

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

UNION – DISCIPLINE – TRAVAIL

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE FELIX HOUPOUËT BOIGNY



UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année : 2012 – 2013

THESE

N°1588/13

Présentée en vue de l'obtention du

**DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

M. NIANGORAN MONNEY ELIE

**Prévalence de la Pneumocystose chez les Sujets VIH
Positifs Présentant un Syndrome
Alvéolo-interstitiel : Recherche par la Technique de PCR**

Soutenue publiquement le 18 Octobre 2013

Composition du jury

Président	: Monsieur MONNET Dagui , Professeur Titulaire
Directeur de thèse	: Monsieur MENAN Eby Ignace Herve , Professeur Titulaire
Assesseurs	: Monsieur INWOLEY Kokou André , Professeur Agrégé
	: Monsieur TONI Thomas , Chargé de Recherche

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	5
INTRODUCTION.	7
PREMIERE PARTIE: REVUE DE LA LITTERATURE.....	11
CHAPITRE I : VIH et SIDA.....	12
I- Historique du VIH.....	12
II- Structure du virus.....	12
III- Physiopathologie de l'infection à VIH.....	16
IV- Données épidémiologiques.....	18
CHAPITRE II : Pneumocystose.....	23
I- Taxonomie.....	23
II- Historique.....	23
III- Epidémiologie.....	24
IV- Pathologie et physiopathologie.....	29
V- Aspect clinique.....	31
VI- Diagnostic biologique.....	32
VII- Traitement.....	39
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	43
CHAPITRE I : Matériel et méthodes.....	44
I- Déroulement de l'étude.....	44
II- Type, durée et lieu de l'étude.....	44
III- La population d'étude.....	45
IV- Méthode d'analyse.....	47

V-	Traitement des données.....	59
VI-	Calcul des paramètres d'évaluation.....	60
CHAPITRE II : Résultats et commentaires.....		62
I-	Caractéristiques socio-démographiques.....	62
II-	Caractéristiques biologiques.....	64
III-	Caractéristiques cliniques et thérapeutiques.....	65
IV-	Etude analytique.....	69
CHAPITRE III : Discussion.....		77
CONCLUSION.....		82
RECOMMANDATIONS.....		84
REFERENCE.....		86
ANNEXES.....		95

ABBREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

ARNr: Acide Ribonucléique ribosomal

ARV : Antirétroviraux

CD4: Cluster Designation Four

CeDReS: Centre de Recherche et Diagnostic sur le SIDA et les Maladies
Opportunistes

CHU: Centre Hospitalier et Universitaire

CIRBA: Centre Intégré de Recherche Bioclinique d'Abidjan

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

IFI : Immuno Fluorescence Indirect

LBA: Lavage Broncho Alvéolaire

LDH: Lactico DésHydrogénase

PaO₂: Pression Partielle d'oxygène

PaCO₂: Pression Partielle de dioxyde de carbone

PCP : *Pneumocystis carinii* Pneumonia

PJP : *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia

PCR : Polymerase Chain Reaction

PID : Pneumopathie Infiltrante Diffuse

PVVIH : Personne Vivant avec le VIH

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu

SMZ : Sulfamethoxazole

SIDA : Syndrome de l'Immuno Déficience Acquis ou Syndrome Immuno Déficitaire
Acquis

TMP: Trimetoprim

TNF: Tumor Necrosis Factor

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma organisationnel du VIH	13
Figure 2 : Cycle de l'infection à <i>Pneumocystis jirovecii</i>	26
Figure 3 : Détection des formes de <i>Pneumocystis</i> par l'utilisation des différentes techniques.....	35
Figure 4 : Schéma d'une nested PCR.....	38
Figure 5 : Répartition de la population selon le sexe.....	63
Figure 6: Répartition de la population selon l'état clinique.....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Gènes et protéines du VIH.....	15
Tableau II: Classification CDC de l'infection VIH pour les adolescents et les adultes (révision CDC 1993).....	22
Tableau III : Terrains prédisposés et facteurs de risque de la transmission de la pneumocystose.....	28
Tableau IV : Indication et posologie de la corticothérapie au cours de la pneumocystose.....	41
Tableau V : Mode opératoire de la nested PCR.....	57
Tableau VI : Données pour le calcul des paramètres d'évaluation diagnostique.....	60
Tableau VII : Données sociodémographiques des patients.....	62
Tableau VIII : Répartition des patients en fonction la classification CDC et taux de CD4.....	64
Tableau IX : Répartition selon le serotype.....	65
Tableau X : Répartition de la population selon la prise d'ARV.....	65
Tableau XI : Répartition des patients selon le traitement prophylactique au cotrimoxazole.....	66
Tableau XII : Répartition des patients selon leur durée de mise sous cotrimoxazole.....	66

Tableau XIII : Répartition selon l'IFI et la PCR.....	68
Tableau XIV: Répartition de l'âge en fonction du résultat de la PCR.....	69
Tableau XV : Répartition du sexe en fonction du résultat de la PCR.....	70
Tableau XVI: Répartition de la situation matrimoniale en fonction du résultat de la PCR.....	70
Tableau XVII: Répartition de la profession en fonction du résultat de la PCR.....	71
Tableau XVIII : Répartition du type d'habitat en fonction du résultat de la PCR.....	72
Tableau XIX : Répartition du nombre de personnes par habitat en fonction du résultat de la PCR.....	72
Tableau XX : Répartition du taux de CD4 en fonction du résultat de la PCR...	73
Tableau XXI : Répartition de la sérologie en fonction du résultat de la PCR..	74
Tableau XXII: Répartition du stade CDC en fonction du résultat de la PCR...	74
Tableau XXIII : Répartition du traitement ARV en fonction du résultat de la PCR.....	75
Tableau XXIV : Répartition du traitement au Cotrimoxazole en fonction du résultat de la PCR.....	76



INTRODUCTION

L'infection à VIH est répandue dans le monde entier, avec 34 millions de sujets infectés [47]. Elle pose un problème majeur de santé dans le monde, tout particulièrement de santé publique dans les pays subsahariens où le manque de moyens financiers rend difficile l'accessibilité effective aux thérapies antirétrovirales [47].

La destruction des lymphocytes T-CD4 lors de la multiplication du virus du VIH constitue une porte ouverte à l'émergence des maladies opportunistes. Elles apparaissent pour bien d'entre elles lorsque le taux de lymphocytes T-CD4 est inférieur à 200 cellules/mm³ de sang [40]. Ces maladies opportunistes sont la cause du taux élevé de mortalité et de morbidité chez les sujets infectés par le VIH.

Parmi ces infections, nous pouvons citer la pneumocystose qui est due à un champignon, *Pneumocystis jiroveci* [31]. Bien que de rares cas de pneumopathie disséminée ou extra pulmonaire aient été décrites, elles se traduisent le plus souvent par une pneumopathie interstitielle diffuse. C'est une parasitose pour laquelle les taux de prévalence sont très variables dans le monde [22].

Aux Etats-Unis, avec l'introduction du traitement ARV dans les années 1996, on assiste à un déclin de 21,5% par an des cas de pneumocystose sur une période allant de 1996 à 1998 [2].

En France, cette affection a amorcé un déclin du fait de l'introduction du traitement ARV, avec 142 cas en 1998 [41].

Dans les pays en développement, plusieurs études mettent en évidence une prévalence de la pneumocystose entre 0 et 11% [2].

La pneumonie à *Pneumocystis jiroveci* demeure l'une des principales infections opportunistes chez les patients atteints du SIDA [34]. Une insuffisance respiratoire aiguë d'évolution fatale, secondaire à une

pneumocystose granulomateuse, a été rapportée chez un sujet atteint de leucémie lymphoïde chronique [52]. Des cas d'affections thyroïdiennes par *Pneumocystis jiroveci* ont été rapportés dans la littérature [64]. La pneumocystose splénique a été rapportée chez une patiente atteinte du SIDA [60]. Les pneumocystoses extra pulmonaires surviennent à un stade tardif de l'infection à VIH et ont un pronostic sévère [60]. La défaillance respiratoire en hospitalisation est l'un des signes majeurs annonciateurs de *Pneumocystis jiroveci pneumonia* (PJP) [3]. En France, elle constitue la principale pathologie révélatrice de l'infection à VIH dans 44% des cas [41].

Les signes radiologiques les plus fréquents sont des ombres diffuses alvéolaires et perihislares en forme de papillon [27]. Ces atteintes respiratoires constituent une urgence médicale chez les sujets séropositifs présentant un syndrome alvéolaire interstitiel.

Cependant, nous ne disposons pas de données suffisantes sur la prévalence de cette infection chez les personnes vivant avec le VIH en Côte d'Ivoire. Plusieurs techniques sont utilisées pour la mise en évidence du parasite dont l'amplification génique (PCR) qui a été décrite comme une méthode sensible et spécifique pour la recherche de l'Acide Desoxyribonucleique (ADN) de *Pneumocystis jiroveci* dans les échantillons biologiques [63].

L'objectif général est de :

Contribuer à l'établissement de données épidémiologiques sur la pneumocystose chez les sujets infectés par le VIH en Côte d'Ivoire.

Les objectifs spécifiques sont de :

- Déterminer la prévalence de la pneumocystose chez les PVVIH et présentant un syndrome alvéolaire interstitiel en Côte d'Ivoire ;
- Comparer deux méthodes de diagnostics à savoir l'Immuno Fluorescence Indirecte (IFI) et la PCR ;
- Identifier les facteurs influençant la prévalence de la pneumocystose.

Notre étude ainsi définie comprend deux parties :

- ° La première est consacrée à la revue de la littérature sur le VIH et la pneumocystose ;
- ° La deuxième qui concerne l'étude expérimentale, décrit la méthodologie et présente les résultats et la discussion.

PREMIERE PARTIE :
REVUE DE LA LITTERATURE

CHAPITRE I : VIH ET SIDA

I-HISTORIQUE DU VIH

L'isolement et la caractérisation du premier rétrovirus humain (Human T cell Leukemia/Lymphoma virus ou HTLV-1) furent publiés par Robert Gallo en 1980 [51]. Et, c'est en 1981 que le C.D.C (Center for Disease Central and Prevention) d'Atlanta identifie les premiers cas de syndrome d'immuno déficience acquise ou SIDA.

Mais, c'est en 1983 que Barre Sinoussi et coll. de l'équipe de Montagnier isolèrent le premiers virus responsable du SIDA : le VIH-1, puis le VIH-2 proche du virus de l'immuno déficience simienne en 1985 par Barin et coll. [6].

Le VIH-1 et le VIH-2 sont décrits au sein du genre Lentivirus : le VIH-1, largement prédominant, répandu dans le monde entier et le VIH-2, beaucoup plus rare et retrouvé en Afrique de l'Ouest, avec une coexistence des deux virus en Côte d' Ivoire [41].

Quatre principaux groupes du VIH-1 classés M, N, O, P sont décrits [50]. Le groupe M est responsable de la pandémie.

II-STRUCTURE DU VIRUS

Le virus du VIH est un virus de 100 nm de diamètre, enveloppé et présentant des spicules permettant l'ancrage (**Figure 1**). La structure du VIH comporte :

- Une enveloppe virale constituée d'une bicouche lipidique et de deux sortes de glycoprotéines : gp 120 et gp 41. La molécule gp 41 traverse la bicouche lipidique, tandis que la molécule gp 120 occupe une position plus périphérique : elle joue le rôle de récepteur viral de la molécule membranaire CD4 des cellules- hôtes. L'enveloppe virale dérive de la cellule-hôte : il en résulte qu'elle

contient quelques protéines membranaires de cette dernière, y compris la molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ;

- Un core viral ou nucléocapside, qui inclu une couche de protéine p 17 et une couche plus profonde de protéine p 24 ;
- Un génome constitué de deux copies d'ARN simple brin associés à deux molécules de transcriptase inverse (p 64) et à d'autres protéines enzymatiques (protéase p 10 et intégrase p 32).

II-1 Morphologie

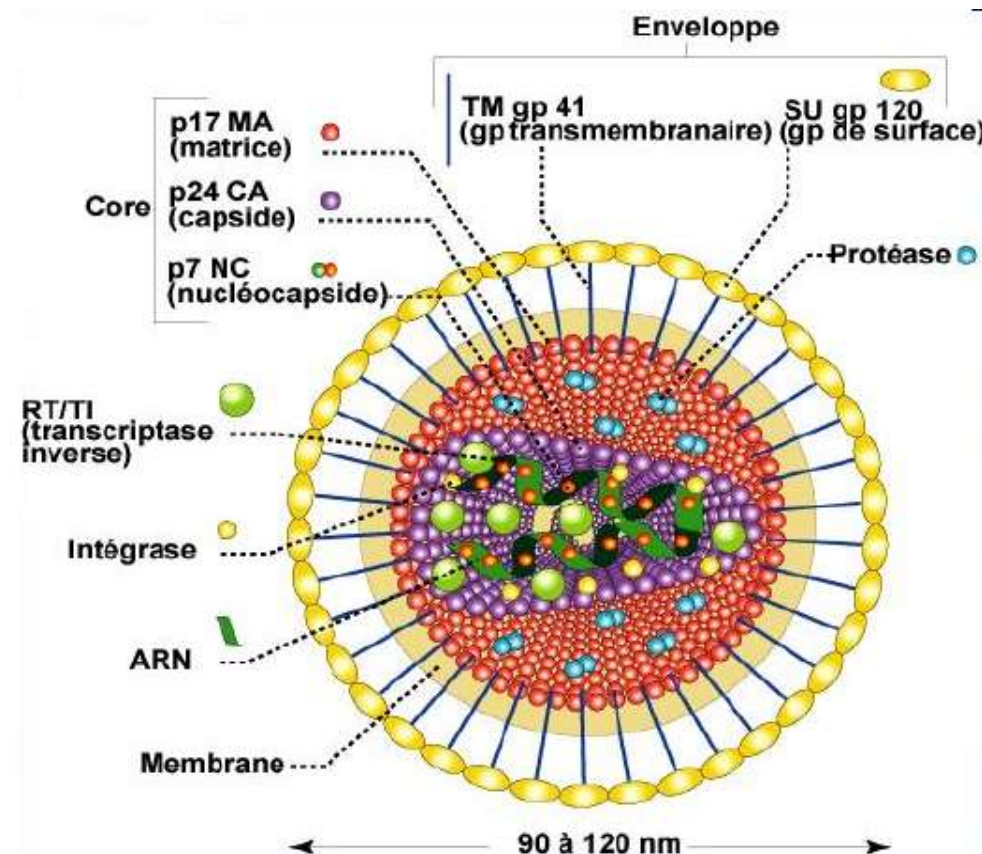


Figure 1 : Schéma organisationnel du VIH1 [11]

II-2 Taxonomie

Le VIH est un rétrovirus, c'est-à-dire qu'il possède une transcriptase inverse (TI) permettant la synthèse à partir de l'ARN viral d'un ADN bicartenaire.

Les rétrovirus de la famille des RETROVIRIDAE peuvent être classés en trois sous-familles [30,55] :

- Les ONCORNNAVIRINAE : ce sont des virus oncogènes induisant certains cancers et leucémie ;
- Les SPUMAVIRINAE : ce sont des virus non pathogènes chez l'homme, mais répandus chez les primates ;
- Les LENTIVIRINAE : ils sont responsables de maladies à évolution lente. Dans ce groupe se trouvent le VIH et le virus de l'immuno déficience simien (SIV).

