tissu endothélial pulmonaire (44).

La défense de l'organisme repose essentiellement sur le rôle pivot des lymphocytes T CD4, mais aussi sur la réponse immune primaire avec le développement d'un foyer inflammatoire (5). Une réponse adaptée du système immunitaire est habituellement suffisante pour mettre fin à l'infection.

1.2.3. Clinique et imagerie

P. jirovecii est responsable classiquement d'une pneumopathie alvéolo-interstitielle bilatérale, chez les patients présentant une immunodépression sévère. Les symptômes sont alors une dyspnée fébrile hypoxémiante, une toux non productive et une fièvre modérée. Cependant, il existe des formes frustes, avec une fièvre isolée ou une altération de l'état général (44).

Des nuances sont à apporter selon le contexte clinique du patient. En effet, chez les patients

infectés par le VIH, les débuts de la maladie, et notamment de la dyspnée, sont progressifs sur quelques semaines, bien que la charge fungique pulmonaire soit très importante. Par ailleurs la mortalité de la PCP dans cette population est de 10 à 20%. Par opposition, les patients non infectés par le VIH présentent une PCP d'installation bien plus rapide, en quelques jours. La dyspnée est plus sévère et l'hypoxie plus importante. La mortalité est aussi plus élevée : comprise entre 30 et 60%. Paradoxalement la charge fongique détectée est plus faible. La sévérité de la maladie et la surmortalité dans cette population pourraient être liées à une réaction inflammatoire plus importante que chez les patients séropositifs pour le VIH (1).

Des formes extra-pulmonaires de diagnostic difficile ont également été rapportées chez des patients infectés par VIH, le plus souvent favorisées par les aérosols de pentamidine (pratique aujourd'hui limitée) (45).

La radiologie et le scanner thoracique montrent une pneumopathie interstitielle atypique avec des plages en verre dépoli bilatérales. Plus rarement, il peut y avoir des lésions nodulaires en verre dépoli, un pneumothorax ou un pneumo-médiastin (44).

1.2.4. Le diagnostic biologique

Le diagnostic biologique a toute son importance dans le cadre d'une PCP, dont les symptômes sont peu spécifiques, et la population concernée sujette à de multiples pathologies opportunistes. *P. jirovecii* n'étant pas cultivable, le diagnostic repose sur la microscopie et les techniques moléculaires d'amplification d'ADN.

- **Examen direct**

La recherche du parasite a longtemps été limitée à la détection par examen microscopique sur prélèvements respiratoires. Différentes colorations permettent de révéler la présence du champignon.

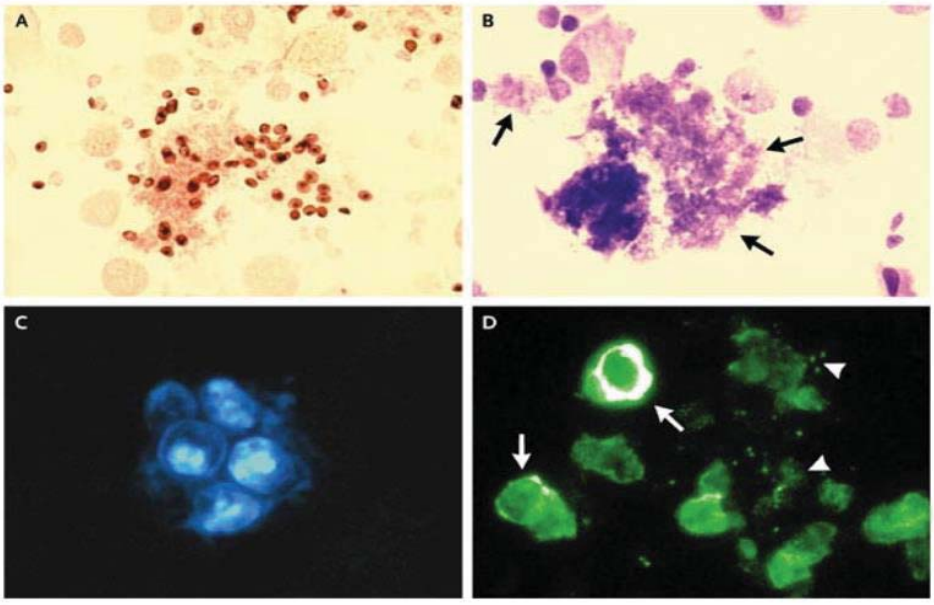


Figure 8: Colorations permettant la mise en évidence de *Pneumocystis* à l'examen direct (d'après Thomas et Limper, N Eng J Med, 2004).

A : coloration argentique, B : coloration de Giemsa, C : coloraton au calcoflorwhite, D : immunofluorescence ou coloration aux anticorps marqués

Les colorations argentiques (A), dérivées du Gomori Grocott, et le bleu de toluidine, colorent les asques de *Pneumocystis,* mais ne colorent pas les ascospores. En revanche, la coloration de Giemsa (B) et les techniques de fluorescence non spécifique (calcofluorwhite (C)) et spécifique (utilisant des anticorps marqués (D)) mettent en évidence les deux formes.

L'examen microscopique après coloration, présente une excellente spécificité (99 -100%), mais une sensibilité variable, allant de 30% à plus de 90% en fonction du type de coloration et du type de prélèvement (46,47).

Pneumocytis jirovecii étant localisé préférentiellement au niveau alvéolaire, le prélèvement de référence est le lavage broncho-alvéolaire qui offre une plus grande sensibilité que des prélèvements plus superficiels comme la broncho-aspiration ou l'expectoration induite.

- **Techniques moléculaires**

Aujourd'hui, l'approche moléculaire est très utilisée dans les laboratoires pour augmenter la sensibilité diagnostique de la PCP (46). La recherche d'ADN de *P. jirovecii* par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet en effet de détecter des charges fongiques très faibles; ceci notamment grâce au ciblage de gènes multicopies (dont *MSG* et *MIT26S*) (48). Cependant, la sensibilité de détection de la PCR soulève le problème de la disctinction entre infection et

colonisation (35,47). L'établissement d'un seuil de pathogénicité (ou cut-off) pour aider à distinguer ces deux situations cliniques est donc nécessaire (49). Enfin, l'approche moléculaire possède une très bonne valeur prédictive négative.

- **Dosage de β(1-3)-D-glucanes**

Les β(1-3)-D-glucanes (BG) sont des polysaccharides présents dans la paroi des asques de *P. jirovecii* (absents dans les formes ascospores). Leur dosage sérique peut aider au diagnostic de la PCP, en particulier pour différencier colonisation et infection. La sensibilité de ce test est très bonne, mais sa spécificité est limitée car ces polysaccharides sont également présents chez d'autres microorganismes (50). La place du dosage des BG dans la démarche diagnostique reste discutée.

1.2.5. Traitement et Prophylaxie

Les recommandations de traitement et de prophylaxie pour la PCP sont détaillées dans la *figure 9.* A ce jour, le cotrimoxazole (Bactrim®) reste le médicament de référence pour le traitement et la prophylaxie de la PCP (5).

Agent	Therapeutic use	Prophylactic use	Primary molecular target	Evidence of resistance
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	First choice	First choice	DHPS/DHFR	DHPS mutations
Primaquine/Clindamycin	Second choice	Not used	Uncertain/ protein synthesis inhibition	None documented
Pentamidine	Alternative choice	Aerosolized; rarely used	DNA synthesis	Clinical resistance suspected
Atovaquone	Alternative choice* (mild–moderate infection)	Alternative choice	Cytochrome *b* complex	Mutations of co-enzyme Q binding site
Dapsone/Trimethoprim	Alternative choice‡	Dapsone alone or Dapsone with Pyrimethamine and Leucovorin	DHPS/DHFR	DHPS mutations
Corticosteroids (adjunctive)	For moderate–severe disease (given in addition to antifungals)	Not used; can induce PCP	$CD8^+$ T cells and many other inflammatory cells and processes	None documented
Trimetrexate plus Leucovorin	Salvage therapy	Not used	DHFR	None documented
Caspofungin	Animal and anecdotal human data only	Not used	GSC1	None documented

*Administer with high-fat meals to maximize absorption.

‡Must be certain patient does not have glucose-6 phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency as haemolysis can occur with G6PD deficiency. DHFR, dihydrofolate reductase; DHPS, dihydropteroate synthase; GSC1, glucan synthetase; PCP, *Pneumocystis* pneumonia.

Figure 9: Recommandations pour le traitement et la prophylaxie de *P. jirovecii* (d'après Thomas et Limper, Nature Rev Microbiol, 2007).

- **Traitement de première ligne : Cotrimoxazole**

Le cotrimoxazole (Bactrim®, Bactrim Forte®) est une association d'un sulfamide, le sulfaméthoxazole, et d'une diaminopyrimidine, le triméthoprime, dans la proportion relative 5/1. Il possède une activité antibactérienne et antiparasitaire grâce à l'action combinée et synergique des deux molécules sur le métabolisme de l'acide folique.

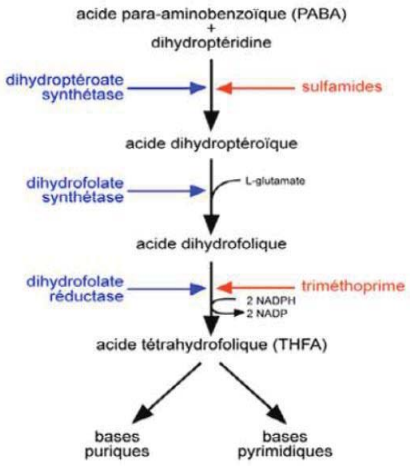


Figure 10: Cibles du cotrimoxazole.

Il s'agit du traitement de première intention de la PCP, à mettre en place dès la suspicion de la pathologie par voie IV ou orale, selon la sévérité de la clinique (51). **Il est le traitement le plus efficace et aboutit à une amélioration clinique et radiologique en 4 à 5 jours.**

Ce médicament présente néanmoins une toxicité importante (rénale, hématopoïétique et neurologique), et la prise de sulfamide engendre fréquemment des réactions d'hypersensibilité cutanées le plus souvent sans gravité, mais pouvant être sévère de type Syndrome de DRESS.

Par ailleurs, de rares résistances cliniques ont été décrites, mais l'association de ces résistances à une mutation des gènes cibles DHPS ou DHFR, reste discutée (52,53). En cas de forte intolérance ou de résistance, le patient pourra recevoir un traitement de seconde ligne.

Pour les patients adultes présentant une hypoxie sévère, l'adjonction d'une corticothérapie peut être bénéfique (5,54). Les arguments ne sont en revanche pas aussi nets pour les enfants.

- **Traitements de seconde ligne**

Les médicaments de seconde ligne sont principalement des composés antiparasitaires. Ils sont moins efficaces que le cotrimoxazole, surtout pour les PCP sévères. Leurs indications sont résumées dans la *figure 9*.

Des études récentes montrent que les échinocandines, inhibiteurs de la synthèse des BG, permettent une amélioration des symptômes cliniques (55). Ces inhibiteurs ne sont donc actifs que sur l'asque, et une association avec le Bactrim® reste nécessaire. Des nouveaux schémas

thérapeutiques associant le cotrimoxazole (à moindre dose) et la caspofungine ont récemment été proposés (55).

Concernant les composés antifongiques ciblant l'ergostérol (azolés et amphotéricine B), ils sont inefficaces, l'ergosterol étant très peu présent dans la paroi de *P. jirovecii.*

- **Prophylaxie**

Les mêmes molécules que précédemment décrites sont utilisées en prophylaxie, avec des variations de posologie. Le cotrimoxazole reste le composé de première intention. Pour les patients HIV, la prophylaxie est recommandée lorsque le taux de lymphocytes T CD4 est inférieur à 200/ mm3. Pour les patients séronégatifs, les schémas prophylactiques varient selon les centres mais sont généralement instaurés dans les 3 mois à 1 an après une transplantation d'organe, notamment pour les greffés rénaux (56,57).

La prophylaxie secondaire est recommandée après un épisode de PCP et doit être maintenue tant que le patient reste immunodéprimé.

2. Epidémies de *Pneumocystis jirovecii*

Une épidémie correspond à la survenue en excès, par rapport à la situation habituelle, d'une maladie donnée en un lieu et une période de temps donnés (58).

Un cluster, ou agrégat spatio-temporel, est défini par l'InVS comme un « *regroupement dans le temps et l'espace de cas de maladies, de symptômes ou d'événements de santé au sein d'une population localisée* » (InVS, 2005 : 5). Cette terminologie ne prend pas en compte le nombre de cas habituels pour un temps et une région donnés. Par ailleurs, le terme épidémie implique une suspicion importante de lien entre les cas ou d'une origine commune. (Investigating an outbreak, https://www.uic.edu/sph/prepare/courses/ph490/resources/epilesson06.pdf, consulté le 02/06/16).

Le terme « cas groupés » désigne généralement un cluster rassemblant peu de patients.

2.1. Description des épidémies de PCP

Rapidement après sa description en tant que pathologie clinique, des cas groupés de PCP sont rapportés dans des orphelinats et des services d'onco-hématologie. Dans les années 80, des épidémies de PCP chez des patients homosexuels masculins ou chez des patients toxicomanes orientent les médecins vers la découverte du VIH (49–51). Des cas groupés dans les services d'hématologie ou chez des patients transplantés d'organes solides (principalement en Europe, en Australie et au Japon) sont également rapportés dans le même temps (51–53).

Le développement de techniques de typages moléculaires des souches a permis dans les années 90 d'affirmer le caractère clonal des souches impliquées dans certaines de ces épidémies.

Les descriptions d'épidémies chez les patients TOS se sont multipliées ces dix dernières années. Elles sont généralement de taille modérée, de dix à trente patients (65,66) et le typage moléculaire retrouve très majoritairement un clone commun (*Tableau I*). Face à ce grand nombre d'épidémies, des mesures prophylactiques spécifiques ont été préconisées dans les secteurs concernés: isolement des patients avec une PCP, port de masque, prophylaxie post-transplantation

prolongée à 1 an (57,67).

Etonnamment, depuis les années 1980, il n'y a que peu de clusters décrits chez les patients atteints de SIDA ou les patients présentant une hémopathie maligne. Deux publications, datant de 1997 et 1998, ont étudié par génotypage des clusters de PCP chez des patients VIH et aucun clone commun n'a été décrit (y compris chez des couples vivant sous le même toit) (68,69). De la même façon, un unique cluster chez des patients d'hématologie a été étudié par génotypage, et ne révélait pas non plus de clone commun (68).

Plus récemment, des clusters chez des patients de rhumatologie traités par biothérapie ont été rapportés mais dans cette étude, aucun typage n'a été réalisé (70).

Le *tableau I* rassemble les différentes épidémies publiées incluant un typage des souches.

Publication	Cas index	Pays	Population	Nombre de cas	Génotypage	Clone commun	Co-infections
Helweg-Larsen, 1998 (68)	1995	Danemark	Hématologie HIV	8 6	Séquençage *ITS*	Non Non	50% (3/6) 17% (1/6)
Olsson *et al.*, 2001 (71)	1987/88	Suède	RTR	3 clusters 5-7-7	Séquençage *MIT26S*	Oui	41% (7/17)
Rabodonirina, 2004 (72)	1994	France	RTR	10	MLST (*ITS1-26S-MIT26S-β TUB*) PCR SSCP *DHPS*	Oui	38% (15/39) 13% plus de 2 souches (5/39)
Höcker *et a.l*, 2005 (73)	2002	Allemagne	RTR pédiatrie	3	PCR SSCP (*ITS1-26S-MIT26S-βTUB*)	Oui	100% (7/7) 30% plus de 2 souches (2/7)
De Boer, 2007 (74)	2005	Hollande	RTR	22	Séquençage *ITS1-ITS2*	Oui	/
Schmoldt *et al.* . 2008 (75)	2006	Allemagne	RTR	16	MLST (*ITS1-26S-MIT26S-βTUB*)	Oui	/
Yazaki *et al.*, 2009 (76)	2004	Japon	RTR	27	Séquençage *ITS1-2*	Oui	/
Gianella, 2010 (40)	2006	Suisse	RTR	20	MLST (*ITS1-26S-MIT26S-βTUB*)	Oui	/
Wynckel *et al.*, 2011 (77)	2008	France	RTR	17	Séquençage *ITS*	Oui	/
Thomas *et al.*, 2011 (78)	2008 2009	Angleterre	RTR RTR	21 11	MLST (*ITS* et *MIT26S*)	Oui Oui	/
Phipps, 2011 (57)	2010	Australie	RTR	14	MLST (*βTUB-DHPS-MIT26S-ITS1*)	Oui	/
Le Gal *et al.*, 2012 (79)	2008	France	RTR	18	RFLP *DHPS* et séquençage *ITS1-ITS2*	Oui	28,6% greffés (4/14) 40% contrôle (6/15)
Sassi *et al.*, 2012 (80)	2006	Allemagne-Suisse	RTR	21	RFLP *MSG*, TR de l'intron du gène *MSG*	Oui	/
Rostved *et al.*, 2013 (81)	2007	Danemark	RTR et LTR	29	RFLP *MSG* et MLST (*ITS1-ITS2- 26s*)	Oui	/
Nankivell *et al.*, 2013 (82)	2010	Australie (23 hôpitaux)	RTR,LTR,RLTR,RPTR	97	MLST (*βTUB-DHPS-MIT26S-ITS1/2*)	Oui	/
Desoubeaux, 2016 (83)	2013	France	LTR	4	MLST (*SOD-MIT26S-CYTB*)	Oui	/
Urabe *et al.*, 2016 (84)	2011	Japon	RTR	5	MLST (*ITS1-26S-MIT26S-βTUB*)	Oui	36% (9/25) avec patients contrôle
Mulpuru *et al.*, 2016 (85)	2011	Canada	RTR	10	Séquençage *ITS*	Oui	37% (6/16) avec patients contrôle

Tableau I : Clusters de PCP décrits incluant un génotypage des souches.

RTR : Transplanté Rénal, LTR : Transplanté hépatique, RLTR : Transplanté rénal et hépatique, RPTR : Transplanté rénal et pancréatique

2.2. Techniques de typage appliquées à l'étude des souches de *P. jirovecii*

Le typage de souches est nécessaire pour affirmer la nature clonale de l'agent infectieux impliqué dans une épidémie. La description d'un clone unique apporte un élément de preuve en faveur d'une source commune de la pathologie (transmission personne à personne ou origine environnementale) et permet de mieux définir les cas qui constituent l'épidémie, en excluant du circuit de transmission les patients ne présentant pas le clone épidémique (58).

Comme *P. jirovecii* est non cultivable, il a fallu attendre le développement de techniques moléculaires pour permettre l'étude génotypique des souches. Le *tableau II* résume les différentes techniques de typage appliquées à *P. jirovecii*, et leurs caractéristiques.

Un des paramètres importants de caractérisation est l'index de discrimination (fréquemment calculé par l'index de Hunter ou D). Cet index évalue la capacité d'une technique à distinguer deux souches aléatoires (86). Un index seuil de 0.95 (correspondant à 95% de chances de séparer 2 isolats non reliés)est considéré comme acceptable pour la discrimination d'isolats (87).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} x_j(x_j - 1)$$

Figure 11: Formule de Simpson, permettant le calcul de l'index de Hunter (d'après Hunter, et Gaston, 1988).

Avec D : index de Hunter, N : nombre d'isolats, s : le nombre de type différents,
x_j : le nombre de souches appartenant au type j

2.2.1. PCR-SSCP : PCR Single Strand Conformation Polymorphism

La PCR-SSCP est une méthode de typage décrite au début des années 1990, adaptée et très utilisée par P.M. Hauser et son équipe à partir de 1997 pour les études épidémiologiques de *P. jirovecii* (88).

Ce typage est basé sur la modification de conformation d'un monobrin d'ADN selon sa séquence primaire. Ainsi, après une étape d'amplification spécifique du locus cible, une dénaturation puis un refroidissement rapide permettent d'obtenir l'ADN amplifié à l'état de simple

brin. La migration en gel de polyacrylamide de ces monobrins permet de visualiser les polymorphismes, grâce aux différents repliements du brin spécifiques à la séquence génomique. La PCR-SSCP permet de détecter des variations mineures de séquence d'ADN, jusqu'au SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Afin d'augmenter le pouvoir de discrimination de la technique, P.M. Hauser a proposé l'étude de quatre loci du génome de *P. jirovecii* (*ITS1*, *26SrRNA*, *MIT26S*, *βTUB*).

