



Doctorat Université Libanaise

THESE EN COTUTELLE



**Université Lille 2
Droit et Santé**

Pour l'obtention du grade de Docteur délivré par

L'Université de Lille 2

et

L'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie

(Université Libanaise)

Spécialité : Microbiologie Médicale

Présentée et soutenue publiquement par

KHALIFE Sara

Le 29 septembre 2014

Interactions hôte-*Pneumocystis* : études fonctionnelles de la PcMnSOD et de la colonisation par *Pneumocystis* spp par des approches expérimentales et clinico-épidémiologiques

Membres du Jury

Président du Jury : Dr. Eric VISCOGLIOSI (Institut Pasteur de Lille, France)

Directeurs de thèse : Pr. Monzer HAMZE (Université Libanaise)

Pr. El Moukhtar ALIOUAT (Université de Lille2, France)

Pr. Fouad DABBOUSSI (co-directeur, Université Libanaise)

Rapporteurs : Dr. Jean MENOTTI (Université Paris Diderot, France)

Pr. Ziad DAOUD (Université de Balamand, Liban)

Examineurs : Pr. Anne TOTET (Université de Picardie Jules Verne, France)

Pr. Nabil HADDAD (Université Libanaise)

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Au Docteur Eric Viscogliosi, vous me faites l'honneur de présider ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au Professeur Ziad Daoud, Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Soyez assuré de toute ma gratitude et de mon profond respect.

Au Docteur Jean Menotti, vous me faites un grand honneur en acceptant d'être rapporteur de ce travail. Soyez assuré de ma gratitude.

Au Docteur Anne Totet, vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury de thèse. Soyez assurée de ma reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Au Docteur Nabil Haddad, vous me faites l'honneur de participer au Jury de thèse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Au Professeur El Moukhtar Aliouat, je vous remercie pour m'avoir transmis votre passion pour la recherche. Pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé tout au long de ce travail, pour m'avoir fait bénéficier de vos connaissances, pour votre disponibilité et votre gentillesse, pour l'intérêt et la confiance que vous m'avez portés tout au long de ces trois années. Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance.

Au Professeur Monzer Hamze, je vous remercie pour votre gentillesse, et votre disponibilité. Que l'aboutissement de ce travail témoigne de toute ma reconnaissance.

Au Professeur Fouad Dabboussi, je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce sujet. Que ce travail, vous témoigne de toute ma gratitude et de mon profond respect.

*Je remercie également Docteur **Cécile-Marie Aliouat** de m'avoir guidée avec délicatesse et rigueur tout au long de ce travail et de la rédaction de ce manuscrit. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et vos précieux conseils.*

A toute l'équipe BDPEE, sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Annie, Magali, Emilie,

Un immense merci pour m'avoir formée, vous avez toujours été disponible et j'ai beaucoup appris grâce à vous.

Nausicaa, Muriel, Christophe,

Un grand merci pour votre aide précieuse lors des manipulations, pour votre bonne humeur, votre aide et vos conseils.

Gabriela, Sadia, Pilar, Karine,

Un grand merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Yuwalee, Linh, Dima, Amandine,

Grâce à vous venir au labo est un réel plaisir. Avec des amies comme vous, le travail devient beaucoup plus facile.

A tous les membres du laboratoire de Microbiologie Santé et environnement de l'Université Libanaise...

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir fait partager votre expérience dans un climat de travail et de bonne humeur.

A mes sœurs, Tania et Nana,

Je vous remercie pour tous ces instants de bonheur partagés ensemble devenus trop rares à mes yeux...

A mes Frères, Rabih et Rami,

Je vous remercie pour votre joie de vivre, votre énergie, et votre soutien dans les moments difficiles...

A mon rayon de soleil, Georges,

Parce que ton sourire et ton amour me permet de gravir des montagnes...

A mes parents, Raymona et Mohamad Khalife,

Je vous remercie d'être là dans chaque étape de ma vie, d'avoir toujours cru en moi, même lorsque le doute m'envahissait. Votre soutien sans faille et tous vos encouragements m'ont permis d'avancer avec confiance. Que tous vos efforts soient aujourd'hui récompensés, je vous dédie ce travail.

RESUME

Le genre *Pneumocystis* regroupe des microchampignons atypiques qui colonisent par voie respiratoire les alvéoles pulmonaires de nombreux mammifères. C'est un pathogène opportuniste qui s'avère particulièrement dangereux lorsque le système immunitaire de l'hôte est déficient (VIH, greffés) et dans ce cas il provoque une pneumonie, la pneumocytose, fatale en absence de traitement. Du fait que les *Pneumocystis* spp restent des microchampignons non cultivables, il est alors impossible de manipuler directement ses gènes et la seule solution pour étudier leurs fonctions et leurs localisations, demeure leur expression en système hétérologue.

Situé dans l'espace alvéolaire, les *Pneumocystis* spp. sont exposés au stress oxydatif généré par les macrophages alvéolaires, les granulocytes neutrophiles ainsi que par les espèces réactives de l'oxygène (EROs) produits par le métabolisme respiratoire. Pour se protéger, ces micro-organismes ont développé un système spécifique de détoxification des EROs incluant les SuperOxyde Dismutases (SOD). Dans notre étude, la carence en MnSOD d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* (EG110) dépourvue du gène *Scsod2* a été complétée par l'introduction d'un plasmide portant une version inductible du gène *Sod2* de *P. carinii* (*Pcsod2*). Une fois exprimée la PcMnSOD était capable de compléter le défaut de croissance de la souche EG110 qui a été exposée à la ménadione. En bref, notre étude a montré une bonne complémentation du gène *Sod2* de *P. carinii* chez une levure déficiente en MnSOD à savoir (i) la reprise de la culture en conditions de stress oxydant, (ii) la mise en évidence de la protéine traduite (Western Blot) et (iii) l'adressage mitochondrial de la protéine hétérologue.

Selon le degré d'altération du système immunitaire, les infections à *P. jirovecii* peuvent présenter des tableaux cliniques variés allant de la colonisation à la pneumocytose. Ces infections semblent être en grande partie liées à des déficits majeurs de l'immunité cellulaire se traduisant plus précisément par une diminution du nombre des lymphocytes TCD4 (LTCD4). Notre deuxième objectif était de parvenir à une appréciation quantitative du risque de contamination par *P. carinii* en fonction du degré d'immunodépression (ID) des rats exposés. Nous avons ainsi développé un modèle animal de transmission naturelle de *P. carinii* où des rats *nude* développant une pneumocytose (« rats donneurs ») sont mis en contact direct avec des rats Sprague Dawley *Pneumocystis*-free (« rats receveurs ») présentant différents niveaux d'ID (dexaméthasone). Après 2 semaines de contact, le niveau de colonisation par *Pneumocystis* des rats graduellement ID est déterminé soit par comptage après coloration au Bleu de Toluidine O, soit par qPCR. Cette étude a permis tout d'abord de valider notre modèle d'ID graduelle chez le rat ; mais surtout, et pour la première fois dans un modèle expérimental chez le rat, nous avons montré une relation inverse entre le niveau de colonisation par *P. carinii* et le taux de LTCD4 ou LTCD8 circulants.

Enfin, nous avons réalisé la première étude épidémiologique portant sur *Pneumocystis* au nord du Liban. Ce projet franco-libanais a été mis en place au vu de l'importance majeure de la colonisation par *Pneumocystis* chez les patients immunocompétents, en particulier chez les patients atteints de pathologies pulmonaires chroniques obstructives tels que la BPCO où la colonisation par *Pneumocystis* est considérée comme un facteur aggravant la maladie. Nos résultats montrent une faible prévalence de colonisation (5,2%) et une prédominance du génotype *mtLSU2* chez les patients atteints de pathologies respiratoires au nord du Liban. De plus, dans notre cohorte de patients présentant des pathologies respiratoires variées, la BPCO semble être la seule maladie respiratoire associée à un facteur de risque de colonisation par *P. jirovecii*.

TABLE DES MATIERES

GENERALITES	1
1. HISTORIQUE	1
2. TAXONOMIE.....	2
3. MORPHOLOGIE ET CYCLE BIOLOGIQUE DE <i>PNEUMOCYSTIS</i>	4
3.1. Morphologie	4
3.1.1. Méthodes d'observation des stades parasitaires de <i>Pneumocystis</i>	5
3.2. Cycle biologique.....	6
3.2.1. Ploidie.....	10
3.3. Interactions hôte/parasite.....	11
3.3.1. Adhésion de <i>Pneumocystis</i> aux cellules alvéolaires.....	11
3.3.2. Interactions avec la matrice extracellulaire	12
3.3.3. Interaction avec le surfactant.....	14
4. LA PNEUMOCYSTOSE.....	16
4.1. Facteurs de risque.....	16
4.1.1. Le risque lié à l'infection par le VIH.....	17
4.1.2. Les risques liés à d'autres causes d'immunodépression.....	17
4.2. Prévalence et incidence de la Pneumocystose.....	19
4.2.1. Population VIH.....	19
4.2.2. Population non VIH.....	20
4.3. Influence des variations saisonnières	21
4.4. Présentations cliniques	22
4.4.1. Pneumocystose	22
4.5. Diagnostic de la pneumonie à <i>Pneumocystis</i>	24
4.5.1. Prélèvements	24
4.5.2. Mise en évidence	25
4.6. Traitement	25
5. IMPLICATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE.....	27
5.1. Immunité innée.....	28

5.2. Immunité adaptative	31
5.3. La réponse cytokinique	32
6. TRANSMISSION	33
6.1. Prévalence de la colonisation asymptomatique et impact clinique	34
6.2. Réactivation ou contamination <i>de novo</i>	35
6.3. Transmission horizontale et verticale	35
6.4. Source environnementale et forme infectante	37
6.5 Variations génétiques des isolats de <i>Pneumocystis</i> et conséquences sur la transmission	38
7. MODELES D'ETUDE.....	40
7.1. Modèles animaux	40
7.2. Modèles de culture <i>in vitro</i>	42
7.2.1. Les co-cultures	42
7.2.2. Les cultures axéniques.....	43
INTRODUCTION DU SUJET	44
MATERIELS ET METHODES	48
Chapitre 1 : Mise au point d'un système d'expression hétérologue en levure permettant l'étude fonctionnelle de gènes de <i>Pneumocystis carinii</i>	48
1. Provenance des souches fongiques.....	48
1.1. Source de <i>Pneumocystis carinii</i>	48
1.2. Souches de levures et conditions de culture	49
2. Extraction des acides nucléiques et amplification des gènes codant pour la MnSOD	50
2.1. <i>Pneumocystis carinii</i>	50
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
3. Clonage et contrôle des clones bactériens	51
4. Transformation de la levure <i>S. cerevisiae</i> déficiente en MnSOD avec les vecteurs plasmidiques d'expression portant les gènes <i>Pcsod2</i> et <i>Scsod2</i>	53
5. Détection de la protéine recombinante MnSOD par Western Blot.	53
6. Séquençage N-terminal de la protéine recombinante MnSOD de <i>P. carinii</i>	55
7. Immunolocalisation des protéines recombinantes exprimées chez la levure	55
8. Etude fonctionnelle : tests de sensibilité à la ménadione	56

9. Analyse statistique.....	57
Chapitre 2 : Etude de la colonisation par <i>Pneumocystis</i> en fonction du statut immunitaire de l'hôte exposé	58
1. Mise en place d'un modèle expérimental d'immunodépression graduelle chez le rat	58
1.2. Détermination du nombre absolu de lymphocytes TCD4 et TCD8	59
1.2.1. Numération Formule Sanguine (NFS).....	59
1.2.2. Immunomarquage et analyse par cytométrie de flux.....	59
2. Etude de la colonisation par <i>Pneumocystis carinii</i> en fonction du degré d'immunodépression	60
2.1. Protocole de transmission naturelle de <i>P. carinii</i> par voie aérienne.....	60
2.2. Etude de la colonisation des rats Sprague-Dawley par <i>P. carinii</i>	61
2.2.1. Comptage microscopique des kystes après coloration au Bleu de Toluidine Ortho	61
2.2.2. Détection et quantification de <i>P. carinii</i> par qPCR au locus <i>dhfr</i> (Dihydrofolate réductase).	61
2.3. Détermination du taux d'anticorps anti- <i>Pneumocystis carinii</i>	63
4. Analyse statistique.....	63
Chapitre 3 : Evaluation du portage de <i>Pneumocystis jirovecii</i> chez les enfants et les adultes atteints de pathologies respiratoires dans plusieurs hôpitaux de Tripoli (Liban).....	65
1. Inclusion des patients	65
2. Collection des données cliniques et biologiques	65
3. Types de prélèvements réalisés chez les patients	65
4. Diagnostic moléculaire de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR nichée.....	66
4.1. Extraction d'ADN	66
4.2. Diagnostic par PCR nichée ciblant le gène <i>mtLSUrRNA</i>	66
4.3. Quantification de la charge fongique par PCR en temps réel.....	67
5. Génotypage.....	68
5.1. Choix des gènes cibles	68
5.2. Séquençage et analyse des génotypes.....	69
6. Analyses statistiques.....	70
RESULTATS.....	71
Chapitre 1 : Complémentation de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> déficiente en <i>sod2</i> avec le gène <i>sod2</i> de <i>Pneumocystis carinii</i>	71
1. Construction des vecteurs plasmidiques d'expression de MnSOD et transformation de <i>S. cerevisiae</i>	71

2. Expression de la protéine recombinante MnSOD	72
3. Séquençage N-terminal de la protéine recombinante	72
4. Localisation cellulaire de la protéine recombinante MnSOD de <i>P. carinii</i> chez la levure.....	72
5. Evaluation de la résistance au stress oxydant de la levure <i>S. cerevisiae</i> EG110 Δ <i>sod2</i> complétée avec le gène <i>sod2</i> de <i>P. carinii</i>	73
Chapitre 2 : Etude de la relation entre la colonisation par <i>Pneumocystis</i> et le degré d'immunodépression de l'hôte exposé.....	75
1. Détermination du nombre absolu de lymphocytes TCD4 et TCD8	75
2. Cinétique de l'évolution des taux de leucocytes, lymphocytes T totaux, lymphocytes TCD4 et TCD8 en fonction de la dose de dexaméthasone.....	76
3. Relation entre colonisation et degré d'immunodépression.....	76
3.1. Comptage microscopique des kystes de <i>Pneumocystis</i>	77
3.2. Détection et quantification de <i>P. carinii</i> par qPCR au locus <i>dhfr</i>	77
4. Détermination du taux d'anticorps anti- <i>Pneumocystis carinii</i>	77
Chapitre 3 : Evaluation du portage de <i>Pneumocystis jirovecii</i> chez les enfants et les adultes atteints de pathologies respiratoires à Tripoli (Liban)	79
1. Fréquence du portage par <i>P. jirovecii</i>	79
2. Identification de facteurs de risque de colonisation par <i>P. jirovecii</i>	80
3. Génotypage des prélèvements positifs en PCR nichée <i>mtLSUrARN</i>	81
DISCUSSION	82
Chapitre 1 : étude fonctionnelle de la MnSOD de <i>Pneumocystis carinii</i>	82
Chapitre 2 : colonisation par <i>Pneumocystis</i> en fonction du statut immunitaire de l'hôte	88
Chapitre 3 : Evaluation du portage de <i>Pneumocystis jirovecii</i> chez les enfants et les adultes atteints de pathologies respiratoires au Nord du Liban (Tripoli)	96
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVE	102
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	106
ANNEXES.....	137
ANNEXE 1.....	138
ARTICLES PUBLIÉS OU EN COURS DE PUBLICATION.....	139
CURRICULUM VITAE	140

ABREVIATIONS ET ANGLICISMES

ADN: Acide désoxyribonucléique

AdoMet:
S-adénosylmethionine

APC: Allophycocyanin

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

BCA: « *BiCinchonimic Acid protein* »

BLAST: « *Basic Local Alignment Search Tool* »

bp: « *base pair* »

BPCO: Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

BTO: Bleu d'ortho-toluidine

CAT: Catalase

cdc2: « *Cell Cycle Division 2* »

CPA: Cellules Présentatrices de l'Antigène

CYB: cytochrome b

DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole

DHFR: dihydrofolate reductase

DHPS: dihydropteroate synthase

DMEM: « *Dulbecco Modified Eagle's Medium* »

DMSO: diméthylsulfoxyde

dNTP: désoxyribonucléotides

EDTA: Ethylène Diamine Tétracétate

EF: « *Elongation Factor* »

EI: Expectoration Induite

ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène

EST: « *Expressed Sequence Tag* »

FITC: « *Fluorescein IsoThioCyanate* »

Fn: fibronectine

FSC: « *Forward Scatter Channel* »

GAL: Galactose

GPx: glutathion peroxydase

HAART: thérapie antirétrovirale hautement active

HSP: « *Heat Shock Protein* »

ID: ImmunoDépression

IFI: ImmunoFluorescence Indirecte

IFN- γ : Interféron Gamma

Ig: Immunoglobuline

IL: InterLeukine

IMS: « *mitochondrial InterMembrane Space* »

ITS: « *Internal Transcribed Spacer* »