II-3 Fonction des gènes et des produits des gènes des virus VIH-1 et VIH-2

Le tableau suivant présente les propriétés antigéniques du VIH [36].

Tableau I : Gènes et protéines du VIH

Gènes communs aux rétrovirus	Gènes	Protéines codées par gène	Fonctions
	GAG	P18, P25, P13 (P7, P9)	Protéine de structures
	POL	P10, P64, P51, P34	Protéase Transcriptase inverse Endonucléase
	ENV	VIH 1: gp120, gp 41 VIH2 : gp106, gp 36	Fixation au récepteur CD4 Phénomène de fusion des membranes
Gènes propres au VIH (gène de régulation)	VIF	P23	Rôle dans l'infectuosité
	VPR	P15	Rôle dans la vitesse de réplication du virus
	TAT	P14	Régulation positive
	REV	P20	Régulation positive
	NEF	P27	Régulation négative (virus en sommeil)
	VPV VIH1 seulement	P16	Rôle dans la maturation des particules virales
	VPX VIH2 seulement	P16	Action à un stade précoce de la réplication du virus

III-PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A VIH

III-1 Interaction virus-hôte

L'homme est essentiellement le seul réservoir du VIH. Au cours de l'infection à VIH, l'atteinte des lymphocytes T-CD4 est le fait essentiel [28, 33]. Les cellules sensibles à l'infection par le VIH sont principalement les cellules qui expriment à leur surface le récepteur CD4 et l'un des corécepteurs CCR5 et CXCR4 [37]. Le récepteur CD4 fonctionne comme un récepteur de hautes affinités pour la protéine gp 120 du VIH ;

Comme cellules cibles du VIH, les lymphocytes T-CD4 et à un degré moindre :

- Les cellules dendritiques et les cellules de langerhans présentes dans les organes lymphoïdes (thymus, rate, ganglions) ;
- Les monocytes circulants ;
- Les macrophages ;
- Les cellules folliculaires dendritiques des ganglions.

III-2 Cycle de réplication

La fixation du virus sur les cellules immunitaires est réalisée par l'intermédiaire de la gp 120 ainsi que par des corécepteurs présents à la surface cellulaire. La fusion de l'enveloppe du VIH avec la membrane de la cellule-hôte est réalisée par l'intermédiaire de la gp 41. Les enzymes et le matériel génétique du virus sont ensuite « déversés » dans le cytoplasme de la cellule.

La Transcriptase Inverse (TI) réalise la retro transcription de l'ARN viral (brin unique) en ADN proviral (double brin), avec élimination de la matrice de l'ARN par les RNase associées à la transcriptase reverse.

Il s'en suit l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN de la cellule infectée par l'intermédiaire de l'intégrase. L'ADN viral est transcrit en ARN viral, transporté dans le cytoplasme de la cellule et traduit en protéine virale. La protéase virale découpe les protéines virales synthétisées, qui, assemblées à des protéines d'ARN virale, constituent les nouvelles particules virales ou virions. Ces virions, par bourgeonnement à la surface de la cellule infectée, entraînent une scission, puis la libération des particules virales.

III-3 La déplétion lymphocytaire

Dès la primo-infection, le virus se réplique activement dans l'organisme, avec production quotidiennement de plusieurs milliards de virions, entraînant la destruction des lymphocytes T-CD4. Cette baisse des lymphocytes T-CD4 est une caractéristique de l'infection à VIH, mais elle n'est pas spécifique [57,58].

Cette réplication se stabilise après quelques semaines à un niveau plus ou moins important selon les sujets. Le taux de lymphocytes T-CD4 reste habituellement à la limite inférieure de la normale et une forte augmentation concomitante de la charge virale.

Il s'en suit une phase de latence pouvant aller de quelques mois à plus de 10 ans où la multiplication du virus se poursuit dans les gîtes lymphoïdes ; avec pour conséquence l'émergence et/ou la sélection de virus mutants qui échappent à la réponse immunitaire. Les perturbations immunitaires n'apparaissent qu'après plusieurs années. Le délai d'apparition de la phase SIDA est de 2 à plus de 10 ans, avec une survie moyenne d'environ 95% de 0 à 5 ans sans traitement antirétroviral.

IV-DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

IV-1 Mode de transmission du VIH

Il existe trois modes de transmission du VIH que sont :

- La voie sexuelle ;
- La voie sanguine ;
- La voie fœto-maternelle ;

IV-1-1 Transmission par voie sexuelle

C'est la principale voie de contamination. Le risque de transmission dépend du type de relation sexuelle et de la quantité de virus présents dans le sperme ou les sécrétions vaginales. A l'échelle mondiale, 75 à 85% des infections à VIH ont été acquises au cours des rapports sexuels non protégés. Plus de 70% sont imputables à la transmission hétérosexuelle, et les 5 à 10% restants, à la transmission homosexuelle [4,9].

IV-1-2 Transmission par voie sanguine

Elle peut survenir lors :

- De la transfusion de sang et/ou de ses dérivés ;
- De l'utilisation des objets tranchants ou piquants ;
- De la toxicomanie intraveineuse ou au cours de certaines pratiques culturelles comme le tatouage, les scarifications, la circoncision et l'excision ;
- D'inoculations accidentelles chez les professionnels.

IV-1-3 Transmission verticale

La transmission verticale peut se faire pendant la grossesse, au cours de l'accouchement ou lors de l'allaitement. Le virus est capable de traverser la barrière hémato placentaire et contaminer le fœtus. Mais, le cas le plus fréquent est toutefois lors de l'accouchement.

De plus, le virus se trouve dans le lait maternel, d'où la contamination lors de l'allaitement (cas fréquent surtout en Afrique).

IV-2 Répartition géographique

IV-2-1 Dans le monde

L'infection à VIH est très répandue dans le monde entier, avec 34 millions de sujets infectés [47]. En 2011, 69% des sujets se trouvent en Afrique subsaharienne où l'infection à VIH constitue l'une des premières causes de mortalité [46]. Parmi celle-ci, 30,8 millions étaient des adultes, dont 15,9 millions de femmes. Le nombre d'enfants vivant avec le VIH était de 2,5 millions. Le nombre de décès était estimé à 1,8 millions d'enfants et d'adultes.

Dans la dernière décennie, on a assisté à une augmentation des moyens mis à disposition pour la prévention et le traitement, ainsi que pour la recherche [44].

IV-2-2 En Afrique Subsaharienne [44]

Les premiers cas de SIDA ont été signalés en Afrique de l'est au début des années 1980 dans la région des lacs, en Ouganda et en Tanzanie. L'épidémie s'est progressivement propagée à l'ouest et au sud de l'Afrique.

En Afrique Subsaharienne, à la fin de l'année 2012, un total de 23,5 millions de personnes vit avec le VIH, soit 68% du total mondial. Les femmes représentent plus de 60% des infections par le VIH en Afrique subsaharienne. Le nombre de nouvelles infections était de 1,8 millions, dont 1,5 millions d'adultes. Le nombre d'orphelins de 0 à 17 ans à cause du SIDA était de 14,8 millions.

Le SIDA figure parmi les principales causes de décès dans le monde et reste la première cause de décès en Afrique. Le nombre de décès était estimé à 1,3 millions d'enfants et adultes.

IV-2-2 Situation en Côte d'Ivoire

La Côte d'Ivoire, comme le reste du monde, est également touchée par l'épidémie. D'une séroprévalence faible au départ, nous avons assisté à une propagation de l'infection à VIH/SIDA. La Côte d'Ivoire est le pays d'Afrique de l'Ouest le plus touché par la pandémie. Il faut noter une coexistence des deux virus VIH1 et VIH2 en Côte d'Ivoire.

Le taux de prévalence, ces dernières années, a considérablement baissé en Côte d'Ivoire passant de 12% en 2003 à 3,7% en 2013 [1]. En 2005, elle était de 4,7% [16]. Cette prévalence était estimée à 2,9% chez les hommes et 6,4% chez les femmes de la tranche d'âge de 15 à 49 ans. La prévalence maximale chez les adultes s'observait chez les sujets de 30 à 40 ans (10,4%). Elle était élevée chez les femmes de 30 à 34 ans (14,9 %). Chez les hommes, elle était plus élevée pour la tranche d'âge de 40 à 44 ans (7%). La prévalence globale en milieu rural était de 4,1% contre 5,4% en milieu urbain [44].

IV.2.3 Catégories cliniques

Il existe deux classifications pour décrire la progression de l'infection VIH, fondées sur les manifestations cliniques et les anomalies biologiques :

- classification CDC (*Center for Disease Control and Prévention*) modifiée en 1993, présentée par le tableau II où les catégories sont décrites [14] dans l'annexe 3 ;
- la classification OMS où les patients sont classés en 4 stades cliniques de gravité croissante (voir annexe 4).

Globalement, chez les personnes infectées par le VIH, il faut distinguer :

- les porteurs asymptomatiques ;
- les personnes atteintes de formes mineures qui présentent une variété de troubles banaux non caractéristiques d'une infection à VIH, parfois associés à des signes biologiques variés révélés par un examen sanguin ;
- les personnes atteintes des formes intermédiaires avec multiplication des symptômes (amaigrissement, fièvre, diarrhée, éruption cutanée, etc.) associés le plus souvent à des signes biologiques ;
- les personnes atteintes de formes majeures qui correspondent au stade sida avec des infections dites opportunistes, des cancers ou des atteintes neurologiques [20].

Tableau II: Classification CDC de l'infection VIH pour les adolescents et les adultes (révision CDC 1993) [14]

Nombre de CD4/mm³	Catégorie A . Asymptomatique . Primo-infection . Lymphadénopathie	Catégorie B . Symptomatique . Sans critère A ou C	Catégorie C . Sida
≥ 500	A₁	B₁	C₁
200-499	A₂	B₂	C₂
<200	A₃	B₃	C₃

CHAPITRE II : PNEUMOCYSTOSE

I-TAXONOMIE

Pneumocystis jiroveci (*Pneumocystis carinii*) a été précédemment classé comme un protozoaire. Actuellement, il est considéré comme un champignon, sur la base de l'analyse des acides nucléiques et des analyses biochimiques [26].

Les pneumocysties appartiennent :

- Au règne des *Fongi* (*mycètes*) ;
- A la division des Ascomycota (Ascomycètes) ;
- A la classe des *Pneumocystidomycètes* ;
- A l'ordre des *Pneumocystidiales* ;
- A la famille des *Pneumocystidaceae* ;
- Au genre *Pneumocystis*.

Chez l'homme, l'agent causal de la pneumocystose est *Pneumocystis jiroveci* (forme ou variété) *hominis* [29]. On continue d'appeler *P. carinii* l'espèce trouvée chez les rats et *P. murina*, l'espèce murine.

II-HISTORIQUE

L'organisme a été découvert au début du 20^{ème} siècle en 1909 par Carlos Chagas par l'utilisation de cobayes, modèle de l'infection à trypanosome [8,19] ; et, secondairement par Antonio Carinii grâce aux infections pulmonaires de rat [12]. Quelques années plus tard, Delanoes isole le parasite chez les rats infectés. Il a reconnu que Chaga et Carinii avaient identifié une nouvelle espèce ayant un tropisme unique pour les poumons. Il donne en définitive le nom du parasite : *Pneumocystis carinii* en l'honneur de Dr Carinii [12]. Des années après, le Dr Otto Jirovec et son équipe isolent l'organisme de l'homme, et ce

parasite responsable de la pneumonie à *Pneumocystis jiroveci* fut baptisé en son honneur (*Pneumocystis jiroveci*) [8]. *Pneumocystis* était initialement classé comme un protozoaire sur la base des caractéristiques morphologiques; petits trophozoïtes, de grands kystes et la rupture du kyste libérant de nouveaux trophozoïtes. En 1988, l'analyse de la sous-unité d'ARNr de *Pneumocystis* établit un lien génétique avec le règne des champignons, et toutes les informations génomiques ont corroboré l'appartenance de *pneumocystis* aux ascomycètes [21].

III-EPIDEMIOLOGIE

III-1 Agent pathogène

La forme infestante demeure inconnue [30]. Les kystes mûrs sont les éléments probables d'infection [8].

Pneumocystis jiroveci est un petit kyste qui produit 8 sporozoïtes intrakystiques. La rupture du kyste libère les sporozoïtes qui vont se transformer en trophozoïtes. Ces trophozoïtes se transforment ensuite en kyste pour recommencer le cycle [32].

III-2 Cycle biologique [26,59]

Le cycle biologique se déroule chez l'hôte et plus précisément dans les alvéoles pulmonaires. Le kyste mûr lysé libère les trophozoïtes qui vont tapisser la surface des pneumocystes de type I et donne successivement le prékyste précoce, le prékyste intermédiaire et le prékyste tardif.

III-2-1 Phase asexuée ou schizogonie

Dans les poumons de l'homme, les formes trophiques sont reproduites par mitose.

III-2-2 Phase sexuée

Les formes trophiques haploïdes subissent une conjugaison pour former un sporocyte qui est le début du kyste. Ce sporocyte subit une méiose et la mitose pour produire huit noyaux haploïdes (phase tardive du kyste ou kyste mur). Les spores se présentent sous différentes formes : forme sphérique, forme allongée. Les spores sont ensuite déversées dans les poumons de l'homme.

