



HAL
open science

Dynamique de la colonisation par *Pneumocystis jirovecii*: intérêt du génotypage par méthode de MLST

Justine Crestia

► **To cite this version:**

Justine Crestia. Dynamique de la colonisation par *Pneumocystis jirovecii*: intérêt du génotypage par méthode de MLST. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03635423

HAL Id: dumas-03635423

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03635423v1>

Submitted on 8 Apr 2022

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

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



UFR de Pharmacie - Année 2020-2021

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

Présentée et soutenue publiquement le 18 octobre 2021

Par Justine CRESTIA

**Dynamique de la colonisation par *Pneumocystis jirovecii* -
Intérêt du génotypage par méthode de MLST**

Présidente du jury & directrice de thèse :

Mme. Anne TOTET, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Membres du jury :

M. Gilles DUVERLIE, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

M. Gilles NEVEZ, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Mme. Céline DAMIANI, Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

M. Yohann LE GOVIC, Praticien Hospitalier

Remerciements

A madame le Professeur Anne TOTET

Merci d'avoir accepté de m'encadrer pour cette thèse. Je vous remercie d'autant plus pour votre disponibilité tout au long de ce travail, votre patience et vos mots tant rassurants.

A monsieur le Professeur Gilles NEVEZ

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de juger ce travail et de faire le déplacement depuis Brest pour la soutenance. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

A monsieur le Professeur Gilles DUVERLIE

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez recevoir l'expression de mes respectueuses considérations.

A madame le Docteur Céline DAMIANI

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également pour ta bienveillance lors de ces deux semestres en parasitologie/mycologie.

A monsieur le Docteur Yohann LE GOVIC

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également pour ta disponibilité et tes précieux conseils. *(Sache que je reste disponible pour un éventuel CNR alpaga.)*

A l'ensemble des techniciens de virologie et d'onco-biologie moléculaire

Merci pour votre aide et vos conseils lors de mes manipulations en PCR.

A l'ensemble de l'équipe de parasitologie-mycologie

Merci pour votre accueil !

Au Docteur Tayeb CHOUAKI. Merci pour tout ce que tu m'as appris dans cette bonne humeur quotidienne.

Aux techniciens, Laure et Jean Marc, merci pour vos conseils et votre amitié, ainsi que Sophie, Agathe et Delphine. « Du coup, café ? »

A ma famille

Mapa, merci d'avoir soutenu votre petite fille qui rêvait d'être pharmacienne. Mon frère, Théo, à jamais ton gâteau bonheur. Je vous aime.

A mes amis et co-internes

A la meilleure des amies, Pauline, merci pour ton soutien indéfectible. A Coline, merci d'être toujours présente malgré la distance. Je vous aime les Canons.

Yel et Ophélie, merci pour ces kiffances de voyage.

Geoff, mon co-président à jamais, merci pour ton accueil si chaleureux à Amiens.

Antonine et Leslie merci pour cette deuxième maison.

Nawal, merci pour ces fous rires dans cette belle colloc du thé.

Mon petit alpaga Tasnim, merci d'être toi, ne change rien.

Flo, Alan et Elodie, mes co-internes avec qui tout commença.

Victor, Eric et Vincent, merci pour votre anormalité.

Table des matières

Remerciements	1
Table des abréviations	5
Index des figures	6
Index des tableaux	7
I. <i>Pneumocystis jirovecii</i>	9
1. L'agent pathogène	9
2. Cycle.....	10
3. Physiopathologie	11
4. Réservoir et transmission	12
5. Les différentes formes d'infections à <i>Pneumocystis</i>	13
a) La pneumonie à <i>Pneumocystis</i>	13
b) La colonisation	16
II. Le génotypage de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	17
1. Index de discrimination	17
2. Les méthodes de génotypage.....	17
III. Etude	20
1. Objectifs	20
2. Matériels & Méthodes	21
a) Patients et échantillons	21
b) Loci.....	22
c) Etapes de l'analyse	22
d) Identification des allèles	24
3. Résultats	26
a) Patients et échantillons	26
b) Polymorphismes nucléotidiques et génotypage multi-loci des isolats de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	31

4. Discussion	35
5. Conclusion & Perspectives.....	41
Bibliographie.....	43
Annexes	51

Table des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

β -tub : β -tubuline

CytB : Cytochrome b

DHPS : Dihydroptéroate synthase

GG : Gomori-Grocott

ITS : *Internal Transcribed Spacers* (espaceurs transcrits internes)

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

MGG : May-Grünwald Giemsa

MLP : *Microsatellite Length Polymorphism*

MLST : *Multi-Locus Sequence Typing*

MSG : *Major Surface Glycoprotein*

mtLSU : Grande sous-unité de l'ARN ribosomique mitochondrial

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PCR-RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*

PCR-SSCP : *Single-Strand Conformation Polymorphism*

PPC : Pneumonie à Pneumocystis

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SOD : Superoxyde dismutase

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Index des figures

Figure 1 : Cycle de vie extracellulaire de <i>Pneumocystis jirovecii</i> au niveau des alvéoles pulmonaires [21]	11
Figure 2 : Examen direct d'un échantillon de lavage broncho-alvéolaire (X 1000) 2A : coloré au May-Grünwald-Giemsa, mettant en évidence un amas spumeux, des asques matures contenant des ascospores (flèches pleines) et des formes trophiques (flèches pointillées) 2B : coloré par l'Uvibio® ; LDBIO Diagnostics, mettant en évidence des asques [images personnelles].....	15
Figure 3 : Formule de Simpson, permettant le calcul de l'index de Hunter [55].....	17
Figure 4 : Pouvoir discriminant de schéma Multi Locus Sequence Typing [56].....	19
Figure 5 : Chromatogrammes obtenus avec le logiciel Geneious	24

Index des tableaux

Tableau I : Loci et amorces sélectionnés pour le géotypage Multi locus sequence typing	22
Tableau II : Conditions d'amplification utilisées pour les 45 cycles des différentes réactions de PCR	23
Tableau III : Polymorphismes nucléotidiques du locus du Cytochrome B	24
Tableau IV : Polymorphismes nucléotidiques du locus de la superoxyde dismutase	25
Tableau V : Polymorphismes nucléotidiques du locus de la grande sous-unité de l'ARN ribosomique mitochondrial	25
Tableau VI : Polymorphismes nucléotidiques du locus de la β -tubuline.....	25
Tableau VII : Données clinico-biologiques des patients inclus dans le groupe 1	28
Tableau VIII : Données clinico-biologiques des patients inclus dans le groupe 2.....	29
Tableau IX : Données clinico-biologiques des patients inclus dans le groupe 3.....	29
Tableau X : Données clinico-biologique des patients inclus dans le groupe 4.....	30
Tableau XI : Géotypes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> dans les échantillons des patients du groupe 1	32
Tableau XII : Géotypes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> dans les échantillons des patients du groupe 2	33
Tableau XIII : Géotypes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> dans les échantillons des patients du groupe 3...	34
Tableau XIV : Géotypes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> dans les échantillons des patients du groupe 4 ..	34

Le genre *Pneumocystis* regroupe plusieurs espèces de micromycètes atypiques largement répandues chez les mammifères. Ces champignons, à comportement opportuniste, sont responsables de pneumonies sévères chez les sujets immunodéprimés - les pneumonies à *Pneumocystis* (PPC). Décrites initialement chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), elles concernent également aujourd'hui des patients immunodéprimés non infectés par le VIH et traités par immunosuppresseurs au long cours tels que les sujets ayant bénéficié d'une transplantation d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques, les patients atteints de cancers solides, d'hémopathies malignes ou de maladies auto-immunes et inflammatoires.

Nos connaissances sur cet agent infectieux restent limitées en raison de l'incapacité à le cultiver *in vitro*. Toutefois, le développement des techniques de biologie moléculaire a largement contribué à une meilleure caractérisation de son réservoir ainsi qu'à une meilleure connaissance de sa circulation au sein de ce réservoir.

Pneumocystis jirovecii demeure aujourd'hui un agent pathogène d'une importance majeure en termes de santé publique.

I. *Pneumocystis jirovecii*

1. L'agent pathogène

Pneumocystis est un organisme unicellulaire eucaryote atypique anciennement rattaché au règne des protozoaires du fait de ses caractéristiques morphologiques, notamment l'aspect amiboïde des formes trophiques et de la présence de filopodes [1], de sa sensibilité aux molécules anti-protozoaires (les sulfamides) et de son absence de développement sur les milieux synthétiques classiquement utilisés pour l'isolement des champignons. En 1988, il a cependant été reclassé dans le règne des champignons. En effet, des études ultra-structurales ont montré que *Pneumocystis* ne possédait ni organe de mobilité tels que des flagelles, cils ou pseudopodes, ni complexe apical, deux structures habituelles des protozoaires. En revanche, ces mêmes études ont montré l'existence de (1,3)- β -D-glucane dans sa paroi, élément structural majeur de nombreux champignons [2].

L'étude de ses caractères génomiques a par ailleurs montré des homologies avec différentes séquences fongiques, en particulier celles codant les gènes de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal [3], de l'ATPase [4], de la β -tubuline (β -tub) [5], de la thymidylate synthétase et de la dihydrofolate réductase [6]. De plus, un facteur spécifique des champignons, le facteur d'élongation FE3 nécessaire à la synthèse protéique, a été mis en évidence chez *Pneumocystis* sp. [7]. Il appartient à l'embranchement des *Ascomycota* [8].

Au sein du genre *Pneumocystis*, il existe une hétérogénéité inter-spécifique selon le mammifère infecté. Cette notion repose d'une part sur l'existence de polymorphismes antigéniques [9,10], caryotypiques [11], isoenzymatiques [12] et surtout génomiques [13–15] en fonction de l'espèce hôte et d'autre part sur l'impossibilité d'obtenir des infections croisées entre différentes espèces animales [16–18]. Actuellement, cinq espèces sont dénommées selon une nomenclature binominale en fonction de leur mammifère hôte. Il s'agit de *Pneumocystis carinii* et *Pneumocystis wakefieldiae* chez *Rattus norvegicus*, *Pneumocystis murina* chez *Mus musculus*, *Pneumocystis oryctolagi* chez *Oryctolagus cuniculus* et *Pneumocystis jirovecii* chez *Homo sapiens* [19]. Cette spécificité d'hôte permet d'écarter les animaux comme sources infectieuses potentielles de *P. jirovecii* et de considérer l'infection chez l'homme comme une anthroponose.

2. Cycle

Le cycle de *Pneumocystis* n'est pas complètement élucidé. Néanmoins, l'hypothèse la plus souvent décrite est celle d'un cycle biphasique impliquant deux stades morphologiques : les formes trophiques et les asques (anciennement appelés kystes). Les formes trophiques mesurent 1 à 5 µm de diamètre, sont pléomorphes et contiennent un seul noyau. Les asques sont à paroi épaisse, arrondis et mesurent 5 à 8 µm de diamètre. Ils contiennent jusqu'à huit ascospores. Le champignon demeure en position extracellulaire, mais est en étroit contact avec les pneumocytes de type un dans la lumière alvéolaire (Figure 1).

Les asques sont formés pendant la phase de multiplication sexuée : la conjugaison de deux formes trophiques haploïdes génère un zygote diploïde qui va subir une méiose, puis une mitose et la transformation en une forme intermédiaire qui passera par trois stades de maturation (avec deux, quatre puis huit noyaux). Les noyaux sont ensuite emballés dans des ascospores par invagination de la membrane de l'asque. L'asque libère ses huit ascospores par ouverture de sa paroi et éclatement de la membrane externe. Les spores ainsi libérées deviennent des formes trophiques haploïdes.

Il existerait en parallèle une multiplication asexuée par fission binaire, processus au cours duquel une forme trophique unique duplique son matériel génétique et crée deux formes filles de taille à peu près égale.

Quel que soit leur mécanisme de formation, les formes trophiques sont capables de se fixer chez l'hôte dans les espaces alvéolaires par adhésion à l'épithélium alvéolaire. La durée de ce cycle reste indéterminée [20].

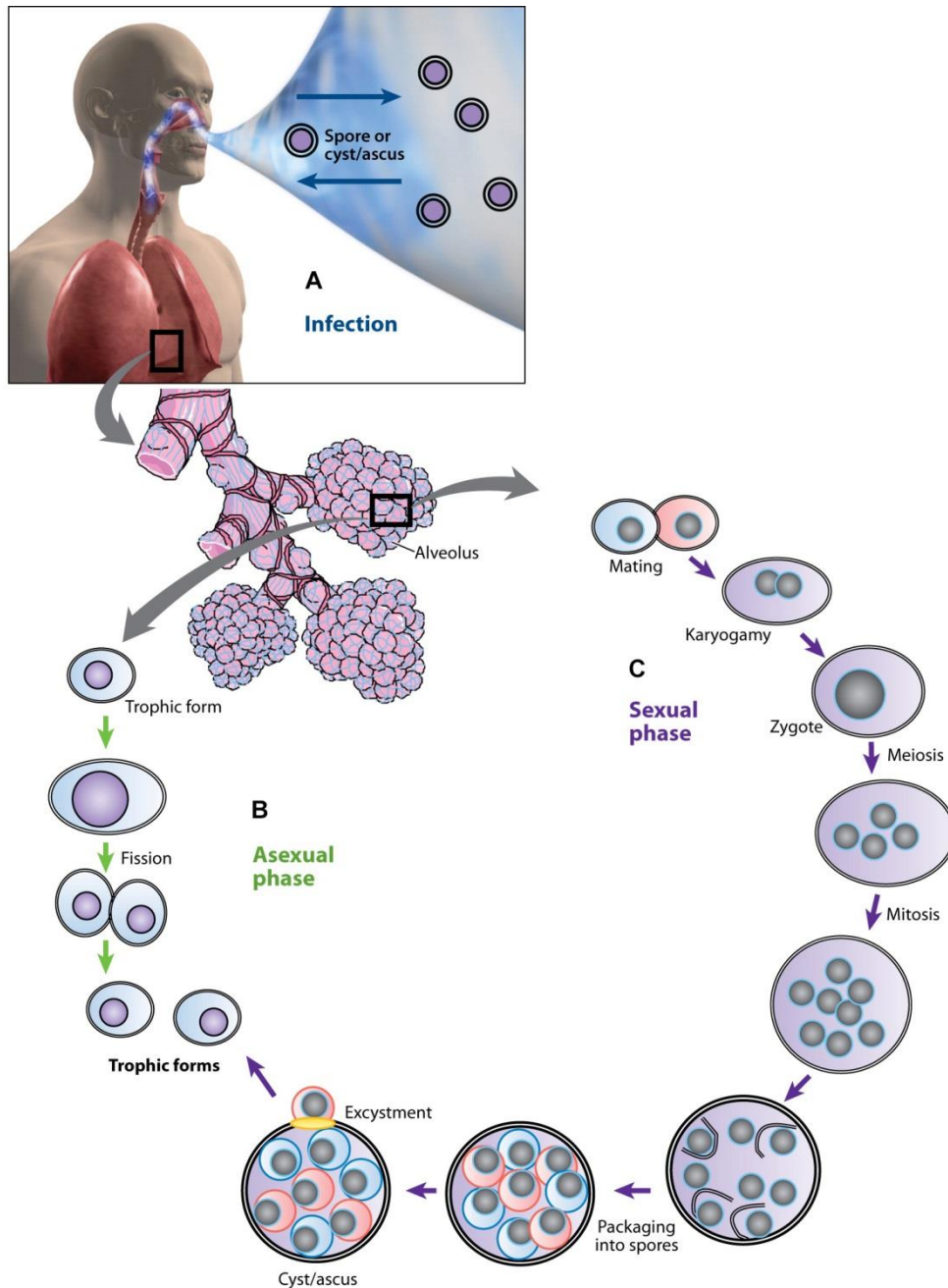


Figure 1 : Cycle de vie extracellulaire de *Pneumocystis jirovecii* au niveau des alvéoles pulmonaires [21]