KO: « *Knock Out* »

LAL: Leucémie Aigue Lymphoblastique

LB: « *Lysogeny Broth* »

LBA: Lavage Broncho-Alvéolaire

LR: « *Lower Right* »

LROP: Liquide de rinçage oro-pharyngé

LT: Lymphocyte T

MA: Macrophages Alvéolaires

MAPK: « *Mitogen Activated Protein kinase* »

MCP: « *Monocyte Chemoattractant Protein* »

MGB: « *Minor Groove Binder* »

MIP: « *Macrophage Inflammatory Protein* »

MMR: « *Macrophage Mannose Receptor* »

Msg: « *Major Surface Glycoprotein* »

mtLSU ARNr: ARN ribosomal de la grande sous-unité mitochondriale

NCBI: « *National Center for Biotechnology Information* »

NFS: Numération Formule Sanguine

Nu: nude

PBS: « *Phosphate Buffer Saline* »

PCM: « *Pneumocystis carinii Map kinase* »

PE: Phycoerythrine

PEG: Polyéthylène Glycol

PPc: Pneumonie à *Pneumocystis*

PRR: « *Pattern-Recognition Receptors* »

RGD: Arginine-Glycine-Asparagine

RT-PCR: « *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* »

SCID: « *Severe Combined Immunodeficiency* »

SC-U: milieu synthétique complet sans uracile

SD: Sprague- Dawley

SDS: « *Sodium dodecyl sulfate* »

SIDA: Syndrome d'Immuno Déficience Acquise

SIV: Virus de l'Immunodéficience Simienne

SMX: sulfaméthoxazole

SOC: « *Super Optimal broth with Catabolite repression* »

SOD: Super Oxyde Dismutase

SOPF: « *Specific and Opportunistic Pathogen Free* »

SP: « *Surfactant Protein* »

SRA: « *Scavenger Receptor A* »

SSC: « *Side Scatter Channel* »

SVF: Sérum de Veau Fœtal

TLR: « *Toll-like Receptor* »

Tm: « *melting Temperature* »

TMP: triméthoprim

TNF: « *Tumor Necrosis Factor* »

TS: Thymidylate Synthase

UR: « *Upper Right* »

VIH: Virus d'Immunodéficience Humaine

Vn: vitronectine

YPD: « *Yeast, Peptone Dextrose* »

GENERALITES

GENERALITES

1. HISTORIQUE

L'histoire de *Pneumocystis* débute en 1909 au Brésil grâce à Carlos Chagas (1879-1934). Son travail est unique dans l'histoire de la médecine: il fut en effet le seul chercheur à décrire complètement une nouvelle maladie infectieuse (Trypanosomose Humaine Américaine ou maladie de Chagas) en allant du vecteur (Triatominae) jusqu'à l'épidémiologie, en passant par l'agent pathogène, l'hôte et les manifestations cliniques. A cette époque, Chagas découvrit pour la première fois des formes kystiques de *Pneumocystis* dans des poumons de cobayes infectés avec du sang de patients atteints de trypanosomose. A tort, il identifia ces formes comme un nouveau stade "schizogonique" de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Il retrouva ces formes lors de l'autopsie du premier cas de trypanosomose humaine (Chagas, 1911 ; Delaporte, 1999). En 1910, Antonio Carini décrivit ces mêmes kystes dans des poumons de rats infectés par *Trypanosoma lewisi* (Carini, 1910).

En 1912, les époux Delanoë observèrent ces mêmes formes kystiques chez des rats d'égouts non infectés par *Trypanosoma* sp., concluant ainsi que les formes décrites par Chagas et Carini étaient en fait une nouvelle entité (Delanoë et Delanoë, 1912 ; Hughes, 1987 ; Calderon-Sandubete *et al.*, 2002). Ils lui donnèrent le nom de *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*): « Pneumo- » pour son tropisme pulmonaire, « -cystis » pour sa forme caractéristique et « carinii » en hommage à Antonio Carini (Delanoë and Delanoë, 1912).

En 1938, Ammich et Benecke identifièrent une pneumonie d'étiologie inconnue, affectant principalement les nourrissons prématurés ou dénutris, qu'ils définirent comme une pneumonie interstitielle plasmocytaire (Ammich, 1938). Cette pneumonie prit une proportion épidémique en Europe Centrale durant la 2^{ème} Guerre Mondiale et pendant les années qui suivirent. Ce n'est qu'en 1942 que, pour la première fois, la relation fut faite entre *Pneumocystis* et cette pneumonie interstitielle plasmocytaire, mais avec peu d'écho (Van der Meer et Brug, 1942). Dix ans après van der Meer et Brug, trois chercheurs tchèques, Vanek, Jirovec et Lukes identifièrent à nouveau *Pneumocystis* comme l'agent responsable de ces pneumonies plasmocytaires (Vanek *et al.*, 1953) et le mérite de cette découverte leur est aujourd'hui souvent mais incorrectement attribué. Les premières images ultrastructurales de

P. carinii apparurent à partir de 1954 (Dieckmann *et al.*, 1954). En 1955, Weller rapporta qu'une pneumonie à *P. carinii* pouvait être obtenue chez des rats traités par des corticoïdes (Weller, 1955). Jusque-là aucun traitement n'était disponible, mais en 1958, Ivady et Paldy découvrirent l'effet de la pentamidine sur *Pneumocystis*, ce qui permit de diminuer fortement la mortalité due à cette pneumonie infantile épidémique (Ivady et Paldy, 1958).

Dans les années 1960-70, de nouveaux cas apparurent chez des adultes et des enfants immunodéprimés, la pneumocystose restant néanmoins considérée comme une maladie rare (Walzer *et al.*, 1974).

A partir des années 1980, avec l'apparition de la pandémie du VIH/SIDA, la prévalence de la pneumocystose augmenta considérablement. *Pneumocystis* fut alors reconnu comme un problème de santé publique majeur (Calderon-Sandubete *et al.*, 2002). Dans les années 1990, la généralisation de la prophylaxie et la mise en place de thérapies antivirales multiples chez les patients atteints du VIH permirent de réduire la fréquence de la pneumocystose. De nos jours, elle demeure l'infection indicatrice de SIDA la plus fréquente et une cause de pneumonie sévère chez les patients VIH positifs, notamment dans les pays en développement où sa prévalence reste élevée. Surtout, elle prend une importance croissante chez des patients immunodéprimés VIH négatifs atteints d'hémopathie maligne ou de cancer, soumis à des greffes de moelle osseuse ou à des transplantations d'organes solides ou souffrant de maladies autoimmunes (Yale et Limper, 1996 ; Dungarwalla *et al.*, 2007 ; Harigai *et al.*, 2007 ; Kalyoncu *et al.*, 2007 ; Kaur et Mahl, 2007 ; Kolstad *et al.*, 2007, Lahiff *et al.*, 2007).

2. TAXONOMIE

Pendant longtemps, la classification taxonomique de *Pneumocystis* fut soumise à controverse. Sur la base de critères morphologiques et par rapport à sa sensibilité à certaines drogues comme la pentamidine, *Pneumocystis* fut initialement considéré comme un protozoaire. Depuis une vingtaine d'années, les données moléculaires se sont accumulées, permettant d'inclure le genre *Pneumocystis* dans le groupe des 'Fungi' (Dei-Cas *et al.*, 2006). Tout d'abord, l'ARN ribosomal 16S de *Pneumocystis* présente de fortes affinités avec celui des Ascomycota (Edman *et al.*, 1988 ; Stringer *et al.*, 1989). De la même manière le gène *mtLSUrRNA*, codant pour l'ARN ribosomal de la grande sous-unité mitochondriale (Sinclair

et al., 1991) et d'autres séquences géniques mitochondriales (Pixley *et al.*, 1991) montrent des homologies significatives avec les séquences d'ADN fongique. Les gènes de *Pneumocystis* codant pour la bêta-tubuline, le facteur de transcription IID et l'ATPase translocatrice de cations de type-P (Meade et Stringer, 1991) sont également très proches de leurs homologues fongiques. Second élément, les gènes de deux enzymes clés, la thymidylate synthase (TS) et la dihydrofolate réductase (DHFR), se trouvent chez *Pneumocystis* sur des chromosomes différents (Edman *et al.*, 1989 ; Lundgren *et al.*, 1990). A la différence des protistes chez qui ces deux activités enzymatiques sont portées par une seule protéine bifonctionnelle, chez *Pneumocystis* comme dans les organismes non protistes, ces activités résident dans deux chaînes polypeptidiques distinctes (Edman *et al.*, 1989). Troisième point, la synthèse protéique implique les facteurs d'élongation 1 et 2 (EF-1 et EF-2) chez les eucaryotes non fongiques. Chez plusieurs champignons s'ajoute un troisième facteur d'élongation (EF-3). Or un gène codant pour une protéine ayant des similarités structurales importantes avec l'EF-3 de *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* a été détecté chez *Pneumocystis* (Ypma-Wong *et al.*, 1992). Enfin, dans le cadre du « *Pneumocystis* Genome Project », il est apparu que la plupart des transcrits présentent une homologie avec des gènes fongiques, en particulier avec les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* ainsi qu'avec les champignons filamenteux *Aspergillus* spp et *Neurospora crassa* (Cushion et Smulian, 2006).

Pneumocystis apparaît finalement comme un microchampignon atypique qui, bien qu'appartenant au phylum des Ascomycètes, présente plusieurs particularités : (i) il n'est pas cultivable dans les milieux fongiques habituels, (ii) sa membrane plasmique ne comporte pas d'ergostérol, (iii) il n'est pas sensible aux antifongiques, à l'exception des échinocandines (Schmatz *et al.*, 1991) et des sordarines (Avilés *et al.*, 2000) mais répond aux antiparasitaires comme la pentamidine et à des antifoliques-antifoliniques (Hughes, 1991 ; Hughes, 1996 ; Lu et Lee, 2008 ; Catherinot *et al.*, 2010 ; Calderon *et al.*, 2010a).

Entre 1909 et 1994, "*Pneumocystis carinii*" était considéré comme une seule entité, la seule espèce parasitant tous les mammifères. En 1976, sur la base de différences observées entre les *Pneumocystis* de l'homme et du rat, Frenkel proposa d'élever au rang d'espèce la forme parasitaire humaine et de l'appeler *Pneumocystis jiroveci* (Frenkel, 1976), proposition qui demeura sans écho. Par la suite, les techniques moléculaires ont révélé dans le genre *Pneumocystis* une diversité génomique intense, stable et corrélée avec l'espèce hôte, ce qui suggérait une spécificité parasitaire étroite (Dei-Cas *et al.*, 1998). En parallèle, des expériences d'infections croisées ont confirmé l'existence d'une forte spécificité d'hôte dans

les sous-populations de *Pneumocystis* adaptées à chaque mammifère (Gigliotti *et al.*, 1993 ; Aliouat *et al.*, 1993 ; Aliouat *et al.*, 1994 ; Dei-Cas *et al.*, 1998 ; Durand-Joly *et al.*, 2002). Ainsi, les variants de ce parasite, spécifiques à chaque espèce de mammifère, furent considérés comme des *formae speciales* (f.sp.) et nommés selon une nomenclature trinominale référée à l'espèce de l'hôte. Ainsi, la *forma specialis* du lapin est nommée '*Pneumocystis carinii* f.sp. *oryctolagi*'. En 2001, lors de l'International Workshop on Opportunistic Protists (IWOP 7, Cincinnati, Etats-Unis), il fut établi que les organismes du genre *Pneumocystis* reconnus comme des *formae speciales* devaient être décrites comme des espèces à part entière. Une nomenclature binominale fut alors adoptée pour les *formae speciales* les mieux caractérisées sur le plan génomique et phénotypique (Stringer *et al.*, 2001). A l'heure actuelle, cinq espèces ont été décrites dans le genre *Pneumocystis* selon le code international de nomenclature botanique (ICBN): *P. jirovecii* (Frenkel, 1999) chez l'homme; *P. carinii* (Frenkel, 1999) et *P. wakefieldiae* (Cushion, 2004) chez le rat, *P. murina* (Keely *et al.*, 2004) chez la souris et *P. oryctolagi* (Dei-Cas *et al.*, 2006) chez le lapin. Les autres espèces du genre *Pneumocystis* encore non décrites formellement gardent la nomenclature trinominale (*formae speciales*) qui comprend le nom de l'espèce des hôtes.

3. MORPHOLOGIE ET CYCLE BIOLOGIQUE DE PNEUMOCYSTIS

Des aspects fondamentaux de la biologie des *Pneumocystis* sp. restent à élucider et aucun système de culture continue n'existe à ce jour.

3.1. Morphologie

De nombreuses études ultrastructurales ont été menées sur des poumons humains (Barton et Campbell, 1967 ; Hasleton *et al.*, 1981) ou d'animaux (Yoshida, 1989 ; Palluault *et al.*, 1991 ; Palluault *et al.*, 1991a) infectés par *Pneumocystis* sp. Les données obtenues en microscopie électronique à transmission, par des techniques de cytochimie ultrastructurale ou par des méthodes de reconstruction tri-dimensionnelle (Palluault *et al.*, 1991 ; Palluault *et al.*, 1991a ; Palluault *et al.*, 1992 ; Palluault *et al.*, 1992a) ont permis de caractériser trois stades parasitaires : les formes trophiques, les sporocytes et les kystes matures (**Figure 1**).

La forme trophique (dénommée auparavant "trophozoïte"), uninucléée, est la plus abondante puisqu'elle représente 90 à 95% des formes parasitaires présentes dans les poumons des hôtes infectés. Cette forme végétative, qui mesure 2 à 8 µm de diamètre, présente un aspect irrégulier, améboïde. Elle possède une paroi cellulaire fine, avec une couche dense aux électrons, et a la particularité de présenter à sa surface de nombreuses

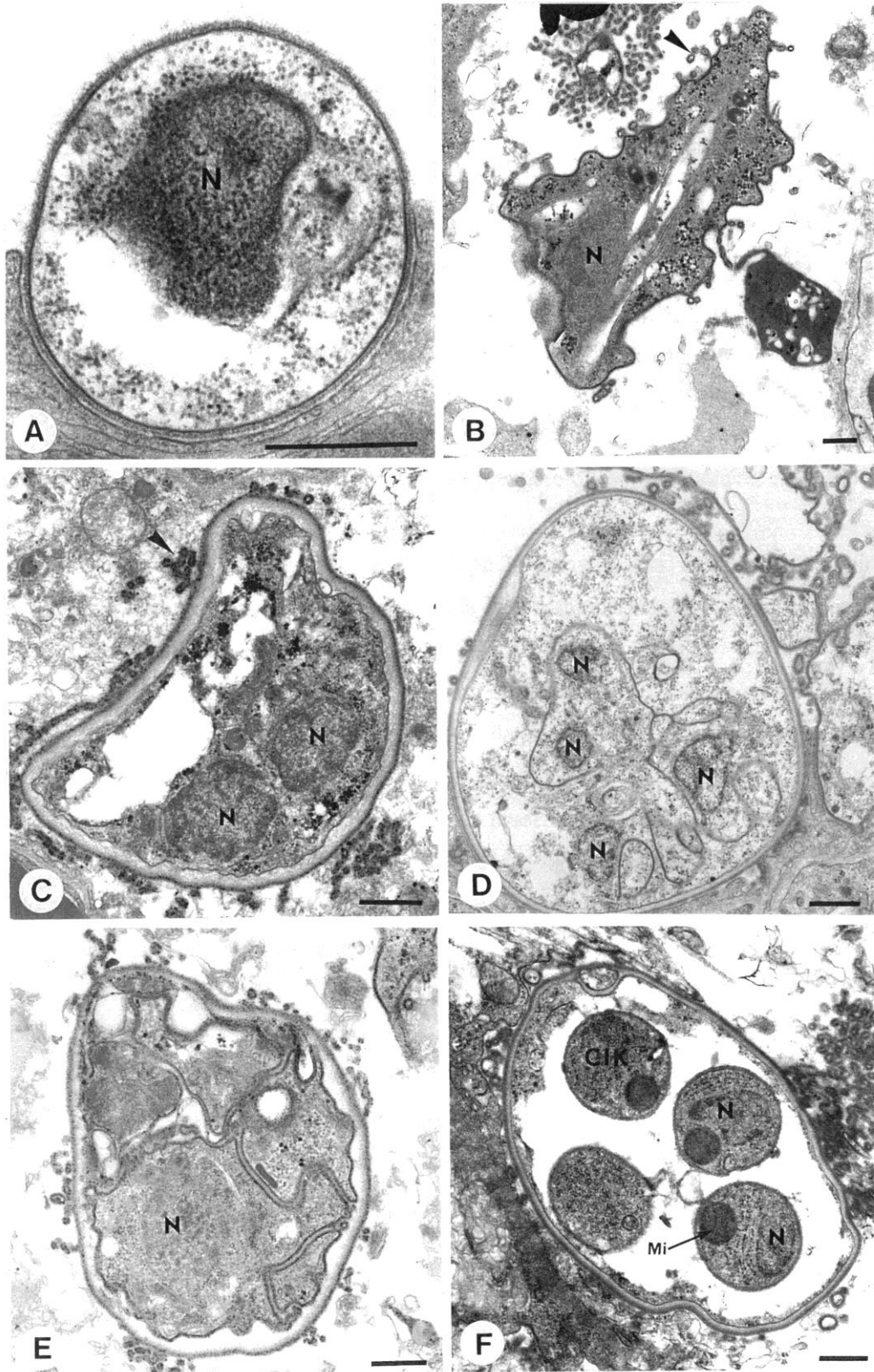


Figure 1. Différents stades de *Pneumocystis* sp. en microscopie électronique à transmission. A: jeune forme trophique attachée à un pneumocyte de type I. **B:** forme trophique dans la lumière alvéolaire. **C:** sporocyte intermédiaire. La paroi cellulaire caractéristique et deux noyaux sont bien visibles. **D:** sporocyte intermédiaire dans lequel l'individualisation des spores est plus avancée. **E:** kyste mature contenant des spores amoéboides. **F:** kyste mature dont la section montre 4 spores sphériques. CIK: spore ; Mi: mitochondrie ; N: noyau. La pointe de flèche signale des filopodes. Barre = 0,5 μ m ; (Dei-Cas *et al.*, 2004).

extensions cytoplasmiques appelées *filopodia* ou filopodes. Ces prolongements tubulaires auraient pour rôle de : (i) faciliter l'attachement spécifique aux pneumocytes de type I (Dei-Cas *et al.*, 1991), (ii) augmenter la surface de contact du parasite avec l'épithélium respiratoire et ainsi accroître les échanges nutritifs et gazeux avec les cellules hôtes (Itatani et Marshall, 1988 ; Nielsen et Settnes, 1991), (iii) agir comme récepteurs chimio-sensitifs (Itatani et Marshall, 1988) (Figure 2).