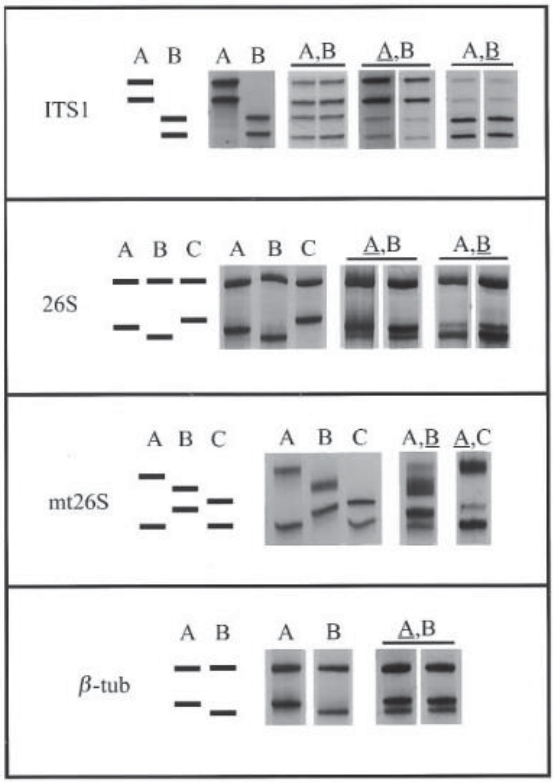


Figure 12: Typage par PCR-SSCP (d'après Nahimana et al., J Med Microbiol, 2000).

La PCR-SSCP est une méthode de typage présentant un bon pouvoir discriminant, l'index de Hunter ayant été évalué à 0,93 par l'équipe de P.M. Hauser (89). Elle permet également de mettre en évidence les co-infections à *Pneumocystis jirovecii*, à partir des profils électrophorétiques "complexes" présentant plus de deux bandes. La détection d'une souche minoritaire est alors possible si elle représente plus de 11% du matériel génétique global de l'échantillon (90). Cependant les échantillons comprenant plus de deux souches ne sont pas analysables (profils trop complexes).

Cette technique, peu coûteuse et rapide, permet l'étude d'un grand nombre de souches. Toutefois, son interprétation est parfois délicate, en particulier en cas de profil complexes, et chaque nouveau profil observé doit être secondairement vérifié par séquençage. De plus, elle ne détecte pas tous les polymorphismes.

2.2.2. PCR-RFLP : Etude des polymorphismes de longueur des fragments de restriction après amplification:

Une région d'ADN est amplifiée par PCR puis incubée en présence d'enzymes de restriction qui fragmentent l'ADN. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose: on obtient un profil de restriction (pattern). Une mutation au niveau d'un site de restriction entraînera une variation du nombre et/ou de la longueur des fragments de restriction. Il est possible également de réaliser un Southern Blot après l'étape de migration électrophorétique. Des sondes spécifiques s'hybrident ainsi sur les zones d'intérêt, facilitant l'analyse.

- **PCR-RFLP du gène *DHPS***

La PCR-RFLP a d'abord été adaptée au gène *DHPS* codant pour la dihydroptéorate synthase au début des années 2000 (91,92). Cette méthode de typage offre une variabilité faible, la digestion par les enzymes de restriction Acc 1 et Hae III ne faisant apparaître que quatre génotypes différents. Elle est par conséquent généralement couplée au séquençage d'un locus ou à une analyse basée sur le séquençage de plusieurs loci (Multi-Locus-Sequence-Typing - MLST).

Néanmoins, cette méthode est encore utilisée dans des études récentes (93), car elle permet d'étudier la résistance aux dérivés sulfamides tels que le Bactrim® pour un coût et un temps d'analyse modérés.

- **PCR-RFLP du gène *MSG***

En 2008, la PCR-RFLP a été réalisée sur l'ADN codant pour la protéine majeure de surface (MSG) (94). Cette glycoprotéine, présente à la surface du champignon, est codée par de multiples copies de gènes de 1300 kb chacune (50-100 copies par génome), regroupées au niveau des télomères de chaque chromosome. La digestion par les enzymes de restriction DraI et Hpy1881 a révélé une discrimination bien plus intéressante que celle du gène *DHPS* avec de nombreux profils électrophorétiques (80,95).

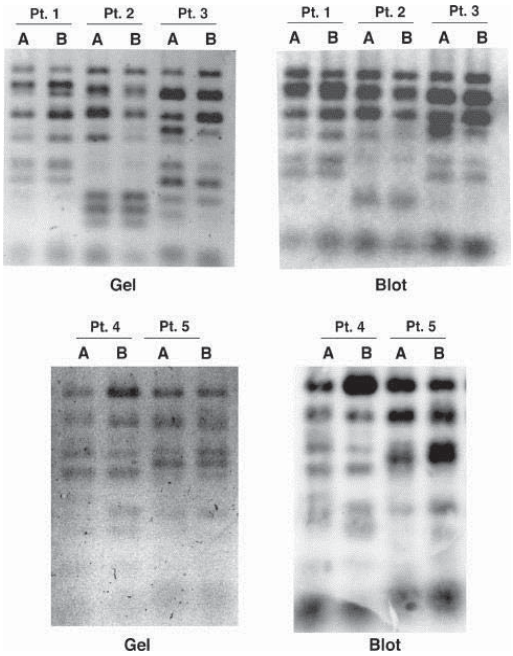


Figure 13: Typage par PCR-RFLP *MSG* (d'après Rostved *et al*., Transplantation, 2013).

Cette méthode de typage possède ainsi un fort pouvoir de discrimination. C'est une technique relativement rapide et peu coûteuse, permettant l'étude simultanée d'un grand nombre d'échantillons.

Cependant, l'analyse des résultats est parfois difficile et la reproductibilité inter-laboratoire complexe, malgré l'utilisation de kit d'électrophorèse définis. Une quantité importante d'ADN est également nécessaire et limite l'analyse de certains prélèvements présentant une charge fongique faible. De plus, l'analyse d'échantillons présentant plusieurs génotypes est limitée du fait de la complexité des patterns. Enfin, *P. jirovecii* modifie régulièrement ces protéines de surface MSG, très immunogènes, afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Des modifications de profils pourraient alors être interprétées à tort comme des co-infections (96).

2.2.3. Analyse des microsatellites

- **Etude des variations des microsatellites de l'intron du gène *MSG***

Une séquence microsatellite (ou microsatellite), appelée également short tandem repeat, est une séquence formée par la répétition continue d'un motif de 2 à 10 nucléotides. Une séquence microsatellite a été mise en évidence dans l'unique intron de la région promotrice du gène *MSG*. Ce microsatellite est composé de 10 nucléotides répétés de 2 à 6 fois, avec une prédominance de 2, 3 et 6 copies. D'autre part, trois SNP ont été décrits au sein de cette séquence microsatellite. Le

nombre de répétition, combiné aux différents SNP engendrent ainsi un nombre important de génotypes possibles.

Par exemple, dans la figure ci-dessous, publiée par Ma *et al.* en 2002, on distingue cinq génotypes différents: 1-2 (ligne 2), 1-2-3 (lignes 3a à 3f), 1-2-3-3 (lignes 4a à 4b), 1-2-2-3 (ligne 4c), 1-1-2-3-3 (ligne 5), 1-1-1-1-2-3 (ligne 6).

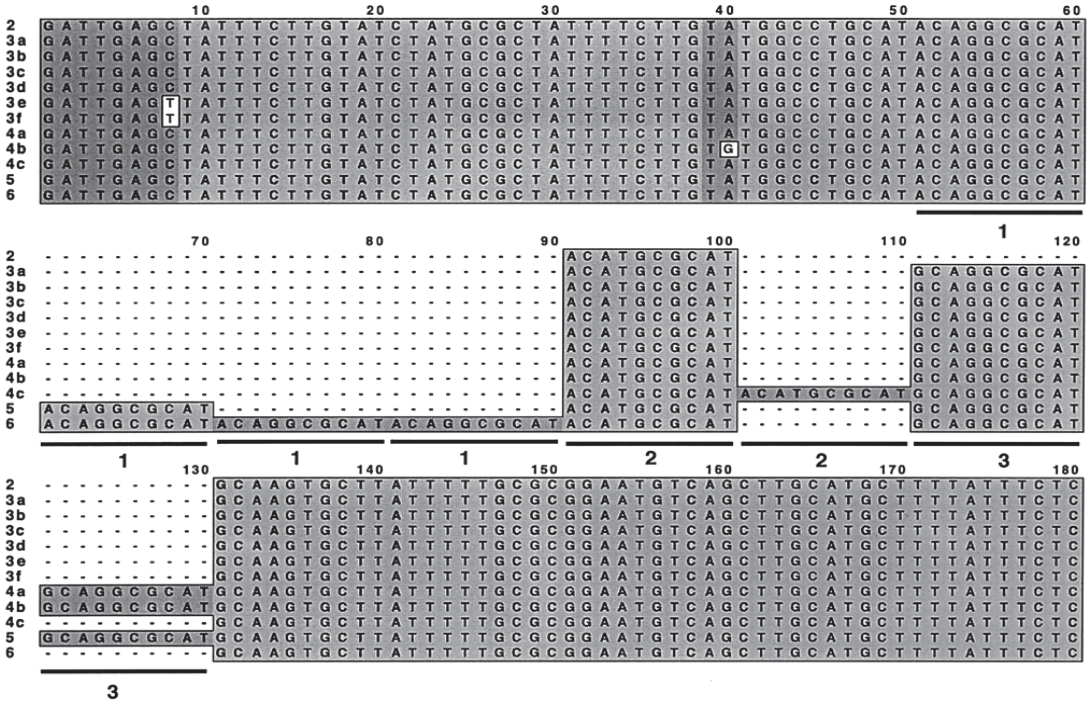


Figure 14 : Typage par étude du microsatellite de la région UCS (d'après Ma et al., J Infect Dis, 2002).

Pour l'analyse des tandems repeats du gène *MSG*, un séquençage peut être réalisé et permet d'étudier le nombre et le type de succession de tandem repeats. Il est également possible de faire migrer les produits de PCR sur gel dénaturant, mais cette technique est moins discriminante car elle ne met en évidence que le nombre de répétitions du microsatellite (97).

- **Etude de short tandem repeats**

La publication du génome complet de *Pneumocystis jirovecii* en 2012 (30) a révélé la présence d'autres microsatellites. Deux équipes différentes ont ainsi développé des outils de typage basés sur l'étude de six microsatellites de motifs plus courts (di ou trinucléotides) autrement appelés « short tandem repeats ». Le pouvoir discriminant de ces microsatellites, pris un à un, est plus faible, car la variation est ici uniquement quantitative. C'est pourquoi il est nécessaire d'associer plusieurs short tandem repeats pour atteindre un pouvoir discriminant intéressant.

Ces nouveaux outils de typage moléculaire semblent avoir un fort index H, autour de 0,99 selon les auteurs (98,99).

Le typage par étude de microsatellites est une méthode discriminante, reproductible et modérément coûteuse. Les co-infections peuvent être également détectées, y compris la présence de souches minoritaires inférieures à 10% (99). Malgré ces avantages incontestables, cette technique ne permet pas encore aujourd'hui facilement l'échange ou la comparaison de données et la stabilité dans le temps de ces polymorphismes n'est pas assurée.

2.2.4. Séquençage de loci et typage MLST

- **Séquençage de loci : Analyse des SNP**

Au début des années 2000, des fragments de gènes identifiés, tels que les gènes *ITS1-2* ou *MIT26s*, sont amplifiés et séquencés par méthode classique de Sanger. Des polymorphismes de séquences entre différentes souches sont décrits. Ces polymorphismes correspondent principalement à une substitution, délétion ou duplication d'un unique nucléotide (SNP). L'ensemble de ces SNP permet de caractériser une souche et de distinguer partiellement les souches entre elles (69,71).

Cette approche étant basée sur l'étude d'un seul gène cible, elle est limitée par son pouvoir discriminant. **L'analyse simultanée des polymorphismes de plusieurs gènes cibles par la technique du multi-locus sequence typing (MLST) permet d'augmenter le pouvoir discriminant de la technique.**

Pour étudier ces SNP, il existe des alternatives plus rapides et moins coûteuses que le séquençage :

- L'Allele Specific Primer Polymerase Chain Reaction (ASP-PCR) est basée sur l'amplification spécifique de polymorphismes préalablement décrits. Esteves *et al*. ont ainsi développé une PCR multiplex comprenant plusieurs amorces spécifiques de différents SNP (100).
- Le Single Nucleotide Primer Extesion (SNuPE) a été également récemment utilisé pour le typage de *P. jirovecii*. Une amorce spécifique s'hybride en amont du polymorphisme cible et une ADN polymérase ajoute à cette amorce un unique ddNTP (analogue du dNTP qui bloque l'élongation). Chaque type de ddNTP (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) est marqué par un fluorophore différent. Ainsi, d'après le chromophore observé, on peut déduire le ddNTP ajouté au primer, et donc le nucléotide complémentaire présent sur la séquence étudiée (101).

- **Typage MLST**

La méthode de typage Multi Locus Sequence Typing (MLST), est dans beaucoup de domaines, la technique de référence pour discriminer différentes souches entre elles.

Le principe du typage MLST est d'amplifier, puis de séquencer plusieurs séquences choisies dans des gènes de ménage (house keeping genes) codant pour des protéines essentielles, qui présentent des polymorphismes stables dans le temps. Les séquences des gènes étudiés sont donc relativement conservées entre les souches, mais elles présentent néanmoins un nombre limité mais suffisant de SNP pour distinguer les souches entre elles. En pratique, après séquençage, les polymorphismes de chacun des gènes sont répertoriés pour chaque souche, décrivant ainsi le génotype. Les haplotypes d'une souche sont ensuite associés pour former un génotype qui est donc la combinaison des différents haplotypes. Enfin, les génotypes de chaque souche sont comparés.

Pour l'analyse MLST chez *P. jirovecii*, le nombre de gènes étudiés n'est pas clairement standardisé. Il dépend de la variabilité de séquence de chacun et de la puissance de discrimination désirée en fonction de la problématique. La première description de typage de *P. jirovecii* par méthode MLST date de 2004 avec l'étude de quatre loci (72).

Récemment une étude de Maitte *et al.* a comparé différentes associations de loci pour le typage MLST *de P. jirovecii*, en déterminant le pouvoir discriminant de chacun des schémas (87).

Molecular typing scheme	Discriminatory power according to our data (H-index)	No. of clinical samples used for determination of H-index[a]
ITS1, β-*TUB*, 26S, mt26S, *CYB*, *SOD*, *DHPS*, *DHFR*	0.996	23
ITS1, mt26S, *CYB*	0.996	23
SOD, mt26S, *CYB*	0.987	22
ITS1, 26S, mt26S, β-*TUB*	0.987[b]	22
ITS1, *CYB*	0.983	22
mt26S, *CYB*	0.957	23
ITS1, mt26S	0.948	22
ITS1	0.828	28
mt26S	0.751	29

[a]Only samples containing a single *P. jirovecii* genotype were included in the analysis.
[b]The discriminatory power of this method (when used as a PCR-SCCP) was 0.93.

Figure 15: Associations de loci pour le typage MLST (d'après Maitte *et al.*, J.Clin Microbiol, 2013).

On remarque ainsi que l'étude d'un locus isolé a un pouvoir discriminant limité avec un index de Hunter à 0,828 pour *ITS1* et à 0,751 pour *MIT26S*. Par ailleurs, l'association de sept loci, et l'association des trois loci *ITS1*, *MIT26S*et *CYTB* ont le même pouvoir discriminant de 0,996. Cette dernière paraît ainsi la plus intéressante avec le plus haut pouvoir discriminant pour uniquement 3 loci étudiés.

Cependant l'utilisation du gène *ITS1* pour les études de typage moléculaire a été récemment discutée de par sa grande variabilité et la démonstration de l'existence de recombinaisons *in vitro* (102). De plus, l'amplification de ce gène nucléaire est parfois difficile à obtenir.

En excluant *ITS1*, la meilleure combinaison pour le typage MLST est, d'après cette étude, l'association des trois loci *SOD*, *MIT26S* et *CYTB* (D = 0,987), recommandée récemment d'ailleurs par l'ECIL (http://www.kobe.fr/ecil/program2013.html).

Les points forts de cette technique MLST, outre son haut pouvoir discriminant, résident dans sa grande précision et sa très bonne reproductibilité inter-laboratoire offrant la possibilité de partage de données au niveau international sur des bases de données telles que FungalMLST (http://mlst.mycologylab.org/).

Malgré tout, le temps technique et le coût peuvent se révéler être assez importants pour l'étude d'un grand nombre d'échantillons. La détection de co-infections est également limitée, car la technique Sanger ne détecte que les souches majoritaires (> 20%).

En résumé, il n'existe pas de méthodes de typage idéales et différentes méthodes peuvent répondre à divers objectifs donnés. La méthode de référence reste à ce jour le MLST pour sa précision de détection des polymorphismes, son haut pouvoir discriminant et sa bonne reproductibilité inter laboratoire. Cependant il s'agit d'une méthode onéreuse et chronophage. À l'avenir, d'autres techniques pourront être préférées pour l'étude de grandes cohortes.

Méthode de typage	Date de description	Principe	Pouvoir discriminant	Reproductibilité	Détection de co-infection	Coût et Rapidité	Remarque
PCR SSCP	1997	Migration électrophorétique d'amplicons simple brin	Fort	Moyenne	Oui (>11%) non analysable si plus de 2 souches	▪ rapide, peu coûteuse ▪ analyse simultanée de nombreux prélèvements	▪ Mise en place de la technique compliquée ▪ Reproductibilité moyenne limitant le partage de données interlaboratoire
PCR-RFLP *DHPS*	2003	Migration électrophorétique des fragments de restriction du gène *DHPS*	Faible	Bonne	Oui (seuil inconnu)	▪ relativement rapide et peu coûteuse ▪ Etude parallèle de plusieurs échantillons	▪ Détection de potentiels mutants résitants au Bactrim ®
PCR-RFLP *MSG*	2008	Migration électrophorétique des fragments de restriction du gène *MSG*	Fort	Bonne	Non analysable	▪ relativement rapide et peu coûteuse ▪ Etude parallèle de plusieurs échantillons	▪ Possible évolution de *MSG* au sein de l'hôte
Microsatellite intron *MSG*	2002	Séquençage ou migration électrophorétique de l'intron dans la region promotrice du gène *MSG*	Fort (avec le séquençage)	Très bonne	Oui (seuil inconnu)	▪ relativement rapide et peu coûteuse	▪ Avec le séquençage, difficulté d'analyse de co-infections
Short Tandem Repeats	2014	Migration électrophorétique d'amplicons contenant des microsatellites	Fort	Très bonne	Oui (<10%)	▪ relativement rapide et peu coûteuse	▪ Etude de régions non codantes moins stables
Séquençage *ITS* ou *MIT26S*	1998	Séquençage Sanger d'un gène	modéré	Excellente	Oui (>20%) non analysable si plus de 2 souches	▪ relativement longue et coûteuse pour de grands échantillons	▪ Bases de données internationales disponibles ▪ Grande variabilité d'ITS, mais recombinaison possible
MLST	2004	Séquençage Sanger de plusieurs loci	Fort	Excellente	Oui (>20%) non analysable si plus de 2 souches	▪ relativement longue et coûteuse pour de grands échantillons	▪ Gold standard ▪ Bases de données internationales disponibles

Tableau II: Les différentes techniques de typage moléculaire de *P. jirovecii*.

2.3. Infections mixtes à *P. jirovecii*

Au cours des dernières années, des co-infections à multiples souches d'un même pathogène ont été décrites chez plusieurs microorganismes. Elles concernent aussi bien des bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), des virus (virus *inflenza*, VHB, VHC, HIV-1), que des champignons (*Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*), ou des parasites (*Plasmodium sp*., *Trypanosoma sp.*). La proportion d'infections mixtes est en moyenne de 21,7%. Tout agent pathogène humain est potentiellement concerné par ces co-infections (103).

Le phénomène de co-infection à différentes souches de *P. jirovecii* a été décrit grâce à différentes techniques de typage, dans des études de diversité génétique ou des études de cas groupés (89,99,104). La détection de plusieurs allèles a en effet été rattachée à la présence de plusieurs souches, car les gènes étudiés sont généralement monocopies, et que le champignon est principalement haploïde. De plus, des échantillons contenant plus de 2 allèles sont fréquemment retrouvés (99).

En fonction des études, les proportions de ces infections mixtes varient de 15% à 75% des cas. (73,89,105). Ces différences peuvent être dues à plusieurs phénomènes non exclusifs:

- la différence de technique de typage employée et la puissance de celle-ci pour détecter de multiples souches
- le contexte clinique des patients et notamment l'origine de l'immunosuppression
- la localisation géographique
- la prise de prophylaxie contre *P. jirovecii*

Lors de l'autopsie de patients décédés de PCP, Helweg Larsen *et al.* ont isolé un nombre de souches dans le parenchyme pulmonaire supérieur au nombre de souches isolées à partir des prélèvements respiratoires correspondants. Ces différentes souches semblent également compartimentées à différents endroits du poumon (106).

Enfin, des études sur des modèles murins immunodéprimés suggèrent que, si différentes souches sont inoculées dans un délai court, une co-infection impliquant toutes ces souches se développe (107).

Sur un plan physiopathologique, les co-infections pourraient modifier l'efficacité du système immunitaire: submerger celui-ci par un grand nombre d'antigènes distincts, ou à l'inverse améliorer la réponse immunitaire par la présence d'une souche plus immunogène. Elles peuvent également interférer entre elles, par un mécanisme de compétition pour les nutriments, ou en coopérant pour lutter contre le système immunitaire, ou encore par échange de patrimoine génétique (phénomène limité pour les champignons).