3. Physiopathologie

La primo-infection à *P. jirovecii* a lieu pendant l'enfance ; 95% des enfants seront infectés et développeront des anticorps pendant leurs deux premières années de vie [22]. Du fait de cette importante exposition précoce, il a longtemps été considéré que la PPC chez les individus immunodéprimés résultait de la réactivation d'une infection latente acquise pendant l'enfance. L'hypothèse de réactivation de stades latents a été récemment reprise à la suite des études menées dans les pays émergents de l'hémisphère sud qui rapportaient la présence de

P. jirovecii chez plus de la moitié des adultes en population générale [23]. Cependant, plusieurs données arguent contre cette hypothèse de réactivation. Une étude menée en Europe a montré que *P. jirovecii* n'était pas détecté dans les poumons de personnes immunocompétentes asymptomatiques malgré l'utilisation de techniques sensibles telles que la *polymerase chain reaction* (PCR) [24]. Il a par ailleurs été établi que des épisodes récurrents de PPC chez un même sujet étaient dus à des génotypes de *P. jirovecii* différents suggérant une réinfection plutôt qu'une réactivation d'une infection latente [25–28]. Cette notion sera reprise en détail dans la suite du manuscrit.

Les résultats des études de séroprévalence doivent donc être réinterprétés car la présence d'anticorps peut être due à un contact, voire à des contacts répétés et transitoires avec *Pneumocystis* [29], et non à la présence de stades pulmonaires latents. La PPC chez l'individu immunodéprimé résulterait soit de l'acquisition *de novo* de *P. jirovecii* soit de l'aggravation d'un état de colonisation.

4. Réservoir et transmission

Aucune niche écologique n'a été identifiée pour les espèces du genre *Pneumocystis* [30]. L'étroite spécificité d'hôte retrouvée chez les espèces connues justifie par ailleurs de considérer l'Homme infecté comme son propre réservoir pour *P. jirovecii*. Au cours d'épisodes de cas groupés de PPC, le génotypage de *P. jirovecii* à l'aide de techniques moléculaires discriminantes associé à l'analyse des contacts intra-hospitaliers entre patients a permis d'étayer l'hypothèse d'une transmission interhumaine au sein de ce réservoir [31–35].

Par ailleurs, les données concernant la circulation de *P. jirovecii* sont en faveur d'une transmission aérienne. Ce mode de transmission a d'abord été démontré chez les modèles murins [36]. En raison du tropisme de *P. jirovecii* pour le poumon humain et des observations cliniques de cas groupés, il est maintenant admis que l'acquisition de *P. jirovecii* survient par inhalation également chez l'Homme. De plus, la concordance des génotypes de *P. jirovecii* dans des paires d'échantillons respiratoires de patients atteints de PPC et d'échantillons d'air prélevés dans la chambre de ces patients plaide en faveur de l'exhalation de *P. jirovecii* par les patients infectés [37]. L'acide désoxyribonucléique (ADN) du champignon a par ailleurs été mis en évidence chez du personnel soignant après avoir inhalé l'air environnant d'un patient développant une PPC [38]. Toutes ces observations sont compatibles avec la circulation et la transmission interhumaine par voie aérienne de *P. jirovecii*.

5. Les différentes formes d'infections à *Pneumocystis*

a) La pneumonie à *Pneumocystis*

Epidémiologie

En France métropolitaine, la PPC est la manifestation inaugurale du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) la plus fréquente avec 22% des 1 205 cas de SIDA déclarés à Santé Publique France en 2018 [39]. Alors que l'incidence chez les patients infectés par le VIH est en baisse grâce à l'amélioration de leur prise en charge par les multithérapies antirétrovirales, elle est en augmentation chez les patients VIH négatifs. Toutefois, le nombre absolu dans cette population n'est pas connu car les cas diagnostiqués dans ce contexte ne bénéficient pas d'un système national de déclaration obligatoire. La seule donnée disponible est le nombre de séjours en établissements de santé pour PPC, via la plateforme ScanSanté ; quel que soit le statut du patient vis-à-vis du VIH, ce nombre est passé de 526 en 2010 à 842 en 2018, reflétant une augmentation de 60%.

Les facteurs de risque pour cette catégorie de patients sont principalement la transplantation d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques, les hémopathies, les tumeurs malignes solides ainsi que l'administration de traitements immunomodulateurs au cours des maladies inflammatoires chroniques et des maladies auto-immunes [40].

Clinique et imagerie

Le diagnostic de PPC est évoqué devant la survenue d'une dyspnée, d'une fièvre et d'une toux non productive chez un patient immunodéprimé. Cependant, cette triade classique est inconstante [41]. L'auscultation pulmonaire est le plus souvent normale et associée parfois à des râles crépitants. Les caractéristiques radiographiques typiques sont les infiltrats interstitiels périhilaires bilatéraux qui deviennent homogènes et diffus à mesure que la maladie progresse. La tomodensitométrie thoracique peut, quant à elle, montrer des images en verre dépoli [42].

Chez les patients infectés par le VIH, l'infection s'installe progressivement, entre trois et quatre semaines. La mortalité globale est de 15% malgré un traitement efficace [43]. Chez les patients non infectés par le VIH, la symptomatologie est identique, mais le début de l'infection est plus brutal, entre huit et dix jours, et évolue rapidement vers l'insuffisance respiratoire aiguë. La mortalité est plus élevée et peut atteindre 50% [44].

Le manque de spécificité du tableau clinico-radiologique nécessite la réalisation d'examens microbiologiques visant à mettre en évidence *P. jirovecii* dans les échantillons respiratoires.

Diagnostic biologique

À ce jour, il n'est pas possible de cultiver ce champignon en pratique courante. Le diagnostic microbiologique repose par conséquent sur la mise en évidence de *P. jirovecii* en microscopie optique et sur des techniques de PCR [45]. Le prélèvement de référence est le lavage broncho-alvéolaire (LBA) dans la mesure où le champignon se multiplie dans les alvéoles pulmonaires. Un examen microscopique est réalisé, après coloration, sur le culot de cyto centrifugation du LBA. Classiquement, deux types de coloration sont associés : la coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) qui permet de visualiser à la fois les formes trophiques et les spores, adjointe à des colorations ne révélant que les asques telles que celle de Gomori-Grocott (GG) ou de son dérivé Musto, deux techniques d'imprégnation argentique ou encore la coloration par le bleu de toluidine. La lecture peut être facilitée par l'utilisation de fluorescence, via un colorant dérivé du stilbène (par exemple : Uvibio®; LDBIO Diagnostics, utilisé au laboratoire du CHU d'Amiens) ne révélant que les asques, ou une immunofluorescence directe permettant la détection des asques et des formes trophiques (MONOFLUO™ *Pneumocystis jirovecii* IFA, Biorad). (Figure 2)

En cas d'infestation massive, telle que la PPC chez les patients infectés par le VIH, la détection du champignon est relativement aisée à l'aide des techniques microscopiques. En revanche, l'examen direct peut s'avérer négatif au cours des PPC survenant chez les patients non infectés par le VIH [46,47]. Ceci s'explique par la faible charge fongique présente dans les alvéoles pulmonaires [42]. Par conséquent, un examen direct négatif n'exclut pas une PPC et les techniques d'amplification génique sont devenues essentielles au diagnostic.

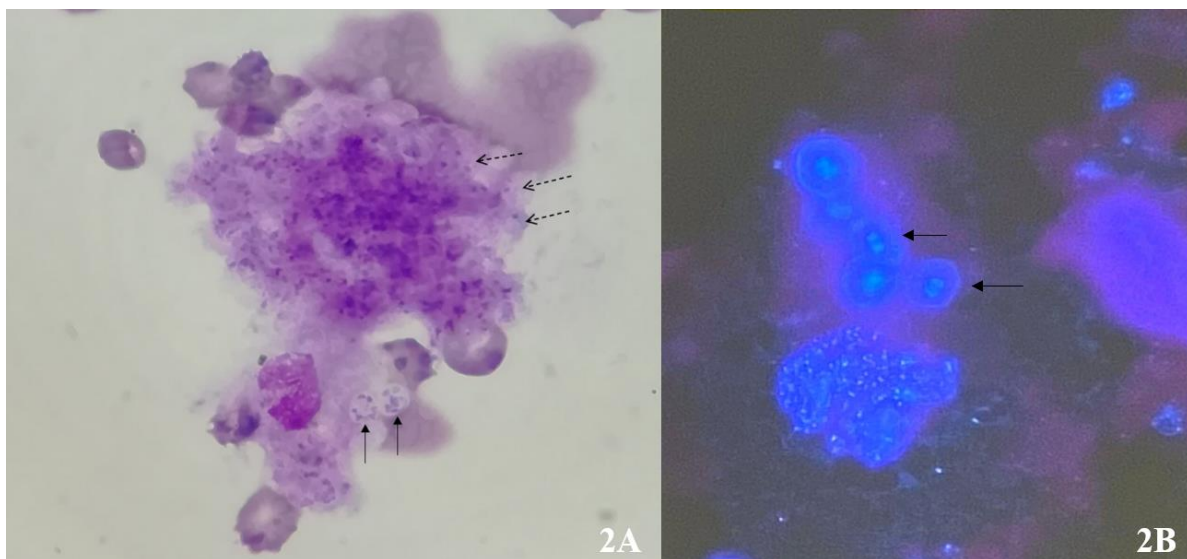


Figure 2 : Examen direct d'un échantillon de lavage broncho-alvéolaire (X 1000) 2A : coloré au May-Grünwald-Giemsa, mettant en évidence un amas spumeux, des asques matures contenant des ascospores (flèches pleines) et des formes trophiques (flèches pointillées) 2B : coloré par l'Uvibio® ; LDBIO Diagnostics, mettant en évidence des asques [images personnelles]

En effet, la coloration est classiquement associée à une technique de PCR. Ainsi, il est possible de détecter de faibles quantités de *P. jirovecii* dans les échantillons de LBA, mais également dans des échantillons recueillis de manière moins invasive, tels que les produits d'aspirations trachéo-bronchiques ou les expectorations.

Un marqueur sérique, le (1,3)- β -D-glucane, peut être dosé en complément. Il s'agit d'un polysaccharide, un composant pariétal majeur de la plupart des champignons [48]. Lors d'une PPC, ce composant est en partie libéré dans les alvéoles pulmonaires de l'hôte puis dans la circulation générale via les capillaires pulmonaires. A des taux importants (>500 pg/mL) la valeur prédictive positive de ce marqueur pour le diagnostic d'une PPC est élevée [49]. Cependant, il est généralement élevé au cours d'autres maladies fongiques invasives et n'est donc pas spécifique des PPC. Son dosage apporte par ailleurs une forte valeur prédictive négative chez les patients infectés par le VIH permettant d'écarter le diagnostic de PPC. Néanmoins, cette valeur prédictive négative est plus faible pour les patients non infectés par le VIH, en particulier les patients atteints d'hémopathies [50]. Le dosage sérique de ce composant apparaît ainsi comme un marqueur complémentaire pour le diagnostic des PPC même si un taux de (1,3)- β -D-glucane négatif peut être à lui seul insuffisant pour exclure une PPC.

Traitement curatif et prophylactique

Le traitement de référence est le cotrimoxazole (Bactrim[®]) par voie intra-veineuse ou orale pendant 21 jours. Le cotrimoxazole est l'association d'un sulfamide, le sulfaméthoxazole et du triméthoprime qui inhibent respectivement la dihydroptéroate synthétase et la dihydrofolate réductase. Cette association permet l'inhibition en synergie de la synthèse des folates. En cas de contre-indication ou d'intolérance au cotrimoxazole, les alternatives principales sont l'atovaquone ou la dapsone (parfois associée au triméthoprime) dans les formes légères à modérées et l'association clindamycine-primaquine ou la pentamidine par voie intra veineuse dans les formes modérées à sévères [51].

Chez les patients infectés par le VIH, le cotrimoxazole est préconisé en prophylaxie si le taux de lymphocytes CD4+ sanguins est inférieur à 200 éléments/mm³. Pour les patients non infectés par le VIH, il n'y a pas de consensus. Cependant, la Haute Autorité de Santé recommande également le cotrimoxazole en première intention pour le traitement préventif. Il sera prescrit en fonction du risque attribué à la maladie sous-jacente et/ou aux traitements immunosuppresseurs.

b) La colonisation

La colonisation par *P. jirovecii* est définie par la présence du champignon au niveau pulmonaire alors qu'un diagnostic alternatif à la PPC est retenu et qu'une amélioration clinique est observée en l'absence de traitement anti-*Pneumocystis*. En raison de la faible charge fongique pulmonaire au cours des colonisations, seules les techniques sensibles de biologie moléculaire permettent d'objectiver la présence du champignon.

La colonisation pulmonaire concerne principalement les patients souffrant d'une maladie pulmonaire sous-jacente et les patients présentant une immunodéficience modérée, quelle qu'en soit la cause [52]. Il s'agit essentiellement des patients atteints de maladies chroniques telles que la mucoviscidose, la bronchopneumopathie chronique obstructive, les cancers pulmonaires et les patients sous immunosuppresseurs au long cours. La grossesse prédispose également à la colonisation par *P. jirovecii* [53].

La prévalence de colonisation varie fortement dans la littérature, de 20 à 69% chez les sujets infectés par le VIH, de 1 à 22% au cours de la mucoviscidose et de 5 à 100% chez les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive [53]. Cette variabilité résulte probablement de différences dans les populations de patients étudiées, mais également dans la nature des échantillons prélevés et dans les méthodes de détection utilisées.