Le sporocyte mesure 3 à 5 μm de diamètre. De forme ovoïde, il se caractérise par une diminution du nombre de filopodes. Selon l'évolution de ce stade, on distingue :

- le sporocyte précoce, uninucléé, qui possède une paroi cellulaire semblable à celle de la forme trophique. Des complexes synaptonémaux y ont été observés (Matsumoto et Yoshida 1984, Peters, 2001) : ils correspondent à l'appariement des chromosomes homologues en prophase I de méiose.
- le sporocyte intermédiaire qui comporte 2 à 8 noyaux. Une couche intermédiaire peu dense aux électrons vient s'intercaler entre la membrane plasmique et la couche externe dense aux électrons.
- le sporocyte tardif qui présente une paroi cellulaire encore plus épaisse. Huit spores uninucléées vont progressivement s'y individualiser, par invagination de la membrane plasmique.

Le kyste mature mesure 4 à 7 μm . De forme arrondie, il possède une paroi cellulaire semblable à celle des sporocytes intermédiaires et tardifs et contient les huit spores bien individualisées. Une deuxième membrane à double feuillet lipidique a été décrite dans la paroi de ces spores (Vavra et Kucera, 1970): similaire à la membrane plasmique, elle couvre la face externe de la paroi cellulaire des spores. Cette membrane externe (ou « *outermembrane* ») est également retrouvée dans l'épaisseur de la couche externe dense aux électrons de la paroi kystique, affleurant la couche intermédiaire peu dense (DeStefano *et al.*, 1990). Cette membrane externe pourrait jouer un rôle dans les mécanismes d'osmorégulation et dans l'incorporation d'éléments nutritifs. Elle pourrait également participer aux interactions cellule hôte/parasite et être une cible pour des agents antimicrobiens (DeStefano *et al.*, 1990) (Tableau 1).

3.1.1. Méthodes d'observation des stades parasitaires de *Pneumocystis*

Les différents stades parasitaires de *Pneumocystis* peuvent être identifiés après coloration panoptique au méthanol-Giemsa (Bommer, 1966). Cette coloration, couramment

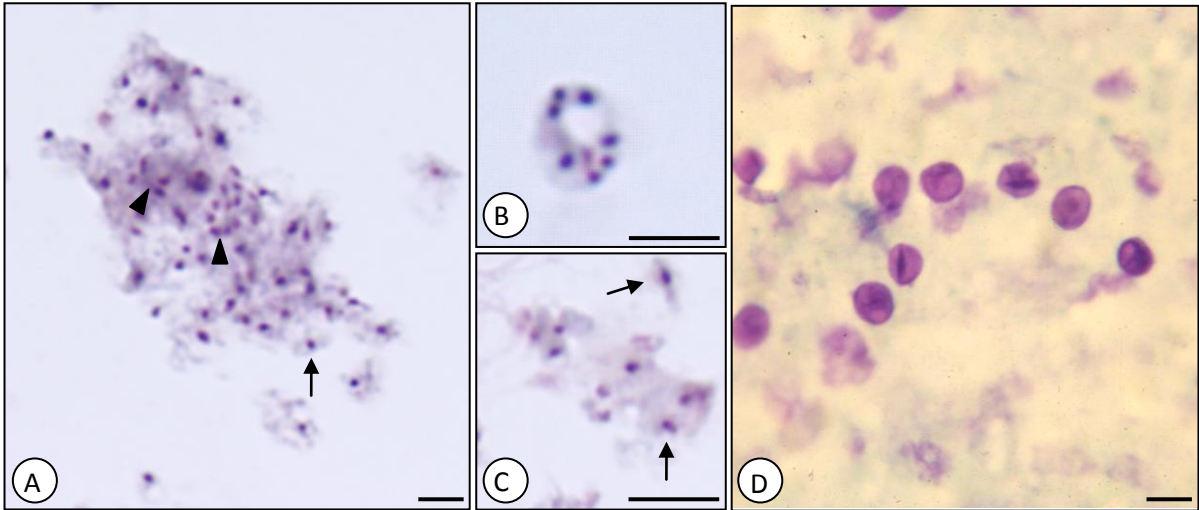


Figure 2. Morphologie de *P. carinii* en microscopie photonique. A-C : parasites extraits, purifiés par gradient de polymères de sucrose et colorés au RAL 555. Les parasites forment souvent des nuages composés de formes trophiques (flèches) et de rares formes kystiques (têtes de flèche) (A) ; Agrandissements d'un sporocyte tardif à 7 noyaux (B) et des formes trophiques amoeböides (C). D = coloration en violet de la paroi des formes kystiques par le Bleu de Toluidine Ortho (BTO). Barre = 5µm.

Tableau 1- Stades parasitaires de *Pneumocystis carinii* (d'après Aliouat-Denis *et al.*, 2009)

A. Microscopie optique

	<i>Forme trophique</i>	<i>Sporocyte précoce</i>	<i>Sporocyte intermédiaire</i>	<i>Sporocyte tardif</i>	<i>Kyste</i>
BTO	-	-	+	+	+
Giemsa	+	+	+	+	+

BTO = Bleu de Toluidine Ortho; - = non coloré; + = coloré.

B. Microscopie électronique à transmission

	<i>Forme trophique</i>	<i>Sporocyte précoce</i>	<i>Sporocyte intermédiaire</i>	<i>Sporocyte tardif</i>	<i>Kyste</i>	<i>Spore</i>
Forme	Irrégulière	Ovoïde	Ovoïde	Ovoïde	Ovoïde	Ovoïde, amoeboïde ou en forme de croissant
Diamètre (µm)	2 - 8	3.5 - 4.5	4 - 6	4 - 6	4 - 7	1 - 2
Nombre de noyaux	1	1	2 - 8	8	8 ⁽¹⁾	1
Ploïdie⁽²⁾	n	2n ⁽³⁾	n	n	n ⁽¹⁾	n
Complexe synaptonémal	Non	Oui	Non	Non	Non	Non
NAO⁽⁴⁾	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non
Fuseau nucléaire	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non
Mitochondrie⁽⁵⁾	Allongée, légèrement ramifiée	Ramifiée	Dendritique	Dispersée	Ovoïde, dense	Ovoïde, dense
Paroi (diamètre en nm)	Couche dense aux électrons (20-25 nm)	Couche dense aux électrons (35-45 nm)	Couche dense + couche interne peu dense aux électrons (80-100 nm)	Couche dense + couche interne peu dense aux électrons (80-120 nm)	Couche dense + couche interne peu dense aux électrons (80-120 nm)	Couche dense aux électrons (20-23 nm)
Filopodes	Nombreux	Peu développés	Rares	Rares	Rares	Aucun

(1) Un noyau dans chacune des 8 spores; (2) Ploïdie hypothétique au regard des travaux de Matsumoto & Yoshida (1984) et de nos observations; (3) Le sporocyte précoce diploïde résulterait probablement de la conjugaison de deux formes trophiques haploïdes; (4) « *Nuclear-associated organelles* », organites associés au noyau. (5) Terminologie employée dans les travaux de Palluault et al (1991 ; 1991a) après analyse des reconstructions 3D de la mitochondrie de *Pneumocystis* sp.

employée en recherche et pour le diagnostic de la pneumocystose, permet d'identifier les différents stades parasitaires de *Pneumocystis* et de les différencier d'autres microorganismes ou de débris cellulaires. Les noyaux des formes parasitaires sont colorés en pourpre et les cytoplasmes sont bleutés. La paroi des formes kystiques n'est en revanche pas colorée, elle apparaît comme un halo clair et réfringent. Les réactifs RAL-555 (Réactifs RAL) et Diff Quick (Andwin Scientific) commercialisés en kits permettent de réaliser rapidement (moins de 2 minutes) le même type de coloration panoptique, avec une qualité proche de celle du Giemsa (Soulez *et al.*, 1988 ; Soulez *et al.*, 1991 ; Tollerud *et al.*, 1989 ; Dei-Cas *et al.*, 2004).

Les formes parasitaires à paroi épaisse (sporocytes intermédiaires, tardifs et kystes) peuvent être mises en évidence par le Bleu de Toluidine Ortho (BTO) (Chalvardjian et Grawe, 1963). Ce colorant réagit avec les sucres complexes de la paroi cellulaire par métachromatie induite. Les parasites prennent alors une couleur bleue violacée et on peut observer une structure en forme de 'virgule' ou de 'parenthèse', indicatrice d'un épaissement localisé de la paroi kystique (Yoshikawa *et al.*, 1987). Il existe également des techniques d'imprégnation argentique comme le Gomori-Grocott qui donne une couleur brune aux parasites, grâce à l'affinité du nitrate d'argent pour la couche intermédiaire de la paroi cellulaire, peu dense aux électrons (Grocott, 1955).

On trouve également des anticorps monoclonaux qui, couplés à des fluorochromes ou à la peroxydase, permettent de détecter soit tous les stades parasitaires (Santa Cruz Biotechnology, Abcam), soit uniquement les formes kystiques (MONOFLUO KIT *P. jirovecii* (*P. carinii*), BioRad) (**Figure 3**).

3.2. Cycle biologique

Plusieurs hypothèses quant au cycle biologique de *Pneumocystis* ont été posées à partir d'observations en microscopie électronique, de reconstitutions 3D et plus récemment de données moléculaires. Différents auteurs ont proposés des cycles similaires, avec à la fois une phase de multiplication sexuée et une phase de multiplication asexuée (Yoshida, 1989 ; Cushion, 2004 ; Dei-Cas, 2004 ; De Souza et Benchimol, 2005, Thomas et Limper, 2007 ; Aliouat-Denis, 2008 ; Aliouat-Denis, 2009 ; Cushion et Stringer, 2010 ; Martinez *et al.*, 2011). Du fait de l'absence de culture continue, la transition dynamique entre ces stades

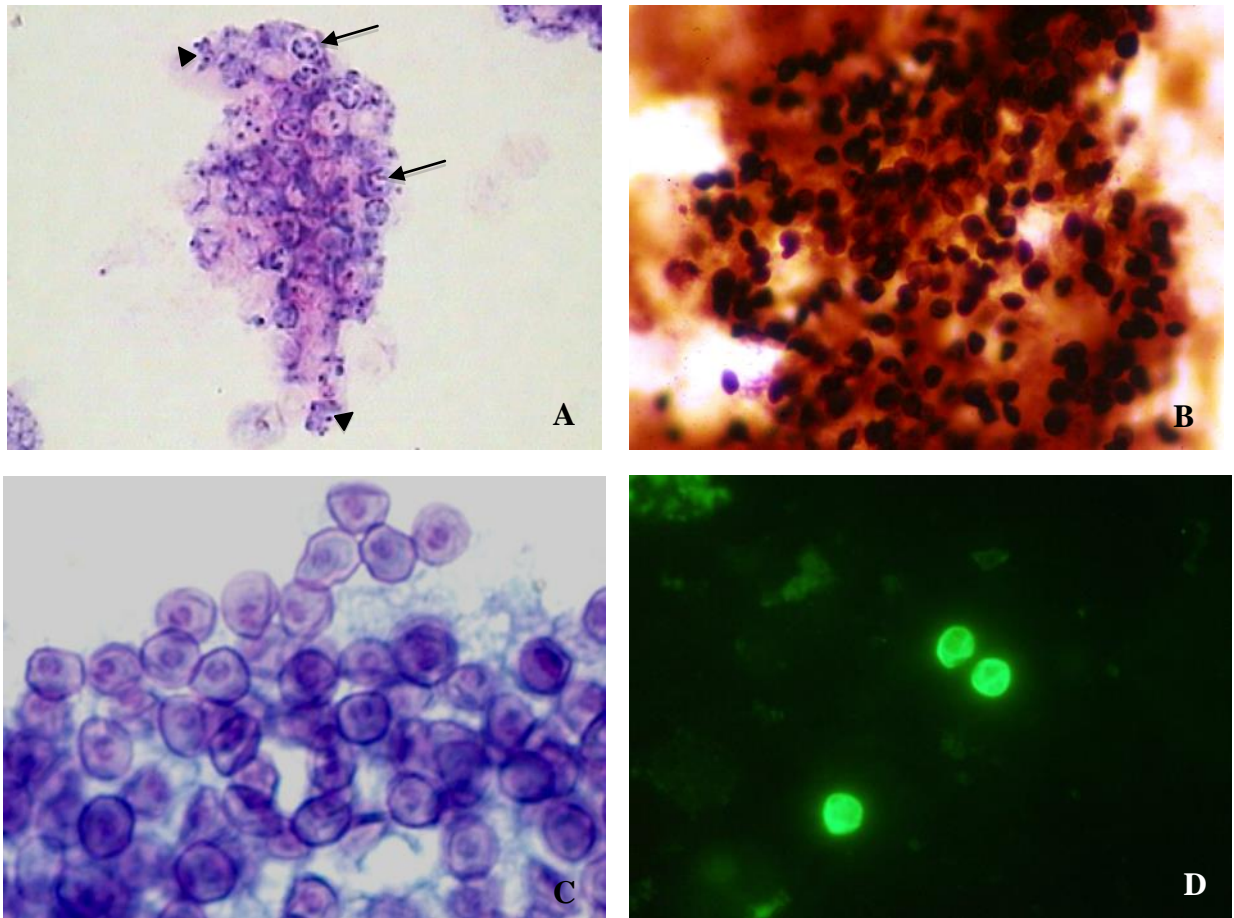


Figure 3. Observation de *Pneumocystis jirovecii* à partir de lavages broncho-alvéolaires. (A) Parasites colorés au Giemsa, formes trophiques (têtes de flèches) et formes kystiques (flèches) ; (B) formes kystiques révélées au Gomori Grocott ; (C) Formes kystiques colorées au BTO ; (D) Formes kystiques immunomarquées (MONOFLUO KIT *P. jirovecii* (*P. carinii*), BioRad)

parasitaires n'a cependant jamais été suivie, empêchant de tester clairement ces hypothèses (**Figure 4**).

Les études ultrastructurales menées sur des parasites d'hôtes d'espèces différentes ont permis de proposer plusieurs cycles biologiques (Campbell, 1972 ; Vossen *et al.*, 1978 ; Yoshida, 1989). A partir de ses observations chez le rat et des données antérieures d'autres auteurs, Yoshida proposa en 1989 un cycle biologique combinant : (i) une phase asexuée au cours de laquelle les formes trophiques, haploïdes ou diploïdes, se multiplieraient par fission binaire et/ou endodiogénie ; (ii) une phase sexuée durant laquelle les spores haploïdes seraient formées et évolueraient après exkystement en formes trophiques.

Quelques auteurs (Yamada *et al.*, 1986 ; Stringer et Cushion, 1998 ; Wyder *et al.*, 1998, Martinez *et al.*, 2011) se sont intéressés à déterminer la ploïdie de *Pneumocystis* et sont parvenus à la conclusion que l'haploïdie était majoritaire en particulier chez les formes trophiques. Le passage par un stade diploïde existe cependant comme l'attestent les images ultrastructurales d'un complexe synaptonémal au stade sporocyte précoce (Matsumoto et Yoshida, 1984) et les analyses caryotypiques par électrophorèse en champ pulsé à 2 dimensions suggèrent également cette diploïdie (Cornillot *et al.*, 2002). L'hypothèse, partagée par une majorité de scientifiques, serait donc qu'une méiose, suivie d'une mitose supplémentaire, aurait lieu chez les formes kystiques et que la fusion (ou *mating*) de deux formes trophiques serait un préalable à la reconstitution de la diploïdie (Cushion, 2004, Martinez *et al.*, 2011). D'ailleurs, l'existence d'une conjugaison entre formes trophiques avait déjà été suggérée sur la base d'images ultrastructurales (Itatani, 1996).