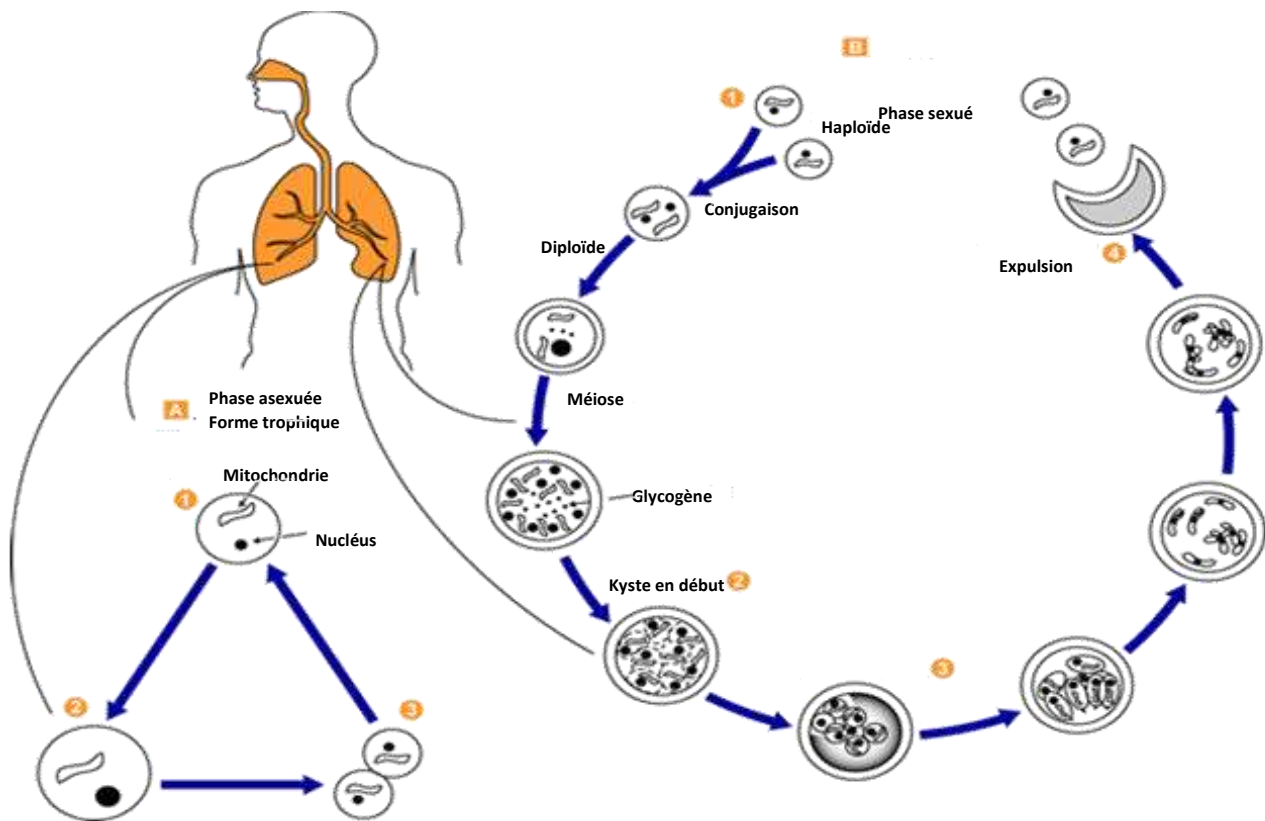


Figure 2 : Cycle de l'infection à *Pneumocystis jirovecii* [18 ; 56]

Il s'agit du cycle de vie général proposé par John J. Ruffolo, ph.D, (Cushion, MT, 1988) pour les diverses espèces de *Pneumocystis*. Ces champignons se trouvent dans les poumons des mammifères où ils résident sans causer d'infection manifeste jusqu'à ce que le système immunitaire de l'hôte soit affaibli. Ensuite, une pneumonie souvent mortelle peut en résulter.

A-Phase asexuée : les formes trophiques (1) se reproduisent par mitose (2) à (3).

B-Phase sexuée : les formes trophiques haploïdes subissent la conjugaison pour produire un zygote ou sporocyte (kyste en début) (2). Le zygote subit la méiose et la mitose ultérieure pour produire huit noyaux haploïdes (kyste à la phase tardive (3)). Les spores présentent des formes différentes (par exemple les formes allongés et sphériques). On reconnaît aussi un stade trophique où probablement les organismes se multiplient par scissiparité.

III-3 Transmission

La transmission de la pneumocystose n'a pas été totalement élucidée, ni aucun réservoir environnemental identifié.

Le principal mode de transmission se fait par l'intermédiaire de l'air inhalé, mais aussi à partir de l'hôte infecté, d'où le risque nosocomial [45] [10]. Il faut noter que la transmission verticale est aussi possible [19].

Aussi, les diverses lignées de *Pneumocystis jiroveci* sont directement rattachées aux différentes espèces hôtes [40]. Il n'existe donc pas de transmission de l'homme à l'animal. Seul *Pneumocystis jiroveci*, forme (ou variété) *hominis*, est l'agent causal de la pneumocystose humaine [19].

Il existe des facteurs favorisant la pneumocystose (voire Tableau III).

III-4-Répartition géographique

La pneumocystose n'est pas une zoonose, mais une anthroponose. Elle est répandue dans le monde entier, aussi bien chez les humains que chez les animaux. La pneumocystose est trois fois plus fréquente dans la population blanche que dans la population noire [32]. L'incidence de la pneumocystose, chez les patients atteints du SIDA en Afrique, est plus faible que celle des autres groupes: seulement 9% des patients sont touchés [32].

Au Cameroun, Fewou A. a trouvé 23,6% [23]. Au Zimbabwe, Malin A. et coll. retrouvent 33% en 1995 [42]. En Côte d'Ivoire, après des études nécropsiques réalisées chez des patients infectés par le VIH en 1994, Coulibaly et coll. retrouvent 8,57% [17].

Tableau III : Terrains prédisposés et facteurs de risque de la pneumocystose [32]

Terrains prédisposés	Facteur de risque
Prématuré, nourrisson	Transmission nosocomiale
SIDA	Cause la plus fréquente, même si la généralisation des prophylaxies secondaire puis primaire a fait diminuer le taux d'incidence. Elle touche près de 30% des patients VIH positifs dont le taux de LT CD4 est inférieur à 200/mm ³ .
Transplantation d'organe (cœur, rein,...)	La PPC survient surtout au cours des épisodes de rejet aigue nécessitant l'apport important de drogues immunosuppressives.
Homéopathie maligne (leucémie aiguë, lymphome, greffe de moelle)	C'est l'intensité des chimiothérapies et l'utilisation de cytolytiques qui accentuent le risque de PPC.
Collagénose, lupus érythémateux, polyarthrites noueux	L'utilisation des drogues immunosuppressives et cytolytiques (méthotrexate, corticoïdes) favorisent le PPC.
Autres apparemment non immunodépressives	Sujet âgé

IV-PATHOGENIE ET PHYSIOPATHOLOGIE

A-PATHOGENIE

Le parasite est observé en position extra cellulaire dans les alvéoles pulmonaires. Les kystes arrivés à maturité libèrent huit (8) corps intrakystiques qui se transforment rapidement en trophozoïtes. Ces trophozoïtes augmentent de taille et émettent des expansions tubulaires permettant de se fixer sur les pneumocystes de type I. Il s'en suit la mort de la cellule, avec fuite de liquide protéique dans l'espace alvéolaire. Ainsi, histologiquement, l'espace alvéolaire ressemble à un œdème de matériels protéiques composé d'un amorphique, mousseux, de matériaux amorphes (parasites + débris cellulaires) [32].

B-PHYSIOPATHOLOGIE

L'infection se propage au tissu interstitiel, au tissu fibreux des poumons et entraîne un épaississement des septa intra alvéolaires et des alvéoles qui aggravent l'hypoxie. Dans cette situation, les taux de Lactico DésHydrogénase (LDH) augmentent, et les échanges gazeux sont diminués. L'oxygène diffuse plus difficilement dans le sang, ce qui entraîne une hypoxie qui peut être sévère. L'hypoxie, associée à l'augmentation du dioxyde de carbone (CO₂), stimule l'effort d'hyperventilation, ce qui entraîne une dyspnée.

➤ **Interaction hôte - agent pathogène**

Une réponse inflammatoire effective est nécessaire pour contrôler la pneumocystose par l'intermédiaire de différentes cellules de l'inflammation :

- **Les lymphocytes T-CD4** : La réponse immunitaire dirigée contre le *Pneumocystis* implique des interactions complexes entre les lymphocytes TCD4, les macrophages alvéolaires, les polynucléaires neutrophiles et les médiateurs solubles qui facilitent la lutte contre l'infection. L'activité des lymphocytes TCD4 est axée sur la défense de l'hôte contre le *Pneumocystis* chez l'homme comme chez les animaux, et le risque d'infection s'accroît lorsque le taux de lymphocytes TCD4 est inférieur à 200 cellules par µl. Les lymphocytes TCD4 ont une fonction de cellules mémoires qui orchestrent la réponse immunitaire de l'hôte à l'attaque de l'organisme, par le recrutement et l'activation d'autres cellules effectrices incluant les macrophages et les monocytes ;

- **Les macrophages** : Les macrophages alvéolaires sont les principaux phagocytes qui interviennent dans la fixation et la dégradation du parasite dans le poumon. La fonction des macrophages est diminuée chez les sujets infectés par le VIH, les cancéreux, avec comme conséquence une réduction de l'épuration *Pneumocystis*.

Les macrophages produisent une large variété de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines après la phagocytose. Ces médiateurs participent à l'éradication du *Pneumocystis* ;

- **Les cytokines et les chémokines** : Le tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) a d'importants effets pendant la pneumocystose. Il stimule le recrutement des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes et des monocytes, mais aussi induisent la production d'autres cytokines et chémokines telles que l'interleukine-8 et l'interféron gamma ;

- **Les cellules épithéliales alvéolaires et les protéines** : l'adhésion des trophozoïtes à l'épithélium alvéolaire est facilitée par l'interaction de protéines telles que la fibronectine et la vitronectine.

V-ASPECT CLINIQUE [15]

V-1 Pneumocystose chez l'immunocompétent

Presque tous les enfants acquièrent les anticorps anti *Pneumocystis jiroveci* à l'âge de 2 ans [32]. Le sujet sain qui s'infecte parviendra à éliminer le parasite. Les macrophages alvéolaires, les polynucléaires neutrophiles et d'autres médiateurs de l'immunité humorale que sont l'interféron et le TNF joueraient un rôle important dans la défense de l'hôte et dans la destruction du parasite.

V-2 Pneumocystose chez l'immunodéprimé

Le cycle de *Pneumocystis jiroveci* ne peut s'accomplir complètement que chez l'immunodéprimé. Le développement parasitaire va être à l'origine de la lésion de l'épithélium alvéolaire. Ces lésions conduisent à l'épaississement des cloisons alvéolaires, source d'hypoxémie et d'insuffisance respiratoire.

Les complications de la pneumocystose à *Pneumocystis jiroveci* sont:

- le pneumothorax spontané ;
- l'hypoxémie secondaire à une détresse respiratoire de l'adulte. Les pneumocystoses extra pulmonaires surviennent à un stade tardif de l'infection à VIH et ont un pronostic sévère [60].

VI -DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

VI-1Prélèvement [25]

VI-1-1 Liquide de lavage broncho alvéolaire (LBA)

Il consiste à injecter sous endoscopie dans les bronches et les alvéoles pulmonaires une solution salée isotonique (50 à 250 ml) stérile à 37°C. L'injection se fait de façon fragmenté : 5 injections de 50 ml. Le fibroscope est bloqué dans les bronches segmentaires. Ensuite, ce liquide est récupéré par aspiration et doit représenter 20 à 60 % de la quantité injecté. Le liquide récupéré constitue le LBA.

VI-1-2 Expectoration induite

Le sérum salé hypertonique à 30 g/l est nébulisé pendant 15 minutes. Le malade doit bien inspirer profondément la solution, la tête renversée en arrière. Le clinicien pourra provoquer les expectorations induites grâce à une kinésithérapie. Ces expectorations sont recueillies dans des poudriers stériles. La deuxième expectoration est, en général, la plus riche en parasites.

VI-2 Technique d'analyse

VI-2-1-Diagnostic direct [25]

a-Méthodes de coloration

Après centrifugation des prélèvements, des étalements sur lame sont réalisés avec le culot.

- Coloration de Gomori-Groth :

Elle permet la mise en évidence des kystes de *Pneumocystis jiroveci* de diamètre compris entre 3,5 et 5µm brun ou noir sur fond vert, arrondis ou en cupule. C'est une méthode difficile, chère et longue.

- Coloration au May Grunwald Giemsa:

Elle permet la visualisation après un fort grossissement (Objectif x 100). Les trophozoïtes apparaissent sous formes de petits corps ovoïdes de 1 à 2 µm de couleur bleu et au noyau rouge vif. L'inconvénient est que l'identification est difficile.

- Coloration au Bleu de Toluidine :

L'observation se fait à l'objectif 100. Les kystes ne sont pas colorés, seuls apparaissent huit corps intrakystiques.

b-Immunofluorescence Indirecte (IFI)

➤ Principe

La trousse MONO FLUO kit *P. jiroveci* est destinée à la détection de *Pneumocystis jiroveci* dans les échantillons d'expectoration induite ou les LBA d'origine humaine par la technique d'immunofluorescence indirecte utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques des oocystes de *P. jiroveci*.

L'échantillon (LBA, expectoration induite) est déposé à la surface d'une lame de microscope, puis séché, fixé et soumis à une digestion enzymatique à 37°C pendant 30 minutes. Il est ensuite mis à réagir pendant 15 minutes avec un anticorps monoclonal dirigé contre les oocystes humains de *Pneumocystis jiroveci*, puis pendant 15 minutes, avec un anticorps dirigé contre l'anticorps monoclonal, et l'échantillon est examiné au microscope à fluorescence.

➤ Résultat

Les échantillons fluorescents contenant au moins cinq (5) oocystes fluorescents sont notés positifs.

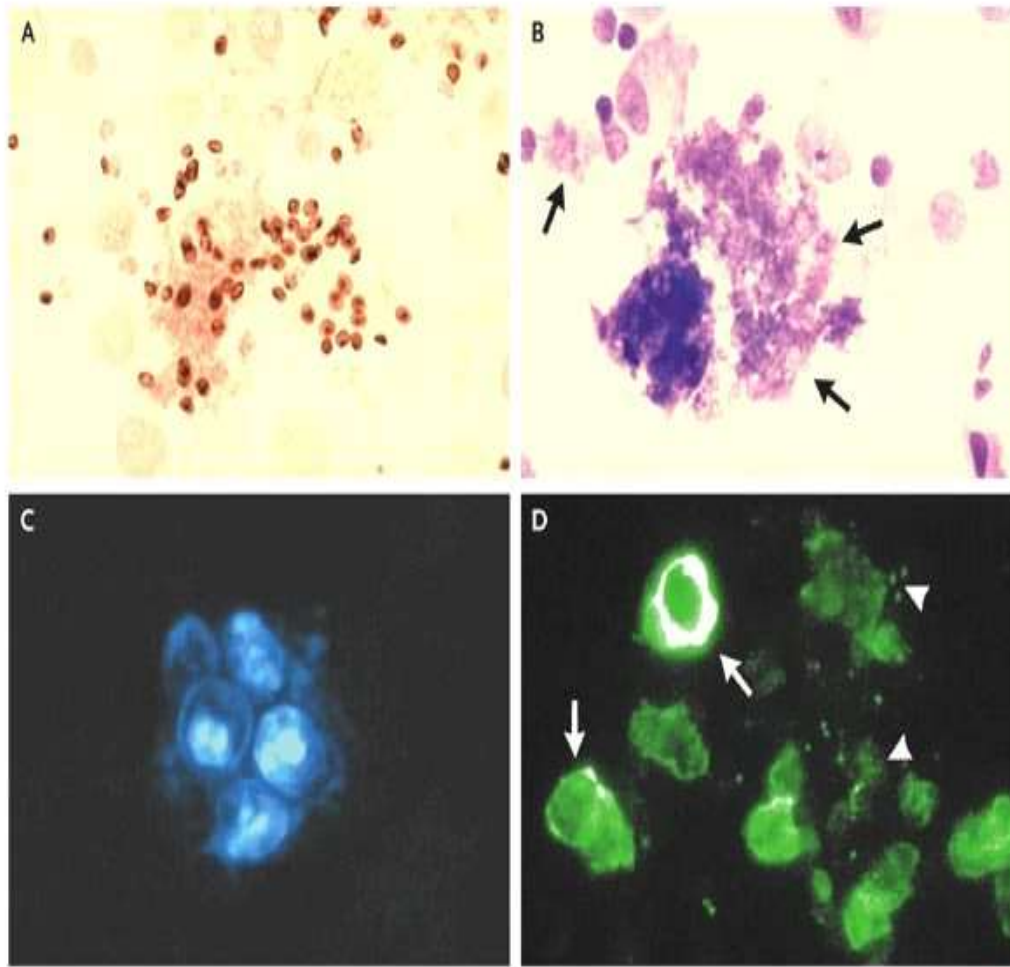


Figure 3 : Détection des formes de *Pneumocystis* par l'utilisation des différentes techniques ; *Panneau A: Forme kystique dans le LBA après coloration de Gomori méthénamine (x100) ; Panneau B : Identification rapide des trophozoïtes par la coloration de Wright–Giemsa dans le LBA et l'expectoration induite (x100) ; Panneau C: Identification des kystes par la technique du calcofluor blanc utilisée pour la confirmation rapide (x400) ; Panneau D : Identification de trophozoïtes et de kystes à l'IFI (x400).*

VI-2-2 Diagnostic indirect : Réaction en chaîne par polymérisation (PCR)

a-Définition de la PCR [48]

La réaction par polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier au grand nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN. Cette technique est basée sur deux facteurs :

- Les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation ADN double brin spécifique des ADN polymérase ADN dépendante thermostable ;
- Les propriétés d'hybridation et de séparation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température.