En pratique, une souche minoritaire à l'instant T du prélèvement pourrait devenir majoritaire dans le temps, selon la pression de sélection antifongique ou la virulence des différentes souches en présence (99) .

3. séquencage nouvelle génération et application en épidémiologie

Le séquençage de l’ ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des bases (adénine, guanine, cytosine et thymine) pour un fragment d'ADN étudié.

3. 1. Le séquençage classique de Sanger

Depuis la fin des années 1970, la technique terminaire de chaîne développée par Friederick Sanger est considérée comme la technique de référence.

Elle repose sur l'utilisation de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués, analogue des désoxynucléotides dATP, dCTP, dTP et dGTP, qui bloquent l’élongation du brin par l’ADN polymerase. Ils sont mélangés aux dNTPs dans une proportion bien minoritaire, de façon à être statistiquement présents à chaque position du brin d’ADN. A la fin de la réaction, les brins de différentes tailles sont séparés par migration électrophorétique. Comme chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome différent, la séquence peut être reconstituée par la succession des différentes couleurs.

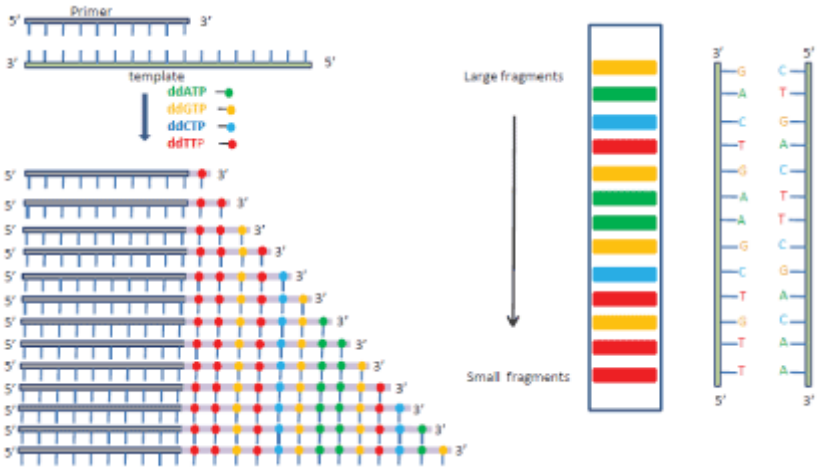


Figure 16: Principe du séquençage Sanger (d'après Y. Fei, application of molecular genetics in personalized medicine, 2013).

3. 2. Le séquençage nouvelle génération

3.2.1. Séquençage 2ème génération

Trente ans après la description de la technique de Sanger, le séquençage deuxième génération est developpé. Ce séquençage "haut débit" est beaucoup plus puissant que le séquençage Sanger, grâce à une miniaturisation de procédés. Celle-ci permet la simultanéité des réactions de séquençage, et ainsi l'analyse concomitante de centaines de milliers de séquences. Elle repose ainsi sur l'amplification clonale (amplification de chaque brin d'ADN en parallèle dans des milieux réactionnels séparés) et sur le séquençage simultané de très petites surfaces, analysées distinctement par un puissant capteur d'image (type caméra).

L'industrie du séquençage a alors vu le développement de plusieurs automates, avec différentes méthodes d'amplification clonale (PCR en émulsion ou Bridge PCR), et différentes méthodes de séquençage (pyroséquençage, ligation). La *figure 17* résume les caractéristiques des principaux séquençeurs de paillasse de 2ème génération.

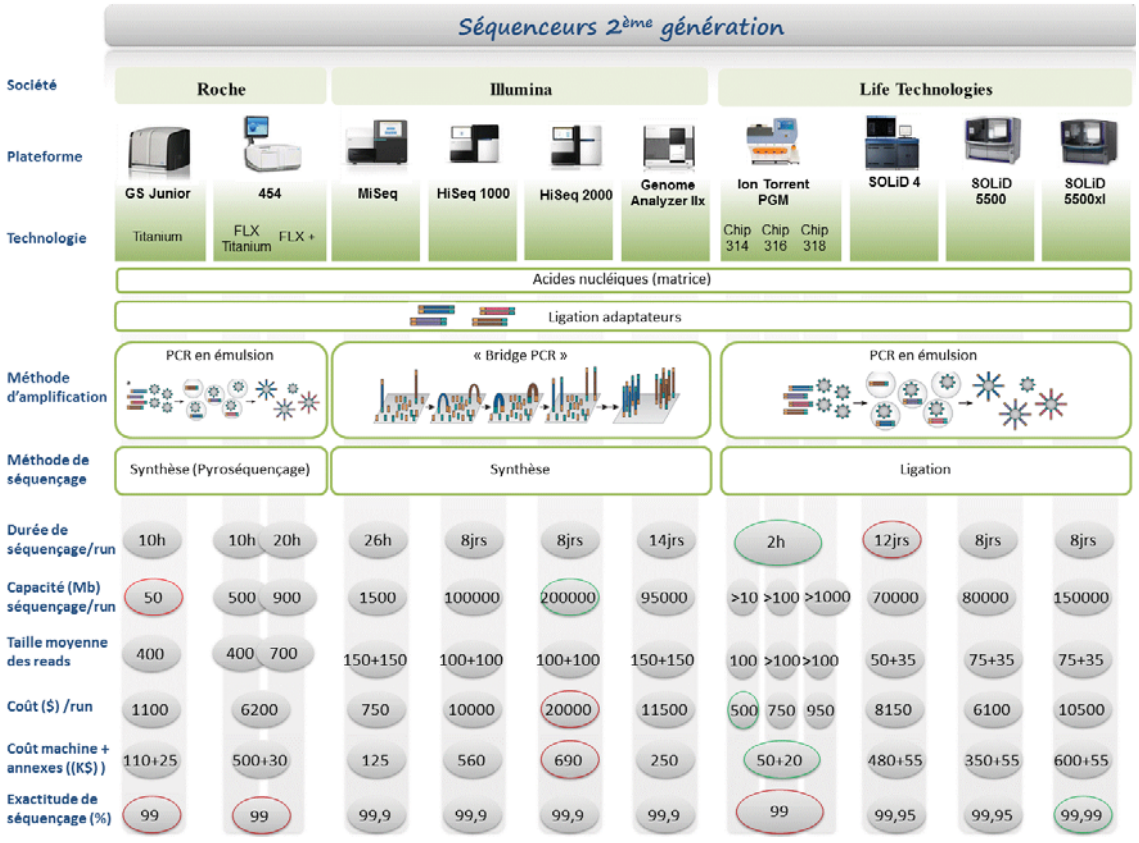


Figure 17: Automates de paillasse pour le séquençage deuxième génération (http://www.biorigami.com/?p=1133, consulté le 20/05/2016).

3.2.2. La technologie 454 Roche : Un brin = une bille = une séquence

La technologie 454 a été développée par 454 Life Sciences, filiale de Roche Diagnostics spécialisée dans le séquençage haut débit. Elle repose sur une amplification par PCR en émulsion, suivie d'un pyroséquençage sur des billes de capture. Cette technologie ayant été utilisée dans notre étude, nous en détaillons ci-après les principes.

Elle est constituée de quatre étapes successives : la préparation de la librairie, l'amplification clonale, le pyroséquençage et enfin l'analyse bioinformatique.

- Préparation de la librairie

Deux critères sont à respecter pour le séquençage : d'abord, obtenir les amplicons de bonne qualité des loci choisis, puis ajouter sur ces amplicons des séquences clés nécessaires au séquençage 454. Ces étapes peuvent être réalisées en une seule ou en deux réactions de PCR. Les éléments clés à rajouter sont les suivants :

- une séquence A ou B : séquence complémentaire des brins recouvrant les billes de capture. Elle permet ainsi la fixation à la bille de capture.
- Une séquence clé : séquence reconnue lors du pyroséquençage, afin d'initier le séquençage.
- Une séquence Multiplex Identifier (MID ou identifiant) : cette séquence d'une dizaine de nucléotide prédéfinis est reliée à une souche ou à un échantillon et permet le multiplexage de tous les échantillons au sein d'une même réaction de séquençage.



Figure 18: séquences "clés" à ajouter lors de la préparation de la librairie (Roche diagnostics).

- Amplification clonale :

Pour la technologie 454, elle repose sur la réalisation d'une PCR en émulsion (eau dans huile). Chaque brin d'ADN à séquencer, est relié à une bille de capture. Au sein de l'émulsion, ces billes se retrouvent dans une gouttelette qui constitue le milieu réactionnel d'amplification.

En théorie, chaque fragment d'ADN du pool, est ainsi amplifié isolément dans une gouttelette de l'émulsion. Après amplification, les billes sont distribuées dans des micropuits constituant la Picotiterplate (PTP), de telle façon qu'une unique bille puisse se loger dans un seul micropuits.

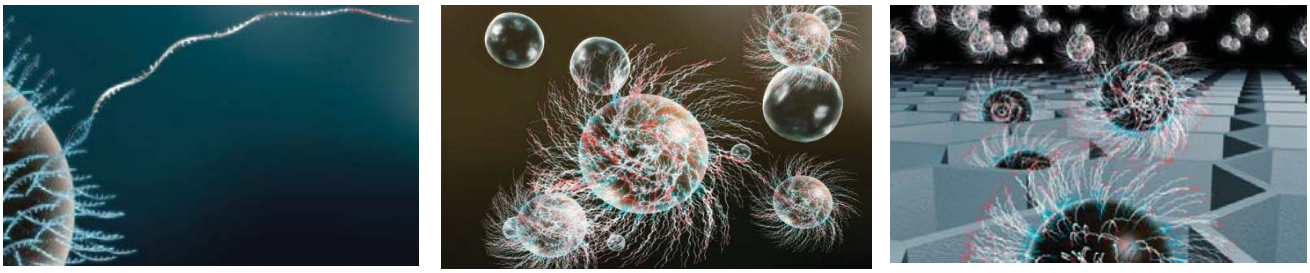


Figure 19: Amplification clonale par la technologie 454 de Roche (Roche Diagnostics).

- Le pyroséquençage :

Il s'agit, comme pour le séquençage Sanger, d'un "séquençage de synthèse". Mais contrairement à la technique classique, les nucléotides sont injectés les uns après les autres. L'ADN polymérase incorpore, ou non, le nucléotide, par complémentarité avec le brin d'ADN à séquencer. Si un nucléotide est incorporé, il y a libération d'un groupement pyrophosphate. Celui-ci sera ajouté à un APS (Adénosine 5'Phosphosulfate) présent dans le milieu réactionnel, pour former de l'ATP. L'ATP pourra alors catalyser la réaction de transformation de la luciférine en oxyluciférine par la luciférase. La lumière émise lors de cette réaction sera captée par un capteur CCD (Charge coupled Device) et sera convertie en pic sur le pyrogramme. La lumière émise est proportionnelle au nombre d'ATP produits, donc au nombre de nucléotides incorporés. Ce cycle recommence à chaque injection de nucléotide.

Chacun des micropuits est analysé distinctement par le capteur CDD. **Ainsi, chacun des amplicons de la librairie est théoriquement séquencé isolément, chaque puits comprenant une unique bille ayant fixé, au départ, un unique brin.**

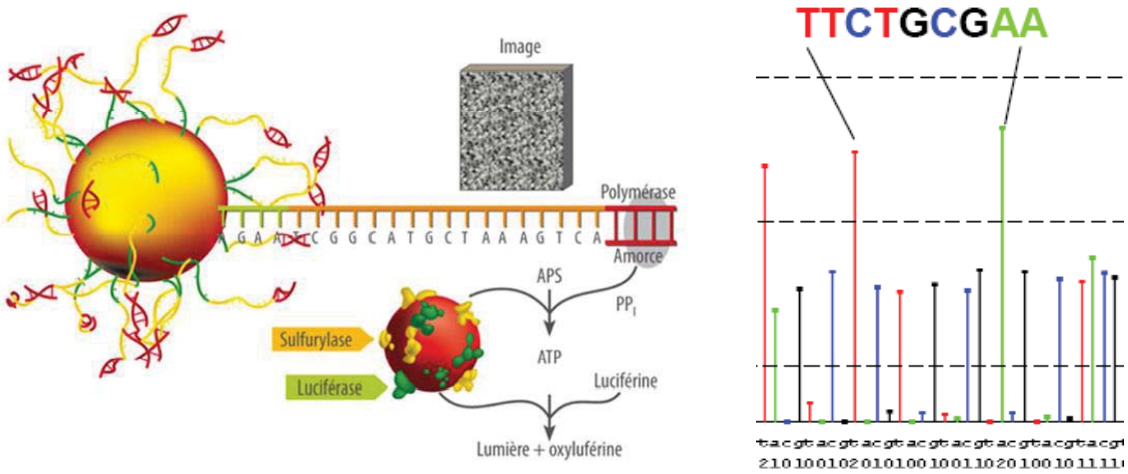


Figure 20: Principe du pyroséquençage (Roche diagnostics).

La dernière étape consiste enfin à analyser l'ensemble des séquences par informatique sur des logiciels spécialement dédiés, comme Amplicon Variant Analyzer ou GS Reference Mapper (logiciels Roche)

Les trousses développées par Roche Diagnostics et basées sur la technologie 454, permettent de séquencer des amplicons de taille modérée (400-500 paires de base) ou de plus grande taille (700-800 pb) avec le kit GS junior +. Actuellement la société Roche Diagnostics a décidé de mettre fin (kit GS+) ou d'arrêter progressivement la commercialisation de ces trousses, pour favoriser l'implantation de séquenceurs de troisième génération.

3.2.3. Séquenceurs de 3ème et 4ème génération : Next generation sequencing

Les séquenceurs de 3ème génération se distinguent des précédents par le séquençage d'une seule molécule d'ADN ("Single Molecule Sequencing"). L'étape d'amplification clonale préalable au séquençage est supprimée. Le séquençage est ainsi plus précis, et le risque de contamination réduit.

Quant au séquençage de 4ème génération, il est en cours de développement et correspond à un séquençage de courts fragments d'ARN *in situ,* directement au niveau des tissus.

3.3. Applications du séquençage nouvelle génération en épidémiologie

3.3.1 Séquençage génome entier par shotgun

La stratégie de séquençage globale (ou shotgun) a pour objectif le séquençage d'un génome entier, ou de très longs loci. Lors de la préparation de la librairie, le génome entier (ou de très longs loci) est fragmenté par technique, mécanique ou chimique, en brins d'ADN de plus petite taille (100-300pb). Une amplification, avec ajout des séquences clés décrites précédemment (*figure 18),* est ensuite réalisée sur ces fragments. L'assemblage des séquences de ces petits fragments permet de reconstituer la séquence du génome entier. **Le pouvoir de discrimination entre les différentes souches est maximal. Cette approche est particulièrement adaptée pour des microorganismes présentant des tailles de génome modérées comme les bactéries.**

Plusieurs pays utilisent cette méthode de typage pour la surveillance de microorganismes d'intérêt en santé publique. Par exemple, les Etats-Unis et le Danemark ont établi une surveillance, par séquençage du génome entier, des souches de *Listeria monocytogenes*. Les données génétiques de typage sont enregistrées dans une banque de données publique, ainsi toute nouvelle souche peut être comparée à la base de donnée nationale (108).

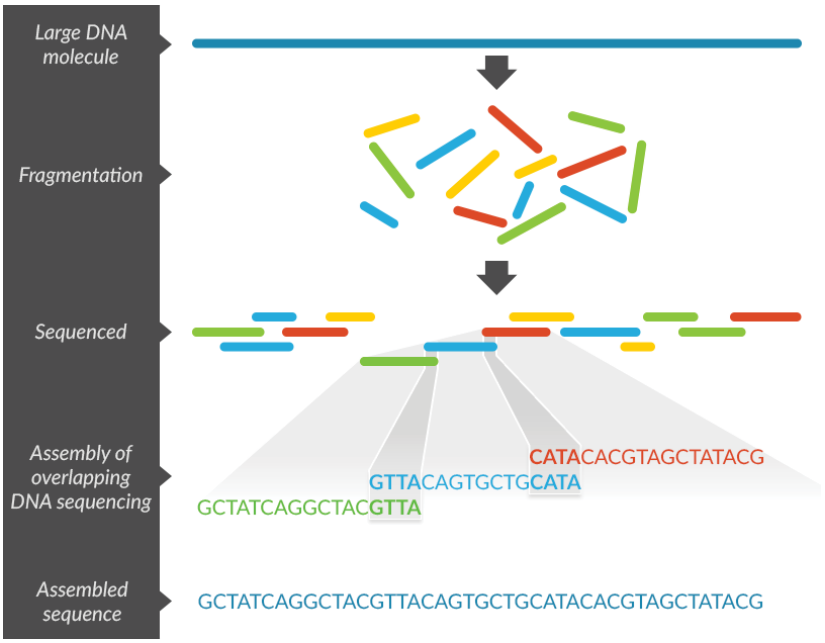


Figure 21: Principe du séquençage shotgun (http://www.micronautomata.com/bioinformatics, consulté le 02/06/16).

3.3.2 Mise en évidence de variants minoritaires résistants

Pour certains microorganismes, dont la culture est fastidieuse (à l'image des virus), une recherche de résistances par séquençage de gènes cibles est nécessaire pour prescrire un traitement adapté. Ces études sont communément réalisées par séquençage Sanger. Or les virus présentent une grande variabilité et des microévolutions peuvent entraîner l'apparition de souches minoritaires, certaines d'entre elles pouvant être résistantes.

Une étude chinoise de 2016 portant sur 29 patients a étudié l'apport du séquençage nouvelle génération dans le cadre de la recherche de résistance systématique. Les gènes étudiés étaient séquencés par méthode Sanger et par "next generation sequencing" (technologie 454 de Roche). Les résultats confirment le seuil de détection des variants minoritaires autour de 20% par le séquençage Sanger. Seules 5% des populations inférieures à 20% détectées par le NGS étaient en revanche retrouvées au séquençage classique (109).

DRMs class	Low-level mutations (<20%)		High-level mutations (≥20%)	
	SS	DS	SS	DS
NNRTI	2	26	9	10
NRTI	0	12	6	7
PI	0	2	0	0
ANY	2	40	15	17

SS—Sanger Sequencing; DS Deep Sequencing

Figure 22: Comparaison séquençage Sanger et séquençage NGS (d'après Chen et al., PloS One, 2016).

3.3.3. NGMLST: Next Generation Multi Locus Strain Typing

L'étude du génome entier est accessible pour des microorganismes ayant un génome de taille modérée. Pour des eucaryotes, la taille du génome est souvent plus importante et la stratégie MLST reste la mieux adaptée. Néanmoins, le NGS présente également des avantages exploitables dans le cadre d'une approche de type MLST.

En 2015, une étude compare le typage MLST de souches de *Cryptococcus neoformans* en utilisant trois techniques de séquençage différentes : le Sanger, un séquençage deuxième génération (Roche diagnostics®), et troisième génération (PacBio- Life Technologies ®) L'étude

portait sur 96 souches de *C. neoformans* avec 8 locis séquencés (110).

Grâce au multiplexage des cibles et au regroupement des réactions de séquençage, les deux techniques de séquençage nouvelle génération se révèlent être moins chronophages et moins onéreuses (d'autant plus pour la technologie de 3ème génération).

Ainsi le choix d'une stratégie MLST avec séquençage nouvelle génération, outre une meilleure détection de sous-populations, peut être financièrement intéressant pour analyser un grand nombre d'échantillons.

	Conventional MLST	**HiMLST**	**NGMLST**
Number of PCRs	768	864 (768 + 96)	192 (96+96)
Number of PCR product purifications	768	More than 96	4
Sanger sequencing reaction	1536 (768 × 2)	None	None
Automate data analysis tool	None	None	MLSTEZ
Estimated experimental time	> 1 week	> 30 hours	7 hours
Estimated data analysis time	> 10 hours (manually)	> 10 hours (manually)	≈1 hour (automatically)*
Estimated cost per isolate	$70.56 (bi-directional)	$42.23 (1/4 plate)	$8.83 (1 SMRT Cell)

*Tested with 8 threads on iMac (Mac OS X 10.9.2) on 3.4G Intel Core i7, 16GB 1333MHz DDR3.

Figure 23: Comparaison des typages MLST et NGMLST (d'après Chen *et al*., Fugal Genet Biol, 2015).

RESUME DU TRAVAIL PERSONNEL EXPERIMENTAL

Cette partie du manuscrit reprend en français les principaux éléments de la problématique, de la méthodologie, des résultats et discussions du travail personnel effectué. L'étude détaillée sera présentée dans la continuité de ce résumé, sous forme d'article en anglais.