La formation des 8 spores haploïdes se ferait par invagination de la membrane plasmique prékystique autour de chacun des 8 noyaux. Leur mécanisme de libération n'est pas encore résolu. La paroi cellulaire kystique pourrait être fragilisée par l'augmentation du volume des spores. Après rupture de cette paroi, les spores seraient expulsées soit passivement (Vavra et Kucera, 1970 ; Vossen *et al.*, 1978 ; Hasleton *et al.*, 1981) soit activement *via* un pore (Itatani, 1994).

Le processus de fusion entre deux cellules de types sexuels opposés ou *mating* nécessite la sécrétion mutuelle de phéromones spécifiques. La fixation de ces phéromones sur un récepteur membranaire couplé à une protéine G active une cascade de transduction du signal, impliquant une MAP kinase (« *mitogen activated protein kinase* »). Cette MAPK active à son tour plusieurs effecteurs cellulaires avec, pour conséquence, un blocage du cycle cellulaire,

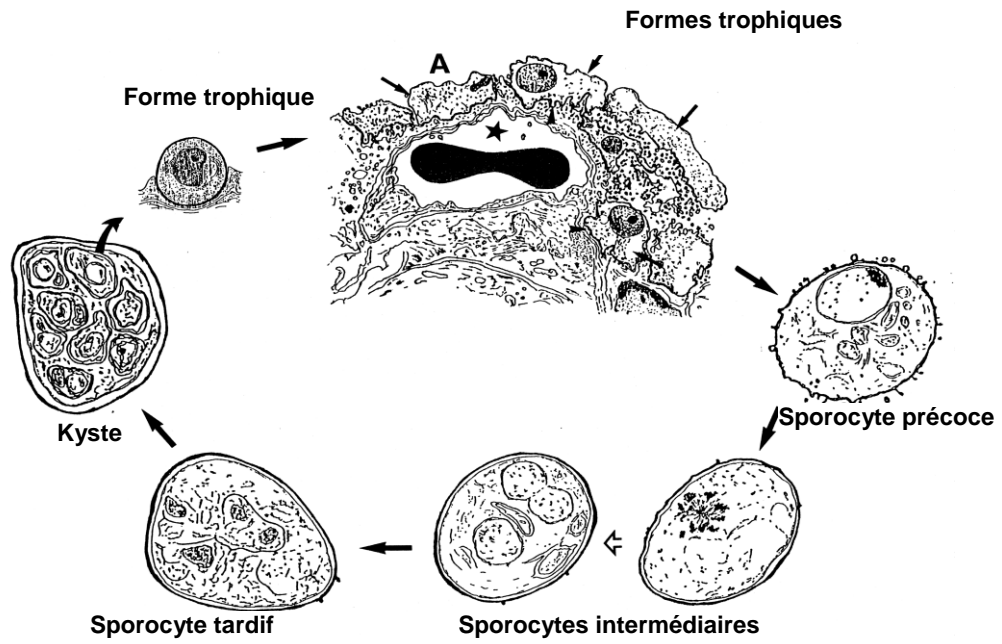


Figure 4. Cycle hypothétique de *Pneumocystis* sp. Les stades parasitaires ont été dessinés à partir de micrographies ultrastructurales. L'étoile indique la lumière d'un capillaire pulmonaire contenant une hématie ; A = lumière alvéolaire ; flèches : formes trophiques attachées aux pneumocytes de type 1.

l'initiation de la transcription des gènes impliqués dans le *mating* et, finalement, la fusion des cellules (Li *et al.*, 2007). Récemment, des homologues fongiques de gènes impliqués dans ces phénomènes furent retrouvés dans le génome de *Pneumocystis*, confortant l'hypothèse de l'existence d'une multiplication sexuée.

L'existence d'un cycle de reproduction sexuée a ainsi été renforcée par la découverte et l'expression hétérologue du gène *Pcste3* («*Pneumocystis carinii* STE3») codant pour un récepteur aux phéromones homologues du type 'a' (Smulian *et al.*, 2001 ; Vohra *et al.*, 2004). Ce récepteur transmembranaire n'est exprimé que par une sous-population de formes trophiques. Il semble absent à la surface des formes kystiques (Vohra *et al.*, 2004). Même si le ligand-phéromone du récepteur codé par *Pcste3* ainsi que le couple récepteur-phéromone opposé n'ont pas encore été identifiés, ces résultats laissent supposer qu'une conjugaison a lieu chez *Pneumocystis* au stade forme trophique. Au niveau chromosomique, le gène *Pcste3* se situe au milieu d'autres gènes, comme les homologues de *ste11* et *ste20*, codant pour des protéines impliquées dans la voie de transduction du signal initiée en réponse aux phéromones (Smulian *et al.*, 2001). *Pcste20* («*P. carinii* STE20») est exprimé suite à l'adhésion du parasite au niveau des cellules épithéliales alvéolaires (Kottom *et al.*, 2003). L'expression hétérologue de ce gène chez des mutants de *S. cerevisiae* $\Delta ste20$ a permis d'obtenir une croissance du champignon et de montrer son implication dans les voies de signalisation activées après le *mating* (Kottom *et al.*, 2003). D'autres homologues (*cdc31* de *S. pombe* par exemple) de gènes fongiques impliqués dans la méiose ont également été retrouvés dans une banque d'EST («*Expressed Sequence Tag*») de *Pneumocystis* (Cushion *et al.*, 2007).

Suite à ce *mating*, une cascade impliquant des MAP kinases est activée. Un gène codant pour une MAPK fut tout d'abord identifié chez *P. carinii* : cette kinase (PCM = «*Pneumocystis carinii* MAP kinase») est homologue à d'autres MAPK fongiques impliquées dans les phénomènes de prolifération et de différenciation (Thomas *et al.*, 1998). Par la suite, des expériences d'expression hétérologue de PCM ont montré qu'elle pouvait restaurer la voie de signalisation induite par les phéromones chez des doubles mutants de *Saccharomyces cerevisiae* *fus3/kss1* (Vohra *et al.*, 2003). Cette kinase, majoritairement présente chez les formes trophiques, peut phosphoryler l'homologue du gène *ste11* de *Schizosaccharomyces pombe* chez *Pneumocystis* (Vohra *et al.*, 2003a). *ste11* code en fait pour un facteur de transcription nécessaire à l'activation de gènes impliqués dans la conjugaison, suite à la fixation des phéromones. Après le *mating* des formes trophiques,

Ste11 activerait, indirectement Mei2, protéine qui joue un rôle dans l'induction et la progression de la méiose (Harigaya *et al.*, 2007).

PcMei2, l'homologue de Mei2 de *S. pombe*, a justement été identifié chez *Pneumocystis* grâce au « *Pneumocystis* genome project » (<http://pgp.cchmc.org/>), ainsi qu'une autre kinase, PcRan1, homologue de Ran1 chez *S. pombe* (Burgess *et al.*, 2008). Chez les levures, Mei2 et Ran1 sont impliquées dans le contrôle de la méiose : Mei2 se fixe sur l'ARN et active le mécanisme de méiose. Ce mécanisme est bloqué lorsque Ran1 phosphoryle Mei2 qui est alors inhibé. Chez *Pneumocystis*, après le *mating* des formes trophiques, Mei2 activerait la méiose au niveau des sporocytes. Il serait ensuite inhibé par Ran1 qui est fortement exprimé au niveau des spores des kystes matures, ce qui éviterait toute méiose supplémentaire (Burgess *et al.*, 2008). Il a été démontré que l'activité de Ran1 était inhibée au-dessus de 30°C : ainsi chez l'hôte, à 37°C, la méiose serait favorisée alors qu'*ex vivo*, le cycle serait bloqué en attendant des conditions de développement plus favorables (Burgess *et al.*, 2009) (**Tableau 2**).

Récemment le rôle respectif des formes trophiques et kystiques de *Pneumocystis carinii* a été étudié *in vivo* et *in vitro* grâce à la mise en place d'une méthode de tri cellulaire qui permet de séparer d'une manière reproductible les formes trophiques des formes kystiques avec un degré de pureté de $99.6 \pm 0,3\%$ (Martinez *et al.*, 2009).

La mise en culture des formes trophiques pures montre leur incapacité à produire des formes kystiques *in vitro* alors qu'elles sont capables de le faire chez l'animal inoculé. Ceci suggère fortement que l'échec des cultures est au moins en partie lié à l'absence de production des kystes et conforte l'hypothèse selon laquelle l'apparition des formes trophiques est dépendante de la formation des kystes de *P. carinii*. Toutefois, ces travaux n'excluent pas le fait que les formes trophiques pourraient également se multiplier de manière limitée (Martinez *et al.*, 2013).

Inversement, la mise en culture de la population kystique pure montre une chute rapide du nombre de formes kystiques simultanée à une forte augmentation des formes trophiques suggérant que l'apparition des formes trophiques est liée à un exkystement massif. Par la suite, les deux populations déclinent indiquant que les formes trophiques nouvellement formées ne parviennent pas à se multiplier puis à redonner des formes kystiques pour que le cycle se poursuive (Martinez *et al.*, 2013). A l'inverse, les formes kystiques pures inoculées chez le rat redonnent rapidement des formes trophiques et les deux populations coexistent et prolifèrent dans l'alvéole pulmonaire, contrairement à ce que l'on observe *in vitro*.

Tableau 2- Principaux gènes/protéines impliqués dans la fusion, la mitose et la méiose chez les microchampignons (d'après Chabe *et al.*, 2010)

Gène	Protéine	Homologue à ^(a)	Fonction
<i>ste2</i> ^(b)	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Récepteur à la phéromone de type alpha
<i>ste3</i>	Ste3p	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Récepteur à la phéromone de type a
<i>mapk</i>	Mapkp	<i>Fusarium solani</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> SpK1, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fus3	Kinase activée lors de la mitose (prolifération et différenciation fongiques)
<i>ste11/ste20</i> ^(c)	Ste11p/Ste20p	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Ste11p, <i>Cryptococcus neoformans</i> Ste20p	Ste11p et Ste20p sont impliqués dans la cascade de transduction du signal en réponse aux phéromones
<i>mei2</i>	Mei2p	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Induction et progression de la méiose
<i>ran1</i>	Ran1p	<i>Pneumocystis carinii</i>	Activité d'inhibition de la méiose température dépendante
<i>cdc2</i>	Cdc2p	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Sérine-thréonine kinase du cycle de division cellulaire (inducteur de méiose)
<i>cdc13</i>	Cdc13p	<i>Pneumocystis carinii</i>	Cdc13p se fixe à Cdc2p (nécessaire à l'activité kinase de Cdc2p)
<i>con7</i> ^(b)	-	<i>Magnaporthe grisea</i>	Impliquée dans la sporogénèse fongique
<i>cdc25</i>	Cdc25p	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Phosphatase induisant la mitose dans le cycle cellulaire
<i>cdc42</i>	Cdc42p	<i>Schizophyllum commune</i>	Interagit avec Ste20. Fonction régulatrice de GTPase

^(a)Seules les homologues fongiques les plus importantes ont été mentionnées.

^(b)Gènes dont la transcription a été montrée chez *P. carinii*.

^(c)Egalement homologue à Ste12p de *Saccharomyces cerevisiae*.

L'absence de transition des formes trophiques en formes kystiques *in vitro* semble être le point de blocage des cultures. (Martinez *et al.*, 2013).

3.2.1. Ploïdie

Des études électrophorétiques en champ pulsé montrèrent que l'haploïdie était majoritaire. Des sondes ADN spécifiques de gènes venant s'hybrider sur les chromosomes séparés par électrophorèse ont été utilisées: ces sondes se fixaient une seule fois, révélant le caractère haploïde du génome de *Pneumocystis* (Cushion *et al.*, 1997). La diploïdie n'était cependant pas exclue, du fait de l'existence possible d'un polymorphisme de longueur entre les chromosomes homologues. Ce polymorphisme existe en effet chez de nombreux champignons (Zolan, 1995). L'amélioration de la technique d'électrophorèse en champ pulsé a par la suite permis de mettre en évidence cette diploïdie pour quelques chromosomes de *Pneumocystis* (Cornillot *et al.*, 2002).

Une autre indication était la mesure du contenu en ADN par cellule. Cette méthode posait un double problème : (i) la contamination des suspensions parasitaires par des cellules pulmonaires de l'hôte ; (ii) la présence de formes trophiques et de formes kystiques qui n'avaient pas forcément la même ploïdie. A une approche globale, il fallait donc préférer l'utilisation d'intercalant de l'ADN dont l'intensité de la fluorescence émise était proportionnelle au contenu d'ADN de chaque cellule étudiée. Les premières études, utilisant le DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole), suggéraient que les formes trophiques étaient haploïdes. De plus, dans les kystes matures (huit spores haploïdes), on retrouvait bien huit fois la quantité d'ADN contenue dans une forme trophique (Yamada *et al.*, 1986). D'autres études confortent cette hypothèse et précisent que les formes trophiques, tout comme les spores, haploïdes contiennent respectivement 6,9 et 6,7 fg d'ADN par cellule (Wyder *et al.*, 1994 ; Wyder *et al.*, 1998).

En analysant le contenu en ADN (C) des formes trophiques et kystiques purs, Martinez *et al.* (2011) ont pu démontrer qu'une grande partie des formes trophiques sont majoritairement haploïdes (1n/1C) comme l'ont suggéré Wyder *et al.* (1998) et Cornillot *et al.* (2002). De plus, ce travail conforte l'hypothèse d'une méiose au sein du cycle de *Pneumocystis* via la fusion entre deux formes trophiques haploïdes (1n/1C) qui produirait un zygote diploïde (2n/2C). Enfin, l'analyse de la population kystique montre un pic à 8C d'ADN qui correspondrait aux kystes matures contenant 8 spores uninucléées haploïdes (1n/8C). Les résultats de Martinez *et al.* (2011) sur la ploïdie de *P. carinii* renforcent

globalement les hypothèses que Yoshida avait émises en 1989. Ils sont résumés sur la **Figure 5**.

3.3. Interactions hôte/parasite

Pneumocystis se retrouve en contact, direct ou indirect, avec tous les acteurs du microenvironnement alvéolaire dont les principaux sont: les pneumocytes de type I et II, les macrophages alvéolaires, les composants du surfactant et l'air alvéolaire. De multiples interactions vont s'établir avec ce parasite extracellulaire, qui lui seront favorables ou fatales.

3.3.1. Adhésion de *Pneumocystis* aux cellules alvéolaires

Les pneumocytes de type I ne représentent qu'un tiers des cellules de l'épithélium alvéolaire, mais recouvrent 95% de sa surface. Les formes trophiques de *Pneumocystis* s'attachent spécifiquement et intimement aux pneumocytes de type I. Cette adhésion semble être indispensable au développement du parasite (Aliouat *et al.*, 1993 ; Aliouat-Denis *et al.*, 2008). L'interaction se fait en deux temps : après une première étape de reconnaissance, *Pneumocystis* émet ensuite des prolongements filopodiaux qui s'ancrent dans le cytoplasme des cellules hôtes sans traverser leur membrane plasmique (Dei-Cas *et al.*, 1991 ; Dei-Cas, 2004) (**Figure 6**). Au niveau de la zone de contact, de nombreuses vésicules de pinocytose s'accumulent dans le cytoplasme des cellules hôtes (Nielsen *et al.*, 1991 ; Dei-Cas *et al.*, 1991). Des études ultrastructurales ont mis en évidence la présence de structures microtubulaires s'étendant jusqu'aux filopodes chez *Pneumocystis* (Itatani et Marshall, 1988). L'altération des structures cytosquelettiques du parasite (actine et microtubules), par exemple par la cytochalasine B ou par la colchicine, inhibe partiellement son adhésion aux cellules hôtes (Aliouat *et al.*, 1993). A l'inverse, une atteinte du cytosquelette de la cellule cible ne perturbe pas l'adhésion de *Pneumocystis* (Aliouat *et al.*, 1993 ; Limper *et al.*, 1997). L'attachement de *Pneumocystis* aux cellules épithéliales alvéolaires s'avère donc non seulement indispensable au développement du parasite, mais il requiert, en outre, l'intégrité structurale et fonctionnelle de son cytosquelette. Cet attachement n'entraîne pas d'altération directe dans le fonctionnement ou dans l'arrangement des cellules pulmonaires (Beck *et al.*, 1998). Les *Pneumocystis* pourraient s'agréger entre eux et former des biofilms (Cushion *et al.*, 2009).