Ces éléments sont assurés grâce à des transitions de température (assuré par un thermocycleur) répétés de manière cyclique.

En moins de 10 ans, cette technique s'est imposée dans les laboratoires et a révolutionné la biologie médicale.

La PCR se déroule en trois étapes :

- L'extraction de l'ADN ;
- L'amplification ;
- La migration et la révélation.

Ces différentes étapes de notre manipulation sont décrites dans la partie « matériel et méthodes ».

1- Définition de la nested PCR [49]

La nested PCR est une technique d'amplification permettant d'augmenter la sensibilité d'un essai. Elle consiste en la réalisation de deux PCR successives.

Le premier couple d'amorces amplifie un fragment beaucoup plus grand que la cible. Une seconde paire d'amorces, appelée « nested primer », vient se fixer (s'emboîter) à l'intérieur du premier fragment produit à la première PCR pour permettre l'amplification d'une seconde PCR dont le produit est plus court que le premier.

Un avantage de la nested PCR est que si un mauvais fragment a été amplifié par erreur à la première PCR, la probabilité est très basse qu'il soit amplifié une deuxième fois.

La nested PCR est une amplification très spécifique.

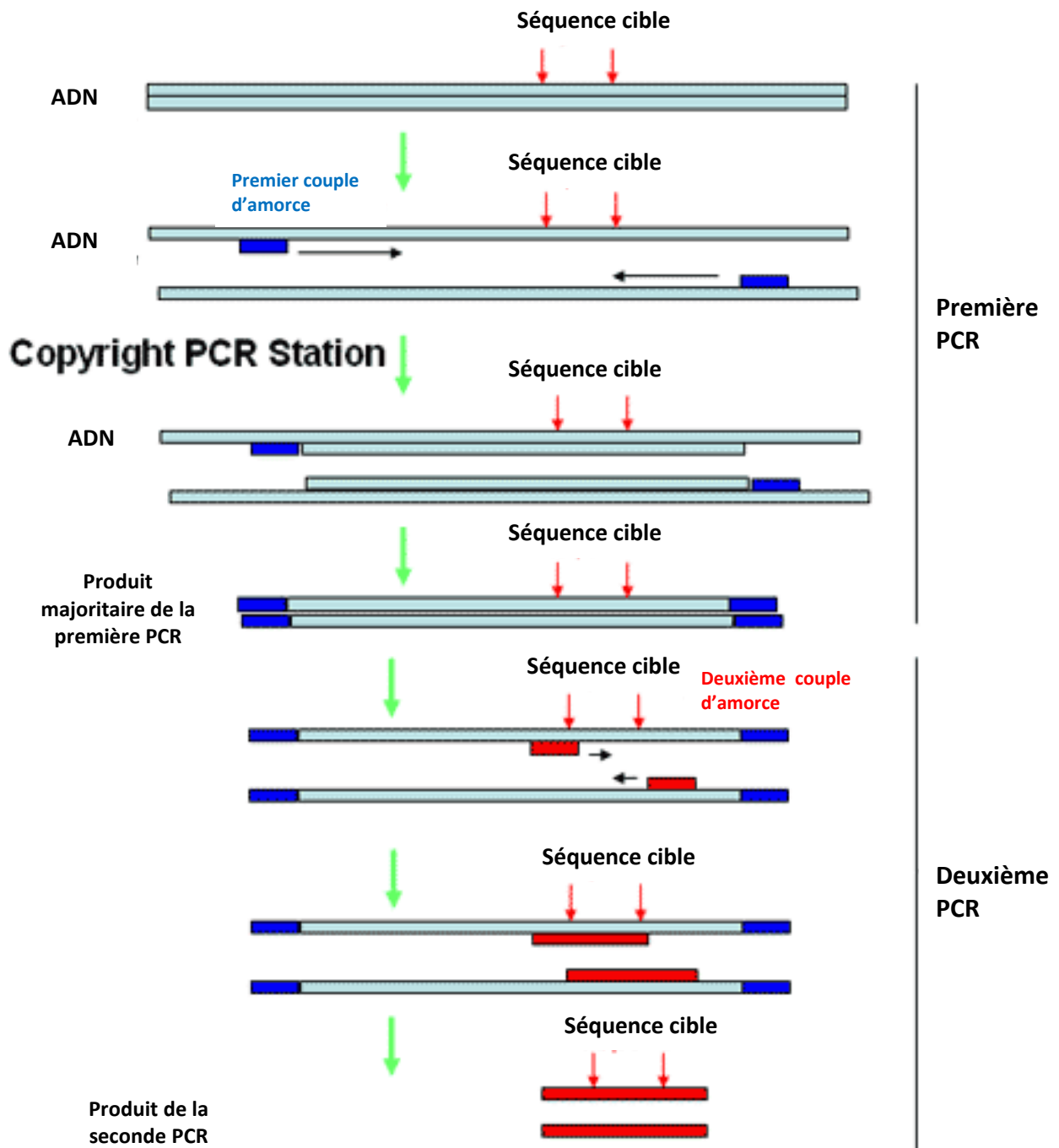


Figure 4 : Schéma d'une nested PCR

Ce schéma comporte deux étapes :

- **Première étape en bleu** : l'ADN est lié par le premier couple d'amorces avec la production de produits multiples ;
- **Deuxième étape en rouge** : le second couple d'amorces vient se nicher dans le produit de la première PCR. Les sites de liaison du deuxième couple d'amorces sont quelques bases internes au premier site de liaison du premier couple d'amorces. Les produits obtenus sont plus courts.

VII-TRAITEMENT

VII-1-Traitement curatif [43]

VII-1-1-Triméthopprime-Sulfamethoxazole (TMP-SMZ)

Il s'agit de molécule de choix en première intention, administrée par voie orale ou veineuse aux doses respectives de 15-20 mg/kg/j (TMP) et 75-100 mg/kg/j (SMZ), correspondant à six (6) comprimés de TMP-SMZ forte ou douze(12) ampoules de TMP-SMZ sur une durée totale de 21 jours.

VII-1-1-1-Indication

- Infections urinaires haute ou basses, prostatites, orchite, épidydimites ;
- Traitement curatif et traitement préventif de la pneumocystose.

VII-1-1-2-Contre indication

Le TMP-SMZ ne doit pas être administré aux patients dans certains cas:

- Allergie aux sulfamides ;
- Insuffisance rénale ;
- Femme enceinte au premier trimestre ;
- Leuconeutropenie inférieur à 750 éléments /mm³ ;
- Anémie inférieure à 7,5g/dl ;
- Nouveau-né au cours des 6 premières semaines ;
- Femme allaitante au cours des 6 premières semaines ;
- Déficit en G6PD.

VII-1-1-3-Effets secondaires

Le TMP-SMZ est responsable de bon nombre d'effets secondaires parmi lesquels :

- Réaction cutanée : Bénigne à type d'urticaire ou de rash, jusqu'à sévère, épidermolyse bulleuse (syndrome de Lyell ou Stevens-Johnson) ;
- Hématotoxicité : Anémie, neutropénie ;
- Plus rare : Diarrhée, hépatique cholestatique, insuffisance rénale.

VII-1-2-Alternatives thérapeutiques

En cas de contre-indication du cotrimoxazole, le choix thérapeutique sera porté sur :

- Soit l'Atovaquone : 1500 mg /j en 2 prises ;
- Soit la Pentamidine : 3-4 mg/kg/j en IV ;
- Soit l'association Clindamycine : 1.800 mg/j en 3 prises et Primaquine : 15 mg/j en une prise ;
- Soit l'association Dapsone : 100 mg/j et triméthoprime 20 mg/kg/j ;
- Dans les formes sévères : Trimétrexate en IV : 45 mg/m²/j.

VII-2- Traitement adjuvant

VII-2-1 – Corticothérapie

Son intérêt a été démontré dans les années 1990. Elle doit être administrée après la preuve parasitologique, en l'absence d'autres agents infectieux (mycobactéries...) et démarré avec le traitement antiparasitaire.

Deux schémas sont validés en fonction de la gazométrie artérielle initiale (voir Tableau IV).

Tableau IV : Indication et posologie de la corticothérapie au cours de la pneumocystose

PaO2 air ambiant	Adjonction de corticoïde	Schéma thérapeutique validé
Plus de 75 mmHg	Inutile	
50-75 mmHg	Efficacité prouvée	PREDNISOLONE 80 mg/J pendant 5 Jours 40 mg/j pendant 5 jours 20 mg /j pendant 5 jours
Moin de 50 mmHg	Efficacité probable	MEYHYLPREDNISOLONE 240 mg/j pendant 3jours 120 mg /j pendant 3 jours 60 mg /j pendant 3j ours

VII-2-2-Oxygénothérapie simple

VII-2-3-Ventilation non invasive (VNI) [38]

La ventilation non invasive regroupe l'ensemble des techniques d'assistance ventilatoire prenant en charge tout ou partie du travail respiratoire, en l'absence de dispositif endotrachéale (sonde d'intubation ou canule de trachéotomie) et permettant d'assurer une ventilation alvéolaire suffisante. Elle est indiquée en cas de signe clinique de gravité.

La ventilation non invasive est susceptible d'exercer deux effets essentiels sur le système respiratoire qui peuvent être utilisés simultanément ou séparément. Elle permet le maintien d'une pression expiratoire positive (PEP) ; elle permet de créer une pression inspiratoire positive associée le plus souvent à la PEP (AI+PEP).

VII-3-Traitement préventif

Le Cotrimoxazole est utilisé à la posologie de 960 mg /j.

Comme alternative, nous avons :

- L'Atovaquone 1500 mg/j en une prise ;
- La Pentamidine : 4 mg/kg/semaine ;
- La Dapsone par voie orale : 100 mg/j ;
- Dapsone par voie orale 100 mg/j et Pyriméthamine 50 mg/semaine.

VII-4 Evolution [43]

Au moment de l'initiation du traitement : une PaO₂ inférieure à 50 mmHg en air ambiant et une élévation majeure du taux sérique de LDH sont de mauvais pronostic.

Deux récentes études ont isolé deux autres facteurs de mauvais pronostic :

- Le pourcentage de neutrophiles dans le LBA supérieur à 10%,
- La présence de mutation du gène de la dihydroptéroate synthase ou du gène cytochrome C chez les patients sous prophylaxie au cotrimoxazole faisant une pneumocystose en dépit d'une prophylaxie par sulfamide dans le premier cas, par l'atovaquone dans le deuxième cas.

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I- DEROULEMENT DE L'ETUDE

Les patients ont été inclus au service de PPH. Le recueil des données s'est fait à l'aide d'un questionnaire standardisé (Annexe I) permettant de recueillir des informations sur :

- Le profil socio démographique ;
- Les conditions socio économiques ;
- Les renseignements cliniques.

Pour les patients venus en consultation, la fiche est totalement remplie. Pour les patients hospitalisés, la rubrique clinique a été renseignée à partir du dossier médical.

Un rendez-vous était donné au patient pour effectuer le lavage. Le jour J, le lavage est effectué par un médecin spécialiste avec le consentement du patient, et le LBA a été récupéré dans un petit pot stérile. Le prélèvement a été transporté dans une glacière au CeDReS. L'IFI a été réalisée sur une fraction du prélèvement frais, et l'autre fraction a été conservée à -80°C pour la réalisation ultérieure de la PCR.

II-TYPE, DUREE ET LIEU DE L'ETUDE

Il s'agit d'une étude transversale qui s'est déroulée au service de pneumophysiologie (PPH) du Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Cocody, au Centre de Recherche et de Diagnostic sur le SIDA et les Maladies

Opportunistes (CeDReS) situé à l'intérieur du CHU de Treichville et au Centre Intégré de Recherche Bioclinique d'Abidjan (CIRBA).

Les prélèvements ont été collectés au service de pneumophysiologie et les analyses réalisées au CeDReS et au CIRBA.

Cette étude a duré 54 mois, du juin 2008 à Décembre 2012.

III-LA POPULATION D'ETUDE

III-1 Critère d'inclusion et de non inclusion

- Critères d'inclusion :

Ont été inclus, dans notre étude :

- Les patients âgés d'au moins 15 ans présentant un syndrome alvéolaire interstitiel ;
- Les patients venant en consultation et / ou hospitalisé au PPH ;
- Les patients présentant une sérologie VIH positive.

- Critères de non inclusion :

N'ont pas été inclus, dans notre étude, les patients avec :

- Détresse respiratoire ;
- Positivité des bacilles de koch ;
- Syndrome alvéolaire interstitiel, avec cardiopathies, insuffisance rénale.

III-2 Spécimen biologique

Dans notre étude, nous avons travaillé sur le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA). Le lavage broncho alvéolaire a été réalisé par un médecin spécialiste.

Le prélèvement se fait de la façon suivante : injecter sous endoscopie dans les bronches et les alvéoles pulmonaires une solution salée isotonique (50-250) stérile à 37°C. L'injection se fait de façon fragmentée : 5 injections de 50 ml.

Le fibroscope est ensuite bloqué dans les bronches segmentaires ou sous-segmentaires. Le liquide est ensuite récupéré par aspiration et doit représenté 20 à 60% de la quantité injectée.

. III-METHODE D'ANALYSE

1-L'IMMUNO FLUORESCENCE INDIRECTE (IFI)

1-1 But

Cette méthode a pour but de rechercher les oocystes de *Pneumocystis jiroveci* dans les prélèvements frais de LBA.

1-2 Principe

Les culots obtenus après centrifugation sont remis en suspension, étalés sur lame d'IFI, puis soumis à une digestion enzymatique. Ils sont ensuite mis à réagir avec l'anticorps monoclonal dirigé contre les oocystes de *Pneumocystis jirovecii*, puis avec un anticorps dirigé contre l'anticorps monoclonal et conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (fluorochrome).

Après rinçage, séchage et montage, les échantillons sont observés au microscope à fluorescence.

1-3 Matériels

- La trousse MONOFLUO kit *P. jirovecii*
- Microscope à fluorescence
- Centrifugeuse
- Plateaux
- Papier absorbant
- Lames pour IFI
- Lames couvre-objet
- Pipette
- Eprouvette graduée
- Tubes à fond conique

- Eau distillée
- Acétone
- Ethanol absolu
- Pissette contenant de l'eau distillée
- Solution saline de tampon phosphate

1-4 Mode opératoire

- L'enzyme lyophilisée a été diluée au 1/10 dans le diluant de l'enzyme ;
- Une dilution au 1/10 a été réalisée dans un tube à fond conique de 15 ml, en mélangeant 1ml de LBA et 9 ml d'eau distillée.