Les conséquences individuelles d'une colonisation par *P. jirovecii* sont l'objet de nombreux travaux [53], en particulier chez les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive, chez lesquels elle participerait à la progression de la maladie en majorant la détérioration des fonctions respiratoires [54].

II. Le génotypage de *Pneumocystis jirovecii*

1. Index de discrimination

Les différentes méthodes de génotypage sont caractérisées et comparées selon un indice de discrimination, qui est calculé par l'index de Hunter. Cet indice évalue la capacité d'une technique à distinguer deux isolats non apparentés [55]. Un index seuil de 0.95, correspondant à 95% de probabilité de séparer deux isolats non reliés, est considéré comme acceptable pour la discrimination des isolats [56].

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

Figure 3 : Formule de Simpson, permettant le calcul de l'index de Hunter [55]

D : index de Hunter ; N : nombre d'isolats dans la population ; s : nombre de motifs distincts discriminés par la méthode de typage ; n_j : nombre d'isolats appartenant au génotype j

Exemple : Analyse de 40 isolats pour un locus. Sur ces 40 isolats, sont identifiées 10 souches de « génotype 1 », 20 souches de « génotype 2 », 6 de « génotype 3 » et 4 de « génotype 4 »
 $\rightarrow N = 40 ; S = 4 ; \sum n_j(n_j-1) = 10 \times 9 + 20 \times 19 + 6 \times 5 + 4 \times 3$

2. Les méthodes de génotypage

La PCR-SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) a été appliquée au génotypage de *P. jirovecii* par Hauser *et al.* dès la fin des années '90 [57]. Elle consiste en l'amplification par PCR d'un locus cible, suivie d'une dénaturation permettant d'obtenir un ADN simple brin. Une migration sur gel de polyacrylamide permet alors de visualiser les polymorphismes de conformation de ces monobrins.

Une méthode de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) basée sur la digestion de l'ADN amplifié par des enzymes de restriction a également été développée. Après amplification par PCR et incubation en présence d'enzymes de restriction, une migration électrophorétique des fragments de restriction est réalisée sur gel d'agarose. Une mutation au niveau d'un site de restriction entraîne une variation du nombre et/ou de la longueur des fragments de restriction. Les profils de restriction des gènes de *P. jirovecii* codant la dihydroptéroate synthase (DHPS) [58] et la *major surface glycoprotein* (MSG) [59] ont été étudiés.

Plus récemment, des méthodes de génotypage basées sur le polymorphisme de longueur des microsatellites (MLP) ont été développées. Ces régions microsatellites correspondent à des répétitions en tandem d'un court motif de bases nucléotidiques (deux à cinq nucléotides). Après amplification de ces régions par PCR, le nombre de leurs répétitions est déterminé par séquençage ou par migration sur gel de polyacrylamide. Le génome de *P. jirovecii* contient notamment des microsatellites dans l'unique intron de la région promotrice du gène codant la MSG qui ont été utilisés pour le génotypage du champignon [60]. Gits-Muselli *et al.* ont quant à eux développé un autre panel de marqueurs en sélectionnant six motifs de répétition en tandem situés sur différentes parties du génome [61].

L'amplification et le séquençage de diverses régions génomiques de *P. jirovecii* ont également permis de mettre en évidence différents degrés de polymorphisme. Les principales régions étudiées étaient les régions intergéniques des *Internal Transcribed Spacers* (ITS) 1 et 2 et une portion du gène codant l'acide ribonucléique (ARN) de la grande sous-unité de l'ARN ribosomique mitochondrial (mtLSU). Sur la base du polymorphisme de l'une ou l'autre de ces régions, des génotypes de *P. jirovecii* ont été publiés [62–64]. Cette approche est ainsi basée sur l'étude d'une seule région génomique et ne présente par conséquent qu'un pouvoir discriminant modéré. C'est pourquoi l'analyse simultanée du polymorphisme de plusieurs loci, correspondant à la méthode de MLST (*Multi Locus Sequence Typing*), permet d'augmenter ce pouvoir discriminant. Aujourd'hui, 19 régions, codantes ou non, ont été explorées pour le génotypage de *P. jirovecii* et 31 schémas de MLST ont été proposés. Ces schémas présentent des pouvoirs discriminants variables, s'expliquant par des niveaux de polymorphisme différents selon les régions d'ADN choisies [65].

L'étude de Maitte *et al.* avait pour objectif de comparer différents schémas de MLST pour le génotypage de *P. jirovecii* [56]. Les auteurs ont calculé le H-index de neuf schémas

correspondant à l'analyse d'un à huit loci. Le H-index établi à 0,996 par l'utilisation d'un schéma à huit loci permettait de démontrer la puissance de la méthode de MLST. Ils ont ensuite proposé des schémas plus simples et moins onéreux (Figure 4). Le schéma incluant la région des ITS1 n'a pas été retenu du fait de la faible amplification de celle-ci. Ainsi, le schéma composé des trois loci du cytochrome B (CytB), de la mtLSU et de la superoxyde dismutase (SOD) était l'alternative la plus intéressante. Les performances de cette méthode de MLST sont comparables à celle de la MLP [66].

TABLE 5 Performance of several previously published schemes for molecular typing of *P. jirovecii*, evaluated by the Hunter index

Molecular typing scheme	Discriminatory power according to our data (H-index)	No. of clinical samples used for determination of H-index ^a	Reference(s) or source
ITS1, β -TUB, 26S, mt26S, CYB, SOD, DHPS, DHFR	0.996	23	This study
ITS1, mt26S, CYB	0.996	23	This study
SOD, mt26S, CYB	0.987	22	This study
ITS1, 26S, mt26S, β -TUB	0.987 ^b	22	14, 15, 17, 30–32
ITS1, CYB	0.983	22	This study
mt26S, CYB	0.957	23	This study
ITS1, mt26S	0.948	22	24
ITS1	0.828	28	21
mt26S	0.751	29	22, 33

^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 4 : Pouvoir discriminant de schéma Multi Locus Sequence Typing [56]

En octobre 2020, un nouveau schéma consensuel de MLST composé de quatre loci génétiquement indépendants a été proposé par Pasic *et al.* pour le génotypage standardisé de *P. jirovecii* [65]. Il ajoute le locus de la β -tub aux trois autres précédemment proposés par Maitte *et al.*

III. Etude

1. Objectifs

L'objectif principal de ce travail est d'appréhender la dynamique de colonisation par *P. jirovecii* chez les patients présentant une immunodépression au long cours ou une maladie pulmonaire chronique. L'objectif secondaire est d'évaluer le potentiel évolutif d'une colonisation vers une PPC. Deux hypothèses peuvent être proposées.

La première hypothèse est celle d'une colonisation au long cours par un (ou des) isolat(s) de *P. jirovecii*. Lors de l'aggravation d'une immunodépression sous-jacente, tout ou une partie de ces mêmes isolats seraient en mesure de se multiplier activement. Cette multiplication se traduirait par le développement d'une PPC. Selon ce premier scénario, la colonisation représenterait l'incubation de la PPC. La durée d'incubation se superposerait alors à la durée de colonisation et varierait essentiellement en fonction du statut immunitaire ou des altérations pulmonaires du patient. La confirmation de cette hypothèse serait un argument majeur pour instaurer un traitement anti-*Pneumocystis* dès la phase de colonisation.

La seconde hypothèse est celle d'un patient immunodéprimé, colonisé de manière séquentielle par différents isolats de *P. jirovecii*. Différents épisodes, de durée indéterminée, seraient entrecoupés d'un état « *Pneumocystis* free ». En d'autres termes, il s'agirait d'un cycle de contamination - clairance - recontamination. En fonction de facteurs liés à l'hôte, un épisode de recontamination pourrait se manifester sous la forme d'une PPC plutôt que sous celle d'une colonisation. Selon ce second scénario, les épisodes antérieurs de colonisation ne pourraient pas refléter l'incubation de la PPC et l'intérêt d'un traitement systématique de ces épisodes serait à discuter.

Pour discerner ces hypothèses, nous avons procédé à la caractérisation moléculaire de *P. jirovecii* isolé de manière répétée chez un même patient, à l'aide d'un génotypage par une méthode de MLST. Une identité génotypique des isolats sur les différents loci serait un argument en faveur de l'hypothèse d'une colonisation au long cours. En revanche, des génotypes différents évoqueraient soit des épisodes répétés de colonisation brève, soit une colonisation prolongée avec différents isolats, dont la prédominance des uns par rapport aux autres fluctuerait dans le temps.

2. Matériels & Méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective monocentrique. Les échantillons sélectionnés dans ce travail sont des extraits d'ADN de *P. jirovecii* issus de prélèvements respiratoires reçus au laboratoire de Parasitologie et Mycologie du CHU Amiens-Picardie entre janvier 2010 et décembre 2020.

a) Patients et échantillons

Pour chaque échantillon, *P. jirovecii* avait initialement été détecté par une méthode de PCR en temps réel « maison » avec amplification du locus de la mtLSU selon un protocole précédemment publié [67,68]. Les patients inclus dans cette étude étaient ceux chez lesquels *P. jirovecii* avait été détecté dans plusieurs échantillons, avec intervalle minimal de sept jours au moment de leur recueil.

Les données cliniques et biologiques recueillies comprenaient l'âge, le sexe, la condition sous-jacente exposant au risque d'infection par *P. jirovecii*, la forme d'infection à *P. jirovecii* et l'administration d'un traitement anti-*Pneumocystis*. La date des prélèvements, la nature des différents échantillons respiratoires, le résultat de l'examen direct pour la détection de *P. jirovecii* lorsqu'il était réalisé, les cycles seuil de détection (Ct) obtenus par la PCR « maison » ont également été relevés pour chaque patient. Ces données ont été complétées par la charge fongique pulmonaire, déterminée exclusivement pour les échantillons de LBA. Le résultat du dosage sérique du β -D glucane était également recueilli s'il était disponible.

Le diagnostic a été retenu selon les arguments suivants :

- « PPC prouvée » : examen direct positif et/ou charge fongique $> 10^7$ copies/mL de LBA (seuil retenu par le laboratoire de Parasitologie et Mycologie du CHU Amiens-Picardie comme charge fongique compatible avec le diagnostic de PPC)
- « PPC possible » : examen direct négatif (si disponible), charge fongique $< 10^7$ copies/mL de LBA et administration d'un traitement anti-*Pneumocystis* (ou manque d'information dans le dossier du patient quant à l'administration d'un traitement) [69]
- « Colonisation » : examen direct négatif (si disponible), charge fongique $< 10^7$ copies/mL de LBA et évolution clinique favorable en l'absence de traitement anti-*Pneumocystis*

b) Loci

Le génotypage de *P. jirovecii* a été réalisé selon le schéma consensuel proposé par l'équipe de Pasic *et al.* qui associe les quatre loci précédemment décrits dans le manuscrit ; il s'agit des loci de la β -tub, du CytB, de la mtLSU et de la SOD. [65]. Les amorces utilisées pour amplifier chacun des loci sont indiquées dans le tableau I.

Locus	Amorces	Séquence nucléotidique	Amplicon	Références
CytB	CytBFw	5'-CCCAGAATTCTCGTTTGGTCTATT-3'	639 pb	Esteves <i>et al.</i> 2010 [70]
	CytBRw	5'-AAGAGGTCTAAAAGCAGAACCTCAA-3'		
mtLSU	pH207	5'-ACAAATCGGACTAGGATATAGCTGGT-3'	301 pb	Chabé <i>et al.</i> 2014 [71]
	pAZ102-E	5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3'		Wakefield <i>et al.</i> 1990 [72]
SOD	MnSODFw	5'-GGGTTTAATTAGTCTTTT TAGGCAC-3'	653 pb	Esteves <i>et al.</i> 2010 [70]
	MnSODRw	5'-CATGTTCCACGCATCCTAT-3'		
β-tub	β -tubFw	5'-TCATTAGGTGGTGG AACGGG-3'	309 pb	Hauser <i>et al.</i> 1997 [57]
	β -tubRw	5'-ATCACCATATCCTGGATCCG-3'		

Tableau I : Loci et amorces sélectionnés pour le génotypage Multi locus sequence typing

pb : paires de bases ; CytB : cytochrome B ; mtLSU : grande sous-unité de l'ARNr mitochondrial ; SOD : superoxyde dismutase ; β -tub : β -tubuline

c) Etapes de l'analyse

Les ADNs utilisés dans cette étude avaient été initialement extraits par méthode automatisée (easyMAG[®] ou eMAG[®], Biomérieux). Après avoir détecté *P. jirovecii* à l'aide de la PCR « maison » citée ci-dessus, ils avaient été conservés à -80°C.

Chacun des quatre loci a été amplifié à l'aide des amorces décrites dans le tableau I, de manière indépendante, à l'aide de quatre réactions de PCR. Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 25 μ L comprenant les amorces à la concentration de 0,2 μ M chacune, du master mix (Qiagen[®] PCR master mix) et 2,5 μ L d'ADN extrait pour l'amplification des loci multicopiés (mtLSU et CytB) ou 5 μ L d'ADN extrait pour l'amplification des loci unicopiés (SOD et β -tub). Cette étape d'amplification a été réalisée sur le thermocycleur Veriti[™] (Applied Biosystems). Tous les programmes commençaient par une activation de la Hot Star Taq polymérase contenue dans le master mix pendant 15 minutes à 95°C, suivie de

45 cycles dont les différentes étapes sont précisées dans le tableau II. Ils se terminaient par une extension finale de 10 minutes à 72°C.

mtLSU	SOD	β -tub, CytB
Dénaturation 94°C → 15 secondes	Dénaturation 94°C → 30 secondes	Dénaturation 94°C → 30 secondes
Hybridation 57°C → 15 secondes	Hybridation 55°C → 90 secondes	Hybridation 60°C → 90 secondes
Elongation 72°C → 25 secondes	Elongation 72°C → 45 secondes	Elongation 72°C → 45 secondes

Tableau II : Conditions d'amplification utilisées pour les 45 cycles des différentes réactions de PCR

CytB : cytochrome B ; *mtLSU* : grande sous-unité de l'ARNr mitochondrial ; *SOD* : superoxyde dismutase ; β -tub : β -tubuline

Les produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse en gel d'agarose à 1%. Les bandes ont été mises en évidence par exposition aux rayons UV et par comparaison à un témoin de poids moléculaire (DNA Mass Ladder, Abbott).

Ils ont ensuite été purifiés par le procédé enzymatique ExoSAP-IT® (Affymetrix) selon le protocole décrit par le fournisseur : 5 μ L d'ADN amplifiés ont été ajoutés à 2 μ L du réactif Exosap®. Le mélange réactionnel a alors été incubé à 37°C pendant 15 minutes puis à 80°C pendant 15 autres minutes.