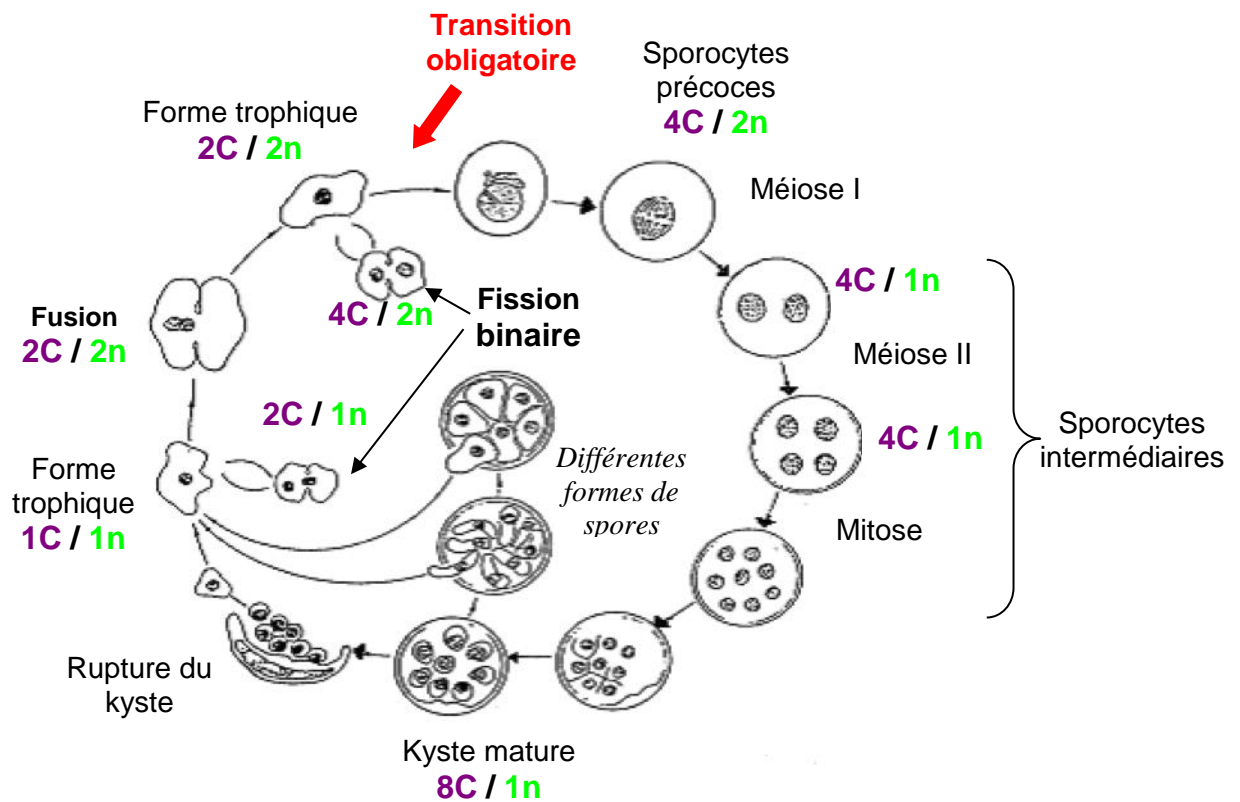


Figure 5. Cycle biologique des *Pneumocystis* sp. (modifié de Yoshida, 1989). Les formes trophiques haploïdes majoritaires (1C et 1n) semblent capables de générer d'autres formes trophiques haploïdes (1C et 1n) par fission binaire. Cette division nécessiterait une synthèse d'ADN préalable conduisant à un doublement transitoire du contenu en ADN de ces formes trophiques (2C et 1n) juste avant qu'elles ne subissent la cytodivision. La progression du cycle nécessite ensuite la fusion de deux formes trophiques pour générer un zygote diploïde (2C et 2n) puis un sporocyte précoce diploïde (4C et 2n) ayant doublé son contenu en ADN préalablement aux divisions méiotiques. Cette transition est cruciale et son absence expliquerait l'échec des cultures *in vitro*. A noter qu'une forme trophique 2C et 2n issue d'une fusion pourrait subir une fission binaire. Cela nécessiterait une synthèse d'ADN conduisant à des noyaux de formes trophiques contenant transitoirement 4C d'ADN (après la synthèse d'ADN et avant la cytodivision). Le sporocyte précoce formé (4C et 2n) donnera ensuite un sporocyte intermédiaire (4C et 1n) à l'issue des deux divisions méiotiques. Une mitose a ensuite lieu pour aboutir aux sporocytes tardifs puis aux kystes (8C et 1n) qui par exkystement redonneront des spores haploïdes (1C et 1n) qui elles-mêmes redonneront des formes trophiques haploïdes (1C et 1n).

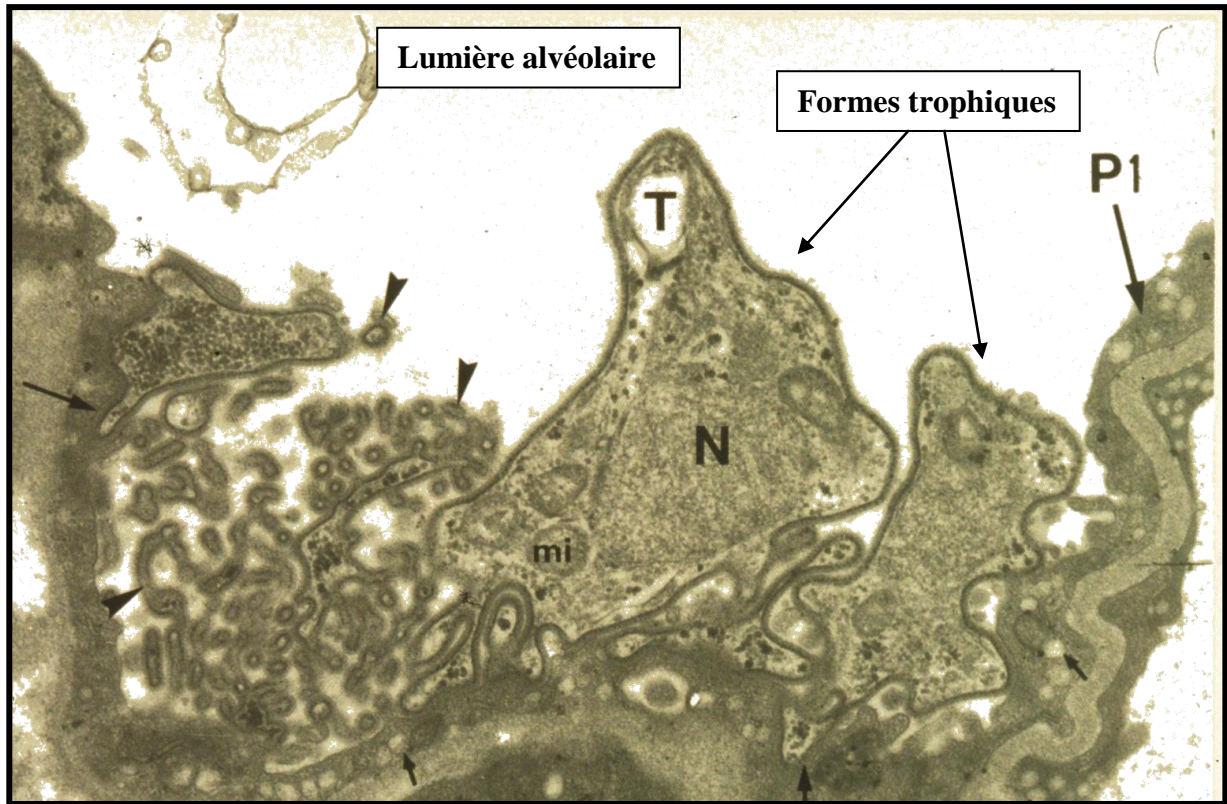


Figure 6. Attachement de *Pneumocystis murina* aux pneumocytes de type I. Présence de nombreux filopodes permettant un contact intime entre les parasites et les cellules hôtes. N = noyau ; mi = mitochondrie ; T = forme trophique; P1= pneumocyte de type 1 ; flèches = vésicules de pinocytose dans le cytoplasme des pneumocytes de 1; têtes de flèches = filopodes.

3.3.2. Interactions avec la matrice extracellulaire

L'attachement des formes trophiques à la matrice extracellulaire semble être associé à des interactions spécifiques de type ligand-récepteur. La protéine la plus abondante de la matrice extracellulaire est la fibronectine (Fn). Cette protéine est liée à la surface des cellules via un récepteur cellulaire transmembranaire. Ce récepteur, de la famille des intégrines, est un hétérodimère constitué d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Il comporte une partie C-terminale cytoplasmique, un domaine transmembranaire et une longue partie N-terminale extracellulaire. Le récepteur reconnaît un domaine majeur de la Fn, qui est la séquence conservée d'adhésion cellulaire Arg-Gly-Asp (RGD) (Albelda et Buck, 1990 ; Roman et McDonald, 1991). L'interaction de *Pneumocystis* avec la matrice de Fn a été très bien décrite. Ainsi, les parasites sont capables, via des récepteurs de surface, de reconnaître spécifiquement et avec une forte affinité, la séquence RGD de la Fn (Pottratz *et al.*, 1991 ; Aliouat *et al.*, 1993).

Il a été démontré que l'un des composés antigéniques majeurs présents à la surface de *Pneumocystis*, la MSG (« Major Surface Glycoprotein »), jouait un rôle important dans l'interaction hôte/parasite. D'une part, la MSG purifiée incubée avec les cellules, ou un anticorps anti-MSG incubé avec les parasites, inhibent l'adhésion de *P. carinii* aux cellules cibles (Pottratz *et al.*, 1991 ; Pottratz *et al.*, 1994). D'autre part, la MSG se lie de façon spécifique au peptide RGD de la Fn. Enfin, un anticorps polyclonal anti-sous-unité β 1 des intégrines reconnaît la MSG par Western-blot (Pottratz *et al.*, 1991). Cette glycoprotéine de surface parasitaire serait donc un récepteur de surface spécifique de la Fn, qui permettrait l'attachement de *P. carinii* aux pneumocytes de type I (Pottratz *et al.*, 1991 ; Limper, 1995).

Récemment, une nouvelle protéine de *Pneumocystis*, PcInt1p, a été identifiée via la banque de données du « *Pneumocystis* genome project », essentiellement au niveau des formes trophiques (Kottom *et al.*, 2008). Le gène *PcInt1* présente une homologie avec le gène *Int1* de *Candida albicans*. Ce gène code pour une *integrin-like* impliquée dans l'adhésion, la croissance et la virulence. PcInt1 comporte un motif RGD et 4 sites MIDAS (« Metal-Ion Dependant Attachment Sites ») qui sont des motifs impliqués dans la fixation de cations bivalents. L'expression hétérologue chez la levure suivie d'une mise en contact avec la Fn met en évidence une fixation, dépendante du calcium. PcInt1 aurait donc également un rôle dans l'interaction avec la matrice de Fn, et donc dans la virulence.

Pneumocystis influencerait directement et sélectivement l'expression des récepteurs membranaires à la fibronectine à surface de la cellule cible (Pottratz *et al.*, 1991, Pottratz *et al.*, 1994). L'attachement de *Pneumocystis* n'est donc pas un phénomène passif. Dans ce

sens, la viabilité du parasite et l'intégrité de la cellule hôte semblent être essentielles (Aliouat *et al.*, 1993).

Un autre composant de la matrice extracellulaire, la vitronectine (Vn), est également important dans l'attachement du parasite (Wisniewski et Martin, 1995 ; Limper, 1995). Cette glycoprotéine monomérique est parfois colocalisée avec la Fn (Yamada, 1991). Elle possède une séquence conservée d'adhésion cellulaire RGD ainsi qu'un domaine cryptique liant l'héparine en C-terminal. La Vn peut, dans certaines conditions, neutraliser l'activité anti-coagulante de l'héparine (Yamada, 1991). Wisniewski et Martin (1995) ont montré la fixation de la ¹²⁵I-Vn à la surface de *P. carinii*. Cette fixation n'est pas affectée par le peptide RGDS, mais inhibée par l'héparine. De plus la MSG ne reconnaît pas la Vn. Ainsi, la présence d'un récepteur spécifique de la région *heparine-binding* de la Vn, à la surface de *P. carinii* semble probable (Wisniewski et Martin, 1995 ; Limper, 1995).

Il a été observé que la Fn et la Vn entraînaient une augmentation de l'interaction entre *Pneumocystis* et les macrophages, qui constituent la première ligne du système de défense innée (Hoyte *et al.*, 1997). Ces glycoprotéines peuvent interagir avec les β -glucanes de la paroi du parasite, entraînant alors une augmentation de la réponse inflammatoire des macrophages. La synthèse d'IL-6 qui en résulte entraîne une augmentation de la synthèse de Fn et Vn (Vassallo *et al.*, 2001). Un autre type d'interaction existe au niveau des macrophages, via leurs MMRs (« *Macrophage Mannose Receptors* ») qui se fixent aux résidus mannose présents à la surface des parasites. La MSG, qui porte l'essentiel des résidus mannose (Cushion *et al.*, 1988 ; Linke *et al.*, 1989), réagit avec les MMR des macrophages (O'Riordan *et al.*, 1995), qui vont alors produire des radicaux oxygénés et phagocyter le parasite (Ezekowitz *et al.*, 1991). L'attachement aux macrophages alvéolaires semble donc être un mécanisme de défense important contre *Pneumocystis*.

Dans toutes les expériences concernant l'interaction de *Pneumocystis* avec la matrice extracellulaire, l'inhibition de l'attachement avoisine 50%, suggérant ainsi que le parasite pourrait utiliser d'autres mécanismes pour adhérer aux pneumocytes de type I. En effet, d'autres études ont montré la présence de lectines parasitaires jouant un rôle dans l'attachement de *P. carinii* aux cellules épithéliales alvéolaires (Vierbuchen *et al.*, 1990 ; Ortega-Barria et Pereira, 1992). Ces lectines parasitaires auraient surtout une forte spécificité pour les résidus L-fucose, D-galactoside, D-mannoside et les acides aminés N acétylés présents à la surface des cellules hôtes ou des mucines présents dans l'espace alvéolaire au cours de l'infection (Vierbuchen *et al.*, 1990).

3.3.3. Interaction avec le surfactant

Le surfactant a un rôle dans la mécanique ventilatoire et dans les échanges gazeux. Il permet de diminuer les tensions de surface à l'interface air/alvéole, évitant ainsi le collapsus à l'expiration. Le surfactant est produit au niveau des pneumocytes de type II, qui sont liés aux pneumocytes de type I par des jonctions serrées. Les composants du surfactant sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique au métabolisme très actif, puis stockés dans des corps lamellaires. Après stimulation, ils seront sécrétés dans l'espace alvéolaire. Le surfactant est composé à 90% de lipides, dont 95% sont des phospholipides (Veldhuizen et Possmayer, 2004). Il comporte également 10% de protéines, majoritairement de l'albumine, mais également quatre protéines spécifiques, SP-A, SP-B, SP-C et SP-D (SP= « *Surfactant Protein* ») (Singh *et al.*, 2003 ; Johansson *et al.*, 1994). SP-A et SP-D sont des protéines hydrophiles, facilement dissociables, qui ont un rôle dans la défense pulmonaire. SP-B et SP-C sont de petites protéines hydrophobes, impliquées dans le rôle mécanique du surfactant en permettant de diminuer la tension de surface (Frerking *et al.*, 2001). La pneumocystose induit une altération des propriétés physiques du surfactant pulmonaire. En fait, les études ont montré que ces perturbations ont leur origine dans les changements aussi bien qualitatifs que quantitatifs des différents constituants du surfactant pulmonaire (Atochina *et al.*, 2004).

Chez l'homme, au cours de la pneumocystose, le taux de phospholipides totaux dans le lavage bronchoalvéolaire diminue et la composition phospholipidique est modifiée (Hoffmann *et al.*, 1992 ; Escamilla *et al.*, 1992). On observe notamment une chute des phosphatidylcholines. Via la MSG, *Pneumocystis* inhiberait directement la sécrétion de lipides par les pneumocytes de type II (Lipschik *et al.*, 1998). Cette diminution est encore accentuée par l'augmentation de l'activité phospholipase A2 qui entraîne une dégradation plus élevée des phospholipides (Hoffman *et al.*, 1992). L'étude dans les modèles animaux était compromise, du fait de l'administration fréquente de corticoïdes connus pour augmenter les taux de phospholipides et de protéines du surfactant. Pour cette raison, deux modèles animaux ne nécessitant pas l'emploi de corticoïdes (Dei-Cas *et al.*, 1998) ont été utilisés: le lapin au sevrage et la souris SCID. Chez le lapereau, qui développe spontanément une pneumocystose au sevrage, on observe une chute des phospholipides (Aliouat *et al.*, 1998). En revanche chez la souris SCID, qui développe une PPc avec une très faible réaction inflammatoire, le taux de phospholipides ne diminue pas (Aliouat *et al.*, 1998).

La pneumocystose a également un effet sur les protéines hydrophobes SP-B et SP-C. En présence de *Pneumocystis*, les quantités de ces deux protéines diminuent en lien avec celle

de la production de leurs ARNm (Beers *et al.*, 1999 ; Atochina *et al.*, 2000). Le TNF- α serait impliqué : en effet son taux augmente lors de l'infection, or on sait que l'une de ses actions est d'inhiber l'expression des ARNm de SP-B et SP-C (Beers *et al.*, 1999). Ces modifications entraînent une diminution de la tension de surface et par conséquent une perturbation de la mécanique respiratoire et des échanges gazeux au sein de l'alvéole pulmonaire (Horowitz *et al.*, 1996 ; Atochina *et al.*, 2001).