Le mélange a été centrifugé à 2.500 tours par minutes pendant 15 minutes, et le culot a été lavé à l'eau distillée. L'opération a été répétée trois fois ;

- Le dernier culot a été remis en suspension dans une petite quantité d'eau distillée ;
- 20 µl du culot ont été déposés à la surface des puits de la lame pour IFI ; et le dépôt, laissé sécher à la température ambiante ;
- Les échantillons ont été fixés à l'aide d'une goutte d'acétone et laissés sécher à la température ambiante ;
- Ensuite, 20 µl d'enzyme diluée ont été déposés sur chaque puits ;
- Les lames ont été ensuite incubées pendant 30 minutes dans la chambre humide ;
- Les lames ont été ensuite rincées à l'eau distillée ; l'excès d'eau a été épongé, et la lame a été séchée à l'air libre ;
- 15 µl d'anticorps anti oocystes de *Pneumocystis jirovecii* ont été déposés sur chaque puits contenant les échantillons. Nous avons incubé dans la chambre humide pendant 15 minutes à 37 °C ;

- Les lames ont été ensuite rincées à l'eau distillée, éponnées et séchées à l'air libre à 37°C ;
- Les produits ont été recouvert avec le conjugué et les lames placées dans la chambre humide pendant 15 minutes à 37°C ;
- Rincé, les lames ont été séché à l'air libre ;
- Une goutte de milieu de montage a été déposée sur chaque puits, et le tout est recouvert d'une lame. Le tout a été retourné sur papier absorbant en pressant doucement ;
- Les lames ont été examinées au microscope à fluorescence.

1-5 Résultat

Les oocystes sont marqués par une fluorescence de couleur vert pomme plus ou moins brillante. Ces oocystes sont marqués de manière uniforme ou irrégulière.

1-6 Interprétation

L'interprétation a été faite selon la présence et le nombre d'oocyste. Il existe trois cas :

- **Résultat négatif** : absence de kyste ;
- **Résultat douteux** : présence de 1 à 5 oocystes ;
- **Résultat positif** : présence de plus de cinq oocystes.

2- LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR)

1-Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN comporte deux étapes :

- Le traitement des LBA ;
- L'extraction des acides nucléiques.

1-1 Principe

Elle a pour but de séparer l'ADN cible des autres éléments du LBA pouvant perturber l'analyse à savoir : les constituants cellulaires, les éventuels inhibiteurs des techniques utilisées pour leur mise en évidence.

1-2 Traitement des LBA

➤ Matériel

La réalisation utilise :

- Tubes à fond conique 15 ml
- Pipettes
- Embouts à filtre
- Vortex
- Centrifugeuse
- Tubes eppendorf stériles
- NaCl à 0,9%

➤ **Mode opératoire**

La décongélation des LBA a été réalisée à la température ambiante.

- 500 µl de chaque LBA ont été déposés dans des tubes à fond conique de 15ml ;
- 1.000 µl de NaCl à 0,9% ont été ensuite ajoutés ;
- Le mélange a été homogénéisé par vortex pendant 5 min, puis centrifugé à 4.000 trs pendant 15 min ;
- Le surnageant a été ensuite éliminé (1.350 µl) ;
- 150 µl de chacun des échantillons a été aliquoté dans des tubes eppendorff stériles et conservés à -80°C pour l'extraction de l'ADN.

1-3 Extraction de l'ADN (extraction Qiagen)

*** Matériels**

- Qiagen DNA Extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France)
- Eau qualité Biologie Moléculaire (Eau BM)
- Vortexer génie 2
- Centrifugeuse universelle 320 R
- Incubateur MULTI-BLOCK HEATER
- Cône à filtre (20 µl, 200 µl, 1.000 µl)
- Bain Marie
- Tube eppendorf stérile 1,5ml
- Pipette électronique
- Appareil fabricant de glace : ICE FLAKER

➤ **Mode opératoire**

- Les échantillons aliquotés ont été décongelés à la température ambiante et homogénéisés par vortex pendant 15 secondes,
- Incubation à 100°C pendant 30 minutes,
- Homogénéiser par vortex 5 secondes après incubation,
- Placer les échantillons dans de la glace pendant 4 minutes,
- Ajouter 200 µl de tampon AL,
- Incuber 5 minutes à la température ambiante,
- Ajouter 200 µl d'éthanol à 100%,
- Homogénéiser par vortex 15 secondes,
- 550 µl d'échantillon sont mis sur colonne,
- Centrifuger à 8.000 trs /min pendant 2 min,
- Remplacer les tubes collecteurs,
- Ajouter 500 µl de tampon AW1,
- Centrifuger à 8000 trs /min pendant 1min,
- remplacer les tubes collecteurs,
- Ajouter 500 µl de tampon AW2,
- Centrifuger à 14.000 trs/min pendant 3 min,
- Verser le filtrat et replacer le même collecteur,
- Centrifuger à 14.000 trs/min pendant 1min,
- Transférer les colonnes sur tube de 1,5ml,
- Ajouter de l'eau BM chauffée à 70°C (200 µl),
- Incuber à la température ambiante pendant 1min,
- Centrifuger à 8.000 trs pendant 1 min,
- Eliminer les colonnes,
- Conserver le filtrat contenant de l'ADN purifié à -20°C à -80°C.

1-4 Mesure de la densité optique (DO)

➤ Matériels

- Tubes de 500 μ l
- Cônes à filtre 100 μ l
- Cônes à filtre 10 μ l
- Pipettes
- Eau Pour Préparation Injectable (EPPI)
- Vortex
- Hôte
- Congélateur à -80°C
- Spectrophotomètre
- Cuves
- Gants

➤ Mode opératoire

- Les échantillons congelés à -80°C ont été décongelés à la température ambiante, puis homogénéisés par vortex quelques minutes ;
- 50 μ l d'EPPI ont été mis dans des tubes de 500 μ l à l'aide de cône à filtre de 100 μ l monté sur une pipette ;
- 5 μ l d'extrait d'ADN ont été ajoutés à chaque tube à l'aide d'un cône de 10 μ l monté sur une pipette.

Réalisation du blanc : 55 μ l d'EPPI ont été déposés dans la cuve et placés dans le spectrophotomètre pour réaliser le blanc. Le facteur de dilution a été inséré : 55+5 μ l ; la lecture est faite, et la cuve retirée.

Mesure des échantillons : 55 μ l de chaque échantillon (diluât) ont été déposés successivement dans la cuve. A chaque mesure de la DO, la cuve est lavée et remplacée à chaque dix (10) échantillons.

Le dosage des acides nucléiques a été réalisé à une longueur d'onde de 260 nm.
A cette longueur d'onde, une unité correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin.

2-Réalisation des PCR

2-1 Matériels

La réalisation de la PCR a nécessité divers matériels:

- Tubes à fond conique
- Cônes à filtre
- Micropipettes (20 µl, 200 µl, 1.000 µl)
- Tube eppendorf
- Vortex
- Tubes pour PCR (0,2 µl)
- SPECTROLINKER XL-1500 UV CROSSLINKER
- HOTE STERIL CARD III ADVANCE
- CENTRIFUGEUSE 5424 EPPENDORF
- Alcool à 70°
- Pinces
- Thermocycleur

2-2 Mode opératoire

a- Choix des amorces [62,63]

Deux couples d'amorces ont été utilisés :

- Une première amplification avec des amorces externes :

PAZ102E (5-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3)

et

pAZ102H (5-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3) (WAKEFIELD et al., 1990)
générant un fragment de 340 Pb.

- Une deuxième amplification avec des amorces internes :

PLE1 (5-TCGGACTAGGATATAGCTGG-3)

et

pLE2 (5-CCCTTTCGACTATCTACC-3) (WEIG et al., 1997) générant un
fragment de 193 Pb.

b- Reconstitution des amorces

Les amorces lyophilisées étaient à 80 nmol.

- 400 µl d'eau ont été ajoutés à chaque amorce : Une solution à 200 µM a été obtenue. Les mélanges ont été centrifugés ;
- 45 µl d'eau ont été ajoutés à 5 µl des mélanges précédents. Une solution à 20 µM de chaque amorce a été obtenue et aliquotée.

c- Condition d'amplifications

Pour la première amplification, la réaction s'effectue dans un volume final de 50 µl comprenant 200 µM de chaque dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) 20µ M de chaque amorce, 2,5U de *taq* DNA polymérase, 5µl de tampon 10X, 1,5µM de MgCl₂ et 10 µl d'ADN extrait (Tableau V).

Les conditions d'amplification consistent en une dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C, suivie d'une phase cyclique répétée 35 fois et qui consiste en une dénaturation de 94°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces pendant 1minute à 55°C et une élongation de 1 minute à 72°C. La réaction se termine par une phase d'élongation de 10 minutes à 72°C.

La seconde amplification se réalise avec 2 µl des produits de la première réaction dans les mêmes conditions avec quelques différences. A savoir, le nombre de répétition de la phase cyclique est de 30 fois, et la température de fixation des amorces est de 58°C. Les produits d'amplification sont révélés après électrophorèse en gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium à 0,5µg/ml et après illumination sur une plaque UV à une longueur d'onde $\lambda = 320$ nm.

d- Programmes d'amplification de la PCR et de la nested PCR

Le programme de la première amplification se définit comme suit:

94°C	12 min	
94°C	30 s	} X 35 cycles
55°C	1min	
72°C	1min	
72°C	7 min	
4°C	∞	

Dans la deuxième amplification, le nombre de répétition de la phase cyclique est de 30 fois, et la température de fixation, 58°C.

Tableau V : Mode opératoire de la nested PCR

		Première amplification	Deuxième amplification
	Concentration stock	Volume en µl/l par tube pour un volume final de 50 µl	Volume en µl/l par tube pour un volume final de 50 µl
10X PCR Buffer	10X	5	5
MgCl ₂ (50 mM)	25 mM	3	3
dNTP mix	10 Mm	1	1
Amorce sens	20 µM	1	1
Amorces antisens	20 µM	1	1
<i>Taq</i> polymérase	5 U/µl	0,4	0,4
Nuclease free Water		QSP 50 µl	36,6

Pour la première PCR, mettre dans les tubes pour PCR :

- 40 µl du mélange de produits pour PCR par tube ;
- 10 µl de chaque extrait d'ADN.

Pour la deuxième PCR :

- 48 µl du mélange de produits pour PCR par tube ;
- 2 µl de chaque extrait d'ADN de produit de la première PCR.

3-Analyse des produits d'amplification

Les produits spécifiques ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 2%.

3-1 Matériel

- Dispositif d'électrophorèse
- Balance
- Spatule
- Four à micro-onde
- Agarose
- TBE 1X (Tris-Borate-EDTA)
- Spectrophotomètre à UV : SPECTRELINE ULTRAVIOLET

3-2-Préparation du support de gel d'agarose à 2%

- Peser 2g d'agarose pur dans un erlen meyer ;
- Ajouter 100 ml de TBE 1X et mélanger le tout. On obtient une solution blanche qui est mise au four à micro-onde pendant 2 min. On obtient une solution limpide claire qui est refroidie ;
- Ajouter au mélange 10 µl de Bromure d'Ethidium (BET). L'ensemble est mélangé, puis le gel est coulé sur le support de gel d'agarose et laissé refroidi ;
- Le support est ensuite déposé dans la cuve d'électrophorèse.

3-3 Analyse des produits [62]

Le support de gel d'agarose à 2% [24] est plongé dans la cuve à électrophorèse remplie de TBE 1X de sorte que la borne négative de la cuve soit du côté des puits, permettant ainsi la migration de l'ADN chargé négativement vers la borne positive.

- Mélanger 10 µl de chaque échantillon avec 2 µl de tampon de dépôt de charge 6X sur une feuille de paraffine et les déposer délicatement dans chaque puits.
- Déposer dans le premier puits le témoin positif : 15 µl de marqueur de poids moléculaire (100 pb)
- Déposer dans le dernier puits le témoin négatif.
- Mettre la cuve de migration sous tension.
- 10 min après, la lecture est faite sur table UV.

3- 4 Interprétation [62]

La lecture se fait par comparaison des différentes bandes générées par le marqueur de poids moléculaire avec celles générées par les échantillons et par les témoins négatifs et positifs :

- Pour le témoin négatif, absence de bande ;
- Pour le témoin positif, présence de bande à 193 pb ; ainsi tous les échantillons ayant généré une bande à 193pb [24] sont déclarés positifs (présence de *Pneumocystis jiroveci*), dans le cas contraire, ils sont négatifs.

IV- TRAITEMENT DES DONNEES

Nos données ont été traitées par les logiciels SPSS et Excel.

Le test de Fisher au risque 5% a été utilisé comme test statistique.

V-CALCUL DES PARAMETRES D'EVALUATION

Tableau VI: Données pour le calcul des paramètres d'évaluation diagnostique

	Malades	Sains	Total
Test positif	VP	FP	VP+FP
Test négatif	FN	VN	VN+FN
Total	VP+FN	VN+FP	VP+FP+VN+FN

VP = vrais positifs

FP = faux positifs

VN = vrais négatifs

FN = faux négatifs

Sensibilité (SE) = $VP / \sum \text{MALADES}$

C'est le pouvoir du test (du facteur de risque) de reconnaître comme malades (à risque) les individus qui le sont vraiment.

Spécificité (SP) = $VN / \sum \text{NON MALADES}$

C'est le pouvoir du test (du facteur de risque) de reconnaître comme sains (non à risque) les individus qui le sont vraiment.

Valeur prédictive positive (VPP) = $VP / (VP+FP)$

C'est la probabilité pour un individu classifié comme malade (à risque), de l'être vraiment. Elle indique le degré de confiance que l'on peut avoir dans un résultat positif.

Valeur prédictive négative (VPN) = $VN / (VN + FN)$

C'est la probabilité pour un individu classifié comme sain (non à risque), de l'être vraiment. Elle indique le degré de confiance que l'on peut avoir dans un résultat négatif.

La nested PCR a été choisie comme la méthode de référence.

CHAPITRE II : RESULTATS ET COMMENTAIRES

I-CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES

Tableau VII : Données sociodémographiques des patients

CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES	Effectif	Pourcentage(%)
Sexe		
Féminin	35	67,3
Masculin	17	32,7
Age		
15-20 ans	2	3,8
20-30 ans	7	13,5
30-40 ans	29	55,8
40-50 ans	7	13,5
>50 ans	7	13,5
Situation matrimoniale		
Marié	7	13,5
Célibataire	23	44,2
Concubinage	22	42,3
Niveau d'instruction		
Alphabète	42	80,8
Analphabète	10	19,2
Catégories socio-professionnelles		
Fonctionnaires	21	40,4
Artisans/ouvriers	8	15,4
Commerçants	5	9,6
Elève/étudiants	8	15,4
Sans emploi	10	19,2
Type habitat		
Villa	11	21,2
Appartement	19	36,5
Cour commune	22	42,3
Nombre de personnes/habitat		
1-5 personnes	22	42,3
6-10 personnes	27	51,9
>10 personnes	3	5,8

La population d'étude comprenait des patients de sexe féminin et des patients de sexe masculin hospitalisés et/ ou venus en consultation. Le sex-ratio était de 0,48 avec une prédominance d u sexe féminin (67,3%).