Un séquençage double brin a ensuite été réalisé pour chacun des quatre loci. Ainsi 1 μ L d'ADN purifié a été ajouté à 9 μ L comprenant le réactif BigDye® Terminator v3.1 (ThermoFisher) et une des huit amorces décrites dans le tableau I. La réaction de séquence a été réalisée sur le thermocycleur Veriti™ (Applied Biosystems) selon un programme qui comprenait une première étape de dénaturation à 96°C pendant une minute suivie de 25 cycles, composés chacun d'une dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, d'une hybridation à 50°C pendant 5 secondes puis d'une élongation à 60°C pendant 4 minutes.

Les produits de séquence ont été purifiés à l'aide du kit BigDye Xterminator™ (ThermoFisher) puis analysés par le séquenceur 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), selon la méthode de séquençage Sanger.

Une analyse bio-informatique a permis de comparer les données obtenues pour chaque locus. Ainsi, les chromatogrammes ont été visualisés avec le logiciel Geneious (Figure 5).

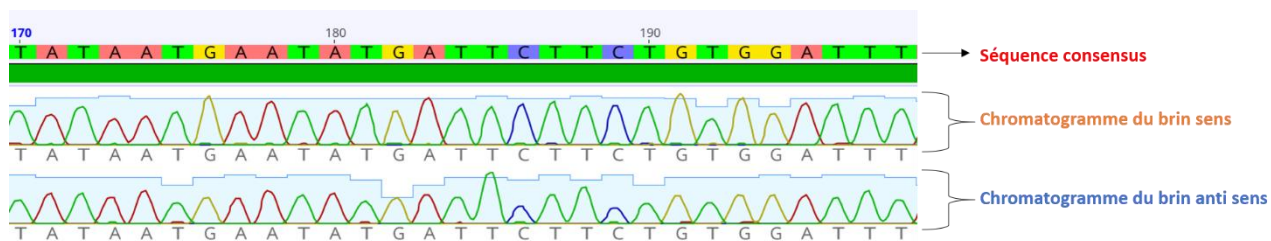


Figure 5 : Chromatogrammes obtenus avec le logiciel Geneious

Le logiciel a permis l'assemblage des séquences d'ADN et l'édition de séquences consensus. Ces séquences ont été alignées aux séquences de référence issues de la banque de données publique GenBank® à l'aide du logiciel Bioedit.

d) Identification des allèles

Les allèles ont été identifiés et dénommés selon les publications antérieures (Tableaux III à VI).

La séquence de référence utilisée pour l'alignement du locus de la CytB est la séquence GenBank® n° AF074871.1 [73]. Esteves *et al.* [70] ont décrit sept allèles, numérotés CytB1 à CytB7 et Maitte *et al.* [56] ont décrit deux allèles supplémentaires, dénommés CytB8 et CytB9.

Références	Positions nucléotidiques													Allèles
	279	299*	348	362*	369*	516	547	566	675*	742*	832*	833*	838	
Esteves <i>et al.</i> 2010 [70]	C		A			C	C	C					C	CytB1
	C		A			C	C	C					T	CytB2
	C		G			T	C	C					C	CytB3
	C		A			C	T	C					C	CytB4
	T		A			T	C	C					C	CytB5
	C		A			T	C	C					C	CytB6
	C		A			C	C	T					C	CytB7
Maitte <i>et al.</i> 2013 [56]	T	C	A	C	G	C	C	C	A	C	T	T	C	CytB8
	C	C	A	C	G	C	C	C	T	C	T	T	C	CytB9

Tableau III : Polymorphismes nucléotidiques du locus du Cytochrome B

* Esteves *et al.* n'ont pas inclus le polymorphisme des positions 299, 362, 369, 675, 742, 832 et 833 pour déterminer les allèles

La séquence de référence utilisée pour l'alignement du locus de la SOD est la séquence GenBank® n° AF146753 [13]. Esteves *et al.* ont décrit quatre allèles, numérotés SOD1 à SOD4 [70].

Positions nucléotidiques			
Références	110	215	Allèles
Esteves <i>et al.</i> 2010 [70]	C	T	SOD1
	T	C	SOD2
	T	T	SOD3
	C	C	SOD4

Tableau IV : Polymorphismes nucléotidiques du locus de la superoxyde dismutase

La séquence de référence utilisée pour l'alignement du locus de la mtLSU est la séquence GenBank® n° M58605.1 [15]. Esteves *et al.* ont décrit cinq allèles, numérotés mtLSU1 à mtLSU5 [70].

Positions nucléotidiques			
Références	85	248	Allèles
Esteves <i>et al.</i> 2010 [70]	C	C	mtLSU1
	A	C	mtLSU2
	T	C	mtLSU3
	C	T	mtLSU4
	A	T	mtLSU5

Tableau V : Polymorphismes nucléotidiques du locus de la grande sous-unité de l'ARN ribosomique mitochondrial

La séquence de référence utilisée pour l'alignement du locus de la β -tub est la séquence GenBank® n° AF170964.1 déposée par S. Landvik. et M.L Berbee. Hauser *et al.* ont décrit trois allèles, numérotés β -tub1 à β -tub3 [57]. Volpe *et al.* ont par la suite décrit un nouvel allèle, la β -tub4 [74].

Positions nucléotidiques				
Références	24	96	282	Allèles
Hauser <i>et al.</i> , 1997 [57]	A	G	G	β-tub1
	T	G	A	β-tub2
	A	G	A	β-tub3
Volpe <i>et al.</i> , 2001 [74]	A	A	A	β-tub4

Tableau VI : Polymorphismes nucléotidiques du locus de la β -tubuline

3. Résultats

a) Patients et échantillons

Dix-neuf patients ont été inclus dans l'étude. L'âge moyen (au moment du premier prélèvement) était de 52 ans (6 mois – 76 ans) et le sex-ratio était de 1,7.

Quarante-deux échantillons ont été recueillis et correspondaient à 31 échantillons de LBA, trois aspirations trachéo-bronchiques, quatre aspirations naso-pharyngées et quatre expectorations. Deux échantillons ont été prélevés pour 15 patients tandis que trois échantillons ont pu être recueillis pour les quatre autres patients.

A l'aide de l'analyse des données clinico-biologiques, les patients ont été classés en quatre groupes : les patients dont les échantillons ont été prélevés au cours d'un même épisode de PPC, qu'elle soit prouvée ou possible ; les patients dont les échantillons ont été prélevés au cours de deux épisodes distincts de PPC ; les patients dont les échantillons ont été prélevés au cours d'une colonisation et les patients dont le premier échantillon a été prélevé au cours d'une colonisation et les suivants au cours d'un épisode de PPC.

i. Groupe 1 : Echantillons prélevés au cours d'un même épisode de PPC

Onze patients ont été inclus dans ce groupe. Les résultats de l'examen direct et/ou de la charge fongique du premier échantillon recueilli ont permis de retenir le diagnostic de PPC prouvée pour six de ces 11 patients (P₁, P₃, P₆, P₇, P₈, P₁₁). Les cinq autres patients (P₂, P₅, P₁₅, P₁₆, P₁₇) ont été classés dans ce groupe dans la mesure où ils avaient reçu un traitement anti-*Pneumocystis*, n'excluant alors pas la possibilité d'une PPC (« PPC possible »). Les données clinico-biologiques des patients sont présentées dans le tableau VII.

ii. Groupe 2 : Echantillons prélevés au cours de deux épisodes distincts de PPC

Les patients P₁₈ et P₁₉ ont été inclus dans ce groupe. Chacun a bénéficié de deux prélèvements, dans un délai de 1450 et 1453 jours. Au total, quatre échantillons ont été recueillis ; aucun n'était positif à l'examen direct. En revanche, les deux échantillons du patient P₁₉ présentaient une charge fongique > 10⁷ copies/mL d'ADN, permettant de retenir le diagnostic de PPC prouvée. Le patient P₁₈ a quant à lui bénéficié d'un traitement anti-*Pneumocystis* curatif au moment du premier prélèvement et présentait une charge fongique probablement élevée – mais non déterminée – au moment du second prélèvement, compte tenu du Ct bas (22) observé dans un échantillon non invasif. Nous avons par conséquent retenu le diagnostic de PPC possible pour ce patient. Les deux patients présentaient de

surcroit un taux de β -D-glucane positif. En outre, compte tenu du délai entre les prélèvements pour chacun des deux patients et de l'amélioration clinique observée pendant ce délai, nous avons considéré qu'il s'agissait d'épisodes distincts de PPC. Les données clinico-biologiques des patients sont présentées dans le tableau VIII.

iii. Groupe 3 : Echantillons prélevés au cours d'une colonisation

Les patients P₄, P₉, P₁₃ et P₁₄ étaient considérés colonisés au moment de la réalisation de chaque prélèvement dans la mesure où aucun d'eux n'avait reçu de traitement spécifique contre *Pneumocystis* et avaient présenté une évolution favorable de leur symptomatologie. Les patients P₄, P₁₃ et P₁₄ ont bénéficié de deux prélèvements et le patient P₉ a été prélevé à trois reprises. Les échantillons ont été prélevés dans un délai variant de 41 à 1637 jours. Tous les patients présentaient un taux de β -D-glucane négatif, lorsqu'il était disponible. Les données clinico-biologiques sont présentées dans le tableau IX.

iv. Groupe 4 : Premiers échantillons prélevés au cours d'une colonisation et échantillons suivants prélevés au cours d'une PPC

Les patients P₁₀ et P₁₂ ont été inclus dans ce groupe. Ils ont bénéficié de trois et deux prélèvements sur une période de 20 et 12 jours respectivement. Aucun examen direct n'a été réalisé sur ces échantillons. Les deux patients ont bénéficié d'un traitement spécifique contre *Pneumocystis* débuté lors du troisième et du second prélèvement respectivement, c'est-à-dire 20 et 15 jours après la détection initiale de *P. jirovecii*. Pour ces raisons, nous avons considéré que ces deux patients, initialement colonisés, avaient par la suite développé une PPC « possible ». Les données clinico-biologiques sont présentées dans le tableau X.

Patient	Age	Sexe	Maladie sous jacente	Echantillon	Nature de l'échantillon	Date de prélèvement	Délai entre les prélèvements (jours)	Ct ^a	Charge fongique ^b	Examen direct ^c	Traitement anti- <i>Pneumocystis</i>		β -D-glucane	
											Molécule	Date de début (Durée)	Résultat (pg/mL)	Date
P ₁	31	F	VIH	1a	LBA	11/06/2020	15	22/21	>10 ⁷	NR/NR	TMP/SMX	9/06/2020 (21 jours)	437	20/05/2020
				1b	LBA	17/06/2020		27/27	4,2.10 ⁶	NR/NR			92	12/06/2020
				1c	LBA	26/06/2020		29/30	7,8.10 ⁵	NR/NR				
P ₂	63	F	Hémopathie LAM	2a	LBA	22/06/2020	18	28/27	1,8 10 ⁶	NR/NR	TMP/SMX	22/06/2020 (21 jours)	<31	22/06/2020
				2b	LBA	10/07/2020		35/34	NR	NR/NR				
P ₃	60	M	VIH	3a	LBA	31/07/2019	14	17/18	>10 ⁷	P/P	TMP/SMX	18/07/2019 (21 jours)	>500	18/07/2019
				3b	LBA	14/08/2019		24/25	1,6.10 ⁶	NR/NR			>500	09/08/2019
P ₅	60	M	Hémopathie Myélome	5a	LBA	24/09/2019	22	29/29	3,3.10 ⁵	N/N	ATV relai TMP/SMX	25/09/2019 relai 30/09/2019 (NR)	92	23/09/2019
				5b	LBA	16/10/2019		35/35	< 10 ⁵	N/N				
P ₆	63	M	Cancer bronchique	6a	LBA	02/10/2020	12	19/18	>10 ⁷	P/P	TMP/SMX relai ATV	03/10/2020 relai 19/10/2020 (16 jours puis 8 jours)	>500	05/10/2020
				6b	LBA	14/10/2020		27/26	9,21.10 ⁵	N/N				
P ₇	69	F	Transplantation rénale	7a	LBA	29/08/2013	14	15/15	NR	P/P	TMP/SMX relai ATV	29/08/2013 (NR)	>500	29/08/2013
				7b	LBA	12/09/2013		19/19	NR	N/P				
P ₈	34	M	VIH	8a	LBA	26/02/2014	51	25/26	NR	P/P	TMP/SMX (dose Prophylactique)	NR	NR	NR
				8b	LBA	18/04/2014		29/30	NR	N/P				
P ₁₁	65	M	Immunodépression*	11a	LBA	02/01/2015	10	29/30	>10 ⁷	N/N	TMP/SMX	6/01/2015 (16 jours)	N	02/01/2015
				11b	LBA	12/01/2015		30/30	>10 ⁷	N/N				
P ₁₅	37	M	VIH	15a	ATB	08/03/2017	27	27/27	NR	NR/NR	TMP/SMX relai ATV	07/03/2017 relai 20/03/2017 (13 jours puis 10 jours)	171	08/03/2017
				15b	LBA	04/04/2017		36/35	< 10 ⁵	NR/NR				
P ₁₆	50	F	Hémopathie LBGCC	16a	LBA	12/01/2017	12	24/23	5.10 ⁶	N/N	ATV	23/01/2017 (21 jours)	>500	13/01/2017
				16b	LBA	24/01/2017		28/28	2,3 10 ⁶	N/N				
P ₁₇	68	M	Transplantation rénale	17a	LBA	16/09/2013	17	25/25	NR	N/N	TMP/SMX (dose curative puis prophylactique)	06/09/2013 (39 jours)	>500	13/09/2013
				17b	LBA	18/09/2013		23/23	NR	N/P				
				17c	Exp	03/10/2013		35/36	NR	NR/NR				

Tableau VII : Données clinico-biologiques des patients inclus dans le groupe 1

Patient	Age	Sexe	Maladie sous jacente	Echantillon	Nature de l'échantillon	Date de prélèvement	Délai entre les prélèvements (jours)	Ct ^a	Charge fongique ^b	Examen direct ^c	Traitement anti- <i>Pneumocystis</i>		β -D-glucane	
											Molécule	Date de début (Durée)	Résultat (pg/mL)	Date
P18	60	M	VIH	18a	Exp	20/01/2014	1450	26/26	NR	NR/NR	TMP/SMX	NR	>500	21/01/2014
				18b	Exp	09/01/2018		22/22	NR	NR/NR	NR	NR	NR	NR
P19	40	F	VIH	19a	LBA	08/12/2015	1453	19/19	>10 ⁷	N/N	NR	NR	NR	NR
				19b	LBA	30/11/2019		15/15	>10 ⁷	NR/NR	TMP/SMX	NR	>500	02/12/2019