La pneumocystose a également un impact sur SP-A et SP-D. Ce sont des protéines hydrophiles qui font partie de la famille des collectines et opsonisent la plupart des pathogènes en se fixant à leurs carbohydrates de surface; elles participent ainsi aux toutes premières étapes de la réponse immunitaire innée. Le taux de SP-A augmente, que ce soit dans les liquides de lavage broncho-alvéolaires (LBA) de patients VIH+ (Stenberg *et al.*, 1995) ou chez des rats immunodéprimés développant une pneumocystose (Phelps et Rose, 1991). SP-A peut interagir avec le parasite, via la MSG pour laquelle elle a une forte affinité (Zimmerman *et al.*, 1992). Cette interaction permettrait d'augmenter la phagocytose des cellules de *Pneumocystis* par les macrophages.

Le rôle de SP-A dans la défense contre *Pneumocystis* n'est cependant pas totalement clair. En dépit de la progression de la maladie, le niveau de SP-A est stable, ainsi que le niveau des ARNm dans les tissus (Atochina *et al.*, 2000). L'augmentation de cette protéine dans le LBA n'est pas due à une régulation de la transcription ou à la stabilisation de l'ARNm (Atochina *et al.*, 2001). Chez des souris KO pour SP-A, un développement plus important de la pneumocystose a été observé (Linke *et al.*, 2001). La levée de l'immunodépression chez ces KO permet cependant l'élimination de *P. murina* (Linke *et al.*, 2006). En fait, en l'absence de SP-A, *Pneumocystis* adhère peu aux macrophages : l'ajout de la protéine permet alors d'augmenter l'adhésion de manière dose dépendante (Linke *et al.*, 2001 ; Linke *et al.*, 2005 ; Linke *et al.*, 2006). Ce rôle de SP-A est limité au début de l'infection, la protéine n'intervenant plus en milieu ou en fin de pneumocystose (Linke *et al.*, 2009).

La pneumocystose entraîne également une accumulation de SP-D dans les voies respiratoires basses, du fait de l'augmentation de la transcription du gène et d'un défaut d'élimination de la protéine (Atochina *et al.*, 2000 ; Atochina *et al.*, 2001, Yong *et al.*, 2003). SP-D se lie aux résidus mannose de la MSG ainsi qu'aux β -glucanes de la paroi cellulaire de *Pneumocystis*. Cette liaison facilite l'adhésion aux macrophages, mais n'induit pas forcément la phagocytose (O'Riordan *et al.*, 1995). En effet, l'agrégation entre *Pneumocystis* et SP-D

forme de gros complexes, difficiles à phagocyter pour le macrophage (Yong *et al.*, 2003). SP-D pourrait ainsi contribuer à protéger les cellules de *Pneumocystis* contre leur élimination par le macrophage.

D'autres approches expérimentales illustrent encore la complexité des interactions entre les variations des SPs et l'évolution de l'infection par *Pneumocystis*. Comme les perturbations du surfactant associent souvent une hypoxie, l'effet d'une hypoxie hypobare intermittente sur la capacité de rats non-immunocompromis infectés par *P. carinii* à éliminer leur infection a été exploré (Vives *et al.*, 2008). Ces expériences ont montré que même si les conditions d'hypoxie hypobare altèrent significativement la composition du surfactant, notamment le niveau de protéines A et D, et affectent la fonction des effecteurs de l'immunité, elles n'inhibent pas les mécanismes d'élimination des cellules de *P. carinii* ni facilitent leur développement (Vives *et al.*, 2008). Ainsi, l'influence potentielle des changements des protéines du surfactant sur l'évolution de l'infection par *Pneumocystis* présente encore beaucoup de zones d'ombre.

4. LA PNEUMOCYSTOSE

4.1. Facteurs de risque

L'état du système immunitaire est bien entendu l'élément clé dans le développement de la pneumocystose à *Pneumocystis* (PPc). Chez les patients VIH positifs, le risque de contracter une PPc symptomatique est directement lié au degré d'immunodépression induit par l'infection virale. Ces patients sont considérés à risque pour la PPc lorsque leur taux de lymphocytes T CD4 est inférieur à 200 / mm³ de sang ou, chez les enfants, s'il est inférieur à 400 / mm³ de sang (Phair *et al.*, 1990 ; Shellito *et al.*, 1990). Alors que chez Les patients immunodéprimés non infectés par le VIH, le risque de survenue d'une PPc est particulièrement élevé lorsque le taux de LTCD4 est en dessous de 300/mm³ (Walzer, 1994 ; Mansharamani *et al.*, 2000).

Une altération du système immunitaire est donc nécessaire pour développer une pneumocystose. Plusieurs groupes de population ont donc été repérés comme étant à risque accru de développer une PPc.

Nous regroupons les facteurs de risque en 2 catégories : celui lié à l'infection par le VIH et ceux liés aux autres types d'immunodépression, sans évoquer le risque de

transmission foeto-maternelle, rapporté dans quelques observations (Céré *et al.*, 1997 ; Montes-Cano *et al.*, 2009).

4.1.1. Le risque lié à l'infection par le VIH

La PPc souvent révélatrice du SIDA (Gottlieb *et al.*, 1981 ; Masur *et al.*, 1981), a pris une ampleur considérable au cours des années 1980, devenant la maladie définissant le stade SIDA pour plus de la moitié des adultes et des adolescents infectés par le VIH aux Etats-Unis (Jaffe *et al.*, 1983).

L'utilisation d'associations d'antirétroviraux a permis d'obtenir une reconstitution immunitaire efficace, et par conséquent une diminution de la survenue de la PPc chez les patients infectés par le VIH (Morris *et al.*, 2004).

4.1.2. Les risques liés à d'autres causes d'immunodépression

Dans ce groupe assez hétérogène, on retrouve des facteurs de risque directement liés à une immunodépression cellulaire, mais aussi d'autres facteurs de risque tels que la prématurité et les traitements par les corticoïdes. Chez ces patients, l'identification d'un ou plusieurs facteurs de risque est nécessaire pour identifier ceux qui devront bénéficier d'une prophylaxie anti-*Pneumocystis* et ceux pour lesquels le diagnostic de PPc devrait être évoqué et un traitement entrepris en urgence en cas d'atteinte respiratoire (Roux, *et al.*, 2010).

- Les nourrissons prématurés ou atteints de déficits immunitaires

Historiquement, le premier facteur de risque identifié a été la prématurité. En effet, la pneumocystose a été décrite dès 1930, chez des nourrissons prématurés ou malnutris, sous le nom de pneumonie plasmocytaire, puis reconnue comme infection à *Pneumocystis* dans les années 1950 (Gajdusek, 1957). La PPc est également fréquente et particulièrement sévère chez les nourrissons présentant des déficits immunitaires congénitaux (immunodéficiences combinées sévères (SCID) et hypogammaglobulinémies) ou une pathologie hématologique associée (leucémie aigue lymphoblastique). Elle apparaît au cours de la première année de vie pour les premiers et entre 1 et 4 ans pour les seconds.

- Les hémopathies malignes

Il est établi que les enfants traités par chimiothérapie pour leucémie aigue lymphoblastique (LAL) sont à risque particulièrement élevé de PPc. Celle-ci peut se développer lors du traitement (chimiothérapie et stéroïdes à fortes doses ou à durée prolongée) ou être inaugurale de la maladie et survenir avant tout traitement

immunosuppresseur (Hughes *et al.*, 1973). De plus des patients traités pour des lymphomes, LLC et autres syndromes lympho- prolifératifs ou myélomes sont particulièrement à risque de pneumocystose en absence de prophylaxie (Wadhwa *et al.*, 2006 ; Martin *et al.*, 2006).

- Les tumeurs solides

Les tumeurs solides (cerveau surtout mais aussi sein et poumon) sont également un facteur de risque de PPc mais à moindre échelle que les hémopathies malignes. L'explication potentielle de la survenue de pneumocystose dans les tumeurs malignes intracérébrales est l'utilisation de corticothérapie prolongée et à forte dose (Yale et Limper, 1996).

- La greffe de moelle osseuse

Les patients recevant une greffe de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques sont aussi à risque de PPc. Dans ce cas, l'infection fongique apparaît sous l'effet d'une forte immunosuppression instaurée pour prévenir la réaction du greffon contre l'hôte ou les rechutes d'hémopathies malignes (Morris *et al.*, 2012).

- La transplantation d'organes solides

Les transplantations d'organes solides (poumon, rein, coeur, foie) constituent un facteur de risque de PPc notamment dans la première année après la transplantation. Les traitements prescrits aux patients transplantés (immunosuppresseurs, sérum antilymphocytaire) pourraient être responsables de la survenue de la maladie (Morris *et al.*, 2012).

- Les maladies inflammatoires et auto-immunes

Bien que cela soit rare, la PPc peut se développer chez des patients ayant une maladie auto-immune ou inflammatoire traitée par des agents cytotoxiques associés ou non à des corticoïdes. Dans cette catégorie de patients, ceux qui présentent une granulomatose de Wegener semblent être les plus à risque de PPc (Godeau *et al.*, 1994 ; Komano *et al.*, 2009).

- Les traitements immunosuppresseurs

Le rôle des immunosuppresseurs dans la survenue de la PPc est très probable mais difficile à individualiser du rôle de la pathologie sous-jacente (hémopathies notamment). De plus les immunosuppresseurs sont souvent associés :

- ✓ Les corticostéroïdes sont identifiés comme un facteur de risque majeur de PPc chez les patients non infectés par le VIH (Yale et Limper, 1996). Une analyse rétrospective de 116 patients non VIH ayant développé une PPc a montré que 90,5% d'entre eux

étaient sous traitement par corticoïdes, depuis au moins 1 mois, au moment du diagnostic (Yale et Limper, 1996).

- ✓ La chimiothérapie : étant donné l'association fréquente d'agents cytotoxiques et immunomodulateurs, l'imputabilité d'un agent en particulier est difficile à établir. Il semblerait que la fludarabine, la cladribine, le cyclophosphamide ou le méthotrexate soient associés à un risque plus élevé de PPc (Thomas et Limper, 2007 ; Kovacs et Masur, 2009 ; Komano *et al.*, 2009).
- ✓ Les anticorps anti-lymphocytaires utilisés pour le traitement des rejets après transplantation d'organe solide sont clairement associés à un risque augmenté de PPc (Radisic *et al.*, 2003). Les risques liés aux autres traitements du rejet (hormis les corticoïdes) sont faibles pour l'azathioprine et la ciclosporine, plus important pour le tacrolimus (Luft *et al.*, 1996) et mal déterminés pour le mycophénolate-mofetil et le sirolimus.
- ✓ Autres immunosuppresseurs : en dépit de quelques cas rapportés (Kondo *et al.*, 2005 ; Seddik *et al.*, 2004 ; Tai *et al.*, 2002), le risque lié aux anti-TNF α ou au rituximab (anti-CD20) utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires n'est pas encore bien établi.

- Autres déficits de l'immunité

Plus rarement, la PPc peut survenir chez des patients ayant un déficit immunitaire, comme une lymphopénie CD4+ idiopathique (Duncan *et al.*, 1993). De manière exceptionnelle, des cas de PPc ont été rapportés chez des patients sans déficit immunitaire identifié ni autre infection opportuniste (Bensousan *et al.*, 1990). Cependant, l'absence d'exploration des fonctions immunitaires de façon globale et détaillée empêche toute conclusion sur ces cas très particuliers.

4.2. Prévalence et incidence de la Pneumocystose

Le nombre total de cas de PPc déclarés demeure stable en France depuis cinq ans. Il tendrait à diminuer chez les patients immunodéprimés par le VIH avec en parallèle une recrudescence chez les patients immunodéprimés par d'autres causes (Magne *et al.*, 2009).

4.2.1. Population VIH

La pneumocystose est une infection opportuniste très fréquente chez les patients infectés par le VIH avec une prévalence de 60 à 80 % dans les pays industrialisés (Lubis *et*

al., 2003) et de 13 à 55 % dans les pays en voie de développement (Morris *et al.*, 2004a). Sa survenue a permis de diagnostiquer l'infection à VIH dans 25 à 39 % des cas en France (May *et al.*, 2005 ; Magne *et al.*, 2009), contre 50 % aux USA (Walzer *et al.*, 2008 ; Morris *et al.*, 2008). L'incidence de la PPc a fortement diminué avec l'introduction de la prophylaxie anti-*Pneumocystis* au début des années 1990 (diminution de 3,4 % par an entre 1992 et 1996). La prévalence de la PPc aux USA était de 53 % en 1989 et de 42 % en 1992. (Morris *et al.*, 2004 ; Morris *et al.*, 2004a). Une seconde régression est apparue en 1996 avec l'utilisation de la thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) chez les patients VIH+ (réduction de 21,5 % par an entre 1996 et 1998 aux USA) (Kaplan *et al.*, 2000).

En Europe, l'incidence de la PPc était de 4,9 % par an avant 1995 pour chuter à 0,3 % par an après mars 1998. (Morris *et al.*, 2004a). Cependant, la PPc reste une infection opportuniste importante chez les patients infectés par le VIH.

Au Liban, une étude récente a été menée au centre médical de l'hôpital de l'Université américaine à Beyrouth où les auteurs ont étudié le profil d'infections opportunistes chez les patients infectés par le VIH. Sur une population de 89 patients VIH+ inclus dans l'étude, la pneumonie à *P. jirovecii* représente 10,9% des infections opportunistes les plus communément diagnostiquées (Naba *et al.*, 2010).

Une étude similaire a été menée en Uganda (Afrique) avec pour objectif de décrire l'épidémiologie de l'infection par *P. jirovecii* chez les patients VIH+. Cent vingt-quatre LBA des patients suspectés atteints de pneumonie ont été analysés par PCR nichée ciblant le gène *mtLSUrRNA* et *P. jirovecii* a été détecté dans 7 des 124 LBA analysés soit une prévalence de 6% chez les patients VIH+ (Taylor *et al.*, 2012).

4.2.2. Population non VIH

Le réseau pneumocystose francilien a mis en évidence une augmentation de la proportion de patients non VIH développant une PPc (25 % en 2003 et 2004, 30 % en 2005, 39 % en 2006, 41 % en 2007) (Magne *et al.*, 2009). La recrudescence de cas de PPc dans cette population peut s'expliquer par l'utilisation de corticoïdes et d'immunosuppresseurs en onco-hématologie, lors de transplantations ou de maladies inflammatoires chroniques. Dans cette population, sans prophylaxie anti-*Pneumocystis*, la prévalence de la PPc est de 5 à 25 % chez les patients transplantés, 2 à 6 % chez les patients atteints de maladies de système et 1 à 25 % chez les patients cancéreux (Morris *et al.*, 2004a).

Selon une étude française, la prévalence des cas de PPc chez les patients non VIH en fonction de la maladie sous-jacente est la suivante : 43 % dans les cas d'hémopathies, 25 %

chez les patients atteints de tumeurs solides, 27 % de maladies de système, 7 % en post-transplantation. Un même patient peut cumuler plusieurs pathologies à risque accru de PPC. Parmi ces patients, 66 % avaient reçu un traitement immunosuppresseur et 71 % une corticothérapie au long court avant le diagnostic de pneumocystose (Roblot *et al.*, 2009).

4.3. Influence des variations saisonnières

Bien que les résultats diffèrent en fonction des auteurs, il existerait une variation saisonnière de l'incidence de la pneumocystose à *P. jirovecii* (Miller *et al.* 2007). En effet, la température et l'humidité extérieures auraient une influence sur la dissémination environnementale des spores du champignon (Miller *et al.* 1992).

La plupart des études sont purement descriptives, seul un petit nombre fait appel à des données statistiques plus robustes (Sing *et al.* 2009 ; Varela *et al.* 2004). Bien que l'association entre les facteurs climatiques (température et humidité) et l'incidence de la PPC ne soit pas clairement établie, l'incidence de la maladie serait globalement corrélée à la hausse des températures (Miller *et al.* 1992 ; Vanhems *et al.* 1992). Plus récemment, les travaux des équipes allemandes et anglaises vont dans ce sens et décrivent des pics saisonniers plutôt estivaux (Sing *et al.* 2009 ; Walzer *et al.* 2008).

A contrario, d'autres équipes, espagnoles et anglaises, ont observé une incidence maximale de la PPC en hiver comme pour les autres infections respiratoires (Calderon *et al.* 2004 ; Varela *et al.* 2004 ; Lubis *et al.* 2003). De plus, selon l'équipe espagnole, la diminution de température aurait une influence sur la survenue de la pneumocystose à *P. jirovecii* mais pas l'humidité (Varela *et al.* 2004). Des études multicentriques américaines et européennes ont même révélé que l'incidence globale était plus élevée dans les villes les plus froides (Hoover *et al.* 1991 ; Delmas *et al.* 1995).