1. Problématique

De mai 2014 à août 2015, au CHU Grenoble Alpes, nous avons observé une incidence particulièrement élevées de PCP chez des patients transplantés d'organe solide (TOS). Alors que l'incidence variait de 0 à 1 cas/an dans cette population, à cette période, 12 cas ont été diagnostiqués (figure 24). Cette situation inhabituelle a déclenché dans notre institution une réponse multidisciplinaire de tous les acteurs concernés, ce qui a permis d'enrayer rapidement l'épidémie. Sur un plan biologique, nous avons mis en place le typage des souches par MLST d'abord par séquençage Sanger, puis par séquençage nouvelle génération.

En effet, comme rappelé précédemment, les infections mixtes sont fréquentes dans la PCP et les techniques de séquençage nouvelle génération sont particulièrement adaptées pour cartographier précisément les souches majoritaires et minoritaires présentes à un temps donné. Dans un contexte épidémique, une description exhaustive de l'ensemble des souches permet de préciser la carte de transmission et éventuellement de révéler de nouvelles situations à risque.

L'objectif principal de cette thèse est de déterminer la potentielle valeur ajoutée d'un typage des souches de *P. jirovecii* par séquençage nouvelle génération, dans un contexte de cas groupés de PCP.

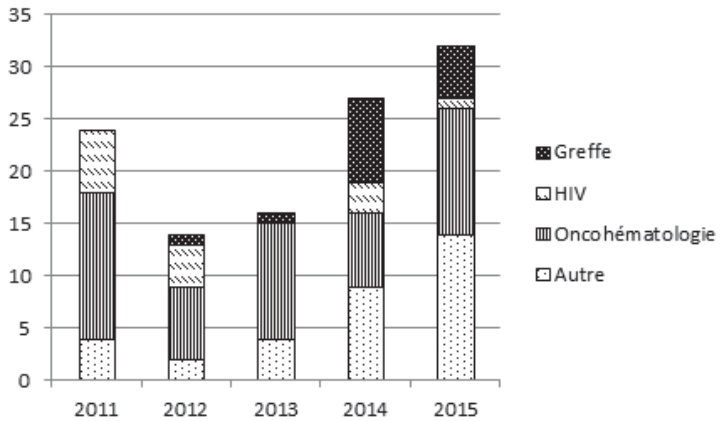


Figure 24: Nombre de PCP diagnostiquées au CHU Grenoble Alpes de 2011 à 2015, et contexte clinique.

2. Méthodologie

2.1. Choix du panel de patients

Afin d' investiguer ces cas groupés (cluster) de PCP diagnostiqués entre 2014 et 2015, nous avons inclus les 12 patients TOS ainsi que vingt patients « contrôle » permettant de définir la distribution 'normale' des souches de *P. jirovecii* au CHU Grenoble Alpes. Ces patients contrôle se répartissaient sur une période allant de 2012 à 2015, et ne présentaient aucun lien épidémiologique évident avec les patients de l'épidémie suspectée (contexte clinique et/ou temporel différents).

Choix du typage par MLST – séquençage nouvelle génération (GS junior + ®, Roche)

Parmi les différentes techniques appliquées au typage de *P. jirovecii* (détaillées dans la partie 2.2 de la bibliographie) nous avons choisi la stratégie MLST, qui correspond actuellement au gold standard pour le typage des souches. Cette approche a l'avantage de combiner une grande précision, un haut pouvoir discriminant et une très bonne reproductibilité. L'utilisation du séquençage nouvelle génération se justifie par une capacité accrue à détecter de souches minoritaires, voire ultra-minoritaires, capacité qui reste très limitée avec le séquençage Sanger. Comparé à d'autres technologies NGS de seconde génération, le système GS junior +® permet également l'analyse d'amplicons de taille relativement importante (700-800 pb) augmentant potentiellement la discrimination des souches dans un contexte de MLST.

2.2. Choix des loci et des amorces

A ce jour, il n'existe pas de schéma définissant clairement le nombre et la nature des amplicons à étudier pour un typage MLST. Généralement, un index de discrimination (Hunter index, D) supérieur à 0.95 est nécessaire pour permettre une différenciation efficace de deux souches. Nous nous sommes appuyés sur la publication de 2013 de Maitte *et al.*, qui comparait l'efficacité de plusieurs schémas de MLST et nous avons choisi de séquencer les loci *SOD*, *MIT26S* et *CYTB* (D=0,987 dans le contexte de cette publication) (87). De nouvelles amorces ont été choisies pour chacun des 3 loci, afin d'obtenir des amplicons de 700-800 pb. Par ailleurs, le séquençage sur GS junior + impose une taille équivalente pour les trois amplicons, afin d'obtenir un séquençage équilibré. Les amplicons de *MIT26S*, *CYTB* et *SOD*, avaient ainsi des tailles

respectives de 732 pb, 735 pb et 764 pb (contre 347 pb, 638 pb et 652 pb pour les fragments classiquement décrits (87)).

Aucune étude de typage n'ayant été basée sur des séquences aussi longues au préalable, les génotypes obtenus ont dû être renommés. Ce choix de présentation a été arbitraire: une lettre majuscule, un chiffre et une lettre minuscule correspondant respectivement aux loci *MIT26S*, *CYTB* et *SOD.* Chaque génotype est donc présenté dans cette étude sous la forme A1a.

2.3. Choix d'une stratégie d'amplification en deux étapes : « universal tail»

La stratégie dite « universal tailed amplicon sequencing » correspond à une préparation des amplicons en deux étapes d'amplification, chacune ayant un objectif différent :

- La première PCR permet l'amplification individuelle des régions cibles, grâce à des amorces spécifiques sur lesquelles est greffée une séquence universelle, commune aux amorces des trois loci.
- La seconde PCR a pour objectif d'ajouter un identifiant patient (MID) et des éléments nécessaires au séquençage 454 (les amorces A et B et les « séquences clés »). Les amorces de la PCR2 contiennent ces séquences d'intérêt et la séquence complémentaire de l'amorce universelle (*Figure 25*).

Une seule PCR aurait pu suffire pour remplir ces deux derniers objectifs, en greffant directement les séquences d'intérêt sur l'amorce spécifique. Cependant la stratégie « universal tail » est plus économique à large échelle, car les amorces PCR2 peuvent être partagées entre plusieurs équipes de recherche étudiant divers pathogènes ou divers régions cibles avec la technologie 454.

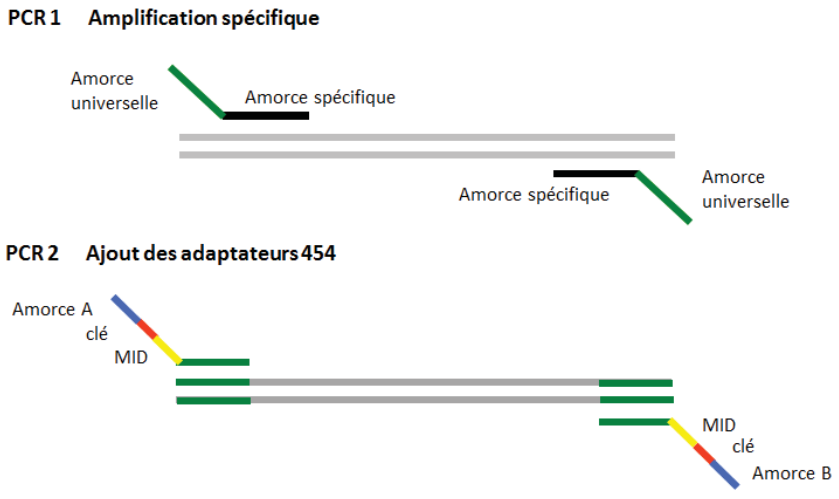


Figure 25: Amplification en 2 étapes, selon la stratégie "universal tail".

2.4. Le séquençage nouvelle génération

Les principales étapes du séquençage nouvelle génération par la technologie 454 telles que réalisées pour notre étude, sont décrites dans la figure 26 ci-dessous. Deux réactions de séquençage, avec une répartition comparable des échantillons, ont été nécessaires pour l'étude des 32 patients (96 amplicons). Il est possible d'inclure plus de patients par réaction de séquençage, mais au dépend de la profondeur de lecture et donc de la sensibilité de détection des variants minoritaires.

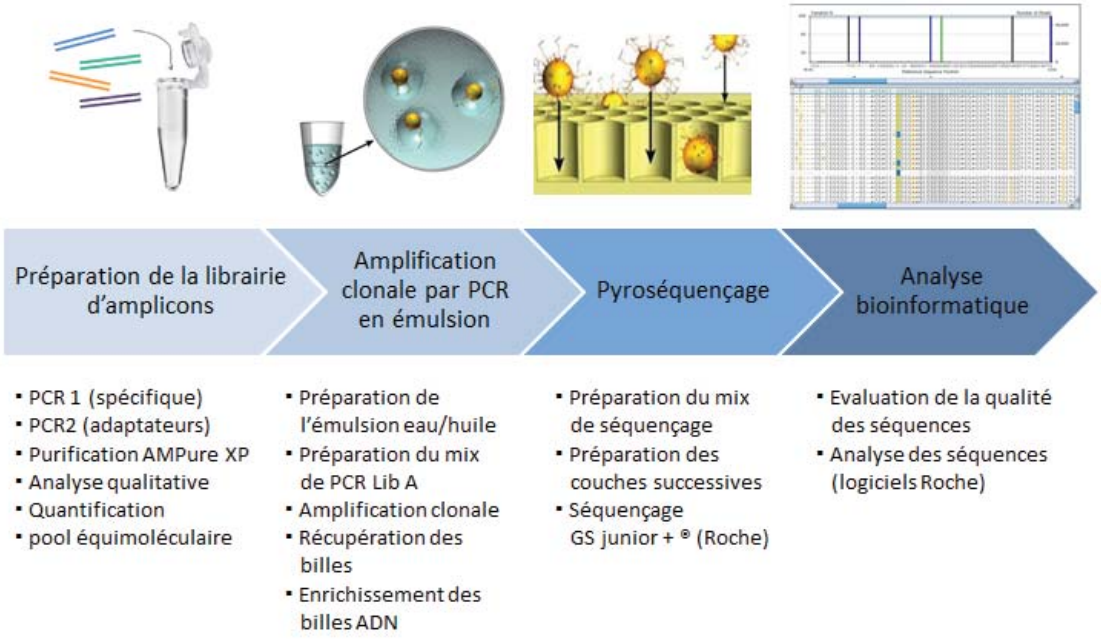


Figure 26: Stratégie expérimentale de l'étude avec séquençage GS junior +®.

Comparaison avec le séquençage Sanger :

Afin d'évaluer l'apport du NGS dans la stratégie de typage MLST, les souches de 11 patients (6 patients du cluster et 5 patients contrôle) ont également été typées par séquençage Sanger. Les amplicons obtenus après la PCR 1 étaient ainsi purifiés et séquencés individuellement.

3. Résultats et Discussion

Polymorphismes et génotypes :

Les souches des 32 patients ont pu être séquencées par technologie NGS. La stratégie MLST choisie a montré une grande diversité de souches, principalement grâce au locus *MIT26S*. En effet, en considérant aussi bien les souches majoritaires que les souches minoritaires, il y avait respectivement 22, 14 et 4 génotypes différents pour les loci *MIT26s*, *CYTb* et *SOD*.

L'analyse des séquences étendues de 732 pb de *MITS26s* a permis la description de 4 nouveaux polymorphismes (3 SNP (single nucleotide polymorphism) et 1 multinucleotide polymorphism (MNP) de 6pb). Ces nouveaux polymorphismes sont situés en amont et en aval de l'amplicon de 347 pb habituellement décrit. Leur analyse permet d'augmenter l'index de discrimination du locus *MIT26S* seul (D = 0.890 contre 0.774 sans ces polymorphismes) ou en association avec *CYTB* (D = 0.963 contre 0.937).

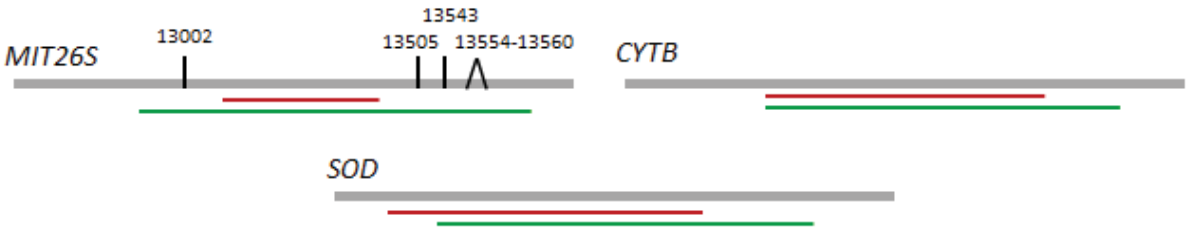


Figure 27: Nouveaux polymorphismes observés.

Les séquences classiquement analysées et celles décrites dans cette étude sont représentées respectivement en rouge et en vert, par rapport à la séquence de leur locus respectifs (en gris). Les barres noires verticales correspondent aux nouveaux polymorphismes observés dans cette étude, avec leurs positions respectives dans le génome mitochondrial.

Un génotype commun (C2a) a été observé chez 5/12 patients TOS, chez un sixième patient en tant que variant ultra-minoritaire (2%) et possiblement chez un septième (1%). Ce génotype n'a pas été observé parmi les patients contrôles. La présence d'une souche clonale au sein du groupe cluster et l'étude d'une carte de transmission confirment la probable transmission nosocomiale de la PCP. Le séquençage NGS permet de retenir dans le cluster épidémique un patient et potentiellement deux, qui auraient été exclus avec un séquençage Sanger.

Analyse des variants

Avec un seuil de détection des variants minoritaires fixé à 1% (grâce à l'étude d'un mélange artificiel de génotypes), 21/32 échantillons (66%) contenaient plusieurs souches de *P. jirovecii*. De plus, 17/32 prélèvements (53%) avaient plus de deux souches. Chez les patients présentant une infection mixte, il y avait en moyenne 5 souches (2 à 12 souches). Une proportion comparable de co-infections à multiples souches de *P. jirovecii* a été rapportée dans différentes études récentes, qui employaient d'autres techniques de typages (98,99). Par ailleurs, seuls 5/12 patients de la population cluster (42%) présentaient une infection mixte, alors que le groupe contrôle en comptait 17/20 (85%), sans explication évidente à ce jour.

La comparaison avec le séquençage Sanger, réalisée pour 11 patients de l'étude, montrait, comme pressenti, une supériorité du séquençage NGS. En effet, alors que le NGS détectait 5/ 11 soit 55% d'infections mixtes, le séquençage Sanger n'en détectait que 3/11, soit 27%. Le séquençage Sanger décelait principalement des variants avec une quantité relative >20% (évaluée par le NGS), mais aucun variant <10% en NGS (*Tableau III*). Ce seuil de détection autour de 20% pour le Sanger est largement rapporté dans la littérature (111,112).

	Nombre de polymorphismes	
Proportion des polymorphismes	NGS	Sanger
>20%	9	5
10-20%	3	1
<10%	15	0

Tableau III: Comparaison des polymorphismes observés avec les techniques NGS et Sanger.

4. Conclusion et perspectives

En conclusion, cette étude a permis de démontrer le véritable avantage d'un séquençage NGS pour le typage MLST, en particulier dans un contexte d'étude épidémiologique de *P. jirovecii*. Les performances accrues du NGS dans la détection et la description de variants minoritaires en font un outil adapté à l'étude génotypique de ce champignon non cultivable fréquemment responsable de co-infections.

Des études complémentaires, incluant des prélèvements itératifs, permettraient de mieux comprendre le développement et l'évolution de ces co-infections au sein de leur hôte. Par ailleurs, le haut pouvoir discriminant associé aux longues séquences de *MIT26s*, devra être confirmé par une étude spécifique, avec entre autres, un panel de souches plus diversifié sur le plan géographique et temporel.

ARTICLE

Added Value of Next Generation Sequencing for MLST Analysis of a *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia Outbreak

Elena Charpentier,[a]# Cécile Garnaud,[a] Claire Wintenberger,[b] Sébastien Bailly,[c] Jean-Benjamin Murat,[a]* John Rendu,[d] Patricia Pavese,[b] Thibault Drouet,[a] C. Augier[e], Paolo Malvezzi,[f] Anne Thiébaut-Bertrand,[g] Marie-Reine Mallaret[h], Olivier Epaulard,[b] Muriel Cornet,[a] Sylvie Larrat,[i] Daniele Maubon.[a]

Department of Parasitology-Mycology, Grenoble University Hospital, Grenoble, France[a]; Department of Infectious diseases, Grenoble University Hospital, Grenoble, France[b]; Inserm, Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité University, Paris, France[c]; Department of Molecular Biology, Grenoble University Hospital, Grenoble, France[d]; Department of Cardiology, Grenoble University Hospital, France[e]; Department of Nephrology, Grenoble University Hospital, Grenoble, France[f]; Department of Oncohaematology, Grenoble University Hospital, Grenoble, France[g]; Departement of Clinical Epidemiology, Grenoble University Hospital, Grenoble, France[h]; Department of Virology, Grenoble University Hospital, Grenoble, France[i].

Running Head: UDPS-MLST to study a *P. jirovecii* Pneumonia Outbreak

#Address correspondence to Elena Charpentier, elenacharpentier1@gmail.com

* Present Adress: Jean Benjamin Murat, Departement of Parasitology-Mycology, Limoges University Hospital, Limoges, France.

Keywords: Pneumonia, *Pneumocystis jirovecii,* Epidemics, High-Throughput Nucleotide Sequencing, Transplants, minor variants, Multilocus Sequence typing**.**

ABSTRACT

Multilocus Sequence Typing (MLST) allows strain characterization, but Sanger sequencing presents limitations for subpopulations determination. Yet, mixed strains coinfections are frequent in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia (PCP). Next Generation Sequencing (NGS) allows both majority and minority variant studies. We evaluated the added value of NGS in an epidemiological MLST study of PCP.

Thirty-two patients (12 solid organ transplant (SOT) and 20 controls) presenting with PCP at Grenoble Hospital, France, were included between 2012 and 2015. A three loci scheme was used for MLST analysis (*MIT26S*, *CYTB*, *SOD*). Primers were designed to obtain ≈ 750 bp amplicons. Sequencing was achieved on 32 samples with a NGS technology (GS junior +, Roche), and with Sanger technology for 12 of them. As no previous report used 750 bp loci, genotypes were named arbitrarily (*MIT26S:* capital letter, *CYTB*: number, *SOD*: lowercase).

Among the 12 SOT, 5 shared a major genotype (C2a). Proportion of mixed genotypes infections was higher with NGS analysis (65%) compared to Sanger (25%). NGS approach revealed infections with more than 3 subpopulations and the presence of minority strains (1%) among which the C2a genotype. Transmission map confirmed the probable nosocomial PCP acquisition. The 732bp *MIT26S* sequence revealed three new SNPs and a new MNP. These new polymorphisms increased significantly the discriminatory power of the *MIT26S* locus.

As expected, in this context of PCP, NGS outperforms Sanger approach for sub-population determination and revealed new discriminating SNPs. These findings bring new insight for future epidemiological studies on this non cultivable opportunistic fungus.

INTRODUCTION

Pneumocystis jirovecii Pneumonia (PCP) is a life threatening opportunistic disease particularly dreaded in units managing oncohematological patients, solid organ transplanted (SOT) recipients and HIV infected patients. In the past 20 years, along with transplantation improvements and immunosuppressive therapy development, PCP incidence increased significantly among SOT recipients (1). Moreover, multiple reports of epidemic cluster among this specific population, some with molecular biology evidence of a common clonal strain, has been described (2–4). These outbreaks supports the hypothesis of a *de novo* "person to person" mechanism of transmission of *P. jirovecii* (5). *P. jirovecii* is still a non-cultivable organism, and its whole genome was only available in 2012 offering new perspectives for extended genomic analysis.

In the past years, different typing approaches have been described to study *P. jirovecii* epidemiology. Sequence typing, especially MultiLocus Sequence Typing (MLST) has been widely used and represents the gold standard typing method because of its excellent discriminatory power and reproducibility (2,3,6,7). However this method is also fastidious and expensive and other methods are available. Allele specific PCR and Single Nucleotide Primer Extension approaches allow time and cost reduction, but are limited to the analysis of a few predefined polymorphisms (8,9). PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism) and PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) are both rapid and cost-saving techniques that allow simultaneous analysis of multiple samples. However complex patterns can be difficult to interpret (10,11). Finally, the study of tandem repeats, i.e. microsatellites, is a reproducible and discriminative approach but until now, data are hardly sharable (12).

Regardless of the typing method, the existence of multiple *P. jirovecii* strains, isolated from respiratory samples, was systematically reported. Proportions of mixed strains in samples varied substantially according to the typing method, up to 70-80% in some recent publications (6–8).
Yet, all these typing methods, including the gold standard MLST are limited to highlight these co-infections situations. Indeed, for MLST, because of the use of Sanger sequencing (Sseq) technologies, minor variants detections are restricted to strains with relative abundance above 20% of the total amount of DNA (15–17). Next generation sequencing (NGS) techniques, like ultra-deep pyrosequencing (UDPS), are characterized by high sequencing performances thanks to miniaturized and parallelized processes. Applications are numerous, from *de novo* whole genome sequencing to metagenomics analysis. Among other advantages, they also allow distinctive variant sequencing and thus detection of ultra-minor populations (up to 0.1%) (18,19). In the context of

antimicrobial resistance, NGS applications have also succeeded to detect ultra-minor resistant hepatitis or HIV genotypes (19).