Tableau VIII : Données clinico-biologiques des patients inclus dans le groupe 2

Patient	Age	Sexe	Maladie sous jacente	Echantillon	Nature de l'échantillon	Date de prélèvement	Délai entre les prélèvements (jours)	Ct ^a	Charge fongique ^b	Examen direct ^c	Traitement anti- <i>Pneumocystis</i>	β -D-glucane	
												Résultat (pg/mL)	Date
P4	71	F	Pneumopathie récidivante sous corticoïdes	4a	LBA	23/10/2018	308	33/33	< 10 ⁵	N/N	non	NR	NR
				4b	LBA	27/08/2019		38/37	< 10 ⁵	N/N	non	NR	NR
P9	1	M	Cytopathie mitochondriale	9a	ATB	13/05/2014	41	37/37	NR	NR	non	NR	NR
				9b	ANP	05/06/2014		37/39	NR	NR	non		
				9c	ANP	23/06/2014		36/37	NR	NR	non		
P13	76	M	Transplantation rénale	13a	LBA	03/05/2011	1637	36/37	NR	N/N	non	NR	NR
				13b	LBA	26/10/2015		34/34	1,8.10 ⁶	N/N	non	< 31	24/10/2015
P14	69	M	Hémopathie LBGC	14a	LBA	07/05/2013	951	31/31	NR	N/N	non	NR	NR
				14b	LBA	14/12/2015		38/38	1,6.10 ⁵	N/N	non		

Tableau IX : Données clinico-biologiques des patients inclus dans le groupe 3

Patient	Age	Sexe	Maladie sous jacente	Echantillon	Nature de l'échantillon	Date de prélèvement	Délai entre les prélèvements (jours)	Ct ^a	Charge fongique ^b	Examen direct ^c	Traitement anti- <i>Pneumocystis</i>		β-D-glucane	
											Molécule	Date de début (Durée)	Résultat (pg/mL)	Date
P ₁₀	65	M	Pemphigoïde bulleuse	10a	Exp	27/11/2014	20	32/33	NR	NR/NR	non		NR	NR
				10b	ATB	15/12/2014		30/30	NR	NR/NR	non			
				10c	LBA	17/12/2014		20/21	>10 ⁷	NR/NR	TMP/SMX	17/12/2014 (NR)		
P ₁₂	0,5	F	PNI Atélectasie	12a	ANP	11/05/2011	12	40/37	NR	NR/NR	non		NR	NR
				12b	ANP	23/05/2011		32/31	NR	NR/NR	TMP/SMX	26/05/2011 (NR)	NR	NR

Tableau X : Données clinico-biologique des patients inclus dans le groupe 4

*Légende des tableaux VII à X : ANP : aspiration naso-pharyngée ; ATB : aspiration trachéo-bronchique ; ATV : atovaquone ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; LBA : lavage broncho-alvéolaire ; LBGC : lymphome B diffus à grandes cellules ; N : négatif ; NR : non réalisé ; PNI : pneumopathie d'inhalation ; TMP/SMX : triméthoprim/sulfaméthoxazole ; a Ct1/Ct2 : cycles seuils de détection obtenus en duplicat b copies d'ADN/mL de LBA c coloration au May Grunwald Giemsa rapide (RAL 555, RAL diagnostics) / immunofluorescence (Monofluokit *Pneumocystis*; Bio-Rad) jusqu'en mars 2018 puis colorant fluorescent (Uvibio®; LDBIO Diagnostics) * Patient immunodéprimé sans étiologie retrouvée, et décédé avant l'exploration de l'immunodépression*

b) Polymorphismes nucléotidiques et génotypage multi-loci des isolats de *Pneumocystis jirovecii*

La comparaison des séquences consensus obtenues avec les séquences de référence issues de la base de données GenBank[®] a permis de distinguer des polymorphismes nucléotidiques sur les quatre loci. Les polymorphismes décrits dans la littérature ainsi que ceux retrouvés pour chaque isolat du présent travail sont présentés dans les annexes I à IV.

Dans ce travail, nous avons identifié six allèles du locus du CytB (CytB1, 2, 3, 5, 6 et 8) parmi les neuf décrits dans la littérature, quatre allèles du locus mtLSU (mtLSU1, 2, 3 et 4) parmi les cinq décrits et deux allèles du locus β -tub (β -tub1 et 3) parmi les quatre décrits. Les quatre allèles du locus de la SOD décrits dans la littérature ont tous été identifiés. De plus un nouvel allèle, non publié précédemment, a été identifié ; nous l'avons dénommé mtLSU6. Celui-ci est caractérisé par la présence d'une adénine en position 248 alors que les allèles jusqu'à présent décrits présentent soit une cytosine soit une thymine sur cette position.

Nous avons ensuite procédé à l'attribution des génotypes pour chaque échantillon à l'aide de la combinaison des différents allèles observés pour chaque locus. Les génotypes obtenus sont présentés dans les tableaux XI à XIV.

*i. Groupe 1 : Génotypage de *P. jirovecii* dans les échantillons prélevés au cours d'un même épisode de Pneumonie à *Pneumocystis**

Le locus de la mtLSU a été amplifié dans les 24 échantillons testés et les loci du CytB, de la SOD et de la β -tub ont été amplifiés respectivement dans 23, 19 et 20 échantillons. Nous avons donc pu analyser quatre loci pour 17 des 24 échantillons, trois loci pour quatre échantillons et deux loci pour les trois derniers échantillons.

Il existe une identité complète de tous les allèles amplifiés pour l'ensemble des échantillons de huit des 11 patients inclus dans ce groupe (P₂, P₃, P₅, P₆, P₇, P₈, P₁₆ et P₁₇) et une identité partielle pour les échantillons de deux autres patients (P₁, P₁₁). En revanche, une différence allélique pour un même locus a été mise en évidence dans les échantillons du patient et P₁₅.

Patient	Echantillon	Allèles			
		CytB	mtLSU	SOD	β -tub
P ₁	1a	CytB1/2	mtLSU3	SOD1	-
	1b	CytB1/2/6	mtLSU3	-	β -tub1/3
	1c	CytB1/2/6	mtLSU3	-	β -tub3
P ₂	2a	CytB5	mtLSU3	SOD2	β -tub1
	2b	CytB5	mtLSU3	-	-
P ₃	3a	CytB2	mtLSU1	SOD2	β -tub3
	3b	CytB2	mtLSU1	SOD2	β -tub3
P ₅	5a	CytB6	mtLSU3	SOD1	β -tub1
	5b	-	mtLSU3	-	β -tub1
P ₆	6a	CytB1	mtLSU2	SOD1	β -tub3
	6b	CytB1	mtLSU2	SOD1	β -tub3
P ₇	7a	CytB1	mtLSU2	SOD1	β -tub1
	7b	CytB1	mtLSU2	SOD1	β -tub1
P ₈	8a	CytB1	mtLSU4	SOD1	β -tub1
	8b	CytB1	mtLSU4	SOD1	β -tub1
P ₁₁	11a	CytB1	mtLSU3	SOD1	β -tub1
	11b	CytB1/2	mtLSU1/3/4	SOD1	β -tub1
P ₁₅	15a	CytB8	mtLSU3	SOD1/2/3/4	β -tub1/3
	15b	CytB5	mtLSU6	SOD2	-
P ₁₆	16a	CytB1	mtLSU3	SOD2	β -tub3
	16b	CytB1	mtLSU3	SOD2	β -tub3
P ₁₇	17a	CytB2	mtLSU4	SOD1	β -tub1
	17b	CytB2	mtLSU4	SOD1	β -tub1
	17c	CytB2	mtLSU4	-	-

Tableau XI : Génotypes de *Pneumocystis jirovecii* dans les échantillons des patients du groupe 1

- : Absence d'amplification ; l'identification de différents allèles dans un même échantillon est indiquée par le symbole « / » entre chaque allèle identifié (ex : CytB1/2)

ii. Groupe 2 : Génotypage de *P. jirovecii* dans les échantillons prélevés au cours de deux épisodes de pneumonie à *Pneumocystis*

Parmi les quatre échantillons testés, seul le locus de la SOD de l'échantillon 19a n'a pas été amplifié. Nous avons donc pu analyser quatre loci pour trois des quatre échantillons et trois loci pour le dernier échantillon.

Des allèles distincts ont été identifiés dans les différents échantillons de chaque patient.

Patient	Echantillon	Allèles			
		CytB	mtLSU	SOD	β -tub
P ₁₈	18a	CytB8	mLSU1/2/3	SOD2/3	β -tub1/3
	18b	CytB1	mtLSU3	SOD2	β -tub1
P ₁₉	19a	CytB3	mtLSU3	-	β -tub1
	19b	CytB1	mtLSU3	SOD1	β -tub1

Tableau XII : Génotypes de *Pneumocystis jirovecii* dans les échantillons des patients du groupe 2

- : Absence d'amplification ; l'identification de différents allèles dans un même échantillon est indiquée par le symbole « / » entre chaque allèle identifié

iii. Groupe 3 : Génotypage de *P. jirovecii* dans les échantillons prélevés au cours d'une colonisation

Le locus du CytB a été amplifié dans tous les échantillons et celui de la mtLSU l'a été dans huit des neufs échantillons testés. A l'inverse, le locus de la SOD n'a été amplifié que dans deux échantillons et celui de la β -tub n'a pas pu être amplifié. Nous avons donc pu analyser trois loci pour deux des neufs échantillons, deux loci pour six échantillons et un locus pour le dernier échantillon.

Aucune co-infection n'a été détectée.

Pour les deux échantillons du patient P₁₄, il existe une identité des complètes des deux allèles amplifiés. A l'inverse, des différences alléliques ont été mises en évidence dans les échantillons des patients P₄, P₉ et P₁₃.

Patient	Echantillon	Allèles			
		CytB	mtLSU	SOD	β -tub
P ₄	4a	CytB1	mtLSU2	-	-
	4b	CytB2	-	-	-
P ₉	9a	CytB8	mtLSU1	SOD2	-
	9b	CytB2	mtLSU3	-	-
	9c	CytB1	mtLSU3	-	-
P ₁₃	13a	CytB6	mtLSU3	-	-
	13b	CytB2	mtLSU4	SOD1	-
P ₁₄	14a	CytB1	mtLSU3	-	-
	14b	CytB1	mtLSU3	-	-

Tableau XIII : Génotypes de *Pneumocystis jirovecii* dans les échantillons des patients du groupe 3

- : Absence d'amplification

iv. Groupe 4 : Génotypage de *P. jirovecii* dans les échantillons prélevés au cours d'une colonisation puis dans les échantillons prélevés au cours d'une pneumonie à *Pneumocystis*

Seul le locus du CytB a été amplifié pour l'échantillon 12a. La totalité des loci a été amplifiée pour les quatre autres échantillons. Nous avons donc pu analyser quatre loci pour quatre des cinq échantillons et un locus pour le dernier échantillon.

Il existe une identité allélique complète du seul locus amplifié dans les deux échantillons du patient P₁₂ – le locus du CytB – et une identité partielle de tous les loci pour les échantillons du patient P₁₀.

Patient	Echantillon	Allèles			
		CytB	mtLSU	SOD	β-tub
P ₁₀	10a	CytB1/6	mtLSU2/3	SOD1	β-tub1/3
	10b	CytB1/6	mtLSU2	SOD1	β-tub1/3
	10c	CytB1/5/6/8	mtLSU2/3	SOD1	β-tub1/3
P ₁₂	12a	CytB1	-	-	-
	12b	CytB1	mtLSU4	SOD1	β-tub3

Tableau XIV : Génotypes de *Pneumocystis jirovecii* dans les échantillons des patients du groupe 4

- : Absence d'amplification ; l'identification de différents allèles dans un même échantillon est indiquée par le symbole « / » entre chaque allèle identifié

4. Discussion

Intérêts, difficultés et limites de la méthode de MLST pour le génotypage de P. jirovecii

Pour mieux comprendre la physiopathologie et l'épidémiologie des champignons d'intérêt médical, différentes méthodes de génotypage ont été développées [75]. La méthode de MLST est aujourd'hui reconnue pour le génotypage de *P. jirovecii* en termes de pouvoir discriminant, de reproductibilité, de comparaison inter-laboratoire des résultats, de faisabilité par rapport au coût et au temps [76]. En 2013, Maitte *et al.* ont proposé un schéma consensuel à trois loci – ceux du CytB, de la mtLSU et de la SOD – permettant d'atteindre un index de discrimination à 0,987 tout en assurant un coût raisonnable et une exécution relativement aisée [56]. Pasic *et al.* ont ensuite proposé de compléter le schéma de Maitte *et al.* par l'étude du polymorphisme d'un quatrième locus [65]. En effet, en se basant sur une analyse de la littérature ainsi que sur le succès d'amplification et le niveau de polymorphisme du locus de la β -tub observés dans leur propre travail, les auteurs ont considéré que l'analyse de ce locus était également pertinente pour le génotypage MLST de *P. jirovecii*. Les auteurs concluent que ce schéma à quatre loci permet d'associer un bon niveau d'amplification des régions génomiques et un pouvoir discriminant élevé. Pour ces raisons, nous avons choisi ce schéma.

Ce schéma consensuel publié par Pasic *et al.* est promu par « The International Society for Human & Animal Mycology » et est désormais disponible en ligne. L'objectif de cette page web (<https://mlst.mycologylab.org>) est de mettre à disposition les schémas de MLST utiles au génotypage de différentes espèces fongiques pathogènes pour l'Homme et comprenant, entre autres, *P. jirovecii*. Toutefois, les amorces que nous avons utilisées pour amplifier le locus de la mtLSU étaient différentes de celles utilisées par Pasic *et al.* Les produits d'amplification que nous avons obtenus pour ce locus n'étaient par conséquent, pas reconnus par le site et nous n'avons pas pu identifier les génotypes de notre travail directement en ligne.