Enfin, les saisons et les facteurs climatiques pourraient avoir une influence sur la répartition des différents génotypes de *P. jirovecii*. Ainsi, le génotype 2 (basé sur le polymorphisme du gène *mtLSUrRNA*) est isolé de manière périodique et sa fréquence d'isolation serait corrélée avec la moyenne des températures (mais aucune corrélation avec l'humidité) (Miller *et al.* 2007). Ceci suggère que les différents génotypes de *P. jirovecii* pourraient avoir des exigences physiques différentes pour leur survie dans l'environnement et la transmission du micro-organisme (Miller *et al.* 2007).

4.4. Présentations cliniques

4.4.1. Pneumocystose

La pneumocystose se présente comme une pneumonie interstitielle bilatérale souvent fébrile, avec toux sèche, tachypnée et dyspnée progressive avec cyanose. L'évolution est lente et le début insidieux. La radiographie thoracique montre généralement des infiltrats diffus bilatéraux. Dans de rares cas, il peut se produire des disséminations extrapulmonaires (Catherinot et *al.*, 2010), exceptionnelles, retrouvées chez 2 à 3% des patients atteints du SIDA (Raviglione, 1990 ; Cohen et Stoeckle, 1991 ; Telzac et Armstrong, 1994). *Pneumocystis* sp. dissémine alors à partir du poumon vers d'autres organes en induisant des lésions secondaires viscérales.

Cependant, la symptomatologie de la PPc diffère selon le contexte clinique et l'âge du patient.

4.4.1.1. Enfants

4.4.1.1.1. Prématurés et malnutris

Historiquement, les nourrissons prématurés et les enfants dénutris constituent les premiers cas de PPc observés. La survenue de PPc dans cette population (âgée de deux à trois mois) est devenue rare de nos jours. L'incubation est longue. Le début des symptômes est insidieux : une tachypnée et une cyanose périorale apparaissent progressivement et évoluent vers une détresse respiratoire. Il n'y a généralement ni toux, ni hyperthermie. (Abrégés Masson, Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales).

Il existe aussi une pneumonie interstitielle plasmocytaire. Son tableau clinique a été décrit en Europe lors d'épidémies pendant et après la seconde guerre mondiale, chez des enfants de 2 à 3 mois d'âge, prématurés ou carencés sur le plan protéino-calorique (Hamperl, 1956 ; Hughes, 1987). Aujourd'hui, cette forme n'est généralement plus retrouvée.

4.4.1.1.2. Immunodéprimés non VIH

Il s'agit principalement de porteurs de déficits immunitaires congénitaux (immunodéficiences combinées sévères ou hypogammaglobulinémies) d'une part et d'enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique d'autre part. Lors de déficit immunitaire primaire, la PPc survient au cours de la première année de vie alors qu'elle apparaît entre un et quatre ans chez les leucémiques. Le début est brutal avec dyspnée, toux sèche et hyperthermie. (Abrégés Masson, Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales).

4.4.1.1.3. Immunodéprimés VIH

Avec l'apparition des antirétroviraux, on observe peu de nourrissons infectés par le VIH et développant une PPc. Le début est progressif avec tachypnée, hyperthermie et toux. (Abrégés Masson, Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales).

4.4.1.2. Adultes

4.4.1.2.1. Patients VIH +

Chez ces patients, la prévalence de la pneumocystose a diminué avec la mise en place de thérapies antivirales multiples et la généralisation de la prophylaxie (moins de 10%). Elle demeure néanmoins l'infection indicatrice du SIDA la plus fréquente (Kaplan *et al.*, 2000).

La PPc se caractérise par une triade d'apparition progressive : hyperthermie, toux non productive et dyspnée d'intensité croissante. Il peut exister des formes fébriles pures. La PPc survient majoritairement lorsque le taux de lymphocytes T-CD4 est inférieur à 200/mm³ de sang (Thomas *et al.*, 2004).

Les patients infectés par le VIH recrutent moins de polynucléaires neutrophiles que les patients non VIH. Ce plus petit nombre de cellules inflammatoires est corrélé avec une meilleure oxygénation et une meilleure survie que pour les patients non infectés par le VIH.

4.4.1.2.2. Patients VIH –

La PPc émerge également chez des patients immunodéprimés VIH négatifs (Dei-Cas, 2000 ; Calderon *et al.*, 2004 ; Calderon *et al.*, 2010 ; Calderon *et al.*, 2010a).

Cette pneumocystose touche les personnes souffrant d'immunodépressions congénitales, de cancers, d'hémopathies malignes, de greffes de moelle osseuse ou de transplantations d'organes. Chez ces patients, l'incidence de la pneumocystose varie de 10 à 40% avec un taux de mortalité compris entre 40 et 50% (Yale et Limper, 1996 ; Monnet *et al.*, 2008).

Dans ce groupe de patients, la PPc est aiguë et sévère. De plus, la survenue des symptômes est plus rapide (1 à 14 jours) que chez les patients infectés par le VIH (14 à 37 jours) (Roux *et al.*, 2010 ; Tokuda *et al.*, 2008 ; Tasaka *et al.*, 2010). La PPc se caractérise par l'apparition brutale d'une insuffisance respiratoire nécessitant souvent le recours à la ventilation mécanique. Au niveau pulmonaire, peu de formes de *P. jirovecii* sont observées (d'où un diagnostic biologique difficile) mais l'inflammation importante (grand nombre de

polynucléaires neutrophiles recrutés) est responsable de symptômes exacerbés chez les patients immunodéprimés hors VIH (Thomas *et al.*, 2004 ; Roux *et al.*, 2010).

4.5. Diagnostic de la pneumonie à *Pneumocystis*

4.5.1. Prélèvements

En raison de la localisation alvéolaire de *Pneumocystis*, le diagnostic de la PPc repose avant tout sur la recherche et la mise en évidence du champignon ou de son ADN dans les prélèvements pulmonaires ou oro-pharyngés.

Cette recherche peut s'effectuer sur plusieurs types de prélèvements :

- Biopsie pulmonaire : pratiquée jusqu'au début des années 1990, la biopsie pulmonaire transpariétale ou transbronchique n'est plus indiquée, en raison des risques qu'elle représente. Elle est remplacée par d'autres techniques moins invasives telles que le LBA et l'expectoration induite.
- Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) : c'est actuellement le meilleur examen pour la mise en évidence de *P. jirovecii*. Réalisé par fibroscopie et sous anesthésie locale, il consiste à injecter environ 300 ml de sérum physiologique tiède dans les alvéoles puis à ré-aspirer immédiatement ce liquide.
- L'expectoration induite (EI) : Cette technique non invasive consiste à faire inhaler au patient un aérosol de solution saline hypertonique, induisant ainsi une toux assez productive, avec l'aide d'un kinésithérapeute respiratoire. Cette technique est cependant moins sensible que le LBA et ne peut pas être réalisée chez tous les patients. Elle nécessite en effet une coopération active du patient, situation inadaptée chez les sujets asthéniques, hypoxémiques, très dyspnéiques, intubés ou présentant des troubles neurologiques.
- Le rinçage oro-pharyngé (ROP) : consiste à faire un gargarisme buccal avec 10 ml de sérum physiologique qui sera ensuite analysé par PCR. Des résultats encourageants ont été obtenus avec cette technique. L'interprétation d'un résultat positif reste cependant difficile, en particulier pour différencier une colonisation d'une infection évolutive (Wakefield *et al.*, 1993 ; Lundgren *et al.*, 1996 ; Vargas *et al.*, 2010).
- L'écouvillonnage nasal : a été évalué dans quelques études et pourrait présenter un intérêt pour la détection de *Pneumocystis*. (Vargas *et al.*, 2010).

- Les autres prélèvements respiratoires (crachat, aspiration endotrachéale) : Il s'agit de prélèvements non-invasifs, qui permettent de détecter *P. jirovecii* chez des patients immunocompétents asymptomatique (Ponce *et al.*, 2010).

4.5.2. Mise en évidence

En raison d'absence de système de culture *in vitro* de *Pneumocystis*, sa mise en évidence dans les prélèvements cités précédemment, repose sur des techniques microscopiques et sur des techniques d'amplification génique (PCR).

La détection se fait généralement par observation microscopique des parasites qui sont colorés (Bleu de Toluidine Ortho, Gomori-Grocott ou Méthanol-Giemsa), ou marqués par des anticorps monoclonaux spécifiques couplés à la fluorescéine, la phosphatase ou la peroxydase (Calderon *et al.*, 2010). Ces méthodes d'observation directe peuvent conduire à des faux négatifs, en particulier chez les patients non sidéens (Limper *et al.*, 1989). Les méthodes moléculaires, comme la PCR nichée et surtout la PCR en temps réel, s'avèrent plus sensibles et plus spécifiques pour identifier *Pneumocystis*. De nombreux protocoles ont été développés, ciblant le plus souvent l'ARN ribosomal de la grande sous-unité mitochondrial (*mtLSU rRNA*) (Wakefield *et al.*, 1990 ; Tsolaki *et al.*, 1999). D'autres gènes de *Pneumocystis* sont également utilisés, comme par exemple *hsp70* (« *heat shock protein* ») (Huggett *et al.*, 2008), *dhfr* (« *dihydrofolate reductase* ») (Bandt et Monecke, 2007), *dhps* (« *dihydropteroate synthase* ») (Alvarez-Martinez *et al.*, 2006) ou *cdc2* (« *cell division cycle 2* ») (Arcenas *et al.*, 2006). La quantification de la charge fongique par PCR en temps réel pourrait par ailleurs permettre de distinguer infection et colonisation (Alanio *et al.*, 2011), de même, de nouvelles méthodes ciblant l'ARNm qui, moins stable que l'ADN, est rapidement dégradé et donc n'est détecté que chez des patients présentant une pneumocystose active (de Oliveira *et al.*, 2007). La mesure du taux de β -1,3-glucanes et de S-adenosylmethionine dans le sérum sont également des pistes (Calderon *et al.*, 2010). En effet le dosage de β -1,3-glucanes est un test non-invasif qui semble être un outil complémentaire pour distinguer entre la colonisation pulmonaire par *P. jirovecii* et la PPc (Damiani *et al.*, 2011 ; Damiani *et al.*, 2013).

4.6. Traitement

Pneumocystis entraîne des pneumopathies graves, fatales en l'absence de traitement chez les patients immunodéprimés. La gravité de l'infection évoluant de manière progressive et le succès du traitement dépendant de la sévérité de la maladie, il est essentiel de débiter le régime thérapeutique au stade le plus précoce.

Le traitement de première intention utilisé en priorité est l'association triméthoprime/sulfaméthoxazole (TMP/SMX) (Benson *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2006). Ce traitement est administré par voie orale ou intraveineuse pour les cas les plus sévères, pendant 21 jours, avec un ajustement de la dose et une surveillance médicale afin de détecter d'éventuels signes de toxicité ou de détérioration clinique (Carmona et Limper, 2010). Les effets secondaires apparaissent généralement à partir de la deuxième semaine de traitement, davantage chez les patients VIH⁺ (Catherinot *et al.*, 2010). La pentamidine en intraveineuse est un traitement de deuxième intention : elle entraîne cependant de très nombreux effets secondaires (DeMasi *et al.*, 2013). D'autres traitements peuvent être utilisés, selon la gravité de la pneumocystose : l'association clindamycine/primaquine pour des pneumocystoses modérées à sévères, la dapsonne ou l'atovaquone pour des pneumocystoses légères à modérées. L'association TMP/SMX et la pentamidine sont les traitements les plus efficaces, leur utilisation combinée n'entraîne cependant pas de synergie (Fishman, 1998). Des corticostéroïdes, comme la prednisone, peuvent être ajoutés en complément. Ils auront un effet positif chez les patients VIH⁺ qui sont en hypoxie, en diminuant le risque de défaillance respiratoire. L'intérêt est moins clair chez les patients VIH⁻, où leur utilisation est à estimer au cas par cas selon la gravité de la pneumocystose (Carmona et Limper, 2010).

Le taux de T-CD4 permet de cibler les populations à risque accru de PPc chez lesquelles la chimioprophylaxie anti-*Pneumocystis* serait souhaitable (Roblot *et al.*, 2009). Ainsi, chez les patients infectés par le VIH, les recommandations préconisent l'administration d'une prophylaxie dès lors que le taux de T-CD4 est inférieur à 200 / mm³ de sang ou en cas de candidose oropharyngée. Cette chimioprophylaxie peut être interrompue lorsque le taux de T-CD4 est supérieur à 200/mm³ de sang pendant au moins trois mois (Catherinot *et al.*, 2010). Ceci est beaucoup moins codifié dans la population d'immunodéprimés non-VIH. Mansharamani et collaborateurs en 2000 ont proposé un taux seuil de T-CD4 à 300 / mm³ de sang. Dès qu'il y a un contexte d'immunosuppression, la prophylaxie anti-*Pneumocystis* doit être envisagée au cas par cas en évaluant le bénéfice par rapport au risque d'effets indésirables parfois importants qu'elle peut générer. Il faut aussi prendre en compte le taux d'attaque de la PPc dans la pathologie considérée (Catherinot *et al.*, 2010 ; Rodriguez *et al.*, 2004). Actuellement les personnes visées par le traitement prophylactique sont :

- les malades VIH⁺ au stade SIDA présentant un nombre de lymphocytes T CD4⁺ inférieur à 200/mm³ de sang ou une candidose oropharyngée (y compris ceux sous traitement antirétroviral) ;

- les patients souffrant de cancer, en particulier ceux qui sont sous hautes doses de stéroïdes ;
- les patients sous traitement immunosuppresseur ou corticostéroïdes à la suite, par exemple, d'une greffe.

La prophylaxie est également recommandée en cas d'antécédents de PPC, à vie sauf si le nombre de lymphocytes T CD4+ dépasse les 200/mm³ de sang pendant plus de 3 mois suite à une thérapie antivirale. Ces lignes directrices concernant la prévention d'infections opportunistes, dont la pneumocystose, ont été publiées en 2002 et actualisées en 2009 (*The Infectious Disease Society of America and the US Public Health Service*) (Masur *et al.*, 2002 ; Huang et Crothers, 2009). Le traitement prophylactique le plus utilisé est l'association TMP/SMX (Fishman 1998 ; Kaplan *et al.*, 2002). Alternativement, on peut utiliser de la dapsons (avec ou sans pyriméthamine), de la pentamidine en aérosol, de l'atovaquone ou de la clindamycine. Le traitement est maintenu tant que les facteurs de risque persistent (Huang *et al.*, 2006).

Lors du traitement, la progression de la maladie après une à deux semaines d'administration doit mener à suspecter des résistances. Ces résistances pourraient être liées à la présence de mutations, par exemple des mutations du gène de la DHPS (Dihydropteroate synthase) peuvent entraîner une résistance au TMP/SMX ou à la dapsons chez d'autres pathogènes (Huang *et al.*, 2004 ; Crothers *et al.*, 2005), une mutation du cytochrome B peut entraîner une résistance à l'atovaquone (Kessl *et al.*, 2004). Si le lien entre prophylaxie au TMP/SMX et la présence de mutations dans le gène *DHPS* a été reconnu, la présence de ces mutations n'est pas un facteur pouvant prédire l'issue de la pneumocystose (Huang *et al.*, 2006a, Rabodonirina *et al.*, 2013).

5. IMPLICATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

De manière plus globale, *Pneumocystis* interagit avec le système immunitaire de l'hôte, composé d'une réponse innée suivie d'une réponse adaptative.

La réponse innée consiste à maintenir l'intégrité structurale du poumon, par intervention d'une activité antimicrobienne et par la capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires et des leucocytes recrutés dans l'espace alvéolaire. Elle est indispensable à l'activation de l'immunité spécifique humorale et cellulaire en présentant aux lymphocytes T les antigènes des microorganismes invasifs. L'une de ces cellules

présentatrices d'antigènes, la cellule dendritique, est la plus performante pour initier la réponse immunitaire adaptative. En retour, les produits de l'immunité spécifique cellulaire ou humorale améliorent les performances de l'immunité innée.

5.1. Immunité innée

Les macrophages alvéolaires constituent la première ligne de défense contre *Pneumocystis*. On observe une corrélation inverse entre leur nombre et la sévérité de la pneumocystose (Fleury *et al.*, 1985 ; Young *et al.*, 1985). Les macrophages reconnaissent des motifs sur *Pneumocystis* via des PRR (« *Pattern-Recognition Receptors* »). L'activation des macrophages est liée à la présence de différents récepteurs membranaires:

- Les récepteurs mannose reconnaissent les MSG à la surface de *Pneumocystis* (Ezekowitz *et al.*, 1991), entraînant une phagocytose et une activation du facteur de transcription NF- κ B.
- Les récepteurs aux β -glucanes induisent la production de TNF- α (« *Tumor Necrosis Factor Alpha* ») et de MIP-2 (« *Macrophage Inflammatory Protein* ») par les macrophages (Vassallo *et al.*, 1999) via la translocation de NF- κ B. Le récepteur principal aux β -glucanes est une lectine, la dectine-1 (Brown et Gordon, 2001).
- Les TLR (« *Toll-Like Receptors* ») ont un rôle dans la réponse inflammatoire mais pas dans la phagocytose. C'est notamment le TLR-2, en combinaison avec le récepteur aux mannoses, qui est impliqué dans l'induction de la sécrétion de cytokines inflammatoires et de chimiokines en réponse à l'infection (Zhang *et al.*, 2006 ; Tachado *et al.*, 2007).
- Le récepteur SRA (« *Scavenger Receptor A* ») intervient dans le contrôle de la réponse inflammatoire (Hollifield *et al.*, 2007).