Taking advantage of this specific characteristic of UDPS, we aimed to evaluate in this study the added value of an UDPS-MLST strategy in the specific context of a PCP cluster in SOT patients, which occurred in our institute between 2014 and 2015.

MATERIALS AND METHODS

Patient Selection and Samples

Between May 2014 and August 2015, 12 cases of PCP were described among SOT patients at Grenoble Teaching Hospital, France. These grouped cases (also called 'cluster') represented a significant increase of incidence in this population compared to previous years (one or two/year). Thirty-two PCP patients were included in the study: 12 SOT recipients and 20 control patients. SOT patients were recipients of different solid organs (kidney, liver, heart, and lung) and were followed up at Grenoble Teaching Hospital, in different specialized units. Control patients were twenty PCP cases with no evident epidemiological link. For each patient, PCP diagnosis was assessed on clinical respiratory samples (bronchoalveolar lavage fluids, bronchoaspiration or sputum) by direct examination after specific or non-specific staining (Rapid Grocott or May-Grunwald-Giemsa staining) and systematically confirmed by quantitative PCR (*MSG* gene) as described before (20). Patients' clinical and biological characteristics are resumed in Table 1.

Extraction , PCR and MLST

At the time of diagnosis, total DNA was extracted using the QIAmp DNA mini kit (Qiagen Hilden, Germany), according to manufacturer instructions. Extracts were stored at -20°C. We chose a MLST strategy to genotype *P. jirovecii* strains. As previously recommended, a combination of three loci was chosen: these loci belong to three different genes coding for the superoxide dismutase (*SOD*), the mitochondrial large subunit of ribosomal RNA (*MIT26S)* and the cytochrom b (*CYTB*)) respectively. A previous study showed that this scheme displays a high level of strain discrimination and is adapted for accurate *P. jirovecii* strain typing (7). As required by the chosen UDPS procedure (GS Junior +, Roche diagnostics, France), new primers were designed for each locus, to obtain 750 bp amplicons. Amplification was performed using a two-step PCR protocol with a universal tail strategy. First, a specific amplification (PCR1) was achieved, and then a second PCR (PCR2) was used to add sample identification (multiplex identifier, MID) and 454 key

sequences. Primers and PCR conditions for loci amplifications are resumed in Table 2.

Purification and emulsion PCR (emPCR)

PCR products were purified with magnetic beads from AMPureXP kit (Beckmann Coulter, Beverly, MA, USA). After qualitative and quantitative analysis, purified PCR2 products were diluted to 1×10^9 molecules/mL and an equal volume of each dilution was pooled to generate the amplicon library. An additional purification step was performed on the amplicon pool. EmPCR was carried out as recommended in the "emPCR Amplification Method Manual-Lib-A" for GS Junior +.

Next Generation Sequencing

NGS was performed on GS Junior+ System® (kit Lib A) (Roche diagnostics) developed to sequence 700-800 bp fragments, according to manufacturer's instructions. A forward and reverse sequencing strategy was used for better coverage. Ninety-six PCR products were distributed in two comparably filled runs. The first run included 18 specimens (8 SOT and 10 controls). Average sequencing depth was 810X (0X-1998X, median 739X). Quality sequence was assessed with FastQC software (see http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/): at 750 bp, average phredscore (or Qscore) per base was around 24, corresponding to a 0.4% probability of error. The second run encompassed 18 samples (4 SOT, 10 controls, 3 reanalysis from the first and a control strain mix). Average sequencing depth was lower at 265X (8X-1268X, median 233X) and median phredscore per base was above 20 only for sequences under 400 bp (error probability below 1%). Both phred score per base analyses results are shown in Figure 1.

To assess subpopulation limit of detection in our experimental conditions, a control sample made *in vitro* from three different strains was added in the second run. This control was composed of three *MIT26S* purified amplicons belonging to 3 unique and different genotypes at three different ratio: 98,9%, 1%, and 0,1%. These amplicons were chosen among strains harboring a unique genotype and displaying more than 1000 reads.

Sanger Sequencing

In order to evaluate the added value of NGS in MLST strategy, 11 samples (from 6 SOT patients and 5 control patients) were also sequenced with Sanger technique. Primers from PCR1 were used and PCR products purification was performed with the EXOsap-IT kit (Affymetrix). Sseq was performed on a ABI 3130 DNA analyzer.

Sequences analysis and Bioinformatic tools

NGS results were analyzed on Amplicon Variant Analyzer (AVA) and GS reference mapper softwares (Roche Diagnostics). Sequences were compared to respective reference sequences (GenBank accession number: NC_020331.1 (*MIT26S*), AF146753.1 (*SOD*), AF320344.1 (*CYTB*)). Because of the lower quality of the second run, each polymorphism position was checked and validated manually. According to the result of our artificial sample on the second run, a 1% threshold was applied for the consideration of minor variant. Sanger sequences were analyzed on SeqScape software (Thermo Fisher Scientific), and confronted to the previous reference sequences. As new primers for *SOD*, *MIT26S* and *CYTB* amplification were used, haplotypes were named arbitrarily with a capital letter, a number and a lowercase corresponding to *MIT26S*, *CYTB* and *SOD* alleles, respectively. Final genotypes were obtained by the association of the three different haplotypes. Haplotypes corresponding polymorphisms are detailed in Supplemental data (Table S1).

Hunter Index

Hunter index (D) was calculated, as previously described, to evaluate the discriminatory power of the three loci and their association (21). Briefly, with a D of 0.95, there is a 95% chance that any two random unrelated samples will be differentiated by the comparison of sequences. Only single strains or strains with an easy extrapolation of the major population (variants in only one locus, or presence of ultra-major variants in all loci containing mixed haplotypes) were taken into account for D calculation. Related samples sharing a common genotype were also excluded.

RESULTS

Polymorphisms and haplotypes

Twelve samples from SOT patients cluster and 20 samples from unrelated control patients were genotyped with a 3 loci MLST strategy and ultra-deep sequencing. Extended *MIT26s* 732 bp sequences analysis revealed 4 new polymorphisms located both upstream and downstream the previously described amplicons classically used for genotyping. These new polymorphisms corresponded to 3 single nucleotide polymorphisms (SNP) at positions 13002, 13505, 13543 (mitochondrial genome) and 1 multinucleotide polymorphism (MNP) between 13554-13560 (Figure 2). By contrast, extended *CYTB* and *SOD* amplicons showed no new polymorphisms on any specimen.

Overall, taking already described and new polymorphisms into account, and considering both major and minor variants, there were among the 32 samples, 22, 14 and 4 different genotypes for *MIT26S*, *CYTB* and *SOD* loci, respectively. A clonal strain identified as the C2a genotype was identified in 5 SOT patients from the cluster: one double (heart and kidney) transplants recipient (T2), one heart transplanted patient (T4) and three renal transplant recipients (T5, T8, T10). This C2a genotype was also detected as a minor variant (2%) and as a possible minor variant (1%) in two other SOT patients belonging to the 2014-2015 epidemic cluster (T7 and T12 respectively). Thus, considering both major and minor genotypes, 6/12 (possibly 7/12) SOT patients were carrying the C2a strain. Of note, this unusual genotype was not detected in any control patient, either as minor or major strain. All genotyping results are detailed in Table 3.

Variants analysis

Among the 32 samples, 11 contained a single and unique *P. jirovecii* strain with no minor variant detected, even for the strains presenting a high number of reads (>1000X). Thus, 21/32 (65%) respiratory samples were composed of multiple *P. jirovecii* strains and 17/32 (53%) presented more than two different *P. jirovecii* strains. Co-infection proportions were significantly different between the cluster group (5 mixed infection among 12 (42%)) and the control group (17 mixed infection among 20 (85%)) ($p < 0,05$). The exact number of strains within each sample was difficult to appreciate, as alleles of the 3 loci could not always be cross-linked. Considering the minimal number of strains (corresponding to the highest number of alleles in one locus), an average of 5 strains, ranging from 2 to 12 strains per sample was described in these co-infected patients. There was a high number of minor variants with proportion <10%. Indeed, 18/32 patients (56%) had at least one sub-population under 10% and 9/32 (28%) had only minor variants under 10%. Considering each amplified loci, *MIT26S*, *CYTB* and *SOD* allowed the detection of 20, 14 and 10 mixed *P. jirovecii* strain infections, respectively. Heatmaps representing strain distribution patterns for each of the three loci are presented in Figure 4. Because of the lower sequencing depth of the second run, co-infections strains could be underestimated. However coinfections proportions were similar between the 2 runs (61% for run 1 and 65% for run 2).

Limit of detection- reproductibility

In the artificial control sample composed of 3 *MIT26S* genotypes at defined concentrations (C: 98,9%, B: 1% and F: 0,1%), the C and B genotypes were correctly detected with NGS at 99% and 1% respectively. Nonetheless the ultra-minor F genotype was not detected which was consistent

with the limited analysis depth obtained for this sequence (220X).

Furthermore, three samples were reanalyzed in the second run, from the first amplification step: one with a unique strain, one with a 'moderate' number of strains and one with multiple strains. Despite the moderate efficiency of the second run, results were mostly comparable. Results are detailed in supplemental data (Table S2).

NGS versus Sseq

Strains from 6 SOT patients and from 5 control patients were sequenced on both NGS and Sseq platform. The classical sequencing method detected only 3/11 (27%) mixed-strain infections, whereas NGS revealed 5/11 (55%) co-infections. Comparison of the sequencing results with both techniques are detailed in Table 4. Analyzing each locus variant, Sseq detected only 1/18 (5%) polymorphism present as minor variant (<20% in relative abundance according to NGS) but 5/9 (56%) polymorphisms present in more than 20% reads.

Discriminatory index

Clonal C2a strains and uninterpretable genotypes excluded, Hunter Index (D) was calculated for each locus on 20 strains (21). Considering already described polymorphisms, *MIT26s* D was of 0,774. Adding the 4 newly described polymorphisms, D increased to 0,89. The association of *MIT26s* and *CYTB* locus raised D from 0,937 to 0,963 (Table 5).

DISCUSSION

Twelve PCP were diagnosed in SOT recipients in our institute between 2014 and 2105. Uncommonly, this cluster was made of patients carrying different transplanted organs and thus, followed-up in different organs specialty units. PCP epidemic among SOT has mostly been described in renal transplanted patients and exceptionally in cardiac transplant recipients. An epidemiological study was required to understand this unusual situation. We decided to characterize strain genotypes using a MLST method based on 3 loci (*MIT26S*, *CYTB*, and *SOD*). In order to accurately characterize both major and minor strains, we used UDPS for the first time in the context of PCP epidemic.

The 12 SOT patients were genotyped along with 20 control patients. The 3 loci UDPS-MLST approach revealed a significant diversity of *P. jirovecii* strains with at least 20 different genotypes observed. Five SOT cluster patients shared a common genotype and the transmission map (Figure

3) confirmed the probable nosocomial transmission of this strain, circulating between cardiology and nephrology transplant units. Of note, this genotype was not detected in the control group, confirming that this *P. jirovecii* strain is not commonly present within our institute.

In our study, although UDPS detected subpopulation under 1%, we used a 1% threshold for minor variant detection. This choice was driven by the result of our artificial mix of control strains which detected the 1% population but not the one at 0,1%. Using this threshold, there were 21/32 (65%) of mixed strains infections and 17/32 (53%) with more than 2 strains. Other previous genotyping studies described *P. jirovecii* co-infections with diverse proportions of mixed-strains (20% to 75% of the studied isolates) (22–24). Hauser *et al.* and Gits-Muselli *et al.* described mixed-populations in 70% with PCR-SSCP and microsatellites analysis respectively (12,22). Using a threshold under 1%, our proportion of mixed strains would have risen up to 78 % (data not shown). Also, when considering only the control patients (with a 1% threshold), this proportion was even higher, with 85% of mixed strains. These last percentages reflect probably with more accuracy the reality of strains diversity within a patient. Indeed, a very recent report also using UDPS to study *P. jirovecii* strains outside an epidemic context, showed a proportion of 92% co-infections (14). Besides, our proportion of mixed infections involving more than 2 strains is higher than previously described (23). This can be explained by the fact that among our multiple strains co-infections, many variants were present in less than 10% and so correctly detected by UDPS, compared to the detection threshold of other typing methods. Although mean sequencing depth was identical, we noted a difference in co-infection proportions between cluster group (42%) and control group (85%) (p value : 0,0083). Virulence or other metabolic advantages of the clonal strains can be evoked but currently, we do not have any clear explanation to this issue and further studies will be needed to confirm and to understand this result.

Multiple studies have already reported the superiority of NGS on Sanger sequencing, but until now the added value of NGS on Sseq was never assessed in the context of a PCP epidemic context. Sseq detected only 25% co-infections, when NGS found 55% on the same panel. In addition, NGS allows a more precise relative quantitation of the different variants among a co-infected sample than Sseq. This enables a follow-up of mixed strain composition in iterative samples, or the evaluation of a variant proportion threshold having potential consequences on infection characteristics, as potential treatment resistance for example. Nevertheless, beyond these clear advantages, in case of multiple variants detected on more than one locus, our NGS strategy did not allow to link these minor variants with certainty. Thus, in this context, theminor genotypes can only be putative. Today, given the size of *P. jirovecii* mitochondrial or nuclear

genomes, whole genome sequencing is not easily achievable on a high number of samples (25,26). Third generation sequencer like PacBio RS II® (Pacific Biosciences, Menlo Pqrk, California, USA) allowing larger amplicons sequencing (average> 10000 pb and up to 60000 pb) will probably help to clarify this issue in a very near future.

We found, thanks to NGS, one confirmed and one putative C2a genotypes as minor strains in patients belonging to the cluster. Previous reports on sequential isolates showed that the ratio among the different *P. jirovecii* strains varies over time: Alanio *et al*. showed modifications in strains ratio or composition on a month period (8). Thus, previously minor strain can become a major strain over time. Thereby, we considered that these patients carrying C2a genotype as a minor strain were also putatively belonging to the same epidemic event. In consequence, the confirmed case with minor strain (T7) was added to the transmission map. This result confirms the higher accuracy of UDPS-MLST for describing an epidemic event.

For the experiment purpose, we designed new primers to generate longer amplicons. If they brought out no new polymorphism for *SOD* and *CYTB* loci, we described 4 new mutations (3 SNPs and 1 hexonucleotide MNP) within the 732 bp M*IT26s* amplicon.These new polymorphisms were detected in different genotypes, confirming their good distribution among the variety of *P jirovecii* strains. The current MLST scheme for PCP typing is not clearly established: the 3 loci *MIT26S-CYTB-SOD* scheme has been proposed as it presents a high discriminatory index and a good amplification success of the loci (7). The European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) recommends this MLST scheme for *P. jirovecii* typing (see http://www.kobe.fr/ecil/program2013.html). The ITS (Internal Transcribed Spacer) regions have also been used extensively but are sometimes difficult to amplify (7). In this study, extended 732 bp *MIT26s* and *CYTB* sequences polymorphisms conferred a high discriminatory power (D>0,95), considered to be sufficient to discriminate strains between them. In addition, *MIT26S* and *CYTB* amplification is facilitated because both genes are present in each of the numerous *P. jirovecii* mitochondria. Hence, the study of lengthened 732 bp *MIT26s* PCR product could be of interest compared to the previously described 300 or 370 bp amplicons (7). The screening of 732 bp *MIT26S* and *CYTB* could be proposed as a rapid screening method to evaluate strains convergence, while SOD could be sequenced in a second step. Further studies implying patients from other institutes will be needed to assess the real added value of these newly described polymorphisms.

CONCLUSION

This study revealed a clear added value of deep-sequencing MLST to analyze major and minor strains in epidemiological *P. jirovecii* studies. With its higher sensitivity and precision, NGS-MLST is more accurate for genotyping studies of this uncultivable fungus frequently responsible for mixed strains infections. Further studies will be useful to better understand these co-infections clinical consequences and kinetics over time. Besides, with NGS techniques and bio-informatics rapid development, deep sequencing costs are reducing, expanding its attractiveness (27). Deep sequencing MLST method could become the new gold standard in the next decade.

DECLARATION OF INTERESTS

We declare no competing interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to François Collyn, Carole Donne-Gousse (Roche Diagnostics) and Roche sequencing service platform for their technical assistance, to Katia Fusillier for sharing her experience and skills on GS Junior + handling and to Joelle Leral for her assistance on Sanger sequencing. We thank Pr Hervé Pelloux for giving us the opportunity to work on this subject and Dr Julien Fauré for granting us access to Sanger sequencing Platform. This work was supported by MSD.

REFERENCES

1. Roux A, Canet E, Valade S, Gangneux-Robert F, Hamane S, Lafabrie A, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with or without AIDS, France. Emerg Infect Dis. sept 2014;20(9):1490–7.

2. Desoubeaux G, Dominique M, Morio F, Thepault R-A, Franck-Martel C, Tellier A-C, et al. Epidemiological outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia are not limited to kidney transplant recipients: genotyping confirms common source of transmission in a liver transplantation unit. J Clin Microbiol. 2 mars 2016;

3. Nankivell BJ, Firacative C, Kable K, Chen SC-A, Meyer W. Molecular epidemiology linking multihospital clusters of opportunistic *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. oct 2013;57(7):1058–9.

4. Rostved AA, Sassi M, Kurtzhals JAL, Sørensen SS, Rasmussen A, Ross C, et al. Outbreak of *Pneumocystis* pneumonia in renal and liver transplant patients caused by genotypically distinct strains of *Pneumocystis jirovecii*. Transplantation. 15 nov 2013;96(9):834–42.

5. Yiannakis EP, Boswell TC. Systematic review of outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: evidence that *P. jirovecii* is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control. J Hosp Infect. mai 2016;93(1):1–8.

6. Schmoldt S, Schuhegger R, Wendler T, Huber I, Söllner H, Hogardt M, et al. Molecular Evidence of Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* Transmission among 16 Patients after Kidney Transplantation. J Clin Microbiol. mars 2008;46(3):966–71.

7. Maitte C, Leterrier M, Le Pape P, Miegeville M, Morio F. Multilocus sequence typing of *Pneumocystis jirovecii* from clinical samples: how many and which loci should be used? J Clin Microbiol. sept 2013;51(9):2843–9.

8. Esteves F, de Sousa B, Calderón EJ, Huang L, Badura R, Maltez F, et al. Multicentre study highlighting clinical relevance of new high-throughput methodologies in molecular epidemiology of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 26 mars 2016;

9. Alanio A, Olivi M, Cabaret O, Foulet F, Bellanger A-P, Millon L, et al. Correlation Between *Pneumocystis jirovecii* Mitochondrial Genotypes and High and Low Fungal Loads Assessed by Single Nucleotide Primer Extension Assay and Quantitative Real-Time PCR. J Eukaryot Microbiol. 4 mai 2015;

10. Hauser PM. The development of a typing method for an uncultivable microorganism: the example of *Pneumocystis jirovecii*. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. sept 2004;4(3):199–203.

11. Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G, Huang L, Schuhegger R, Sing A, et al. Restriction fragment length polymorphism typing demonstrates substantial diversity among *Pneumocystis jirovecii* isolates. J Infect Dis. 15 nov 2009;200(10):1616–22.

12. Gits-Muselli M, Peraldi M-N, de Castro N, Delcey V, Menotti J, Guigue N, et al. New Short Tandem Repeat-Based Molecular Typing Method for *Pneumocystis jirovecii* Reveals Intrahospital Transmission between Patients from Different Wards. PloS One. 2015;10(5):e0125763.

13. Le Gal S, Blanchet D, Damiani C, Guéguen P, Virmaux M, Abboud P, et al. AIDS-related *Pneumocystis jirovecii* genotypes in French Guiana. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. janv 2015;29:60–7.

14. Alanio A, Gits-Muselli M, Mercier-Delarue S, Dromer F, Bretagne S. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* during Infection Revealed by Ultra-Deep Pyrosequencing. Front Microbiol. 2016;7:733.

15. Chen X, Zou X, He J, Zheng J, Chiarella J, Kozal MJ. HIV Drug Resistance Mutations (DRMs) Detected by Deep Sequencing in Virologic Failure Subjects on Therapy from Hunan Province, China. PloS One. 2016;11(2):e0149215.

16. Liang B, Luo M, Scott-Herridge J, Semeniuk C, Mendoza M, Capina R, et al. A Comparison of Parallel Pyrosequencing and Sanger Clone-Based Sequencing and Its Impact on the Characterization of the Genetic Diversity of HIV-1. PLOS ONE. 21 oct 2011;6(10):e26745.

17. Mello FCA, Lago BV, Lewis-Ximenez LL, Fernandes CA, Gomes SA. Detection of mixed populations of wild-type and YMDD hepatitis B variants by pyrosequencing in acutely and

chronically infected patients. BMC Microbiol. 2012;12:96.

18. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance. Genome Res. 8 janv 2007;17(8):1195–201.

19. Quiñones-Mateu ME, Avila S, Reyes-Teran G, Martinez MA. Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. sept 2014;61(1):9–19.

20. Chumpitazi BFF, Flori P, Kern J-B, Brenier-Pinchart M-P, Hincky-Vitrat V, Brion J-P, et al. Characteristics and clinical relevance of the quantitative touch-down major surface glycoprotein polymerase chain reaction in the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. Med Mycol. oct 2011;49(7):704–13.

21. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. J Clin Microbiol. sept 1990;28(9):1903–5.

22. Hauser PM, Blanc DS, Sudre P, Senggen Manoloff E, Nahimana A, Bille J, et al. Genetic diversity of *Pneumocystis* carinii in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. AIDS Lond Engl. 9 mars 2001;15(4):461–6.

23. Rabodonirina M, Vanhems P, Couray-Targe S, Gillibert R-P, Ganne C, Nizard N, et al. Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. Emerg Infect Dis. oct 2004;10(10):1766–73.

24. Le Gal S, Damiani C, Rouillé A, Grall A, Tréguer L, Virmaux M, et al. A cluster of *Pneumocystis* infections among renal transplant recipients: molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of *Pneumocystis jirovecii*. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. avr 2012;54(7):e62-71.

25. Ma L, Chen Z, Huang DW, Kutty G, Ishihara M, Wang H, et al. Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. Nat Commun [Internet]. 22 févr 2016 [cité 9 avr 2016];7. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4764891/

26. Ma L, Huang D-W, Cuomo CA, Sykes S, Fantoni G, Das B, et al. Sequencing and

characterization of the complete mitochondrial genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent *Pneumocystis*. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. mai 2013;27(5):1962–72.

27. Chen Y, Frazzitta AE, Litvintseva AP, Fang C, Mitchell TG, Springer DJ, et al. Next generation multilocus sequence typing (NGMLST) and the analytical software program MLSTEZ enable efficient, cost-effective, high-throughput, multilocus sequencing typing. Fungal Genet Biol FG B. févr 2015;75:64–71.

TABLES AND FIGURES

Patient N°	Gender	Age (years)	PCP diagnosis	Underlying condition	Age of transplant (months)	Immunosppressors	Sample	CMV blood (log)	CD4 (/mm3)	Microscopy	Fungal Load (copy/ capilary)	Outcome
T1	F	34	5/20/14	Pulmonary Transplant	60	Eve, Tac, Aza, Pred 4mg/d	BAL	negative	110	positive	1,1E+10	Death
T2	F	59	5/27/14	Heart and Kidney Transplants	Heart : 300 Kidney : 2	Eve, Tac, MMF, Pred>20mg/d	BAL	negative	/	/	3,9E+08	Favorable
T3	F	57	6/19/14	Heart Transplant	137	Tac, Eve, MMF	BAL	negative	200	negative	2,7E+08	Death
T4	M	65	7/7/14	Heart Transplant	37	Tac, MMF	BAL	Positive (3,26)	370	positive	1,5E+08	Death
T5	M	66	8/19/14	Kidney Transplant	4	Tac, MMF	Sputum	negative	/	negative	1,3E+11	Favorable
T6	M	48	8/29/14	Heart Transplant	78	Ciclo, MMF, Pred 2 mg/d	BAL	negative	1000	negative	1,0E+06	Favorable
T7	F	74	10/29/14	Kidney Transplant	128	Tac (overdosed), MMF	BAL	Positive (2,95)	/	positive	2,0E+06	Death
T8	F	69	11/24/14	Kidney Transplant	23	Tac, MMF	BAL	negative	/	positive	8,8E+06	Favorable
T9	M	63	1/7/15	Liver Transplant	5	Tac, MMF, Pred	BAL	Positive (3,67)	/	negative	1,1E+04	Favorable
T10	M	69	1/10/15	Kidney Transplant	228	Ciclo, MMF	Sputum	negative	/	negative	1,2E+05	Favorable
T11	F	61	3/3/15	Heart Transplant	122	Ev, Pred 2mg/d	BAL	negative	700	negative	3,0E+03	Favorable
T12	F	75	8/26/15	Heart Transplant	95	Ciclo, MMF	BAL	negative	/	negative	2,0E+05	Favorable
C1	M	56	8/25/12	Liver Transplant	6	Ciclo, MMF, Pred 10mg/d	BA	negative	/	negative	3,4E+05	Death (HCV relapse)
C2	M	52	5/17/13	Pulmonary Transplant	21	Tac, MMF, Pred 7,5 mg/d	BAL	Positive (2,5)	250	negative	5,0E+03	Favorable
C3	F	82	3/9/12	Rheumatoid Polyarthritis	/	MTX, Pred	BAL	negative	/	negative	6,0E+06	Favorable
C4	M	62	8/29/13	Non Hodgkin Lymphoma	/	/	BAL	Positive (3,12)	/	negative	2,1E+08	Favorable
C5	M	66	9/10/13	Non Hodgkin Lymphoma	/	RCHOP 02/13, Pred	BAL	negative	500	negative	1,2E+05	Favorable
C6	M	25	2/27/14	HIV	/	/	BAL	Positive (4,5)	200	positive	4,2E+08	Favorable
C7	F	1	4/9/14	Primary Immunodeficiency	/	/	BAL	negative	1200	positive	1,0E+07	Favorable
C8	M	56	4/19/14	HIV	/	/	BAL	Positive (3,7)	150	positive	4,3E+09	Favorable
C9	F	47	4/24/14	AML with GVHD on allograft	/	Pred	BAL	negative	100	positive	1,4E+06	Favorable
C10	M	74	7/1/14	Non Hodgkin Lymphoma	/	RCHOP 07/13	BAL	negative	100	positive	6,0E+08	Favorable
C11	M	77	9/4/14	MPN and NHL	/	Rituximab	BAL	negative	/	negative	1,2E+05	Favorable
C12	M	82	9/5/14	Non Hodgkin Lymphoma	/	RCHOP 07/13	BAL	Positive (2,8)	600	negative	5,8E+04	Favorable
C13	M	68	10/10/14	Glioblastoma	/	Temozolomide	BAL	Positive (3,0)	100	positive	1,7E+10	Favorable
C14	F	0,6	10/15/14	Primary Immunodeficiency	/	/	sputum	Positive (3,4)	/	negative	4,7E+06	Favorable
C15	F	75	10/23/14	B-Chronic Lymphoid Leukemia	/	Lenalidomide 10/14	BAL	Positive (3,9)	1000	negative	3,4E+04	Favorable
C16	F	82	12/5/14	B-Chronic Lymphoid Leukemia	/	Rituximab chloraminophène	BAL	negative	/	negative	1,1E+04	Favorable
C17	F	32	2/27/15	Hodgkin's disease	/	/	BAL	Positive (2,5)	90	negative	1,2E+04	Favorable
C18	M	50	2/28/15	Hodgkin's disease	/	ABVD	BAL	Positive (3,2)	80	negative	6,4E+03	Favorable
C19	M	78	3/18/15	B-Chronic Lymphoid Leukemia	/	/	BAL	negative	30	positive	6,0E+06	Favorable
C20	M	75	3/22/15	Non Hodgkin Lymphoma	/	Rituximab Bendamustine	BA	negative	/	negative	3,9E+04	Death

Table 1: Main clinical and paraclinical characteristics of the 12 SOT patients and 20 control patients

T1 to T12 represent the 12 SOT patients from the cluster; C1 to C20 represent the 20 control patients.

Ciclo : cyclosporine, Tac : tacrolimus, Aza : Azathioprime, Pred : Prednisone, Eve : Everolimus, MMF : mycophenolate mofetil, MTX : methotrexate, RCHOP : lymphoma protocol including rituximab and prednisone, ABVD : chemotherapy protocol including Doxorubicin and Bleomycin; BAL : Bronchoalveolar lavage fluids, BA :Bronchoaspiration ; NA : Not applicable, ND : Not done, / : inexistent or unspecified

PCR 1 : Specific Amplification

Locus	Primers	Amplicon size	Annealing temperature	pH	Mg2+(mM)	n Cycle
MIT26s	F : Universal tail- TTTTGCATAATGGGTCAGCA R : Universal tail-TCGGCGAATAGGATTTTCAC	732 bp	65°C	8,3	1,5	40
CYTB	F : Universal tail-CTCCCAGAATTCTCGTTTGG R : Universal tail-GTCCAAGCGTCACAAAAGGT	735 bp	65°C	8,3	1,5	30
SOD	F : Universal tail-CTTTCTCATGATTTGCTTGAGG R : Universal tail-CCTTTTGCTTCATTAGTCAAAAAATTA	761 bp	60°C	8,3	2,5	30

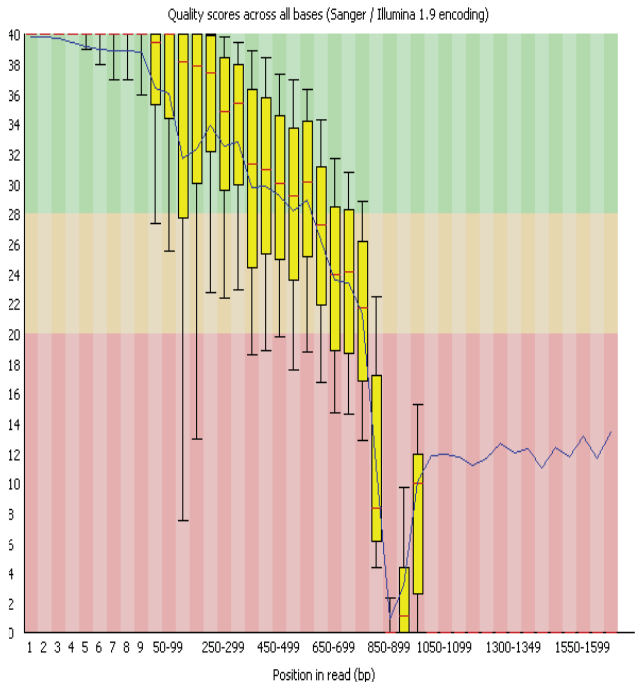
PCR 2 : Universal Amplification

Locus	Primers	Amplicon size	Tm	pH	Mg2+(mM)	n Cycle
MIT26S *CYTB* *SOD*	F : Primer(A)-Key-MID-Universal tail R : Primer(B)-Key-MID-Universal tail	~ 800 bp	65°C	9,2	3	40

Table 2 : PCR1 and PCR2 primers and amplification conditions.

Universal tail = M13 universal primer

RUN 1



RUN 2

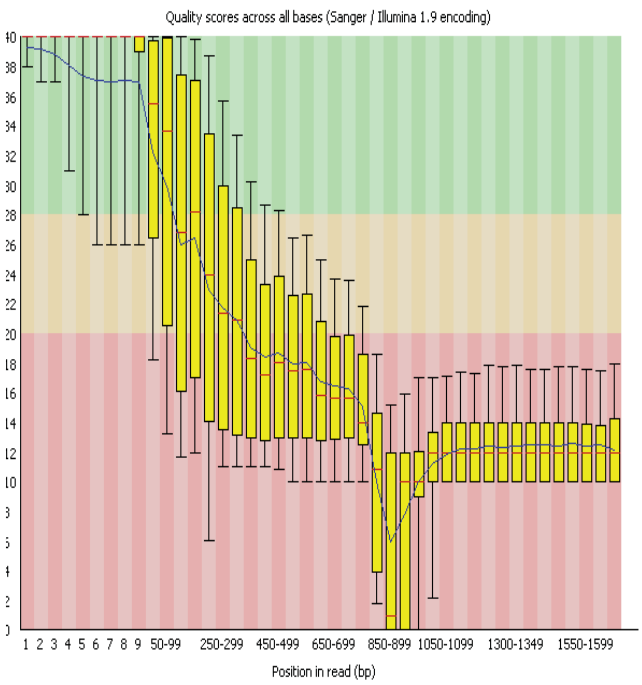


Figure 1: Phred score curves (Q-score curves) per base for Run 1 and Run 2.

Phred score or Q-score curves were obtained with FastQC software. They represent sequence quality, from the worst quality (Q score 0) to the best quality (Q score 40) depending on the position in read (bp). Red zone: phred score < 20 (Probability of error > 1%); Orange zone : phred score 20- 28 (probability of error 0.1-1%); green zone : phred score > 28 (Probability of error < 0.1%)

		MIT26S		*CYTB*		*SOD*	
Patient N°	Run	n	Genotype	n	Genotype	n	Genotype
T1	1	1413	B (100%)	531	1 (100%)	946	a (100%)
T2	1	1062	C (100%)	1361	2 (100%)	2506	a (100%)
T3	1 *SOD*, *MIT26S* 2 *CYTB*	638	N (89%), A (6%), K (2%), O (1,25%)	84	3 (100%)	491	b (100%)
T4	2	87	C (100%)	215	2 (100%)	204	a (100%)
T5	1	460	C (100%)	1030	2 (100%)	337	a (100%)
T6	2	42	E (100%)	237	2 (100%)	171	a (100%)
T7	T	546	C (100%)	1088	2 (100%)	303	b (93%),c (3%), a (2%), d (2%)
T8	1	606	C (98%),D (2%)	1136	2 (99%), 3(1%)	808	a (100%)
T9	2	194	C (100%)	160	2 (100%)	8	b (100%)
T10	1	415	C (100%)	1360	2 (100%)	898	a (100%)
T11	2	420	O (98%), A (1%), P (1%)	370	1 (96%), 2 (4%)	298	b (98%), a (1%), c (1%)
T12	1	658	F (67%), A (12%), N (7%), O (7%), U (3%), H (1%), B (1%), K(1%), C(1%)	809	3 (91%), 2 (4%), 6 (3%), 11 (2%)	781	a (100%)
C1	1	318	P (97%), I (2%), A (1%)	1046	3 (100%)	1268	a (100%)
C2	2	422	B (41%), A (24%), H (12%), F (8%), K (6%), N (5%), V (2%), O (2%)	339	3 (53%), 6 (23%), 11 (13%) , 1 (11%)	364	a (99%), c (1%)
C3	2	350	I (100%)	564	3 (100%)	1268	b (100%)
C4	2	292	N (99%),A (1%)	492	3 (100%)	427	b (100%)
C5	1	71	B (100%)	651	2 (100%)	880	b (100%)
C6	1	368	P (38%), L (16%), A (16%), B (14%), S (3%), I (3%), J (2%), N (2%), K (2%), E (2%), R (1%), W (1%)	473	3 (80%), 4 (15%), 6 (2%)	575	b (53%), c (17%), a (16%), d (14%)
C7	2	153	F (75%), A (25%)	103	3 (99%), 2 (1%)	54	a (65%), c (20%), d (7%), b (8%)
C8	1	383	I (42%), N (30%), A (16%), P (11%), O (1%)	697	3 (83%), 2 (17%)	653	b (87%), a (5%), c (4%), d (4%)
C9	2	148	F (99%), P (1%)	104	2 (63%), 3 (18%), 14 (16%), 4 (3%)	154	a (100%)
C10	1	934	F (96%), H (4%)	1146	2 (86%), 3 (6%), 9 (4%), 10 (3%), 14 (1%)	550	a (98%), d (1%), c(1%)
C11	2	229	B (82%), A (8%), L (8%), P (2%)	750	3 (90%), 2 (7%), 13 (3%)	119	b (97,5%), c (2,5%)
C12	2	580	G (91%), M (9%)	398	1 (100%)	509	a (100%)
C13	1	869	F (100%)	1998	3 (100%)	663	a (100%)
C14	1	901	B (72%), A (10%), K (7%), L (3%), I (2%), P (2%), J (2%), N (1%), D (1%)	1403	2 (100%)	411	b (100%)
C15	1	653	N (100%)	1664	3 (85%), 4 (15%)	5	a (100%)
C16	1	1275	F (100%)	1052	11 (100%)	591	a (100%)
C17	2	372	P (34%), F (24%), A (10%), E (13%), L (5%), H (5%), B (4%), Q (2%), I (2%), M (1%)	434	2 (90%), 3 (8%), 9 (2%)	361	b (100%)
C18	2	296	F (100%)	271	3 (100%)	15	b (70%), c (15%), a (15%)
C19	1	948	F (66%), H (34%)	795	1 (44%), 7 (40%), 6 (10%), 8 (6%)	494	a (100%)
C20	2	243	A (55%), P (16%), N (13%), I (13%), O (3%)	284	2 (63%),3 (8%), 12 (8%), 9 (6%), 10 (5%), 7 (4%) / 6 (3%), 5 (2%), 13 (1%)	240	b (98%), c (2%)

Table 3: Next Generation Sequencing haplotypes for *MT26S*, *CYTB* and *SOD*

T1 to T12 refer to the SOT patients from the cluster, C1 to C20 refer to control patients. n = number of reads analyzed for each locus, and for each patient. Columns corresponding to each loci: Capital letter, A to V: *MIT26S* locus haplotypes ; Numbers 1 to 14: *CYTB* locus haplotypes; lowercase: a to d: *SOD* locus haplotypes. Nucleotide polymorphisms associations corresponding to each haplotype are specified in Supplemental date (Table S1). (X%) corresponds to the relative proportion of each haplotype observed in the corresponding sample. Underlined haplotypes constitutes the major allele in the corresponding sample.

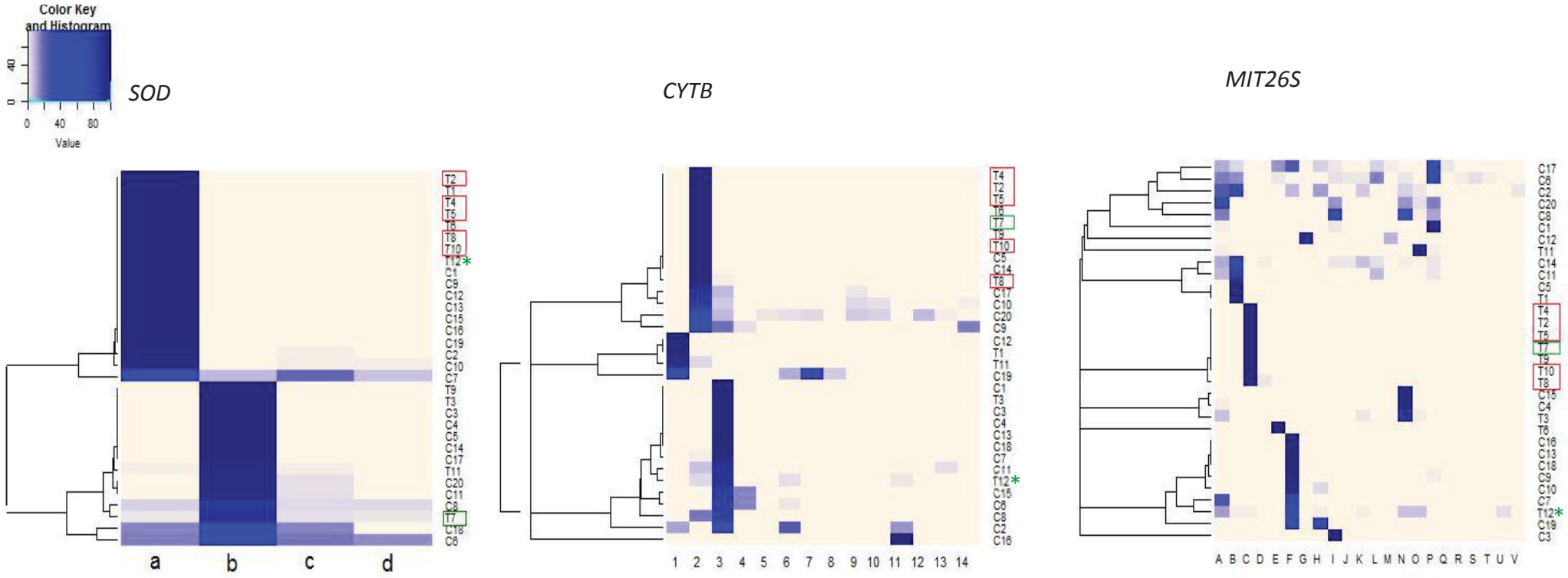


Figure 2: Heatmaps representing variants distribution for *MIT26S*, *CYTB* and *SOD.*

Each heatmap corresponds to variant distribution in each locus, with the variant proportion indicated by blue shades, as defined in the color key square. X-axis and Y-axis refer to the different haplotypes and patients, respectively. Strain clusterization is based on the nature of both major and minor haplotypes. Red-framed patients correspond to cluster patients sharing the common C2a haplotype. Green-framed patient is the patient containing C2a haplotype as minor variant (2%), and patient marked with green asterisk is the putative carrier of C2a strain as minor variant (1%).