Neuf des 42 échantillons (21,4%) analysés dans ce travail présentent des mélanges alléliques sur au moins un locus, suggérant la présence de plusieurs isolats fongiques dans un même échantillon, désignés sous le terme de co-infection. Toutefois, compte-tenu des éventuelles recombinaisons des génomes mitochondriaux d'une part [77] et de l'hétéroplasmie de l'ADN mitochondrial d'autre part [78], l'hypothèse d'un mélange d'ADN mitochondrial pour un même isolat a été émise par certains auteurs, proposant alors d'écarter les cibles mitochondriales dans les approches de génotypage [79]. Nous avons pourtant choisi

de conserver ces cibles dans notre schéma de MLST puisqu'il s'agit de régions génomiques multicopiées qui sont par conséquent, facilement amplifiées, même en cas de faibles charges fongiques telles que celles observées au cours des colonisations. Les gènes mitochondriaux multicopiés du CytB et de la mtLSU ont en effet été amplifiés pour 41 et 40 échantillons, correspondant à des rendements d'amplification respectifs de 98% et 95%. A l'inverse, les gènes nucléaires unicopiés de la SOD et de la β -tub ont été amplifiés dans 28 échantillons chacun, résultant en un rendement d'amplification de 67%. Quoiqu'il en soit, le polymorphisme du génome mitochondrial identifié dans neuf échantillons a été confirmé par la mise en évidence simultanée d'un polymorphisme du locus nucléaire de la β -tub pour six d'entre eux (échantillons 1b, 10a, 10b, 10c, 15a, 18a) et du locus nucléaire de la SOD pour deux d'entre eux (échantillons 15a, 18a). Ce polymorphisme nucléaire conforte ainsi l'existence de réelles co-infections plutôt qu'un mélange d'ADN mitochondrial. Ainsi, le principal intérêt d'ajouter le locus de la β -tub au schéma de MLST proposé par Maitte *et al.* est de confirmer les co-infections initialement détectées par un polymorphisme du génome mitochondrial. Les trois autres échantillons présentant un polymorphisme mitochondrial (échantillons 1a, 1c et 11b) ne présentaient pas de polymorphisme nucléaire. Pour ces échantillons, une étape supplémentaire de clonage des produits d'amplification des loci nucléaires serait intéressante afin de confirmer l'existence d'une co-infection suspectée devant le polymorphisme des loci mitochondriaux.

Les rendements d'amplification de 98% et 95% que nous avons obtenus pour les gènes multicopiés sont semblables à ceux décrits par Pasic *et al.* En revanche, le rendement de 67% obtenu pour les gènes unicopiés est inférieur à celui de 80% rapporté par ces mêmes auteurs, bien que nous ayons adapté les protocoles de PCR tant sur les volumes d'ADN que sur les températures d'hybridation. Ce plus faible rendement n'est toutefois pas surprenant dans la mesure où notre travail comportait des échantillons de faible charge fongique, tels que ceux recueillis de manière peu invasives et ceux provenant de patients colonisés.

Dans notre travail, la caractérisation moléculaire de *P. jirovecii* a été réalisée par une méthode de MLST avec un séquençage direct de type Sanger. Cette technique ne détecte pourtant que les souches présentes à plus de 20% dans la population considérée et montre par conséquent des limites dans la caractérisation des sous-populations [80]. Une étude préliminaire a permis d'évaluer les performances du séquençage nouvelle génération pour le génotypage de *P. jirovecii* [81]. A l'aide de cette méthode, le seuil de détection des variants minoritaires a été évalué à 1% permettant ainsi de détecter des co-infections dans une

proportion plus importante qu'à l'aide du séquençage direct. A l'avenir, la puissance de cet outil en termes de discrimination devrait permettre de définir précisément les proportions de variants majoritaires et minoritaires dans un même échantillon et d'apporter ainsi de nouveaux éléments à la compréhension de l'histoire naturelle des infections par *P. jirovecii*.

Episodes de pneumonie à Pneumocystis

Ce travail a permis l'étude de 15 épisodes de PPC. Il s'agissait d'une PPC prouvée pour neuf d'entre eux dans la mesure où l'examen direct de l'échantillon de LBA était positif et/ou que la charge fongique était supérieure ou égale à 10^7 copies/mL de LBA. Il s'agissait d'une PPC possible pour les six autres épisodes puisque les critères biologiques évoquaient une colonisation (examen direct négatif [si disponible] et charge fongique $< 10^7$ copies/mL de LBA) mais l'administration d'un traitement anti-*Pneumocystis* ne permettait pas d'exclure une PPC.

Que le diagnostic de PPC soit prouvé ou possible, nous avons séparé les patients chez lesquels les prélèvements successifs avaient été réalisés au cours d'un même épisode de PPC (11 patients, inclus dans le groupe 1) des patients chez lesquels les prélèvements avaient été réalisés au cours d'épisodes récurrents de PPC (deux patients, inclus dans le groupe 2).

Les différences alléliques observées dans les échantillons successifs d'un seul des 11 patients prélevés pendant un même épisode de PPC (P₁₅) évoquent une co-infection avec une permutation de l'isolat fongique majoritaire au cours de l'épisode. Une autre hypothèse est celle d'un isolat unique présentant un mélange d'ADN mitochondrial puisque les différences n'ont été observées que sur des loci mitochondriaux. Cette seconde hypothèse est renforcée par les allèles identifiés dans les échantillons des dix autres patients. En effet, une identité allélique complète ou partielle de *P. jirovecii* dans tous les échantillons d'un même épisode a été mise en évidence. Cette identité est donc compatible avec la présence soit d'un isolat unique, dans le cas d'une identité complète, soit d'une co-infection par plusieurs isolats sans permutation de l'isolat majoritaire, dans le cas d'une identité partielle. Ainsi, nos résultats sont en faveur d'une stabilité relative des isolats fongiques tout au long d'un même épisode. Ces données renforcent celles de Latouche *et al.* qui ont observé une concordance complète des allèles mtLSU, ITS 1 et 2 chez 10 patients infectés par le VIH ayant bénéficié de prélèvements séquentiels d'un unique épisode de PPC [26]. Elles diffèrent en revanche de celles d'Helweg-Larsen *et al.* publiées il y a une vingtaine d'années dans lesquelles un changement de génotype était objectivé chez 10 des 19 patients (53%) qui avaient bénéficié

de plusieurs prélèvements au cours d'un unique épisode de PPC [82]. Toutefois, les auteurs ont évoqué, entre autres, l'existence d'une instabilité intrinsèque des séquences des ITS utilisées pour le génotypage de *P. jirovecii* plutôt qu'une réelle permutation des isolats majoritaires.

Il a par ailleurs été établi que des épisodes récurrents de PPC chez un même sujet étaient dus à des génotypes de *P. jirovecii* différents suggérant une recontamination à partir d'une source exogène plutôt qu'une réactivation de stades quiescents endogènes [25–28]. Dans notre travail, deux patients ont développé des épisodes distincts. Pour chaque patient, seul le locus mitochondrial du CytB présentait des allèles qui différaient selon l'échantillon alors qu'il existait une identité allélique complète ou partielle pour les trois autres loci. Compte tenu du concept de recontamination majoritairement admis aujourd'hui et exposé ci-dessus, nos résultats sont compatibles avec deux hypothèses. La première est celle du faible polymorphisme des loci de la mtLSU, de la SOD et de la β -tub qui n'a pas permis de distinguer les isolats différents dans chaque échantillon ; la seconde est celle d'une recontamination par des isolats génotypiquement semblables. Le faible nombre de patients dans ce groupe ne permet pas de privilégier l'une ou l'autre hypothèse.

Dynamique de la colonisation

Les différences alléliques mises en évidence dans les échantillons de trois des quatre patients colonisés au moment de la réalisation de chaque prélèvement (P₄, P₉ et P₁₃) suggèrent qu'il s'agit, pour chaque patient, d'isolats fongiques distincts dans chaque échantillon. A partir de cette observation, trois hypothèses peuvent être émises. La première est celle d'une clairance complète du champignon après un premier épisode de colonisation, suivie d'une nouvelle contamination par un isolat différent qui serait alors à l'origine de l'épisode de colonisation suivant. Ces épisodes de colonisation seraient entrecoupés de périodes « *Pneumocystis free* ». Une deuxième serait une colonisation au long cours avec un mélange d'isolats, dont l'un serait majoritaire – et par conséquent détecté dans l'échantillon – à un temps T, puis deviendrait minoritaire au profit d'un autre à un temps T+1. Une dernière est celle d'un isolat unique présentant un mélange d'ADN mitochondrial puisque les différences n'ont été observées que sur des loci mitochondriaux. Ces deux dernières hypothèses paraissent les plus probables et sont comparables à celles évoquées précédemment à propos du patient P₁₅. Le quatrième patient inclus dans ce groupe (P₁₄) présente quant à lui une identité allélique pour les deux gènes multicopiés amplifiés dans chaque échantillon. Cette identité est compatible avec la présence du même isolat fongique dans chacun des deux

échantillons prélevés à 951 jours d'intervalle et par conséquent, avec une colonisation au long cours sans clairance intermédiaire du champignon. Toutefois, nous ne pouvons pas complètement exclure le fait qu'il s'agisse en réalité de deux isolats distincts, non discriminés par l'analyse de deux allèles sur les quatre initialement décrits dans le schéma de MLST.

A notre connaissance, une seule équipe s'est intéressée au suivi longitudinal de la colonisation par *P. jirovecii* [83]. Montes-Cano *et al.* ont détecté le champignon par « nested PCR » dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Le génotypage a été réalisé par séquençage du locus de la mtLSU. Il existait un « switch » génotypique dans les échantillons successifs de cinq des huit patients colonisés pendant au moins six mois. Pour les trois autres, un unique génotype a été identifié dans les différents échantillons. Leurs observations sont donc comparables aux nôtres.

Quoi qu'il en soit, nos résultats sont compatibles avec la possibilité qu'il n'existe pas de périodes « *Pneumocystis free* » ; les patients présenteraient plutôt une colonisation au long cours avec fluctuation dans le temps de la proportion des différents variants. Cette notion, combinée aux conséquences individuelles de la colonisation sur le plan respiratoire évoquées au début de ce manuscrit, sont des arguments majeurs pour l'instauration d'un traitement anti-*Pneumocystis* chez les patients colonisés. En revanche, nous ne disposons pas aujourd'hui de données suffisantes pour définir la durée de colonisation à partir de laquelle il serait nécessaire d'instaurer ce traitement.

De la colonisation à la PPC

Le principal facteur prédictif d'une PPC est un déficit immunitaire. Un état de colonisation pourrait ainsi être le point de départ d'une PPC chez les sujets dont l'immunodépression perdure ou s'aggrave [84]. Il existe dans la littérature de rares études qui étayaient cette hypothèse. La première concerne des patients qui recevaient du méthotrexate au long cours pour traiter une polyarthrite rhumatoïde [85]. Les auteurs décrivent trois patients ayant développé une PPC dans les deux à quatre semaines suivant la mise en évidence d'une colonisation. Chacun recevait du méthotrexate depuis deux, 12 ou 24 mois, sans qu'il ne soit pourtant fait mention d'une intensification du traitement immunomodulateur précédant l'épisode de PPC. Dans cette étude, le génotypage de *P. jirovecii* n'a pas été réalisé et seuls les diagnostics successifs de colonisation puis de PPC sur un court laps de temps ont permis aux auteurs d'émettre l'hypothèse que la colonisation pouvait être un évènement prédictif d'une PPC chez des patients sous immunomodulateurs au long cours. Une observation

similaire a été rapportée dans une cohorte de huit patients infectés par le VIH et colonisés par *P. jirovecii* [86]. Un des patients a développé une PPC 50 semaines après le diagnostic de colonisation, sans modification apparente de son état d'immunodépression. Le génotype mtLSU de *P. jirovecii* identifié au moment de la colonisation était identique à celui identifié au moment de la PPC, évoquant ici encore l'évolution d'une colonisation vers une PPC. Ces premières données ont été renforcées par l'étude de Le Gal *et al.* dans laquelle les génotypes de *P. jirovecii* dans les paires d'échantillons respiratoires de cinq patients ont été comparés [33]. Pour chaque patient, le premier échantillon a été prélevé à un stade de colonisation et le second à un stade de PPC, avec une période médiane de 41 jours (de sept à 586 jours) entre le recueil des deux échantillons. Les génotypes ont été déterminés à l'aide d'une méthode de MLST ciblant deux loci mitochondriaux (mtLSU et CytB) et un locus nucléaire (SOD). Des identités génotypiques complètes et partielles ont été objectivées chez trois et un patient(s) respectivement, ces identités étant compatibles avec l'hypothèse d'un continuum entre la colonisation et la PPC. Toutefois, les différences génotypiques mises en évidence pour le cinquième patient suggèrent à l'inverse une contamination *de novo* à l'origine de l'épisode de PPC, les auteurs concluant alors à la nécessité d'un traitement de la colonisation au cas par cas.

S'agissant des différents échantillons du patient P₁₀ inclus dans notre étude, des identités complètes et partielles ont été objectivées pour les allèles nucléaires et mitochondriaux respectivement. Il existait également une identité allélique complète du seul locus amplifié pour le second patient inclus dans ce groupe (P₁₂). Ces identités sont compatibles avec un continuum des épisodes de colonisation et de PPC, comme évoqué précédemment par Le Gal *et al.*

La durée d'incubation de la PPC est quant à elle encore mal définie. Plusieurs travaux se sont appuyés sur la survenue de cas groupés en milieu hospitalier pour étayer cette notion en définissant le délai entre l'exposition d'un patient susceptible à un patient malade et l'apparition de la PPC chez le patient susceptible [61,81,87,88]. Toutefois, les intervalles observés sont extrêmement variables, allant de 7 à 705 jours. En revanche, considérant que la colonisation représente l'incubation de la PPC, Le Gal *et al.* ont observé des durées de sept, 41 et 63 jours pour chacun des trois patients cités plus haut, ces durées correspondant au délai écoulé entre le recueil des différents échantillons [33]. Dans notre travail, nous observons des résultats similaires avec des périodes d'incubation de 20 et 12 jours pour les patients P₁₀ et P₁₂ respectivement.

5. Conclusion & Perspectives

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la dynamique de colonisation par *P. jirovecii* et son potentiel évolutif vers une PPC. La première hypothèse était celle d'une colonisation au long cours par un (ou des) isolat(s) de *P. jirovecii*, qui évoluerait vers une PPC lors de l'aggravation de l'immunodépression. La seconde hypothèse était celle d'épisodes successifs de colonisation par différents isolats, chacun aboutissant à une clairance complète du champignon. Les identités alléliques mises en évidence pour la majorité des isolats de *P. jirovecii* chez les patients colonisés, que la colonisation ait précédé ou non une PPC, permettent d'argumenter en faveur de la première hypothèse.

Ainsi, même si nous ne pouvons pas exclure complètement l'hypothèse de périodes « *Pneumocystis free* » chez les patients présentant une immunodépression chronique, la possibilité de colonisation au long cours est à privilégier. Cette colonisation pourrait de surcroît évoluer en PPC. Ces deux données sont à elles seules suffisantes pour justifier l'instauration d'un traitement anti-*Pneumocystis* chez les patients présentant une immunodépression chronique avec une colonisation par *P. jirovecii* au long cours.