Nous avons inclus dans notre étude 52 patients. L'âge moyen de nos patients est de 37 ans \pm 12,09, avec des extrêmes allant de 16 ans à 49 ans. La tranche d'âge de 30 à 40 ans est la plus représentée, avec 55,8%.

Les célibataires et les concubins constituent la tranche la plus élevée, avec respectivement 44,2% et 42,3%. Les alphabètes représentent 80,8% de la population.

Les fonctionnaires constituent la tranche la plus élevée de la population (40,4%).

42,3% de la population habitent dans des cours communes et 51,9% vivent avec 6 à 10 personnes.

II-CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES

La population a été répartie selon le taux de CD4.

Tableau VIII : Répartition des patients en fonction de la classification CDC et du taux de CD4

		Catégorie CDC				
		B2	C1	C2	C3	Total
Taux de CD4	<200	1	1	0	44	46
	200-499	0	0	3	2	5
	≥500	0	0	1	0	1
	TOTAL	1	1	4	46	52

La majorité des patients ayant un taux de CD4<200 sont au stade C3.

III-CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET THERAPEUTIQUES

Les différents serotypes de VIH étaient représentés au sein de notre population d'étude.

Tableau IX : Répartition selon le serotype

	Effectif	Pourcentage (%)
VIH-1	49	94,2
VIH-2	2	3,8
VIH 1+2	1	1,9
Total	52	100,0

94,2% de la population sont porteurs du VIH-1

Tous les sujets d'étude n'étaient pas sous traitement ARV.

Tableau X : Répartition de la population selon la prise d'ARV

	Effectif	Pourcentage (%)
OUI	16	30,8
NON	36	69,2
Total	52	100

Seulement 30,8% de la population sont sous traitement ARV.

Notre population d'étude a été répartie selon le traitement prophylactique au cotrimoxazole.

Tableau XI : Répartition des patients selon le traitement prophylactique au cotrimoxazole

	Effectif	Pourcentage (%)
OUI	41	78,85
NON	11	21,15
Total	52	100

78,85% des patients sont sous traitement au cotrimoxazole.

Tableau XII : Répartition des patients selon leur durée de mise sous cotrimoxazole

sous cotrimoxazole	Effectif	Pourcentage(%)
>1 mois	5	12,2
< 1mois	36	87,8
Total	41	100

12,2% des patients étaient sous traitement au cotrimoxazole avant le lavage bronchoalvéolaire.

Les patients présentaient des symptômes différents, ce qui a permis leur répartition selon l'état clinique.

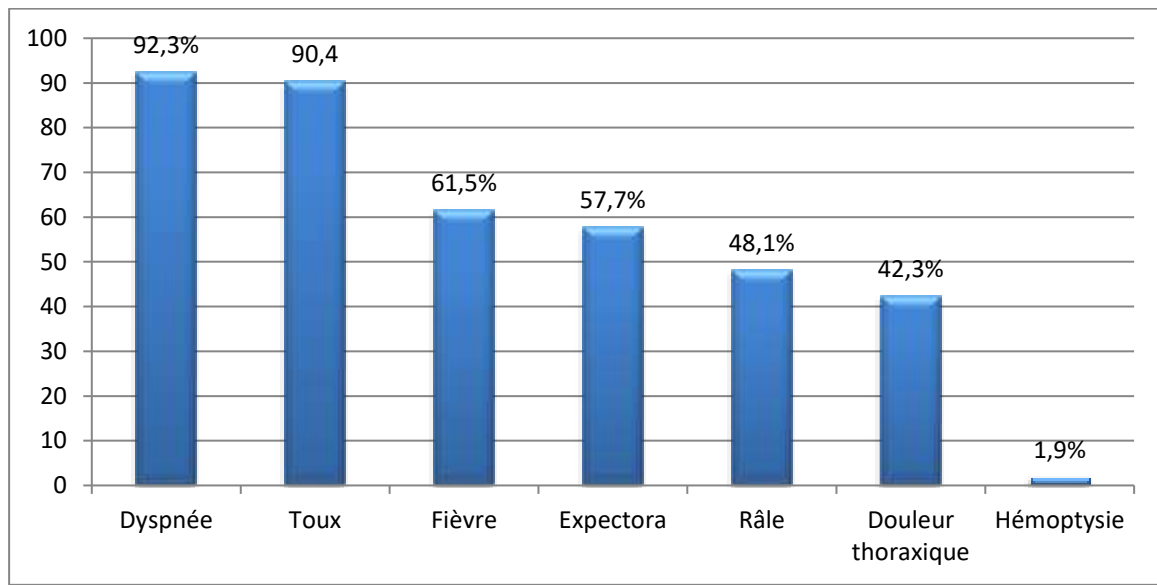


Figure 5: Répartition de la population selon l'état clinique

La dyspnée, la toux et la fièvre sont des signes majeurs.

Les résultats de l'IFI et de la PCR ont été comparés.

Tableau XIII : Répartition selon l'IFI et la PCR

		PCR		Total
		positif	négatif	
IFI	positif	3	4	7
	négatif	9	36	45
	Total	12	40	52

Nous avons quatre (4) résultats :

- Trois (3) échantillons sont positifs et à l'IFI et à la PCR, soit (5,8%) ;
- Neuf (9) échantillons sont PCR positif /IFI négatif, soit (17,3%) ;
- Quatre (4) échantillons sont PCR négatif/IFI positif, soit (7,7%) ;
- Trente six (36) échantillons sont PCR négatif/IFI négatif, soit (69,2%).

En prenant la PCR comme test de référence, les performances diagnostiques de l'IFI sont : - Sensibilité : **25%**

- Spécificité : **90%**
- Valeur prédictive positive (VPP) : **42,8%**
- Valeur prédictive négative (VPN) : **80%**

IV- ETUDE ANALYTIQUE

IV-1 REPARTITION DES CARACTERISTIQUES SOCIO- DEMOGRAPHIQUES SELON LE RESULTAT

IV-1-1 L'âge

Tableau XIV: Répartition de l'âge en fonction du résultat de la PCR

	PCR		
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
<20 ans	2	0	0
20-30 ans	7	1	14,3
30-40 ans	29	9	31
40-50 ans	7	0	0
>50 ans	7	2	28,6
Total	52	12	23,1

Test Exact de Fisher* **p = 0,81*

La différence est non significative ($p > 0,05$).

Il n'y a pas de relation entre la pneumocystose et l'âge des patients.

IV-1-2 Le sexe

Tableau XV : Répartition du sexe en fonction du résultat de la PCR

	PCR		
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
Féminin	35	10	28,6
Masculin	17	2	11,8
Total	52	12	23,1

***Test Exact de Fisher* $p = 0,15$**

La différence est non significative ($p > 0,05$).

Il n'y a pas de relation entre la pneumocystose et le sexe des patients.

IV-1-3 La situation matrimoniale

Tableau XVI: Répartition de la situation matrimoniale en fonction du résultat de la PCR

	PCR		Total
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
Marié	7	3	42,9
Célibataire	23	4	17,4
Concubinage	22	5	22,7
Total	52	12	23,1

***Test Exact de Fisher* $p = 0,029$**

La différence est significative.

Il y a une relation entre le portage de la pneumocystose et la situation matrimoniale.

Les mariés présentent le plus fort taux de positivité, avec 42,9%. Ils sont suivis par les concubins, avec un taux de 22,7%.

La pneumocystose peut se contracter à partir de l'air inhalé, mais aussi à partir de l'hôte infecté. La transmission aérienne est aussi représentée par les gouttelettes de salives provenant d'un sujet infecté. Chez les mariés, la proximité est donc responsable des contaminations interhumaines entre sujet infecté et sujet sain.

IV-1-4 La profession

Tableau XVII: Répartition de la profession en fonction du résultat de la PCR

	PCR		
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
Fonctionnaires	21	3	14,3
Artisans/Ouvriers	8	3	37,5
Commerçants	5	1	20
Elèves/Étudiants	8	0	0
Sans emploi	10	5	50
Total	52	12	23,1

Test Exact de Fisher **p = 0,43**

La différence est non significative.

Il n'y a pas de relation entre la pneumocystose et la profession des patients.

IV-1-5 Le type d'habitat

Tableau XVIII : Répartition du type d'habitat en fonction du résultat de la PCR

	PCR		
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
Villa	11	2	18,2
Appartement	19	4	21,1
Cour commune	22	6	27,3
Total	52	12	23,1

***Test Exact de Fisher* $p = 0,43$**

La différence est non significative.

Il n'y a pas de relation entre le type d'habitat et la pneumocystose.

IV-1-6 Le nombre de personnes par habitat

Tableau XIX : Répartition du nombre de personnes par habitat en fonction du résultat de la PCR

	PCR		
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
1-5 personnes	22	6	27,3
6-10 personnes	27	6	22,2
>10 personnes	3	0	0
Total	52	12	23,1

***Test Exact de Fisher* $p = 0,24$**

La différence est non significative.

Il n'y a pas de relation entre la pneumocystose et le nombre de personnes

par habitat.

IV-2 REPARTITION DES CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES SELON LE RESULTAT

Tableau XX : Répartition du taux de CD4 en fonction du résultat de la PCR

	PCR		
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
<200	46	12	26,1
200-499	5	0	0
>500	1	0	0
Total	52	12	23,1

Test Exact de Fisher* **p = 0,015*

La différence est significative.

Il y a une relation entre la pneumocystose et le taux de CD4.

Tous les sujets parasités parmi les PVVIH ont un taux de CD4 inférieur à 200 cellules par mm³ de sang. La défense immunitaire de l'organisme est très faible à ce taux de LTCD4.

En effet, c'est à ce stade qu'apparaissent les maladies opportunistes dont la pneumocystose.

IV - 3 REPARTITION DES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET THERAPEUTIQUES SELON LE RESULTAT

IV-3-1 La sérologie

Tableau XXI : Répartition de la sérologie en fonction du résultat de la PCR

	PCR		
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
VIH-1	49	11	27,5
VIH-2	1	1	100
VIH 1+2	1	0	0
Total	40	12	23,1

Test Exact de Fisher **p = 0,15**

La différence est non significative.

Il n'y a pas de relation entre le portage de la pneumocystose et le serotype viral.

IV-3-2 Le stade CDC

Tableau XXII: Répartition du stade CDC en fonction du résultat de la PCR

	PCR		
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
B2	1	0	0
C1	1	0	0
C2	4	0	0
C3	46	12	26,1
Total	52	12	23,1

Test Exact de Fisher **p = 0,014**

La différence est significative.

Il y a une relation entre la pneumocystose et le stade CDC.

Toutes les PVVIH parasités sont au stade C3 : 26,1%. Le stade C correspond au stade Sida, et le stade C3 à un taux de LT-CD4 inférieur à 200 cellules /mm³ de sang. C'est à ce stade qu'apparaissent les maladies opportunistes dont la pneumocystose.

IV-3-3 Le traitement ARV

Tableau XXIII : Répartition du traitement ARV en fonction du résultat de la PCR

	PCR		
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
Oui	16	1	6,3
Non	36	11	30,6
Total	52	12	23,1

Test Exact de Fisher* **p = 0,01*

La différence est significative.

Il y a une relation entre la pneumocystose et le traitement ARV.

La majorité des patients parasités ne sont pas sous traitement ARV : 30,6%. L'absence du traitement ARV entraîne une chute plus rapide du taux de CD4 en dessous de 200/mm³ et donc augmente le risque de pneumocystose.

IV-3-4 Le traitement au Cotrimoxazole

Tableau XXIV : Répartition du traitement au Cotrimoxazole en fonction du résultat de la PCR

	PCR		
	Examinés	Positifs	Taux de positivité (%)
Oui	41	12	29,3
Non	11	0	0
Total	52	12	23,1

***Test Exact de Fisher* $p = 0,011$**

La différence est significative ($p < 0,05$).

La pneumocystose est liée au traitement au cotrimoxazole.

Le cotrimoxazole est la molécule de référence utilisée dans le traitement et la prophylaxie de la pneumocystose. Tous les sujets parasités reçoivent une prophylaxie au cotrimoxazole : 29,3%. Mais, cette prophylaxie se situe après le lavage broncho-alvéolaire pour la plupart.

CHAPITRE III : DISCUSSION

I- PREVALENCE GLOBALE APRES LA TECHNIQUE DE PCR

La prévalence de la pneumocystose est de 23,1%. Cette prévalence est proche de celle de Malin en 1995 [42] qui est de 33%. Elle est supérieure à celle de Coulibaly et coll. (8,57%): le diagnostic de la pneumocystose a été effectué sur des spécimens de poumons de sujets atteints de VIH et décédés [17]. Cette différence est explicable par la méthode de diagnostic utilisée: la coloration de Gomori Grocott. En effet, cette technique est moins sensible que la nested PCR.

II- PREVALENCE GLOBALE PAR LA TECHNIQUE PCR ET IFI : ETUDE COMPAREE

La détermination de la prévalence de la pneumocystose en utilisant une méthode de diagnostic appropriée et fiable permet d'améliorer le pronostic des sujets. Cette étude a permis de déterminer la prévalence de la pneumocystose sur le LBA en utilisant deux méthodes de diagnostic différentes: la nested PCR et l'IFI.

La prévalence de la pneumocystose est de 23,1% pour la PCR contre 13,5% pour l'IFI. La nested PCR s'avère être un outil fiable pour la détection de *P. jirovecii* dans les échantillons de LBA. Cette différence pourrait s'expliquer par la grande sensibilité de la PCR par rapport à l'IFI. En effet, la sensibilité de la PCR est de 100% [54].

Trois (3) sujets sur 52 (5,8%) sont PCR positif/IFI positif: ces sujets ne recevaient aucune prophylaxie ni ARV, ni au cotrimoxazole. Deux de ces patients sont décédés par la suite. Cela pourrait s'expliquer par le stade avancé de la pneumocystose atteignant les formes extra pulmonaires.

Neuf (9) sujets sur 52 (17,3%) sont PCR positif /IFI négatif. Ce sont aussi des sujets ne recevant aucune prophylaxie. Ces sujets avaient un nombre de kystes inférieur à cinq (5), donc déclarés négatifs à l'IFI;

Quatre (4) sujets sur 52 (7,7%) sont PCR négatif/IFI positive. Ce sont des échantillons pour lesquels deux contenaient du sang (présence d'hémoglobine) et deux autres avaient des densités optiques faibles et un pourcentage ADN/protéine faible (présence de mucoprotéines). l'hémoglobine et les mucoprotéines sont des inhibiteurs de la PCR. Ces deux éléments pourraient avoir inhibé la PCR, d'où la nécessité d'avoir de bons prélèvements.

III- PREVALENCE DE LA PNEUMOCYSTOSE EN FONCTION DE L'AGE

La population de 30 à 40 ans est plus touchée, avec 31% de la population. La pneumocystose est une affection du sujet adulte jeune dans la littérature des pays pauvres [61]. La tranche de 30 à 40 représente la tranche de la population sexuellement active. Les contaminations sont représentées par les comportements à risque et la fréquentation des milieux à risque.