Patient N°		*MIT26S*		*CYTB*		*SOD*	
		Sanger	NGS	Sanger	NGS	Sanger	NGS
T2	Haplotype	**C**	**C**	**2**	**2**	**a**	**a**
	Polymorphisms	–	–	–	–	–	–
T3	Haplotype	**A**	**A** + **N** (95%), **K** (2%), **O** (1,25%)	**3**	**3**	**b**	**b**
	Polymorphisms	–	13215 A : 1,25% (**O**), 13378 T : 2% (**K**)	–	–	–	–
T4	Haplotype	**C**	**C**	**2**	**2**	**a**	**a**
	Polymorphisms	–	–	–	–	–	–
T5	Haplotype	**C**	**C**	**2**	**2**	**a**	**a**
	Polymorphisms	–	–	–	–	–	–
T8	Haplotype	**C**	**C** (98%), **D** (2%)	**2**	**2** (99%), **3** (1%)	**a**	**a**
	Polymorphisms	–	13378 T : 2% (**D**)	–	838 C : 1% (**3**)	–	–
T10	Haplotype	**C**	**C**	**2**	**2**	**a**	**a**
	Polymorphisms	–	–	–	–	–	–
C6	Haplotype	**A/B/I/J?**	**P**+ **I** (41%), **L** +**J** (18%), **A** +**N** (18%), **B** + **K** (16%), **S** (3%), **E** (2%), **R** (1,0%), **W** (1%)	**3**	**3** (80%), **4** (15%), **6** (2%)	b	**b** (53%), **c** (17%), **d** (14%), **a** (16%)
	Polymorphisms	13215 : C/T 13378 : C/T	13215 C : 36% (**A** + **N** + **B** + **K** + **R** + **W**) 13378 T : 36% (**L** + **J** + **B** + **K** + **R** + **W**) 13543 T : 7% (**E** + **S** +**R** + **W**) 13554-13560 ATACG : 4% (**S** + **R**)	–	517 T : 2% (**6**) 566 T : 15% (**4**)	–	110 C : 30% (**a**,**d**) 219 T : 31% (**a**,**c**)
C7	Haplotype	**F**/**A**	**F** (75%), **A** (25%)	**3**	**3**(99%), **2**(1%)	a/b/c/d?	**a** (65%), **c** (20%), **d** (7%), **b** (8%)
	Polymorphisms	13215 : C/T	13215 C : 25% (**A**)	–	–	110 : C/T 219 : C/T	110 T : 28% (**b** + **c**) 219 C : 15% (**b** + **d**)
C9	Haplotype	F	**F** (99%), **P**(1%)	**2**	**2**(63%), **3**(18%),**14**(16%), **4**(3%)	a	a
	Polymorphisms	–	13215 T : 1% (**P**)	–	566 T : 16% (14) 838 C : 21% (3 + 4)	–	–
C10	Haplotype	F	**F** (96%), **H** (4%)	**2**	**2** (86%),**3** (6%), **9** (4%), **10** (3%), **14** (1%)	a	**a** (98%), **d** (1%), **c**(1%)
	Polymorphisms	–	13378 T : 4% (**H**)	–	348 G : 3% (**10**) 517 T : 4% (**9**) 566 T : 1% (**14**) 838 C : 6% (**3**)	–	110 T : 1% (**c**) 219 C : 1% (**d**)
C19	Haplotype	F/H	**F** (66%), **H** (34%)	**1**	**1** + **6** (54%), **7** + **8** (46%)	a	a
	Polymorphisms	13378 : C/T	13378 T : 34% (**H**)	–	348 G : 46% (**7** + **8**)	–	–

Table 4: Results of comparison between Sseq and NGS techniques in the typing of 11 samples

Haplotypes (blurred characters) and corresponding polymorphisms (nucleotides) obtained with both Sanger and NGS sequencing for six patients from cluster group (T2 to T10) and 5 patients from control group (C6 to C19). Columns corresponding to each loci: Capital letter, A to V: *MIT26S* locus haplotypes; Numbers 1 to 14: *CYTB* locus haplotypes; lowercase: a to d: *SOD* locus haplotypes. Nucleotide polymorphisms associations corresponding to each haplotype are specified in Supplemental date (Table S1).

(X%) corresponds to the relative proportion of genotype observed in the corresponding sample. 279 CYTB and 314 MIT polymorphisms could not be interpreted with Sanger sequencing because they were located too close to amplicons edges. Genotypes differing only by these nucleotides were gathered in NGS analysis. “x,y,z?” putative haplotypes.

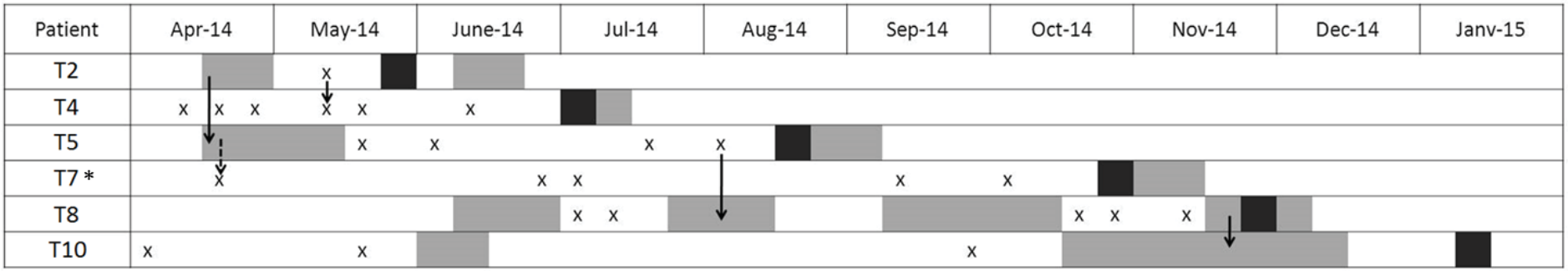


Figure 3: Transmission map for cluster patients sharing clonal C2a genotype

Grey rectangles: hospitalization periods > 1 day. Black squares: date of diagnosis and treatment initiation.

X: one day presence in the institution (emergency services, imaging, laboratory, consultations, day care)

→ **:** probable nosocomial transmission of *P. jirovecii*. **-->** : possible nosocomial transmission of *P. jirovecii*.

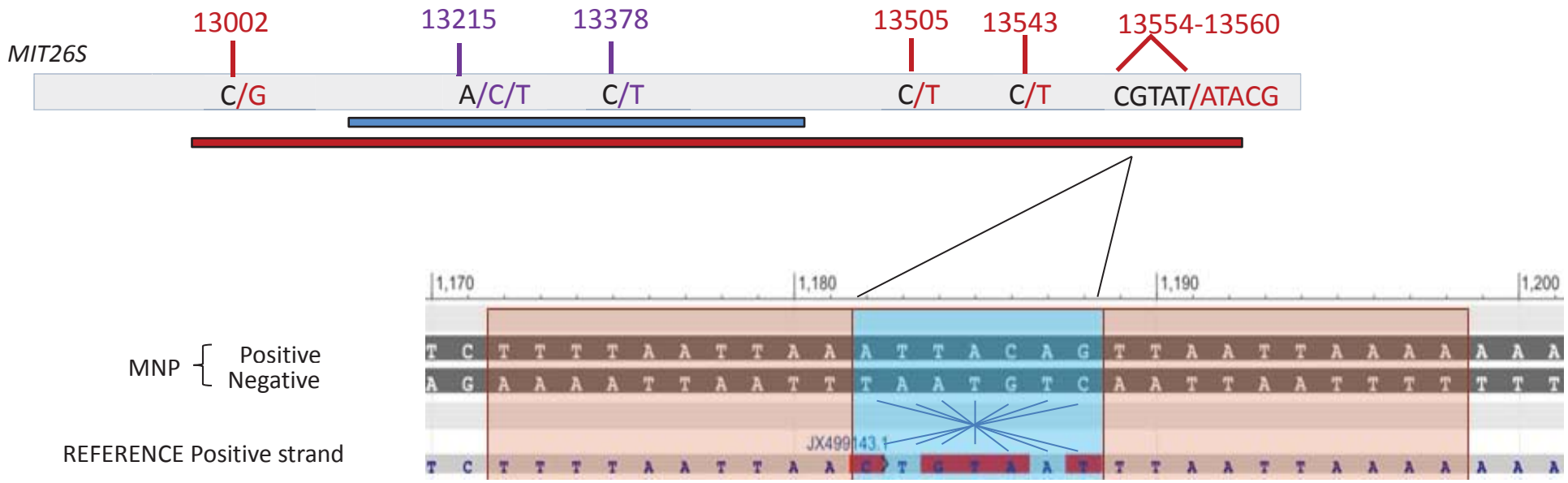


Figure 4: New polymorphisms described on *MIT26S* extended locus

Blue line: sequence corresponding to the amplification with classical primers. Red line: 732 bp sequence corresponding to the amplification with new primers.

Polymorphims are represented by bars, with their corresponding positions in mitochondrial genome and nucleotide variations. Purple-coloured polymorphisms and red coloured polymorphisms correspond to already described and newly described polymorphisms, respectively. Red zone on *MIT26S* sequence frame the inversed sequence fragment and blue zone indicates the MNP detected region.

Type of amplicons	*MIT26S*	*CYTB*	*SOD*	*MIT26S-CYTB*	*MIT26S-CYTB-SOD*
Short amplicons	4 genotypes D = 0,774	4 genotypes D = 0,684	2 genotypes D = 0,526	11 genotypes D = 0,937	17 genotypes D = 0,984
Maitte et Al (2013)	*H=0,751*	*D =0,794*	*D =0,57*	*D =0,957*	*D=0987*
Extended amplicons	9 genotypes D = 0,890	4 genotypes D = 0,684	2 genotypes D = 0,526	15 genotypes D = 0,963	18 genotypes D = 0,990

Table 5: Hunter Index (D) of *MIT26S*, *CYTB* and *SOD* loci with classical short amplicons and extended amplicons

SUPPLEMENTAL DATA

MIT26S

Haplotype	Polymorphisms									
	13002	13215	13378	13505	13543	13554	13556	13557	13558	13560
A	C	C	C	C	C	C	G	T	A	T
B	C	C	T	C	C	C	G	T	A	T
C	C	C	T	C	C	A	T	A	C	G
D	C	C	C	C	C	A	T	A	C	G
E	C	T	C	C	T	C	G	T	A	T
F	C	A	C	C	C	C	G	T	A	T
G	C	A	C	T	T	C	G	T	A	T
H	C	A	T	C	C	C	G	T	A	T
I	G	T	C	C	C	C	G	T	A	T
J	G	T	T	C	C	C	G	T	A	T
K	G	C	T	C	C	C	G	T	A	T
L	C	T	T	C	C	C	G	T	A	T
M	C	A	C	C	T	C	G	T	A	T
N	G	C	C	C	C	C	G	T	A	T
O	G	A	C	C	C	C	G	T	A	T
P	C	C	T	C	C	C	G	T	A	T
Q	C	C	C	C	T	G	T	A	T	T
R	C	C	T	C	T	A	T	A	C	G
S	C	T	C	C	T	A	T	A	C	G
T	C	C	T	T	C	C	G	T	A	T
U	C	A	C	C	C	A	T	A	C	G
V	G	A	T	C	C	C	G	T	A	T

CYTB

Haplotype	Polymorphisms												
	279	299	348	362	369	517	547	566	675	742	832	833	838
1	T	C	A	C	G	T	C	C	A	C	T	T	C
2	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	T	T	T
3	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	T	T	C
4	C	C	A	C	G	C	C	T	A	C	T	T	C
5	C	C	G	C	G	C	C	C	A	C	T	T	C
6	C	C	A	C	G	T	C	C	A	C	T	T	C
7	C	C	G	C	G	T	C	C	A	C	T	T	C
8	T	C	G	C	G	T	C	C	A	C	T	C	C
9	C	C	A	C	G	T	C	C	A	C	T	T	T
10	C	C	G	C	G	C	C	C	A	C	T	T	T
11	T	C	A	C	G	C	C	C	A	C	T	T	C
12	C	C	G	C	G	T	C	C	A	C	T	T	T
13	T	C	A	C	G	C	C	C	A	C	T	T	T
14	C	C	A	C	G	C	C	T	A	C	T	T	T

SOD

Haplotype	Polymorphisms		
	110	179	215
a	C	T	T
b	T	T	C
c	T	T	T
d	C	T	C

Table S1 : Polymorphisms association corresponding to each haplotypes for *MIT26S*, *CYTB* and *SOD* loci.

Polymorphism positions are indicated, according to their Genbank reference sequence (*CYTB* and *SOD*) or to the mitochondrial genome (*MIT26S*).

		MIT26S	
Patient N°	Run	n reads	Haplotype
C10	1	934	F (96%), H (4%)
	2	214	F (98%), H (2%)
C6	1	368	P (38%), A (16%), L (16%), B (14%), S (3%), I (3%), J (2%), N (2%), K (2%), E (2%), R (1,0%), W (1%)
	2	74	P (49%), A (18%), L (10%), N (7%), I (7%), J (3%), K (3%), C (1,5%), D (1,5%)
T7	1	546	C (100%)
	2	83	C (100%)

		CYTB		*SOD*	
Patient N°	Run	n reads	Haplotypes	n reads	Haplotype
C10	1	1146	2 (86%), 3 (6%), 9 (4%), 10 (3%), 14 (1%)	550	a (98%), d (1%), c (1%)
	2	64	2 (93%), 3 (4%), 9 (2%)	392	a (100%)
C6	1	473	3 (80%), 4 (15%), 6 (2%)	575	b (53%), c (17%), a (16%), d (14%)
	2	67	3 (77%), 4 (20%), 6 (2%), 2 (1%)	65	b (65%), c (13%), a (13%), d (7%)
T7	1	1088	2 (100%)	/	/
	2	59	2 (100%)	303	b (93%), c (3%), a (2%), d (2%)

Table S2: Reproducibility evaluation of the NGS for 3 patients.

Each patient was analysed twice, once in each run, with only extraction as common step. Underlined haplotype indicates the major haplotype (for mixed populations).

CONCLUSION

Le typage par Multilocus Sequence typing (MLST), basé sur l'analyse de séquences nucléotidiques, est à la fois précis et discriminant. Cette technique représente actuellement la méthode de référence pour la caractérisation de microorganismes. Néanmoins, le séquençage Sanger communément utilisé dans cette application, est peu adapté à la détection de variants minoritaires. Au cours d'une pneumocystose pulmonaire à *Pneumocystis jirovecii* (PCP) les co-infections à différentes souches sont fréquentes. Le séquençage nouvelle génération (NGS) qui permet de détecter aussi bien les souches majoritaires que les souches minoritaires, représente un outil d'intérêt pour définir plus précisément l'épidémiologie de *P. jirovecii,* notamment en cas d'épidémie de PCP.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'intérêt du typage MLST par NGS dans un contexte d'épidémie de PCP.

Trente-deux patients présentant une PCP au Centre Hospitalo-universitaire Grenoble-Alpes entre 2012 et 2015 ont été inclus dans l'étude : 12 cas groupés chez des transplantés d'organe solide (TOS) et 20 patients contrôle. Une stratégie de typage MLST basée sur le séquençage de trois loci (*SOD*, *MIT26s* et *CYTb*) a été utilisée. Pour les 32 prélèvements, les amplicons cibles ont été séquencés par NGS (trousse GS+ -Roche Diagnostics) et pour 12 un séquençage Sanger a également été réalisé.

Parmi les 12 patients TOS, 5 partageaient un même génotype majoritaire (C2a). Ce génotype était également retrouvé en tant que souche minoritaire chez deux autres patients TOS. Une carte de transmission a confirmé une probable acquisition nosocomiale de *P. jirovecii*. Sur les 32 échantillons, 65% présentaient des populations mixtes et 53% contenaient plus de 2 souches de *P. jirovecii*. Parallèlement, cinq nouveaux polymorphismes du gène *MIT26s* ont été mis en évidence. Comparé aux polymorphismes préalablement décrits, ces nouvelles mutations augmentent significativement l'index de discrimination du locus *MIT26s.*

Ce travail a permis de mettre en évidence, pour la première fois dans un contexte épidémique de PCP, la plus-value du typage MLST par NGS, comparé à la technique classique de Sanger. Des études futures, incluant notamment des isolats séquentiels, permettraient de préciser la dynamique des souches de *P. jirovecii* au cours de l'infection.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 9/11/16

LE DOYEN

Pour la Présidente
et par délégation
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SEVE

Pr. Michel SEVE

LA PRESIDENTE DE LA THESE

Pr. M. Cornet

Bibliographie

1. Roux A, Canet E, Valade S, Gangneux-Robert F, Hamane S, Lafabrie A, et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with or without AIDS, France. Emerg Infect Dis. 2014 Sep;20(9):1490–7.

2. Thomas S, Vivancos R, Corless C, Wood G, Beeching NJ, Beadsworth MBJ. Increasing frequency of Pneumocystis jirovecii pneumonia in renal transplant recipients in the United Kingdom: clonal variability, clusters, and geographic location. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2011 Aug 1;53(3):307–8.

3. de Boer MGJ, de Fijter JW, Kroon FP. Outbreaks and clustering of Pneumocystis pneumonia in kidney transplant recipients: a systematic review. Med Mycol. 2011 Oct;49(7):673–80.

4. Yiannakis EP, Boswell TC. Systematic review of outbreaks of Pneumocystis jirovecii pneumonia: evidence that P. jirovecii is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control. J Hosp Infect. 2016 May;93(1):1–8.

5. Thomas CF, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of Pneumocystis pneumonia. Nat Rev Microbiol. 2007 Apr;5(4):298–308.

6. Hauser PM, Blanc DS, Sudre P, Senggen Manoloff E, Nahimana A, Bille J, et al. Genetic diversity of Pneumocystis carinii in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. AIDS Lond Engl. 2001 Mar 9;15(4):461–6.

7. Höcker B, Wendt C, Nahimana A, Tönshoff B, Hauser PM. Molecular evidence of Pneumocystis transmission in pediatric transplant unit. Emerg Infect Dis. 2005 Feb;11(2):330–2.

8. Le Gal S, Blanchet D, Damiani C, Guéguen P, Virmaux M, Abboud P, et al. AIDS-related Pneumocystis jirovecii genotypes in French Guiana. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. 2015 Jan;29:60–7.

9. Alanio A, Gits-Muselli M, Mercier-Delarue S, Dromer F, Bretagne S. Diversity of Pneumocystis jirovecii during Infection Revealed by Ultra-Deep Pyrosequencing. Front Microbiol [Internet]. 2016 May 24 [cited 2016 Jun 2];7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4877386/

10. Gits-Muselli M, Peraldi M-N, de Castro N, Delcey V, Menotti J, Guigue N, et al. New Short Tandem Repeat-Based Molecular Typing Method for Pneumocystis jirovecii Reveals Intrahospital Transmission between Patients from Different Wards. PloS One. 2015;10(5):e0125763.

11. Rabodonirina M, Vanhems P, Couray-Targe S, Gillibert R-P, Ganne C, Nizard N, et al. Molecular evidence of interhuman transmission of Pneumocystis pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. Emerg Infect Dis. 2004 Oct;10(10):1766–73.

12. Parobek CM, Jiang LY, Patel JC, Alvarez-Martínez MJ, Miro JM, Worodria W, et al. Multilocus

microsatellite genotyping array for investigation of genetic epidemiology of Pneumocystis jirovecii. J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1391–9.

13. Chen X, Zou X, He J, Zheng J, Chiarella J, Kozal MJ. HIV Drug Resistance Mutations (DRMs) Detected by Deep Sequencing in Virologic Failure Subjects on Therapy from Hunan Province, China. PloS One. 2016;11(2):e0149215.

14. Cunningham EB, Applegate TL, Lloyd AR, Dore GJ, Grebely J. Mixed HCV infection and reinfection in people who inject drugs--impact on therapy. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015 Apr;12(4):218–30.

15. Gregori J, Esteban JI, Cubero M, Garcia-Cehic D, Perales C, Casillas R, et al. Ultra-deep pyrosequencing (UDPS) data treatment to study amplicon HCV minor variants. PloS One. 2013;8(12):e83361.

16. Cissé OH, Pagni M, Hauser PM. Comparative genomics suggests that the human pathogenic fungus Pneumocystis jirovecii acquired obligate biotrophy through gene loss. Genome Biol Evol. 2014 Aug;6(8):1938–48.

17. Ma L, Chen Z, Huang DW, Kutty G, Ishihara M, Wang H, et al. Genome analysis of three Pneumocystis species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. Nat Commun [Internet]. 2016 Feb 22 [cited 2016 Apr 9];7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4764891/

18. Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG, Haidaris PJ. Pneumocystis carinii is not universally transmissible between mammalian species. Infect Immun. 1993 Jul;61(7):2886–90.

19. Chagas C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909 Aug;1(2):159–218.

20. Carini A. Formas de eschizogonia do Trypanosoma lewisi. Soc De Med et Chir de Sao Paulo 13 aou 1910. Bol Soc Med E Cir Sao Paulo. 1910;18:204.

21. Delanoë P, Delanoë M. Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le Trypanosoma lewisi. CR Acad Sci Paris. 1912;155:658–60.

22. Vavra J, Kucera K. Pneumocystis carinii delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. J Protozool. 1970 Aug;17(3):463–83.

23. Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows Pneumocystis carinii to be a member of the fungi. Nature. 1988 Aug 11;334(6182):519–22.

24. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A New Name for Pneumocystis from Humans and New Perspectives on the Host-Pathogen Relationship. Emerg Infect Dis. 2002 Sep;8(9):891–6.

25. Aliouat-Denis C-M, Martinez A, Aliouat EM, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas E. The Pneumocystis life cycle. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 May;104(3):419–26.

26. Itatani CA, Marshall GJ. Ultrastructural Morphology and Staining Characteristics of Pneumocystis carinii In situ and from Bronchoalveolar Lavage. J Parasitol. 1988;74(4):700–12.

27. Cushion MT, Keely SP. Assembly and Annotation of Pneumocystis jirovecii from the Human Lung Microbiome. mBio [Internet]. 2013 Apr 16 [cited 2016 May 17];4(2). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3634608/

28. Cushion MT, Smulian AG. The pneumocystis genome project: update and issues. J Eukaryot Microbiol. 2001;Suppl:182S – 183S.

29. Beck JM, Cushion MT. Pneumocystis Workshop: 10th Anniversary Summary. Eukaryot Cell. 2009 Apr;8(4):446–60.

30. Cissé OH, Pagni M, Hauser PM. De novo assembly of the Pneumocystis jirovecii genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. mBio. 2012;4(1):e00428–00412.

31. Ma L, Huang D-W, Cuomo CA, Sykes S, Fantoni G, Das B, et al. Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three Pneumocystis species provide new insights into divergence between human and rodent Pneumocystis. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2013 May;27(5):1962–72.

32. VANEK J, JÍROVEC O. Parasitic Pneumonia. “Interstitial” Plasma-Cell Pneumonia due to Pneumocystis carinii in Little Cbildren. Zentralblatt Bakteriol Parasitenkd Infekt Hyg. 1952 May 12;158(2):120–7.

33. Bruce ES, Kearsley-Fleet L, Watson KD, Symmons DPM, Hyrich KL. Risk of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with inhibitors of tumour necrosis factor α: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis. Rheumatology. 2016 Apr 26;kew200.

34. Chen M, Tian X, Qin F, Zhou J, Liu J, Wang M, et al. Pneumocystis Pneumonia in Patients with Autoimmune Diseases: A Retrospective Study Focused on Clinical Characteristics and Prognostic Factors Related to Death. PloS One. 2015;10(9):e0139144.

35. Morris A, Norris KA. Colonization by Pneumocystis jirovecii and its role in disease. Clin Microbiol Rev. 2012 Apr;25(2):297–317.

36. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. Pneumocystis carinii f. sp. hominis DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with P. carinii pneumonia. J Clin Microbiol. 2001 Nov;39(11):3877–82.

37. 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. 2001 Mar 15;32(6):855–61.

38. Cushion MT, Linke MJ, Ashbaugh A, Sesterhenn T, Collins MS, Lynch K, et al. Echinocandin Treatment of Pneumocystis Pneumonia in Rodent Models Depletes Cysts Leaving Trophic Burdens That Cannot Transmit the Infection. PLOS ONE. 2010 Jan 29;5(1):e8524.

39. Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet J-C, Nevez G, Garin YJF, et al. Quantification and spread of

Pneumocystis jirovecii in the surrounding air of patients with Pneumocystis pneumonia. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2010 Aug 1;51(3):259–65.

40. Gianella S, Haeberli L, Joos B, Ledergerber B, Wüthrich R p., Weber R, et al. Molecular evidence of interhuman transmission in an outbreak of Pneumocystis jirovecii pneumonia among renal transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2010 Feb 1;12(1):1–10.

41. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, et al. Genetic variation in Pneumocystis carinii isolates from different geographic regions: implications for transmission. Emerg Infect Dis. 2000 Jun;6(3):265–72.

42. Montes-Cano MA, Chabe M, Fontillon-Alberdi M, de-Lahorra C, Respaldiza N, Medrano FJ, et al. Vertical transmission of Pneumocystis jirovecii in humans. Emerg Infect Dis. 2009 Jan;15(1):125–7.

43. Hong ST, Park YK, Kim J, Kim DH, Yun CK. Is Pneumocystis carinii vertically transmitted to neonatal rats? Korean J Parasitol. 1999 Sep;37(3):149–56.

44. Thomas CF, Limper AH. Pneumocystis pneumonia. N Engl J Med. 2004 Jun 10;350(24):2487–98.

45. Kovacs JA, Masur H. Evolving health effects of Pneumocystis: one hundred years of progress in diagnosis and treatment. JAMA. 2009 Jun 24;301(24):2578–85.

46. Flori P, Bellete B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing Pneumocystis jiroveci pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol. 2004 Jul;53(Pt 7):603–7.

47. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev. 2014 Jul;27(3):490–526.

48. Chumpitazi BFF, Flori P, Kern J-B, Brenier-Pinchart M-P, Hincky-Vitrat V, Brion J-P, et al. Characteristics and clinical relevance of the quantitative touch-down major surface glycoprotein polymerase chain reaction in the diagnosis of Pneumocystis pneumonia. Med Mycol. 2011 Oct;49(7):704–13.

49. Maillet M, Maubon D, Brion JP, François P, Molina L, Stahl JP, et al. Pneumocystis jirovecii (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2014 Mar;33(3):331–6.

50. Karageorgopoulos DE, Qu J-M, Korbila IP, Zhu Y-G, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Jan;19(1):39–49.

51. Martin SI, Fishman JA, AST Infectious Diseases Community of Practice. Pneumocystis pneumonia in solid organ transplantation. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2013 Mar;13 Suppl 4:272–9.

52. Ma L, Borio L, Masur H, Kovacs JA. Pneumocystis carinii dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole

or dapsone use. J Infect Dis. 1999 Dec;180(6):1969–78.

53. Nahimana A, Rabodonirina M, Helweg-Larsen J, Meneau I, Francioli P, Bille J, et al. Sulfa resistance and dihydropteroate synthase mutants in recurrent Pneumocystis carinii pneumonia. Emerg Infect Dis. 2003 Jul;9(7):864–7.

54. Ewald H, Raatz H, Boscacci R, Furrer H, Bucher HC, Briel M. Adjunctive corticosteroids for Pneumocystis jiroveci pneumonia in patients with HIV infection. Cochrane Database Syst Rev. 2015;(4):CD006150.

55. Utili R, Durante-Mangoni E, Basilico C, Mattei A, Ragone E, Grossi P. Efficacy of caspofungin addition to trimethoprim-sulfamethoxazole treatment for severe pneumocystis pneumonia in solid organ transplant recipients. Transplantation. 2007 Sep 27;84(6):685–8.

56. Stern A, Green H, Paul M, Vidal L, Leibovici L. Prophylaxis for Pneumocystis pneumonia (PCP) in non-HIV immunocompromised patients. Cochrane Database Syst Rev. 2014;(10):CD005590.

57. Phipps LM, Chen SC-A, Kable K, Halliday CL, Firacative C, Meyer W, et al. Nosocomial Pneumocystis jirovecii pneumonia: lessons from a cluster in kidney transplant recipients. Transplantation. 2011 Dec 27;92(12):1327–34.

58. Desenclos J-C, Vaillant V, Delarocque Astagneau E, Campèse C, Che D, Coignard B, et al. [Principles of an outbreak investigation in public health practice]. Médecine Mal Infect. 2007 Feb;37(2):77–94.

59. Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, et al. An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. N Engl J Med. 1981 Dec 10;305(24):1431–8.

60. Follansbee SE, Busch DF, Wofsy CB, Coleman DL, Gullet J, Aurigemma GP, et al. An outbreak of Pneumocystis carinii pneumonia in homosexual men. Ann Intern Med. 1982 Jun;96(6 Pt 1):705–13.

61. Lozada F, Silverman S, Conant M. New outbreak of oral tumors, malignancies and infectious diseases strikes young male homosexuals. CDA J Calif Dent Assoc. 1982 Mar;10(3):39–42.

62. SINGER C, ARMSTRONG D, ROSEN PP, SCHOTTENFELD D. Pneumocystis carinii Pneumonia: A Cluster of Eleven Cases. Ann Intern Med. 1975 Jun 1;82(6):772–7.

63. Ruebush TK, Weinstein RA, Baehner RL, Wolff D, Bartlett M, Gonzles-Crussi F, et al. An outbreak of pneumocystis pneumonia in children with acute lymphocytic leukemia. Am J Dis Child 1960. 1978 Feb;132(2):143–8.

64. Bensousan T, Garo B, Islam S, Bourbigot B, Cledes J, Gale M. Possible transfer of Pneumocystis carinii between kidney transplant recipients. The Lancet. 1990 Oct 27;336(8722):1066–7.

65. Boer MGJ de, Fijter JW de, Kroon FP. Outbreaks and clustering of Pneumocystis pneumonia in kidney transplant recipients: a systematic review. Med Mycol. 2011 Jan 10;49(7):673–80.

66. Yiannakis EP, Boswell TC. Systematic review of outbreaks of Pneumocystis jirovecii pneumonia: evidence that P. jirovecii is a transmissible organism and the implications for

healthcare infection control. J Hosp Infect. 2016 May;93(1):1–8.

67. Jairam A, Dassi M, Chandola P, Lall M, Mukherjee D, Hooda AK. Pneumocystis jiroveci outbreak in a renal transplant center: Lessons learnt. Indian J Nephrol. 2014 Sep;24(5):276–9.

68. Helweg-Larsen J, Tsolaki AG, Miller RF, Lundgren B, Wakefield AE. Clusters of Pneumocystis carinii pneumonia: analysis of person-to-person transmission by genotyping. QJM. 1998 Dec 1;91(12):813–20.

69. Latouche S, Poirot JL, Maury E, Bertrand V, Roux P. Pneumocystis carinii hominis sequencing to study hypothetical person-to-person transmission. AIDS Lond Engl. 1997 Mar 15;11(4):549.

70. Mori S, Cho I, Sugimoto M. A cluster of Pneumocystis jirovecii infection among outpatients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2010 Jul;37(7):1547–8.

71. Olsson M, Eriksson BM, Elvin K, Strandberg M, Wahlgren M. Genotypes of clustered cases of Pneumocystis carinii pneumonia. Scand J Infect Dis. 2001;33(4):285–9.

72. Rabodonirina M, Vanhems P, Couray-Targe S, Gillibert R-P, Ganne C, Nizard N, et al. Molecular evidence of interhuman transmission of Pneumocystis pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. Emerg Infect Dis. 2004 Oct;10(10):1766–73.

73. Höcker B, Wendt C, Nahimana A, Tönshoff B, Hauser PM. Molecular evidence of Pneumocystis transmission in pediatric transplant unit. Emerg Infect Dis. 2005 Feb;11(2):330–2.

74. Boer MGJ de, Coppenraet LESB van, Gaasbeek A, Berger SP, Gelinck LBS, Houwelingen HC van, et al. An Outbreak of Pneumocystis jiroveci Pneumonia with 1 Predominant Genotype among Renal Transplant Recipients: Interhuman Transmission or a Common Environmental Source? Clin Infect Dis. 2007 Jan 5;44(9):1143–9.

75. Schmoldt S, Schuhegger R, Wendler T, Huber I, Söllner H, Hogardt M, et al. Molecular Evidence of Nosocomial Pneumocystis jirovecii Transmission among 16 Patients after Kidney Transplantation. J Clin Microbiol. 2008 Mar;46(3):966–71.

76. Yazaki H, Goto N, Uchida K, Kobayashi T, Gatanaga H, Oka S. Outbreak of Pneumocystis jiroveci pneumonia in renal transplant recipients: P. jiroveci is contagious to the susceptible host. Transplantation. 2009 Aug 15;88(3):380–5.

77. Wynckel A, Toubas D, Noël N, Toupance O, Rieu P. Outbreak of pneumocystis pneumonia occurring in late post-transplantation period. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2011 Jul;26(7):2417; author reply 2418.

78. Thomas S, Vivancos R, Corless C, Wood G, Beeching NJ, Beadsworth MBJ. Increasing frequency of Pneumocystis jirovecii pneumonia in renal transplant recipients in the United Kingdom: clonal variability, clusters, and geographic location. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2011 Aug 1;53(3):307–8.

79. Le Gal S, Damiani C, Rouillé A, Grall A, Tréguer L, Virmaux M, et al. A cluster of Pneumocystis infections among renal transplant recipients: molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of Pneumocystis jirovecii. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc

Am. 2012 Apr;54(7):e62–71.

80. Sassi M, Ripamonti C, Mueller NJ, Yazaki H, Kutty G, Ma L, et al. Outbreaks of Pneumocystis Pneumonia in 2 Renal Transplant Centers Linked to a Single Strain of Pneumocystis: Implications for Transmission and Virulence. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2012 May 15;54(10):1437–44.

81. Rostved AA, Sassi M, Kurtzhals JAL, Sørensen SS, Rasmussen A, Ross C, et al. Outbreak of pneumocystis pneumonia in renal and liver transplant patients caused by genotypically distinct strains of Pneumocystis jirovecii. Transplantation. 2013 Nov 15;96(9):834–42.

82. Nankivell BJ, Firacative C, Kable K, Chen SC-A, Meyer W. Molecular epidemiology linking multihospital clusters of opportunistic Pneumocystis jirovecii pneumonia. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2013 Oct;57(7):1058–9.

83. Desoubeaux G, Dominique M, Morio F, Thepault R-A, Franck-Martel C, Tellier A-C, et al. Epidemiological Outbreaks of Pneumocystis jirovecii Pneumonia Are Not Limited to Kidney Transplant Recipients: Genotyping Confirms Common Source of Transmission in a Liver Transplantation Unit. J Clin Microbiol. 2016 May;54(5):1314–20.

84. Urabe N, Ishii Y, Hyodo Y, Aoki K, Yoshizawa S, Saga T, et al. Molecular epidemiologic analysis of a Pneumocystis pneumonia outbreak among renal transplant patients. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2016 Apr;22(4):365–71.

85. Mulpuru S, Knoll G, Weir C, Desjardins M, Johnson D, Gorn I, et al. Pneumocystis pneumonia outbreak among renal transplant recipients at a North American transplant center: Risk factors and implications for infection control. Am J Infect Control. 2016 Apr 1;44(4):425–31.

86. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988 Nov;26(11):2465–6.

87. Maitte C, Leterrier M, Le Pape P, Miegeville M, Morio F. Multilocus sequence typing of Pneumocystis jirovecii from clinical samples: how many and which loci should be used? J Clin Microbiol. 2013 Sep;51(9):2843–9.

88. Hauser PM, Francioli P, Bille J, Telenti A, Blanc DS. Typing of Pneumocystis carinii f. sp. hominis by single-strand conformation polymorphism of four genomic regions. J Clin Microbiol. 1997 Dec;35(12):3086–91.

89. Hauser PM, Blanc DS, Sudre P, Senggen Manoloff E, Nahimana A, Bille J, et al. Genetic diversity of Pneumocystis carinii in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. AIDS Lond Engl. 2001 Mar 9;15(4):461–6.

90. Nahimana A, Blanc DS, Francioli P, Bille J, Hauser PM. Typing of Pneumocystis carinii f. sp. hominis by PCR-SSCP to indicate a high frequency of co-infections. J Med Microbiol. 2000 Aug;49(8):753–8.

91. Costa MC, Gaspar J, Ribeiro C, Antunes F, Matos O. Dihydropteroate synthase (DHPS) genotyping by PCR-RFLP analysis of Pneumocystis jirovecii repeated isolates from HIV-infected patients: a preliminary study. J Eukaryot Microbiol. 2003;50 Suppl:607–8.

92. Montes-Cano MA, de la Horra C, Martin-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, et al. Pneumocystis jiroveci genotypes in the Spanish population. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2004 Jul 1;39(1):123–8.

93. Monroy-Vaca EX, de Armas Y, Illnait-Zaragozí MT, Toraño G, Diaz R, Vega D, et al. Prevalence and genotype distribution of Pneumocystis jirovecii in Cuban infants and toddlers with whooping cough. J Clin Microbiol. 2014 Jan;52(1):45–51.

94. Kutty G, Maldarelli F, Achaz G, Kovacs JA. Variation in the major surface glycoprotein genes in Pneumocystis jirovecii. J Infect Dis. 2008 Sep 1;198(5):741–9.

95. Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G, Huang L, Schuhegger R, Sing A, et al. Restriction fragment length polymorphism typing demonstrates substantial diversity among Pneumocystis jirovecii isolates. J Infect Dis. 2009 Nov 15;200(10):1616–22.

96. Skalski JH, Kottom TJ, Limper AH. Pathobiology of Pneumocystis pneumonia: life cycle, cell wall and cell signal transduction. FEMS Yeast Res. 2015 Sep;15(6).

97. Ma L, Kutty G, Jia Q, Imamichi H, Huang L, Atzori C, et al. Analysis of variation in tandem repeats in the intron of the major surface glycoprotein expression site of the human form of Pneumocystis carinii. J Infect Dis. 2002 Dec 1;186(11):1647–54.

98. Parobek CM, Jiang LY, Patel JC, Alvarez-Martínez MJ, Miro JM, Worodria W, et al. Multilocus microsatellite genotyping array for investigation of genetic epidemiology of Pneumocystis jirovecii. J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1391–9.

99. Gits-Muselli M, Peraldi M-N, de Castro N, Delcey V, Menotti J, Guigue N, et al. New Short Tandem Repeat-Based Molecular Typing Method for Pneumocystis jirovecii Reveals Intrahospital Transmission between Patients from Different Wards. PloS One. 2015;10(5):e0125763.

100. Esteves F, de Sousa B, Calderón EJ, Huang L, Badura R, Maltez F, et al. Multicentre study highlighting clinical relevance of new high-throughput methodologies in molecular epidemiology of Pneumocystis jirovecii pneumonia. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2016 Mar 26;

101. Alanio A, Olivi M, Cabaret O, Foulet F, Bellanger A-P, Millon L, et al. Correlation Between Pneumocystis jirovecii Mitochondrial Genotypes and High and Low Fungal Loads Assessed by Single Nucleotide Primer Extension Assay and Quantitative Real-Time PCR. J Eukaryot Microbiol. 2015 May 4;

102. Beser J, Hagblom P, Fernandez V. Frequent in vitro recombination in internal transcribed spacers 1 and 2 during genotyping of Pneumocystis jirovecii. J Clin Microbiol. 2007 Mar;45(3):881–6.

103. Balmer O, Tanner M. Prevalence and implications of multiple-strain infections. Lancet Infect Dis. 2011 Nov;11(11):868–78.

104. Sun L, Huang M, Wang J, Xue F, Hong C, Guo Z, et al. Genotyping of Pneumocystis jirovecii isolates from human immunodeficiency virus-negative patients in China. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. 2015 Apr;31:209–15.

105. Le Gal S, Blanchet D, Damiani C, Guéguen P, Virmaux M, Abboud P, et al. AIDS-related Pneumocystis jirovecii genotypes in French Guiana. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. 2015 Jan;29:60–7.

106. Helweg-Larsen J, Lundgren B, Lundgren JD. Heterogeneity and compartmentalization of Pneumocystis carinii f. sp. hominis genotypes in autopsy lungs. J Clin Microbiol. 2001 Oct;39(10):3789–92.

107. Cushion MT, Orr S, Keely SP, Stringer JR. Time between inoculations and karyotype forms of Pneumocystis carinii f. sp. Carinii influence outcome of experimental coinfections in rats. Infect Immun. 2001 Jan;69(1):97–107.

108. Jackson BR, Tarr C, Strain E, Jackson KA, Conrad A, Carleton H, et al. Implementation of Nationwide Real-time Whole-genome Sequencing to Enhance Listeriosis Outbreak Detection and Investigation. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2016 Apr 18;

109. Chen X, Zou X, He J, Zheng J, Chiarella J, Kozal MJ. HIV Drug Resistance Mutations (DRMs) Detected by Deep Sequencing in Virologic Failure Subjects on Therapy from Hunan Province, China. PloS One. 2016;11(2):e0149215.

110. Chen Y, Frazzitta AE, Litvintseva AP, Fang C, Mitchell TG, Springer DJ, et al. Next generation multilocus sequence typing (NGMLST) and the analytical software program MLSTEZ enable efficient, cost-effective, high-throughput, multilocus sequencing typing. Fungal Genet Biol FG B. 2015 Feb;75:64–71.

111. Mello FCA, Lago BV, Lewis-Ximenez LL, Fernandes CA, Gomes SA. Detection of mixed populations of wild-type and YMDD hepatitis B variants by pyrosequencing in acutely and chronically infected patients. BMC Microbiol. 2012;12:96.

112. Liang B, Luo M, Scott-Herridge J, Semeniuk C, Mendoza M, Capina R, et al. A Comparison of Parallel Pyrosequencing and Sanger Clone-Based Sequencing and Its Impact on the Characterization of the Genetic Diversity of HIV-1. PLOS ONE. 2011 Oct 21;6(10):e26745.

Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes.



Serment de Galien

« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

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

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».