Aujourd'hui et en l'absence de biomarqueur prédictif de PPC chez les patients immunodéprimés non infectés par le VIH, la décision d'initier une chimioprophylaxie pour empêcher le développement d'une PPC se fonde sur les recommandations de sociétés savantes [89,90]. Ces recommandations ne tiennent cependant pas compte de la présence éventuelle de *P. jirovecii*. La recherche initiale d'une colonisation pulmonaire nous paraît pourtant essentielle et serait une stratégie permettant d'éviter les traitements prophylactiques par excès chez les patients non colonisés ; en ce sens, cela réduirait l'impact de la pression de sélection médicamenteuse sur le micro-organisme d'une part et la survenue d'effets indésirables chez ces patients immunodéprimés au long cours souvent polymédicamentés d'autre part. A l'inverse, la détection précoce d'une colonisation pourrait être suivie de l'éradication médicamenteuse du micro-organisme, permettant à la fois de préserver les fonctions respiratoires des patients et d'empêcher l'évolution vers une PPC. Toutefois, la durée de colonisation à partir de laquelle cette prophylaxie devrait être instaurée ainsi que les facteurs déterminant l'évolution de la colonisation en PPC sont encore incertains. En outre, il serait intéressant de rechercher des périodes « *Pneumocystis free* » chez les patients immunodéprimés au long cours. Une étude prospective de suivi longitudinal d'une cohorte de patients immunodéprimés colonisés permettrait d'explorer ces différents aspects. Ainsi, il serait possible d'affirmer ou d'écarter la présence du champignon dans des échantillons

recueillis de manière séquentielle, de calculer les durées maximales de colonisation et d'identifier des facteurs liés à l'hôte responsable de l'évolution de la colonisation vers la PPC.

Bibliographie

- [1] Yoneda K, Walzer PD, Richey CS, Birk MG. *Pneumocystis carinii* : Freeze-fracture study of stages of the organism. *Exp Parasitol* 1982;53:68–76. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(82\)90093-5](https://doi.org/10.1016/0014-4894(82)90093-5).
- [2] Matsumoto Y, Yamada M, Amagai T. Yeast glucan of *Pneumocystis carinii* cyst wall: an excellent target for chemotherapy. *J Protozool* 1991;38:6S-7S.
- [3] 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;334:519–22. <https://doi.org/10.1038/334519a0>.
- [4] Meade JC, Stringer JR. Cloning and characterization of an ATPase gene from *Pneumocystis carinii* which closely resembles fungal H⁺ ATPases. *J Eukaryot Microbiol* 1995;42:298–307. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1995.tb01584.x>.
- [5] Edlind TD, Bartlett MS, Weinberg GA, Prah GN, Smith JW. The β -tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol* 1992;6:3365–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02204.x>.
- [6] Edman U, Edman JC, Lundgren B, Santi DV. Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:6503–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6503>.
- [7] Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1992;60:4140–5. <https://doi.org/10.1128/iai.60.10.4140-4145.1992>.
- [8] Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, *et al.* The revised classification of Eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 2012;59:429–514. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>.
- [9] Gigliotti F. Host species-specific antigenic variation of a mannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 1992;165:329–36. <https://doi.org/10.1093/infdis/165.2.329>.
- [10] Kovacs JA, Halpern JL, Lundgren B, Swan JC, Parrillo JE, Masur H. Monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*: identification of specific antigens and characterization of antigenic differences between rat and human isolates. *J Infect Dis* 1989;159:60–70. <https://doi.org/10.1093/infdis/159.1.60>.
- [11] Stringer JR, Stringer SL, Zhang J, Baughman R, Smulian AG, Cushion MT. Molecular genetic distinction of *Pneumocystis carinii* from rats and humans. *J Eukaryot Microbiol* 1993;40:733–41. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04468.x>.
- [12] Mazars E, Guyot K, Durand I, Dei-Cas E, Boucher S, Abderrazak SB, *et al.* Isoenzyme diversity in *Pneumocystis carinii* from rats, mice, and rabbits. *J Infect Dis* 1997;175:655–60. <https://doi.org/10.1093/infdis/175.3.655>.

- [13] Denis CM, Mazars E, Guyot K, Ödberg-Ferragut C, Viscogliosi E, Dei-Cas E, *et al.* Genetic divergence at the SODA locus of six different formae speciales of *Pneumocystis carinii*. *Med Mycol* 2000;38:289–300. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.4.289.300>.
- [14] Hunter JA, Wakefield AE. Genetic divergence at the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene among isolates of *Pneumocystis carinii* from five mammalian host species. *J Eukaryot Microbiol* 1996;43:24S-25S. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb04962.x>.
- [15] Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol Biochem Parasitol* 1991;45:183–4. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90042-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90042-5).
- [16] Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, Delcourt P, Billaut P, Camus D. *Pneumocystis* cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. *J Eukaryot Microbiol* 1994;41:71S.
- [17] Durand-Joly I, Aliouat EM, Recourt C, Guyot K, François N, Wauquier M, *et al.* *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* is not infectious for SCID mice. *J Clin Microbiol* 2002;40:1862–5. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.5.1862-1865.2002>.
- [18] Soulez B, Palluault F, Cesbron JY, Dei-Cas E, Capron A, Camus D. Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice. *J Protozool* 1991;38:123S-125S.
- [19] Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *J Eukaryot Microbiol* 2006;53:2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00072.x>.
- [20] Thomas CFJ, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis* pneumonia. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:298–308. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1621>.
- [21] Cushion MT, Stringer JR. Stealth and opportunism: alternative lifestyles of species in the fungal genus *Pneumocystis*. *Annu Rev Microbiol* 2010;64:431–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134335>.
- [22] Meuwissen JHET, Tauber I, Leeuwenberg ADEM, Beckers PJA, Sieben M. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J Infect Dis* 1977;136:43–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/136.1.43>.
- [23] Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. *Pneumocystis* Colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clin Infect Dis* 2010;50:347–53. <https://doi.org/10.1086/649868>.
- [24] Peters SE, Wakefield AF, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. *J Pathol* 1992;166:195–8. <https://doi.org/10.1002/path.1711660217>.
- [25] Keely SP, Stringer JR, Baughman RP, Linke MJ, Walzer PD, Smulian AG. Genetic variation among *Pneumocystis carinii hominis* isolates in recurrent pneumocystosis. *J Infect Dis* 1995;172:595–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.2.595>.

- [26] Latouche S, Poirot JL, Bernard C, Roux P. Study of internal transcribed spacer and mitochondrial large-subunit genes of *Pneumocystis carinii hominis* isolated by repeated bronchoalveolar lavage from human immunodeficiency virus-infected patients during one or several episodes of pneumonia. *J Clin Microbiol* 1997;35:1687. <https://doi.org/doi:10.1128/jcm.35.7.1687-1690.1997>.
- [27] Keely SP, Stringer JR. Multi-locus genotype switching in *Pneumocystis carinii sp. f. hominis*: evidence for reinfection. *J Eukaryot Microbiol* 1996;43:50S. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb04985.x>.
- [28] Keely SP, Baughman RP, Smulian AG, Dohn MN, Stringer JR. Source of *Pneumocystis carinii* in recurrent episodes of pneumonia in AIDS patients. *AIDS Lond Engl* 1996;10:881–8. <https://doi.org/10.1097/00002030-199607000-00011>.
- [29] Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis* 2005;11:245–50. <https://doi.org/10.3201/eid1102.040487>.
- [30] Ma L, Cissé OH, Kovacs JA. A molecular window into the biology and epidemiology of *Pneumocystis spp.* *Clin Microbiol Rev* 2018;31. <https://doi.org/10.1128/CMR.00009-18>.
- [31] 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* 2012;54:e62–71. <https://doi.org/10.1093/cid/cir996>.
- [32] 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;93:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.01.018>.
- [33] Le Gal S, Bonnet P, Huguenin A, Chapelle C, Boulic P, Tonnelier JM, *et al.* The shift from pulmonary colonization to *Pneumocystis* pneumonia. *Med Mycol* 2020. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa107>.
- [34] Azar MM, Cohen E, Ma L, Cissé OH, Gan G, Deng Y, *et al.* Genetic and epidemiologic analyses of an outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among kidney transplant recipients in the United States. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2021:ciab474. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab474>.
- [35] Nevez G, Morio F, Bonnet P, Nan NL, Blanc F-X, Le Gal S. A proposal for pragmatic investigation of possible clonal clusters of *pneumocystis pneumonia* cases. *J Hosp Infect* 2021;108:215–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.11.022>.
- [36] Hughes WT. Natural mode of acquisition for *de novo* infection with *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 1982;145:842–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/145.6.842>.
- [37] Damiani C, Choukri F, Le Gal S, Menotti J, Sarfati C, Nevez G, *et al.* Possible nosocomial transmission of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis* 2012;18:877–8. <https://doi.org/10.3201/eid1805.111432>.

- [38] Valade S, Azoulay E, Damiani C, Derouin F, Totet A, Menotti J. *Pneumocystis jirovecii* airborne transmission between critically ill patients and health care workers. *Intensive Care Med* 2015;41:1716–8. <https://doi.org/10.1007/s00134-015-3835-9>.
- [39] Bulletin de santé publique VIH/sida. Octobre 2019. n.d. /maladies-et-traumatismes/infections-sexuellement-transmissibles/vih-sida/documents/bulletin-national/bulletin-de-sante-publique-vih-sida.-octobre-2019.
- [40] Roux A, Gonzalez F, Roux M, Mehrad M, Menotti J, Zahar JR, *et al.* Update on pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection in non-HIV patients. *Med Mal Infect* 2014;44:185–98. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.01.007>.
- [41] Kales CP, Murren JR, Torres RA, Crocco JA. Early predictors of in-hospital mortality for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 1987;147:1413–7. <https://doi.org/doi:10.1001/archinte.1987.00370080049012>.
- [42] Thomas CFJ, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia. *N Engl J Med* 2004;350:2487–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMra032588>.
- [43] Dromer F, Bretagne S, Lortholary O. Rapport annuel d'activité, centre de national de référence mycoses invasives et antifongiques. Inst Pasteur 2019.
- [44] Fungal Disease Frequency. Gaffi n.d. <https://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/>.
- [45] Totet A, Damiani C, Le Gal S, Nevez G. Infections à *Pneumocystis jirovecii* : biologie et clinique. *Encycl Méd Chir* 2020. [https://doi.org/10.1016/S1166-8598\(13\)32470-3](https://doi.org/10.1016/S1166-8598(13)32470-3).
- [46] Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, Rüssmann H, Tybus K, Pfaff F, *et al.* Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *J Clin Microbiol* 2000;38:1461–7.
- [47] 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 jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol* 2004;53:603–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45528-0>.
- [48] Yasuoka A, Tachikawa N, Shimada K, Kimura S, Oka S. (1-3) beta-D-glucan as a quantitative serological marker for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:197–9. <https://doi.org/doi:10.1128/cdli.3.2.197-199.1996>.
- [49] Li WJ, Guo YL, Liu TJ, Wang K, Kong JL. Diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia using serum (1-3)- β -D-Glucan: a bivariate meta-analysis and systematic review. *J Thorac Dis* 2015;7:2214–25. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.12.27>.
- [50] Damiani C, Demey B, Pauc C, Le Govic Y, Totet A. A negative (1,3)- β -D-glucan result alone is not sufficient to rule out a diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in patients with hematological malignancies. *Front Microbiol* 2021;12:2296. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713265>.

- [51] Haute Autorité de Santé. Évaluation des actes de diagnostic biologique de la pneumocystose (*Pneumocystis jirovecii*) 2017.
- [52] Nevez G, Raccurt C, Jounieaux V, Dei-Cas E, Mazars E. Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS* 1999;13:535. <https://doi.org/doi:10.1097/00002030-199903110-00020>.
- [53] Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:297–317. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-12>.
- [54] Morris A, Scirba FC, Lebedeva IP, Githaiga A, Elliott WM, Hogg JC, *et al.* Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:408–13. <https://doi.org/10.1164/rccm.200401-094OC>.
- [55] Hunter P, Gaston M. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988;26:2465–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.26.11.2465-2466.1988>.
- [56] Maitte C, Leterrier M, Le Pape P, Miegerville M, Morio F. Multilocus sequence typing of *Pneumocystis jirovecii* from clinical samples: how many and which loci should be used? *J Clin Microbiol* 2013;51:2843–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.01073-13>.
- [57] 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;35:3086–91. <https://doi.org/DOI:10.1128/jcm.35.12.3086-3091.1997>.
- [58] Santos LD, Lacube P, Latouche S, Kac G, Mayaud C, Marteau M, *et al.* Contribution of dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii f.sp. hominis* epidemiology. *J Eukaryot Microbiol* 1999;46:133S-134S.
- [59] Kutty G, Ma L, Kovacs JA. Characterization of the expression site of the major surface glycoprotein of human-derived *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol* 2001;42:183–93. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02620.x>.
- [60] 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;186:1647–54. <https://doi.org/10.1086/345721>.
- [61] Gits-Muselli M, Peraldi MN, 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:e0125763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125763>.
- [62] Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:90–3. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.1.90-93.1998>.
- [63] Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, *et al.* Update on *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* typing based on nucleotide sequence variations in