IV- PREVALENCE DE LA PNEUMOCYSTOSE EN FONCTION DE LA SITUATION MATRIMONIALE

La pneumocystose se retrouve aussi bien chez les célibataires, chez les concubins que chez les mariés. La contamination est due au contact étroit entre un sujet atteint de pneumocystose et un autre sain.

En effet, la pneumocystose peut se contracter à partir de l'air inhalé, mais aussi à partir de l'hôte infecté, d'où le risque nosocomial. La transmission aérienne est due aux gouttelettes de salives provenant d'un sujet infecté. Ainsi, dans le concubinage comme dans le mariage, la proximité est responsable des contaminations interhumaines. Il peut aussi s'agir des comportements à risques.

V- PREVALENCE DE LA PNEUMOCYSTOSE SELON LE SEXE

La prévalence de la pneumocystose chez la femme est de 28,6% contre 11,8% chez l'homme. Cette prévalence chez la femme pourrait être associée à une féminisation du VIH. En effet, dans notre étude, les femmes séropositives représentent 67,3% de la population contre 32,7% chez les hommes. Cette féminisation du VIH est en accord avec une enquête menée en 2011 qui donne une prévalence de 2,9% chez l'homme et 6,4% chez la femme [44].

VI-PREVALENCE EN FONCTION DU STADE CDC

La pneumocystose est une infection opportuniste qui apparaît chez les sujets VIH positifs lorsque le taux de lymphocytes TCD4 est inférieur à 200/mm³ de sang. Cette observation est rapportée au niveau de la littérature. Tous les sujets atteints de la pneumocystose sont au stade C3, mais aussi ont un taux de CD4 inférieur à 200 cellules/mm³ de sang. Ces résultats sont en accord avec la classification du CDC [14].

VII-PREVALENCE DE LA PNEUMOCYSTOSE EN FONCTION DU TRAITEMENT ARV

Le traitement antirétroviral permet de retarder l'apparition de la phase SIDA et donc de la pneumocystose.

En effet, le traitement antirétroviral consiste en une association de médicaments antirétroviraux. Son but est de rendre indétectable la charge virale plasmatique et restaurer le système immunitaire par l'augmentation du taux de CD4 [9]. Dans notre étude, 11 personnes sur les 36 personnes qui ne sont pas sous traitement ARV sont atteintes de pneumocystose (11/36). Ces dernières présentent en plus un taux de CD4 inférieur à 200.

De même 1 sur les 16 sujets sous traitement ARV est atteint de pneumocystose. Ce sujet est sous traitement ARV depuis plus de 10 ans. Ceci confirme une observation faite dans la littérature, à savoir : les personnes suivant un traitement antirétroviral présentent une fréquence moindre de pneumocystose [35].

VIII-MANIFESTATIONS CLINIQUES OBSERVEES

La dyspnée, la toux et la fièvre sont des signes majeurs. Cette présentation de la pneumocystose dans notre contexte est classique: dyspnée d'aggravation progressive, fièvre, toux. Ces signes varient en fonction du délai de consultation, avec comme stade ultime la détresse respiratoire liée à l'hypoxémie. Ces trois signes liés à la pneumocystose sont retrouvés dans la littérature [53]. En absence de traitement, il y a une aggravation et un risque de décès.

Chez 36 patients sur 52, cette triade fièvre, toux, dyspnée inaugure le passage au stade SIDA. Parmi ces 36 patients, chez 11, elle marque le passage à la pneumocystose. La pneumocystose inaugure le SIDA, dans 21,15% des cas. Ce pourcentage est en accord avec une observation faite dans la littérature selon laquelle la pneumocystose constitue l'infection inaugurale du SIDA dans 15 à 50% des cas si un traitement préventif au cotrimoxazole n'est pas institué. C'est le cas en France où la pneumonie à *Pneumocystis* reste la pathologie inaugurale la plus fréquente du SIDA [39].

DIFFICULTES RENCONTREES

Plusieurs difficultés ont été rencontrées dans notre étude :

- Difficulté dans l'obtention des prélèvements ;
- Difficulté dans l'obtention des réactifs ;
- Manipulation d'échantillons hautement infectieux, ce qui nécessite beaucoup de précaution ;
- Manipulation de produits toxiques, ce qui a nécessité beaucoup de précaution ;
- Absence de matériel ;
- Les manipulations ont été faites avec des quantités très faibles pour la PCR, ce qui a nécessité beaucoup d'application.

CONCLUSION

La pneumocystose est une infection opportuniste due à un microorganisme, *Pneumocystis jiroveci*. Ce parasite se développe principalement dans les poumons des sujets immunodéprimés. L'infection est très courante dans la population, en général, mais ne conduit à une maladie pulmonaire que lorsque le taux de LT-CD4 est inférieur à 200/mm³ de sang. Ce qui est le cas chez les sujets VIH positifs au stade SIDA. C'est une pathologie létale chez les PVVIH. La maladie se caractérise par une atteinte bronchique diffuse unilatérale ou bilatérale pouvant évoluer vers un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) justifiant l'admission en réanimation [5]. La prévalence de cette infection est très variable dans le monde. En Côte d'Ivoire, nous ne disposons pas de données sur cette infection.

C'est à cet effet que nous avons entrepris d'évaluer la prévalence de cette infection tout en utilisant deux méthodes de diagnostic différentes : l'Immuno Fluorescence Indirecte (IFI) et la PCR. Ces deux méthodes ont été comparées quant à leurs performances diagnostiques.

Au total, 52 patients vivant avec le VIH ont fait l'objet de notre étude. L'examen à la PCR s'est révélé positif pour 23,1% des patients contre 13,5% pour l'IFI. La sensibilité et la spécificité de l'IFI par rapport à la PCR ont été respectivement de 25% et de 90%. La PCR se révèle la meilleure technique pour la recherche de *Pneumocystis jiroveci* dans le LBA.

En effet, plusieurs techniques sont utilisées pour la mise en évidence du parasite dans le LBA, mais la nested PCR est décrite comme la méthode sensible et spécifique.

Ces résultats montrent la présence effective de cette pathologie au sein de notre population de PVVIH. Elle est évitée en cas de prophylaxie au cotrimoxazole et/ou de traitement par ARV.

RECOMMANDATIONS

Dans le souci de faire reculer la pneumocystose et si possible de l'éradiquer, il est important et nécessaire de faire les recommandations suivantes :

❖ **Aux autorités politiques, administratives et aux autorités sanitaires**

- Subventionner la prise en charge des affections opportunistes, notamment de la pneumocystose ;
- Mettre en place, dans les centres de recherche et de diagnostic, un plateau technique pour le diagnostic de la pneumocystose par la PCR.

❖ **Au personnel de santé**

Renforcer de la chimioprophylaxie au cotrimoxazole pour la prévention de la pneumocystose tout en respectant les contre-indications.

REFERENCE

1- Ake M.

Le taux de prévalence en baisse en Côte d'Ivoire. Santé et Bien Etre.
Dec. 2012. (Page consultée le 01/06/2013)
<<http://www.infodrome.co/index.php?>>

2- Alison M., Jen D, Henry M.

Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. S
Rev Biomed. 2005 ;(16):55-65.

3- Alvarez-Martinez M.,Moreno A., Miro JM et al.

Pneumocystis jirovecii pneummonia in Spanish HIV-infected patient in
combined antiretroviral therapy era: Prevalence of dihydropteroate synthase
mutation and pronostic factors of mortality.
Diagn. Microbiol Infect. Dis.2008 ; 62(1) :33-34

4- Anglaret X., Salomon R.

Epidémie de SIDA en Afrique subsaharienne.
M/S : Médecine Science. 2004 ; 20 (5) :593-598.(Page consultée le 18/4/2013)
<[http : //id.erudit.org/iderudit/008429ar](http://id.erudit.org/iderudit/008429ar)>

5 - Baite A., Hassouni A., Dimdou M.

Syndrome de détresse respiratoire aigue suite à une pneumocystose chez un
patient séropositif. A propos d'un cas : revue de la littérature.
Med Afr Noire. 2007; 54(5):257-261

6- Barin F., M'Doup S., Denis F et al.

Serologic evidence for virus related to simian T lymphotropic retrovirus III in
resident of West Africa. Lancet.1985; 5(2):1387-1389

7- Ben M.,Slim A., Garboug M at al.

Diagnostic et suivi virologique de l'infection par le VIH.
Tunisie Médicale. 2006 ; 84 (7) :395-402

8- Bennett N.J.

Pneumocystis (carinii) jirovecii pneumonia.2008. (Page consultée le 10/9/2010)
<<http://emedicine.medscape.com/article>>

9- Bissagnene E., Dariose CQ JM., Drabo J et al.

Mémento thérapeutique du VIH/SIDA en Afrique. Paris: Doin, 2005. 242 p

10- Boer MG., Fijter W., Kroon FP.

Outbreaks and clustering of *Pneumocystis* Pneumonia in Kidney transplant recipient: a systematic review.

Med Mycol.2011; 49:673- 680

11- Brun Vezinet F., Damond F., Des champs D et al

Virus de l'immunodéficience humaine, Encycl. Med Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), maladies infectieuses, 8-050-B-15, 2000,10 p.

12- Carinii A.

Formas de eschizogonia do trypanosomia lewisi. Commun Soc Med Sao Paolo.1910; 16:204

13- Centers for Diseases Control and Prevention. Atlanta.

Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults.

(Page consultée le 04/05/2013)

<<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00018871.htm>>

14- Centers for Diseases Control and Prevention. Atlanta.

Revised classification systems for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults.

MMWR Recomm Rep. 1992; Déc.18; 41(RR-17): 1-19

15- Charles F T., Andrew H L.

Pneumocystis pneumonia.

N Engl J Med. 2004 ;(350):2487- 2498

16- Côte d'Ivoire. Ministère de la Santé et de la Lutte Contre le Sida, Institut National de la Statistique. Abidjan.

Enquête sur les indicateurs du sida. Abidjan .MLS, 2006.

(Page consultée le 05/06/2013)

<http://www.google.ci?url?sa>

17- Coulibaly G.,N'dhatz S M.

Prevalence of *Pneumocystis* in HIV infected patients in pneumologie unit, autopsy study performe in Abidjan. Ivory Coast. Rev Pneumol Clin.1994;50:141-143.

18- Cushion MT., Ruffollo JJ., Waler PD.

Analyse des stades de développement de *Pneumocystis carinii* in vitro.
Lab Invest.1988; 58:324-331

19- D. Chabass,C.I. Guiguen.,N.,Contet-Audonneau .

Mycologie médicale.(Page consultée le 10/10/2012)
<<http://books.google.com/boo?ids>>

20- Delaney KM., Palella FJ., Moorman A C and al.

Decining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators.
N Engl J Med. 1998, Mar 26; 338 (13):853-860

21- Delanoe P.,Delanoe M. Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec trypanosome lewisi.CR Acad Sci.1912;155:658-660

22- Ennaifer-jerbi,lovzir B.

Prévalence des pneumopathies *Pneumocystis carinii* chez le sujet infecté par le VIH en Tunisie.
Rev Biomed. 2005; 16: 55-64.

23- Fewour A., Esssame O., Kouabang G.

L'atteinte pulmonaire au cour du SIDA : Aspect histopathologique en milieu camerounais : Résultats préliminaire.
Med Afr Noire. 2004; 51(1):55-59

24- Flori P., Bellete B., Durand F et al.

Comparison between real –time PCR, conventional PCR and different staining technique for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* from bronchoalveolar lavage specimen.
J. Med. Microbiol. 2004; 53:603-607

25- Fotso S.

Prévalence de la pneumocystose au cour des pneumopathies interstitielles fébriles chez les sujets infectés par le VIH au service de Pneumophtysiologie du CHU de Cocody. 95 p
Mem.CES.Pneumologie: Abidjan, 2009

26- Frenkel JK.

Pneumocystis pneumonia, une maladie immunodépendante.
J Eucargot. Microbiol. 1995; 46:89s-92s

27- Galanski M., Nischeleskij.

Pneumonie à *Pneumocystis carinii*. Der radiologe. 1987; 27(10):444-449.

28- Herion R. Les femmes et le SIDA.

Paris : Flammarion ; 1998. P.27-35.

29- Herrag M., Eflassy F.M.T., Alaoui Y.

Pneumocystis jirovecii : Ce nom que signifie-t-il ?
Rev Pneumol Clin. 2010 ; 66(6) :342-346

30- Jacomet C.

Guide de l'infection à VIH. Paris: Impact médecin, 2002. P19

31- Kaouech E., Kallel K., Anane S.

Pneumocystis jirovecii pneumonia: Comparison between conventional PCR and staining technique. Pathologie et Biologie. 2009; 57(5):373-377.

32- Khan.A.N.

Pneumonia, *Pneumocystis Carinii*. 2008. (Page consultée le 25/11/2010)
<<http://www.emedecine.medscape.com/article>>

33- Klatzmann D.

Physiopathologie de l'infection à VIH. 1^{ère} éd
Paris: Flammarion , 1989 . P81-89

34- Krajicek B., Limper A., Thoma C.

Advances in the biology, pathogenesis and identification of *pneumocystis* pneumonia. Etats-Unis, Hagerstown : 2008. p 228-234

35- La pneumocystose. Janv. 2012. (Consulté le 01/08/2013)

<www.medQual.fr>

36- Laporte A.

SIDA et infection par le VIH. 1^{ère} éd.
Paris : Flammarion, 1989. P 3-12

37- Levy JA.

Acute HIV infection and cells susceptible to HIV infection. In: Levy JA, ed. HIV and pathogenesis of AIDS. 2nd ed.

Washington: ASM Press, 1998. P 75-96.

38- L'Her E.

Généralité sur la ventilation non invasive au cours de l'insuffisance respiratoire aiguë. ITBM RBM. 2005; 26(1):41-50.

39- Lisa R., Taggart MC., Nancy L et al.

Validation de la Trousse de Pneumonie de Myc Assay pour la détection de *Pneumocystis jirovecii* dans les spécimens de lavage broncho alvéolaire par rapport à un standard de laboratoire de microscopie par Immunofluorescence Direct, PCR en temps réel ou PCR conventionnel.

J Clin Microbiol. 2012; 50(6):1856-1859

40- Lloyd A.

HIV infection and AIDS. PNG Med. 1996; 36(3) :174-180

41- Magne D., Angoulvant A., Botterel F et al.

Surveillance de la pneumocystose dans les 14 hôpitaux de l'assistance publique-Hôpitaux de Paris(AP-HP), France, 2003-2005. BEH. 2007; 5:42-44.

42- Malin A., Gwanzura L., Klein S et al.

Pneumocystis carinii pneumonia in Zimbabwe. Rev. Critique de l'actualité scientifique internationale sur le VIH et les virus des hépatites. Lancet. 1995; 346 :1258-1261

43- Mayaud C., Naccache J M., Cadramel J.

Manifestation respiratoire au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. Encycl Med Chir Pneumologie 6-0046A640, 2001, 11P.

44- Minga A.K.

Intérêt d'une cohorte de sujet adulte à date d'infection par le VIH estimée en Afrique subsaharienne. 221 p

ThMed : Bordeaux, SP:2011, 183

45- Nevez G., Chabe M., Rabodonirina M et al.

Pneumocystis jirovecii infection. Parasite.Sep.2008 ; 15 :359-365

46- OMS.Genève,ONUSIDA.Paris

Zéro nouvelles infections à VIH, zéro discrimination, zéro décès lié au sida :
Rapport 2012.Paris : ONUSIDA, 2012. 108 p

47- ONUSIDA.Paris,OMS.Genève

Rapport 20 Nov.2012. (Page consultée le 08/5/2013)

[<www.cite6science.fr>](http://www.cite6science.fr)

48- Opeli A. T.

Mise au point d'une technique de PCR pour la recherche de *Cryptosporidium parvum* chez les sujets infectés par le VIH. 95 p

Th.Pharm:Abidjan.Université de Cocody, 2007,1182

49- PCR nichée. (Page consultée le 01/08/2013)

[<http://www.pcrstation.com>](http://www.pcrstation.com)

50- Plantier J.C.

A new human immunodeficiency virus derived from gorillas.

Nat.Med.2009: aug; 15(8):871-872

51- Poiesz BJ., Ruscetti FW., Gazdar A Fet al.

Detection and isolation of type C retrovirus particules from fresh and cultured lymphocytes of patients with cutaneous Tcell lymphoma.

Proc.Natl. Acad.Sci.Usa.1980; 77:7415-7419.

52- Pontier S.,Busafo F.,Daste G.,et al.

Pneumocystose à forme granulomateuse. Revue des Maladies Respiratoire.2004 ;(21) :989-992

53- Riadh H.

La Pneumocystose. Jav.2013.p7-14. (Page consultée le 05/06/2013)

[<http://fr.Sideshare.net/riadhammedi9/Pneumocystose>](http://fr.Sideshare.net/riadhammedi9/Pneumocystose)

54- Ribes J A., Limper AH., Smith T F et al.

PCR of *Pneumocystis carinii* broncho alveolar specimen: Analisis of sensitivity. Journal of Clinical Microbiologie. 1997:830-835

55- Robertson DL., Anderson JP., Bradac JA et al.

HIV. Nomenclature Proposal. Science. 2000 ; 288 :55-57.

56- Ruffolo JJ.

Structure cellulaire de *pneumocystis carinii*. In: pneumonie à *Pneumocystis carinii* pneumonia. 2^e ed.

[Lieu] : Marcel Dekker, 1994 .P25-43.

57- Salamon R., Marimoutou C., Ekra D.

Clinical and biological evolution of HIV1 seroconverters in Abidjan, Cote d'Ivoire 1997-2000.

J Acq Immune Defic Syndr Hum Retroviral. 2002; 29:149-157.

58- Simon V., Ho DD.

HIV1 dynamics in vivo: Implication for therapy.

Nat.Rev Microbiol. 2003; 181-190

59- Stringer JR., Beard JR., Beard CB et al.

A new name (*Pneumocystis jirovecii*) pour la pneumonie de l'homme.

Emerg.Infect.Dis. 2002 ; 8 :891-896

60- Terris B., Marche C., Potet F.

Pneumocystose extra pulmonaire au cours du SIDA : à propos d'une observation.

Anal de Pathologie. 1996; 16(1):41-44

61- Udwandia Z F., Daoki A V., B Hadar A S.

Peumocysis carinii pneumonia HIV infected from mubai.

J Assoc Physician India. 2000 ;(53):437-440

62- Wakefield A., Miller R., Guiver L., et al.

Granulomatous *Pneumocystis carinii* pneumonia. DNA amplification studies on bronchoscopic alveolar lavage sample.

J.Clin.Pathol. 1994; 47: 664-666

63- Weig M., klinker H., Meir A. et al.

Usefulness of PCR for diagnosis of *pneumocystis carinii* pneumonia in different patient groups. 1997

J.Clin.Microbiol. 1997; 35(6):1445-1449

64- Zavascki A., Maia A., Goldanie L.

Pneumocystis jiroveci thiroiditis :report of 15 cases in the
literature.Mycose.2007;50(6):443-446

ANNEXES

ANNEXE I

**PREVALENCE DE LA PNEUMOCYSTOSE CHEZ LES SUJETS VIH
POSITIFS PRESENTANT UN SYNDROME ALVEOLO-INTRRSTITIEL :
RECHERCHE PAR LA TECHNIQUE DE PCR**

FICHE D'ENQUETE

N°

N° AMI.....

I-IDENTIFICATION

Nom et prénom :

Age :

Sexe :

M

☐

F

☐

Situation matrimoniale :

Marie(e) ☐

célibataire

☐

concubin(e)

☐

Sérologie VIH : VIH1 ☐ VIH2 ☐ VIH1+2 ☐

Date de dépistage

Taux de CD4.....

II-CONDITION SOSCIO-ECONOMIQUE

Alphabète

Oui

☐

Non

☐

Profession.....

Zone d'origine.....

Lieu d'habitation.....

Type d'habitation :

-villa

☐

-appartement

☐

-cour commune

☐

Nombre de personne :personne

III-RENSEIGNEMENT CLINIQUE

1-motif d'admission.....

2-Durée d'évolution.....

3-Antécédent thérapeutique

Traitement au cotrimoxazole :<1 mois ☐ >1mois ☐

Autre traitement parasitaire

Traitement ARV Oui ☐ Non ☐

Si oui durée.....molécule utilisée

Stade clinique(CDC).....

Antécédent clinique.....

Infection opportuniste en cour.....

Taitement en cour

IV-CLINIQUE

Dyspnée ☐

Toux ☐

Fièvre ☐

Douleurs thoracique ☐

Expectoration ☐

Rale crépitant ☐

Hemoptisie ☐

V-RESULTATS

PCR.....Positif ☐ Négatif ☐

ANNEXES II

Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, and body fluids using a microcentrifuge. For total DNA purification using a vacuum manifold, see "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol)" on page 30.



Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 18).
- 200 µl of whole blood yields 3–12 µg of DNA. Preparation of buffy coat (see page 19) is recommended if a higher yield is required.

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature.
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 17.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Pipet 20 µl QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 ml microcentrifuge tube.
2. Add 200 µl sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 µl whole blood, plasma, serum, buffy coat, or body fluids, or up to 5×10^6 lymphocytes in 200 µl PBS.

If the sample volume is less than 200 µl, add the appropriate volume of PBS.

QIAamp Mini spin columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 µl of an RNase A stock solution (100 mg/ml) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

Note: It is possible to add QIAGEN Protease (or proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

3. Add 200 µl Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s.

In order to ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

If the sample volume is larger than 200 µl, increase the amount of QIAGEN Protease (or proteinase K) and Buffer AL proportionally; for example, a 400 µl sample will require 40 µl QIAGEN Protease (or proteinase K) and 400 µl Buffer AL. If sample volumes larger than 400 µl are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits is recommended; these can process up to 2 ml or up to 10 ml of sample, respectively.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

4. Incubate at 56°C for 10 min.

DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

5. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

6. Add 200 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

If the sample volume is greater than 200 µl, increase the amount of ethanol proportionally; for example, a 400 µl sample will require 400 µl of ethanol.

7. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.*

Close each spin column in order to avoid aerosol formation during centrifugation. Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) in order to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again at higher speed until the QIAamp Mini spin column is empty.

Note: When preparing DNA from buffy coat or lymphocytes, centrifugation at full speed is recommended to avoid clogging.

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.*

It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 if the original sample volume is larger than 200 µl.

* Flowthrough contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

9. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.
10. Recommended: Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200 µl Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

A second elution step with a further 200 µl Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200 µl should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 µl increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 26). For samples containing less than 1 µg of DNA, elution in 50 µl Buffer AE or water is recommended. Eluting with 2 x 100 µl instead of 1 x 200 µl does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at –20°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

A 200 µl sample of whole human blood (approximately 5×10^8 leukocytes/ml) typically yields 6 µg of DNA in 200 µl water (30 ng/µl) with an A_{260}/A_{280} ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, refer to pages 25–26 and Appendix A, page 51.



Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from whole blood, plasma, serum, lymphocytes, and body fluids using the QIAvac 24 Plus or equivalent vacuum manifold. For total DNA purification using a microcentrifuge, see "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)" on page 27.



Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- For setup of the QIAvac 24 Plus, see pages 20–24.
- Switch off vacuum between steps to ensure that a consistent, even vacuum is applied during protocol steps.
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 18).
- 200 µl of whole blood yields 3–12 µg of DNA.

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature.
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 17.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Pipet 20 µl QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 ml microcentrifuge tube.
2. Add 200 µl sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 µl whole blood, plasma, serum, or body fluids, or up to 5×10^6 lymphocytes in 200 µl PBS.

If the sample volume is less than 200 µl, add the appropriate volume of PBS.

QIAamp Mini columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 µl of an RNase A stock solution (100 mg/ml) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

Note: It is possible to add QIAGEN Protease (or proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

ANNEXE III

Annexe 1: Classification en catégories clinique du CDC 1993

Catégorie A	Un ou plusieurs critères listés ci-dessous chez un adulte ou un adolescent infecté par le VIH, s'il n'existe aucun des critères des catégories B et C Infection à VIH asymptomatique Lymphadénopathie persistante généralisée Primo-infection symptomatique
Catégorie B	Manifestations cliniques chez un adulte ou un adolescent infecté par le VIH, ne faisant pas partie de la catégorie C et qui répondent au moins à l'une des conditions suivantes : Candidose oropharyngée Candidose vaginale persistante, fréquente ou répondant mal au traitement Dysplasie du col fièvre (38°5) ou diarrhée supérieure à 1 mois Leucoplasie chevelue de la langue Zona récurrent Purpura thrombocytopénique idiopathique Neuropathie périphérique
Catégorie C	Cette catégorie correspond à la définition du SIDA chez l'adulte. Lorsqu'un sujet a présenté l'une des pathologies ci-dessous, il est classé définitivement dans la catégorie C : Candidose trachéale, bronchique, pulmonaire, oesophagienne, extrapulmonaire Cryptococcose extrapulmonaire Pneumonie à <i>Pneumocystiscarinii</i> Toxoplasmose cérébrale Infection à CMV Rétinite à CMV Infection à <i>Mycobacteriumtuberculosis</i> Infection à <i>Mycobacterium avium</i> ou <i>kansaii</i> Pneumopathie bactérienne récurrente Septicémie à salmonella non typhiques récurrente Cryptosporidiose intestinale évoluant depuis plus d'un mois Leucoencéphalopathie multifocale progressive Coccidioïdomycose, disséminée ou extrapulmonaire Histoplasmosse disséminée Sarcome de Kaposi Lymphome de Burkitt lymphome cérébral primaire Syndrome cachectique dû au VIH

Annexe 2 : classification OMS 2006

Stade 1	1. Patient asymptomatique, adénopathies persistantes généralisées
Stade 2	2. Perte de poids inférieure à 10% du poids corporel involontaire. 3. Dermite séborrhéique, prurigo typique atteinte fongique des ongles, Chéilite, Ulcérations buccales récurrentes 4. Zona au cours des 5 dernières années 5. Infection récidivantes des voies respiratoires supérieures
Stade 3	6. Perte de poids supérieur ou égale à 10% du poids corporel involontaire. 7. Diarrhée chronique inexpliquée pendant plus de 1mois. 8. Fièvre prolongée inexpliquée (intermittente ou constante) pendant plus de 1mois. 9. Candidose buccale persistante. 10. Leucoplasie chevelue buccale typique. 11. Tuberculose pulmonaire certaine ou probable dans les 2 années précédentes. 12. Infections bactériennes sévères (pneumopathie, salpingite, septicémie, pyélonéphrite, prostatite). 13. Anémie (<8g/dl), neutropénie (<(500 10 ⁶ /l) et/ou une thrombopénie chronique
Stade 4	14. Syndrome cachectique lié au VIH, 15. Pneumopathie à <i>Pneumocystisjiroveci</i> . 16. Tuberculose extra-pulmonaire dans les antécédents 17. Sarcomes de kaposi 18. Toxoplasmose cérébrale. 19. Cryptosporidiose, accompagnée de diarrhée pendant plus de 1mois. 20. Septicémie à salmonelles non typiques récurrentes 21. Isosporose chronique 22. Candidose de l'œsophage, de la trachée, des bronches ou des poumons 23. herpès cutanéomuqueux pendant plus de 1mois. 24. Mycobactériose atypique généralisé 25. Herpès viscéral quelle que soit la durée, ou infection viscérale à CMV 26. Cryptococcose extra-pulmonaire 27. Lymphome (cérébral ou B non hogdkinien) ou autres tumeurs solides associées au VIH 28. Leuco-encéphalopathie multifocale progressive ou encéphalopathie à VIH. 29. Histoplasmoses ou coccidioïdomycose. 30. Leishmaniose atypique disséminée 31. Cancer invasif du col utérin. 32. Néphropathie ou cardiopathie symptomatique associées au VIH

RESUME

Justification : La destruction des lymphocytes T4 lors de la multiplication du virus du VIH constitue une porte ouverte à l'émergence des maladies opportunistes. La pneumocystose constitue l'une de ces pathologies, et elle est causée par un parasite : *Pneumocystis Jirovecii*. Ce parasite est responsable de syndrome alvéolo-interstitiel caractérisé par une détresse respiratoire chez les sujets au stade SIDA. La lutte contre cette affection au sein des PVVIH passe par une bonne connaissance des données épidémiologiques.

Objectif : Contribuer à l'établissement de données épidémiologiques sur la pneumocystose chez les PVVIH en Côte d'Ivoire.

Matériel et méthodes : Deux tests de diagnostic de la pneumocystose ont été utilisés : la nested PCR et l'IFI. Les analyses ont été faites sur le LBA de sujets consultant et/ou hospitalisés au PPH du CHU de Cocody et ayant été déclarés positifs au VIH. L'IFI est réalisée sur les prélèvements frais au CeDReS, et la nested PCR sur les extraits d'ADN au CeDReS et au CIRBA. Les caractéristiques épidémiologiques et les données sociodémographiques ont été recueillies à l'aide d'un questionnaire standardisé.

Résultats : Notre étude a porté sur 52 PVVIH dont la moyenne d'âge était de 37 ans, avec 67,3% de femmes et 32,7% d'homme. Parmi cette population, 94,2% sont porteurs du VIH1, 3,8% sont porteurs du VIH2 et 1,9% sont porteurs du VIH1+2. 88,5% ont un taux de CD4 inférieur à 200 cellules/mm³ de sang et au stade C3 de la classification du CDC. 78,9% de la population sont sous prophylaxie au cotrimoxazole, et 30,8 % de la population sont sous traitement ARV. La dyspnée, la toux et la fièvre sont les signes majeurs. L'IFI était positive pour 13,5% des patients, et la PCR était positive pour 23,1% des patients. La pneumocystose, dans notre étude, est liée à la situation matrimoniale, au taux de CD4, au stade CDC, au traitement ARV et à la prophylaxie au cotrimoxazole. La sensibilité et la spécificité de l'IFI par rapport à la PCR ont été respectivement de 25% et de 90%. La PCR se révèle la meilleure technique pour la recherche de *Pneumocystis jiroveci* dans le LBA.

Conclusion : Cette étude confirme l'existence de la pneumocystose chez les PVVIH et la nécessité de mener une lutte contre cette affection.

Mots clés : Pneumocystose, VIH, Syndrome alvéolo-interstitiel, IFI, PCR.