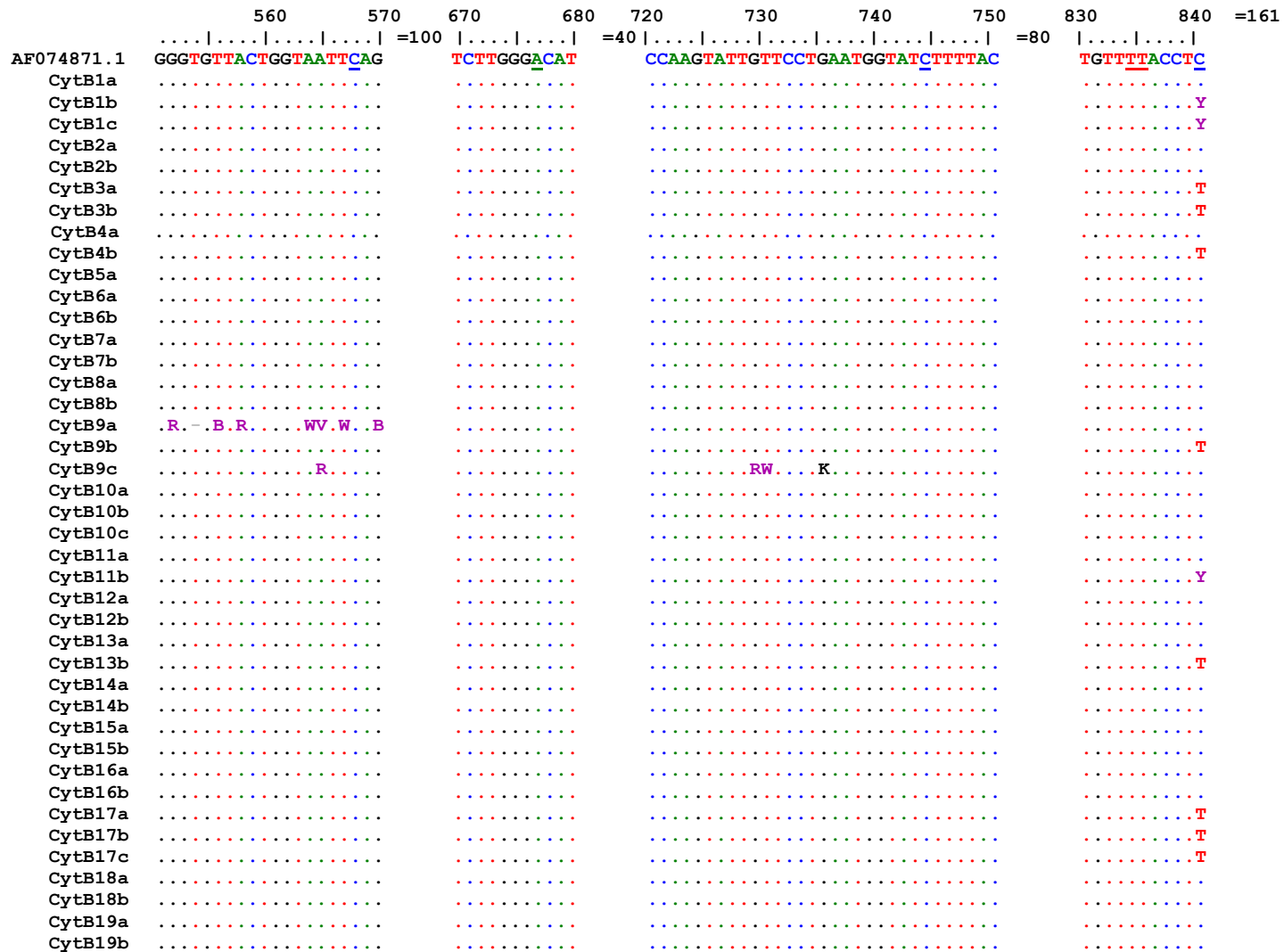
- internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1998;36:734–41. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.3.734-741.1998>.
- [64] Latouche S, Roux P, Poirot JL, Lavrard I, Hermelin B, Bertrand V. Preliminary results of *Pneumocystis carinii* strain differentiation by using molecular biology. *J Clin Microbiol* 1994;32:3052–3. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.12.3052-3053.1994>.
- [65] Pasic L, Gotteris L, Guerrero-Murillo M, Irinyi L, Kan A, Ponce CA, *et al.* Consensus multilocus sequence typing scheme for *Pneumocystis jirovecii*. *J Fungi* 2020;6:259. <https://doi.org/10.3390/jof6040259>.
- [66] Gits-Muselli M, Campagne P, Desnos-Ollivier M, Le Pape P, Bretagne S, Morio F, *et al.* Comparison of MultiLocus Sequence Typing (MLST) and Microsatellite Length Polymorphism (MLP) for *Pneumocystis jirovecii* genotyping. *Comput Struct Biotechnol J* 2020;18:2890–6. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.005>.
- [67] 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* 2010;51:259–65. <https://doi.org/10.1086/653933>.
- [68] Totet A, Latouche S, Duwat H, Magois E, Lacube P, Pautard J-C, *et al.* Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in patients developing diverse forms of parasitism: implication for a wide human reservoir for the fungus. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50:670–89. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00679.x>.
- [69] Lagrou K, Chen S, Masur H, Viscoli C, Decker CF, Pagano L, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* disease: basis for the revised EORTC/MSGERC invasive fungal disease definitions in individuals without human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2021;72:S114–20. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1805>.
- [70] Esteves F, Gaspar J, Tavares A, Moser I, Antunes F, Mansinho K, *et al.* Population structure of *Pneumocystis jirovecii* isolated from immunodeficiency virus-positive patients. *Infect Genet Evol* 2010;10:192–9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.12.007>.
- [71] Chabé M, Khalife S, Gantois N, Even G, Audebert C. An improved single-round PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Pneumocystis spp.* *Med Mycol* 2014;52:841–6. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu032>.
- [72] Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, *et al.* Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet Lond Engl* 1990;336:451–3. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92008-6](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92008-6).
- [73] Walker DJ, Wakefield AE, Dohn MN, Miller RF, Baughman RP, Hossler PA, *et al.* Sequence Polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* Cytochrome b Gene and Their Association with Atovaquone Prophylaxis Failure. *J Infect Dis* 1998;178:1767–75. <https://doi.org/10.1086/314509>.
- [74] Volpe G, Sbaiz L, Avanzini C, Caramello P, Savoia D. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* isolated from human immunodeficiency virus-positive patients in

- Turin, Italy. *J Clin Microbiol* 2001;39:2995–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2995-2998.2001>.
- [75] Alanio A, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S. Investigating clinical issues by genotyping of medically important fungi : why and how? *Clin Microbiol Rev* 2017;30:671–707. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-16>.
- [76] Sokulska M, Kicia M, Wesołowska M, Hendrich AB. *Pneumocystis jirovecii* - from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. *Parasitol Res* 2015;114:3577–85. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4678-6>.
- [77] Westermann B. Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochim Biophys Acta* 2014;1837:1039–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.005>.
- [78] 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00733>.
- [79] Valero C, Buitrago MJ, Gits-Muselli M, Benazra M, Sturny-Leclère A, Hamane S, *et al.* Copy number variation of mitochondrial DNA genes in *Pneumocystis jirovecii* according to the fungal load in BAL specimens. *Front Microbiol* 2016;7:1413. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01413>.
- [80] 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:e0149215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149215>.
- [81] Charpentier E, Garnaud C, Wintenberger C, Bailly S, Murat J-B, Rendu J, *et al.* Added value of next-generation sequencing for multilocus sequence typing analysis of a *Pneumocystis jirovecii* pneumonia outbreak. *Emerg Infect Dis* 2017;23:1237–45. <https://doi.org/10.3201/eid2308.161295>.
- [82] Helweg-Larsen J, Lee CH, Jin S, Hsueh JY, Benfield TL, Hansen J, *et al.* Clinical correlation of variations in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes in *Pneumocystis carinii f.sp. hominis*. *AIDS Lond Engl* 2001;15:451–9. <https://doi.org/10.1097/00002030-200103090-00003>.
- [83] Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena FJ, Mateos I, Friaza V, Respaldiza N, *et al.* Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2007;13:1008–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01789.x>.
- [84] Alanio A, Bretagne S. *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000Research* 2017;6:739. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10619.1>.
- [85] Mori S, Cho I, Sugimoto M. A followup study of asymptomatic carriers of *Pneumocystis jirovecii* during immunosuppressive therapy for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2009;36:1600–5. <https://doi.org/10.3899/jrheum.081270>.

- [86] Gutiérrez S, Morilla R, León JA, Martín-Garrido I, Rivero L, Friaiza V, *et al.* High prevalence of *Pneumocystis jiroveci* colonization among young HIV-infected patients. *J Adolesc Health* 2011;48:103–5. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2010.05.013>.
- [87] Yazaki H, Goto N, Uchida K, Kobayashi T, Gatanaga H, Oka S. Outbreak of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in renal transplant recipients: *P. jirovecii* is contagious to the susceptible host. *Transplantation* 2009;88:380–5. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181aed389>.
- [88] Manoloff ES, Francioli P, Taffé P, van Melle G, Bille J, Hauser PM. Risk for *Pneumocystis carinii* transmission among patients with pneumonia: a molecular epidemiology study. *Emerg Infect Dis* 2003;9:132–4. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020141>.
- [89] Maertens J, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Alanio A, *et al.* ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2397–404. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw157>.
- [90] Fishman JA, Gans H, AST Infectious Diseases Community of Practice. *Pneumocystis jirovecii* in solid organ transplantation: guidelines from the american society of transplantation infectious diseases community of practice. *Clin Transplant* 2019;33:e13587. <https://doi.org/10.1111/ctr.13587>.

Annexes

	270	280	290	300	340	350	360	370	510	520	540	550
= 270												
AF074871.1	TGTAGTTATCTTCCTTAATTATGATGTTACT				=40	TTGTGGGGAGCGACTGTATTACTAATTGA			=140	CATTTAATCTC	=20	AGTAATCCTCT
CytB1a
CytB1b	R.....Y..
CytB1cY..
CytB2a	T.....T..
CytB2b	T.....T..
CytB3a	T.....
CytB3b	T.....
CytB4a
CytB4b
CytB5aT..
CytB6a
CytB6b
CytB7a
CytB7b
CytB8a
CytB8b
CytB9a	T.....
Cytb9b
CytB9cR.Y..
CytB10aY..
CytB10bY..
CytB10cY..
CytB11a
CytB11b
CytB12a
CytB12b
CytB13a
CytB13bT..
CytB14a
CytB14b
CytB15a
CytB15b	T.....T..
CytB16a
CytB16b
CytB17a
CytBA17b
CytB17c
CytB18a	T.....
CytB18b
CytB19a	G.....T..
CytB19b



Annexe I : Alignements des séquences pour le locus du Cytochrome B

	80	90	100	250	260
=130			=150 = 64
M58605.1	TCC	TAAAAAA	--TAGTAGG	CCC	AATTAATA
mtLSU1a	T	--
mtLSU1b	T	--
mtLSU1c	T	--
mtLSU2a	T	--
mtLSU2b	T	--
mtLSU3a	C	--
mtLSU3b	C	--
mtLSU4a	H
mtLSU5a	T	--
mtLSU5b	T	--
mtLSU6a	--
mtLSU6b	--
mtLSU7a	AA
mtLSU7b	AA
mtLSU8a	C	--	T
mtLSU8b	C	--	T
mtLSU9a	C	--
mtLSU9b	T	--
mtLSU9c	T	--
mtLSU10a	W	--
mtLSU10b	W	--
mtLSU10c	W	--
mtLSU11a	T	--
mtLSU11b	Y	--	Y
mtLSU12b	C	--	T
mtLSU13a	T	--
mtLSU13b	C	--	T
mtLSU14a	T	--
mtLSU14b	T	--
mtLSU15a	T	--
mtLSU15b	RTG	T . CC	G	A
mtLSU16a	T	--
mtLSU16b	T	--
mtLSU17a	C	--	T
mtLSU17b	C	--	T
mtLSU17c	C	--	T
mtLSU18a	H	--
mtLSU18b	T	--
mtLSU19a	T	--
mtLSU19b	T	--

Annexe II : Alignements des séquences pour le locus de la mtLSU

	100	110	120	200	210	220
=100			=80	= 770
AF146753	TTGTTTAAAGYCC	TTTTTTAA		TGATTCTTCTGTGGAYTTAGC		
SOD1a	T.....
SOD2a	T.....	C.....
SOD3a	T.....	C.....
SOD3b	T.....	C.....
SOD5a	C.....	T.....
SOD6a	C.....	T.....
SOD6b	C.....	T.....
SOD7a	C.....	T.....
SOD7b	C.....	T.....
SOD8a	C.....	T.....
SOD8b	C.....	T.....
SOD9a	T.....	C.....
SOD10a	C.....	T.....
SOD10b	C.....	T.....
SOD10c	C.....	T.....
SOD11a	C.....	T.....
SOD11b	C.....	T.....
SOD12b	C.....	T.....
SOD13b	C.....	T.....
SOD15a	Y.....	Y.....
SOD15b	T.....	C.....
SOD16a	T.....	C.....
SOD16b	T.....	C.....
SOD17a	C.....	T.....
SOD17b	C.....	T.....
SOD18a	T.....	Y.....
SOD18b	T.....	C.....
SOD19b	C.....	T.....

Annexe III : Alignements des séquences pour le locus de la SOD

		20	30	40	50	90	100	180	280	290	300	310
	= 20											
	
AF170964.1		GTGCAGGCATGGGAAC	TTTGC		TTTCAGTGGTT			CATTAAAAATTGCCGGATCCAGGATATGGTGAT				
β-tub 1b		.WR	WR
β-tub 1c	
β-tub 2a		S.R	KW	K
β-tub 2a	G	M
β-tub 2a		WR
β-tub 3a	
β-tub 3b	
β-tub 5a	G
β-tub 5b		S.RS	G	M	G	R
β-tub 6a	
β-tub 6b	
β-tub 7a	G
β-tub 7b		G
β-tub 8a		G
β-tub 8b		G
β-tub 10a		RS	K	R
β-tub 10b		R	RW
β-tub 10c		R
β-tub 11a		K	G	R
β-tub 11b		K	G	R
β-tub 12b		RS	DKA	K	WR
β-tub 15a		R
β-tub 16a	
β-tub 16b	
β-tub 17a		G
β-tub 17b		G
β-tub 18a		R	RW
β-tub 18b		G	RW
β-tub 19a		G
β-tub 19b		G

Annexe IV : Alignements des séquences pour le locus de la β-tub

CRESTIA Justine

**Thèse d'exercice pour le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie
Université de Picardie Jules Verne**

**Dynamique de colonisation par *Pneumocystis jirovecii* -
Intérêt du génotypage par méthode de MLST**

Résumé :

Pneumocystis jirovecii est un champignon responsable de pneumonie sévère chez les patients immunodéprimés, la pneumonie à *Pneumocystis* (PPC), mais également de colonisation pulmonaire chez les individus présentant une immunodépression moindre.

L'objectif de ce travail est de comprendre la dynamique de colonisation par *P. jirovecii* et son potentiel évolutif vers une PPC. Nous avons réalisé un génotypage par méthode *Multi Locus Sequence Typing* sur quatre loci (ARNr mitochondrial, cytochrome B, superoxyde dismutase et β -tubuline) des isolats de *P. jirovecii* provenant d'échantillons successifs prélevés chez un même patient.

Quarante-deux échantillons respiratoires recueillis chez 19 patients ont été analysés. Vingt-quatre provenaient de 11 patients prélevés à deux reprises au cours d'un épisode de PPC ; quatre échantillons provenaient de deux patients prélevés au cours d'épisodes distincts de PPC ; neuf échantillons provenaient de quatre patients colonisés et cinq échantillons provenaient de deux patients ayant successivement présenté une colonisation puis une PPC.

Les identités alléliques mises en évidence pour la majorité des isolats de *P. jirovecii* chez les patients colonisés, que la colonisation ait précédé ou non une PPC, suggèrent la possibilité d'une colonisation au long cours avec fluctuation temporelle des différents variants ainsi que l'existence d'un continuum de la colonisation vers la PPC. Ces notions, combinées aux conséquences individuelles de la colonisation sur le plan respiratoire, sont des arguments majeurs pour l'instauration d'un traitement contre *Pneumocystis* chez les patients colonisés présentant une immunodépression chronique.

Mots-clés

Pneumocystis jirovecii, Pneumonie à *Pneumocystis*, colonisation, génotypage, MLST