La reconnaissance et l'attachement du parasite au macrophage entraînent alors son activation et/ou une phagocytose aboutissant à sa propre dégradation. La phagocytose est un processus actif : dans un premier temps, le parasite est entouré de la membrane du phagocyte, puis il est internalisé dans le phagosome. La production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les cellules immunitaires effecteurs stimulée de l'hôte tels que les neutrophiles, monocytes et macrophages (Nathan et Cunningham-Bussel, 2013; Hasenberg *et al.*, 2013), entraîne alors la mort du parasite (Steele *et al.*, 2003). De la même manière, la production d'oxyde nitrique et d'intermédiaires réactifs du nitrogène par les macrophages sont toxiques

pour le parasite. Bien que les EROs, y compris les radicaux libres, les anions superoxydes et les peroxydes, sont maintenant considérés comme des molécules de signalisation cellulaire qui participent à l'homéostasie cellulaire, ils peuvent conduire à des dommages oxydatifs dans les cellules ou les tissus lorsqu'elles sont produites en excès (Haliwell et Gutteridge, 2006; Nathan et Cunningham Bussel, 2013). La seule présence de *Pneumocystis* ne permet cependant pas leur production (Shellito *et al.*, 1996). Il faut également une stimulation des macrophages par TNF- α et IFN- γ (Downing *et al.*, 1999) qui vont permettre de renforcer leurs capacités phagocytaires.

Les récepteurs mannoses des macrophages reconnaissent la glycoprotéine MSG. Cette glycoprotéine de surface est un mélange de plusieurs protéines codées par la famille de gènes MSG. Une seule MSG est exprimée à la surface d'une même sous-population de *Pneumocystis* sp.

Les gènes codant pour les MSG sont présents à l'extrémité des chromosomes de *Pneumocystis* sp. Cette localisation favorise les translocations et est ainsi à l'origine de variations antigéniques ou de « switch » d'une protéine MSG à une autre. Chaque sous-population de *Pneumocystis* exprime une glycoprotéine de surface différente. Cette variation immunogénique et antigénique serait un mécanisme d'échappement immunitaire. (Cushion, 2004 ; Thomas *et al.* 2004).

Il existe aussi une interaction entre le récepteur dectin-1 du macrophage et le β -glucane de la paroi du micro-organisme. Les molécules de β -glucane (largement répandues) ont un rôle important dans l'initiation de la réponse inflammatoire lors d'une pneumocystose. *Pneumocystis* sp. est ensuite phagocyté par les macrophages où il est incorporé dans des phagolysosomes et finalement détruit (Rapaka *et al.*, 2007).

Il est donc indispensable d'avoir une réponse inflammatoire efficace chez l'hôte pour contrôler une pneumocystose.

Or, chez les patients immunodéprimés (SIDA, maladies malignes), les fonctions des macrophages (phagocytose et activation de l'inflammation) sont altérées, ce qui a pour conséquence de diminuer l'élimination du pathogène des poumons. Ceci favoriserait le développement d'une infection dans ces populations à risque. (Catherinot *et al.* 2010 ; Thomas *et al.* 2004).

Dans l'environnement micro-alvéolaire, les champignons sont confrontés aux macrophages alvéolaires et les neutrophiles qui sont la première ligne de défense contre ces

infections (Hasenberg *et al.*, 2013). Les granulocytes neutrophiles produisent également des EROs ce qui crée un stress oxydant pour *Pneumocystis* favorisant sa clairance. De plus les neutrophiles fonctionnent en concert avec les macrophages, les cellules dendritiques, et les cytokines pour promouvoir la clairance de *Pneumocystis* (Morris *et al.*, 2012).

Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) les plus puissants présents dans les poumons. Les cellules dendritiques pulmonaires sont situées près des portes d'entrée des micro-organismes, en contact avec l'alvéole ou les cellules épithéliales respiratoires et sont parmi les premières cellules à contacter de nombreux micro-organismes inhalés. (Carmona *et al.*, 2006). Les cellules dendritiques sont efficaces pour activer la réponse immunitaire des cellules T naïves. Dans un poumon sain, elles ne sont présentes qu'en faible quantité dans l'espace alvéolaire et dans un état immature. Lors d'une infection leur nombre augmente très rapidement et une fois stimulée ces cellules évoluent afin d'acquérir la capacité de présenter des antigènes. La migration de ces cellules dans les ganglions lymphatiques devient alors nécessaire pour présenter l'antigène aux lymphocytes T résidents (Wright *et al.*, 2004). Elles sont les régulateurs clés de l'activation du système immunitaire à la fois innée et adaptative. Et comme l'activation des cellules T nécessite des interactions optimales avec les cellules dendritiques matures, il est donc probable que l'initiation et le contrôle des réponses immunitaires essentielles pendant la pneumocystose sont médités par les cellules dendritiques. (Carmona *et al.*, 2006).

Enfin les cellules épithéliales alvéolaires, comme toutes les cellules épithéliales, secrètent des cytokines et des chimiokines inflammatoires en réponse au stress. Ainsi, la lignée cellulaire continue A549 (cellules épithéliales alvéolaires humaines) produit de l'IL-6 en réponse à *P. carinii* (Pottratz *et al.*, 1998). En présence de MSG, ces cellules produisent de l'IL-8 et MCP-1 (« *Monocyte Chemoattachment Protein* ») (Benfield *et al.*, 1999). MCP-1 est impliquée dans l'inflammation du poumon, la réponse immune et la réparation du poumon (Wang *et al.*, 2007). En présence de β -glucanes de *Pneumocystis*, les cellules épithéliales alvéolaires de rat en culture primaire, produisent MIP-2 (« *neutrophil chemoattractant protein* ») (Hahn *et al.*, 2003). En fait, *Pneumocystis* active la production de NF- κ B dans le poumon (Wang *et al.*, 2005), d'où la production de MIP-2 (Evans *et al.*, 2005). A noter que l'on observe une augmentation de l'apoptose des cellules pulmonaires en présence de *Pneumocystis* (Beck *et al.*, 2009).

5.2. Immunité adaptative

Les cellules dendritiques et les macrophages peuvent, par leur capacité de présentation d'antigène, activer les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, d'où une réponse adaptative. Activées, elles permettent la production de cytokines et migrent dans les ganglions lymphatiques pour présenter l'antigène aux lymphocytes T résidants. Les β -glucanes de *Pneumocystis* induisent l'expression d'une molécule costimulatrice qui active ces cellules dendritiques, entraînant une réponse de type Th-1, avec sécrétion des cytokines IL-1 β et le TNF- α (mais pas l'IL-12) et induction de la prolifération des cellules T via la molécule Fas (Carmona *et al.*, 2006).

Les lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺) permettent de coordonner la réponse inflammatoire par recrutement et activation de cellules effectrices, responsables de l'élimination de *Pneumocystis*. Chez les hôtes immunodéprimés, les LT CD4⁺ sont modifiés en quantité mais aussi en qualité. Il a aussi été démontré, dans un modèle murin, que même avec des macrophages fonctionnels, l'absence de LT CD4⁺ empêche la réponse de l'hôte contre *Pneumocystis* (Beck *et al.*, 2003). Ainsi, les patients VIH⁺ avec un nombre de LT CD4⁺ inférieur à 200 / mm³ de sang sont prédisposés à développer une pneumocystose (Phair *et al.*, 1990 ; Shellitto *et al.*, 1990), et ceux non infectés par le VIH sont à risque de développer une pneumocystose lorsque le taux de LT CD4⁺ est inférieur à 300 / mm³ de sang. (Walzer, 1994 ; Mansharamani *et al.*, 2000).

Lors d'une réponse immunitaire normale, les LT CD8⁺ ont une action coordonnée avec les LT CD4⁺. Des travaux chez des souris déplétées en LT CD4⁺ et/ou LT CD8⁺ montrent d'une part que l'absence de LT CD8⁺ n'a pas d'effets lorsque les LT CD4⁺ sont présents et d'autre part qu'en l'absence de LT CD4⁺, les LT CD8⁺ prennent le relais et participent à l'élimination du parasite (Beck *et al.*, 1996). Les LT CD8⁺ agissent via l'expression d'IFN- γ et ce mécanisme est encore amplifié en présence d'IFN- γ (Kolls *et al.*, 1999). A l'inverse, d'autres travaux chez des souris déplétées en LT CD4⁺ et/ou LT CD8⁺ suggèrent que les LT CD8⁺ ne sont pas impliqués directement dans l'élimination du parasite (Gigliotti *et al.*, 2006). Les LT CD8⁺ auraient un effet inflammatoire en l'absence de LT CD4⁺, proportionnel au nombre de récepteurs au TNF- α (Wright *et al.*, 2004 ; Pryhuber *et al.*, 2008). Le rôle des LT CD8⁺ est donc ambigu, protecteur ou délétère selon leur production en cytokines.

Les anticorps et les lymphocytes B ont également un rôle dans la défense contre *Pneumocystis*. Au niveau des anticorps sériques, on trouve surtout des IgG mais également

des IgM spécifiques de *Pneumocystis* (Walzer et Rutledge, 1981 ; Furuta *et al.*, 1985). Des études montrent que des IgM reconnaissant la MSG de *Pneumocystis* permettent une protection partielle en cas d'immunodépression (Gigliotti et Hughes, 1988). L'administration intranasale d'IgM anti-*Pneumocystis* chez des animaux infectés immunodéprimés permet également une protection (Gigliotti *et al.*, 2002). L'utilisation d'un sérum hyper-immun anti-*Pneumocystis* permet de diminuer le nombre de parasites quel que soit le stade de la maladie chez une souris SCID infectée (Roths et Sidman, 1993). Outre cette immunisation passive, une immunisation active a également été mise en évidence. L'exposition répétée de souris déplétées en cellules T à *Pneumocystis* permet l'élimination du parasite (Harmsen *et al.*, 1995) via la production d'IgG anti-*Pneumocystis* qui protège l'animal. Même en cas de déplétion en LT CD4⁺, l'animal sera alors protégé contre l'infection, (Harmsen *et al.*, 1995). Les lymphocytes B ont un rôle dans l'activation des cellules T. Si l'interaction dépendante de CD40-CD40L entre les cellules B et T est bloquée, l'élimination de *Pneumocystis* diminue en corrélation avec la baisse du niveau d'IgG spécifiques et la diminution de l'activation des cellules T (Wiley et Harmsen, 1995). L'effet protecteur des lymphocytes B se fait par l'activation des cellules T par le CD40 (Lund *et al.*, 2003). Les cellules B permettent également la formation de cellules T CD4⁺ mémoires en réponse à *Pneumocystis* (Lund *et al.*, 2006).

5.3. La réponse cytokinique

Outre les différentes cellules impliquées, les cytokines et chemokines ont bien entendu un rôle essentiel.

Au cours de la pneumocystose, l'IFN- γ est produit dans les poumons par les LT CD4⁺ (Ishimine *et al.*, 1995). Il n'est pas directement toxique pour *Pneumocystis* (Pesanti, 1991) mais a un rôle dans l'inflammation et l'activation des macrophages.

Le TNF- α est une cytokine proinflammatoire sécrétée par les macrophages alvéolaires (Tamburrini *et al.*, 1991). Il a un rôle contre le parasite, mais peut également avoir des effets délétères en recrutant les neutrophiles, d'où une inflammation. L'inhibition de TNF- α entraîne une élimination du parasite plus lente chez une souris normale et une infection plus chronique chez une souris déplétée en LT CD4⁺ (Kolls *et al.*, 1997). Le TNF- α permet de recruter les neutrophiles, lymphocytes et monocytes nécessaires à l'élimination de *Pneumocystis* (Thomas et Limper, 2007).

De nombreuses autres cytokines interviennent également. L'IL-1, cytokine pro-inflammatoire, joue un rôle dans l'élimination du parasite (Chen *et al.*, 1992). Au contraire, l'IL-6, autre cytokine pro-inflammatoire, n'agit pas directement sur l'élimination du parasite, mais permet le recrutement de neutrophiles et de lymphocytes (Chen *et al.*, 1993). Elle intervient également dans la production de fibronectine et de vitronectine (Vassallo *et al.*, 2001) et est elle-même régulée par la SP-A (Linke *et al.*, 2006). L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, n'intervient pas dans l'élimination de *Pneumocystis* mais permet de limiter les dommages aux poumons (Qureshi *et al.*, 2003). Cependant, la production d'IL-8 est corrélée avec l'infiltration des neutrophiles et la diminution des échanges gazeux lors de pneumocystose sévère humaine. Les taux d'IL-8 dans les LBA pourraient être prédictifs de déficience pulmonaire et de décès dus à la PPc (Catherinot *et al.* 2010).

Bien que la réponse inflammatoire engendrée par *Pneumocystis* sp. soit indispensable pour l'élimination du pathogène, elle cause néanmoins des effets délétères pour l'hôte comme des lésions pulmonaires et une détresse respiratoire (Catherinot *et al.* 2010).

6. TRANSMISSION

Les populations naturelles de *Pneumocystis* sp. sont étroitement inféodées aux différentes espèces hôtes, comme en témoignent des données génomiques, caryotypiques, antigéniques, ultrastructurales et biologiques (expériences d'infection croisée) (Aliouat *et al.*, 1993 ; Gigliotti *et al.*, 1993 ; Aliouat *et al.*, 1994 ; Mazars *et al.*, 1997 ; Wakefield, 1998 ; Dei-Cas *et al.*, 1998 ; Aliouat *et al.*, 1999 ; Dei-Cas *et al.*, 2000, Durand-Joly *et al.*, 2002). Des études récentes sur la co-évolution des *Pneumocystis* et de leurs hôtes témoignent de l'adaptation très ancienne de ces parasites aux mammifères (Demanche *et al.*, 2001 ; Guillot *et al.*, 2001 ; Hugot *et al.*, 2003 ; Keely *et al.*, 2003). Cette forte spécificité parasitaire a amené à considérer la pneumocystose chez l'homme comme une anthroponose et non une zoonose. L'homme, qu'il soit malade ou porteur, constituerait un réservoir de *P. jirovecii*. Un porteur sain de *Pneumocystis* se définit par : (i) une PCR positive réalisée sur des prélèvements respiratoires ; (ii) un examen microscopique négatif ; (iii) l'absence de signes clinico-radiologiques de pneumocystose.

6.1. Prévalence de la colonisation asymptomatique et impact clinique

La colonisation humaine par *P. jirovecii* semble avoir un rôle majeur dans la transmission. De nombreuses études mentionnent la détection d'ADN de *Pneumocystis* sp. dans des prélèvements respiratoires de patients asymptomatiques et immunocompétents (Catherinot *et al.*, 2010). Cette détection a été rendue possible grâce au développement de techniques de biologie moléculaire (PCR) plus sensibles que les méthodes traditionnelles.

La durée du portage asymptomatique de *P. jirovecii* fluctue entre quinze jours et seize mois et demi (Cushion, 2004). Pendant cette période, *P. jirovecii* se multiplie transitoirement dans les poumons de l'hôte (Aliouat-Denis *et al.*, 2008).

La colonisation par *P. jirovecii* commence dès le plus jeune âge. Quinze à 32 % des enfants d'âge compris entre un mois et deux ans, hospitalisés pour une pathologie respiratoire sont colonisés (Catherinot *et al.*, 2010, Vargas *et al.*, 2001). De plus, la colonisation par *P. jirovecii* pourrait être associée à des bronchiolites ou au syndrome de mort subite du nourrisson (Vargas *et al.*, 2007, Morris *et al.*, 2008).

La prévalence chez des adultes sains est faible (0 à 20 % selon les études, résultats dépendants de la technique de détection et du type de prélèvement respiratoire). Certaines populations sont à plus haut risque de colonisation comme les patients infectés par le VIH (31 à 68 %), ceux présentant une maladie pulmonaire chronique obstructive (37 à 55 %), les fumeurs, les patients atteints de diabète, de myélome multiple, de leucémie lymphoïde chronique, ou de sarcoïdose. La colonisation est favorisée par les traitements corticoïdes ou la grossesse (16 % de femmes au troisième trimestre de grossesse) (Vargas *et al.*, 2003). De plus, le personnel soignant en contact avec des patients ayant une PPc serait plus fréquemment colonisé que celui qui n'est pas exposé (Miller *et al.*, 2001).

De nombreuses populations asymptomatiques sont susceptibles d'être colonisées par *P. jirovecii*. Les personnes colonisées peuvent être à risque de développer une pneumocystose mais surtout, elles constituent un réservoir pour la transmission du micro-organisme (Catherinot *et al.*, 2010). Chez les patients recevant une prophylaxie anti-*Pneumocystis* au long court, la colonisation pourrait induire la sélection de mutants résistants au traitement. Enfin, la présence de *P. jirovecii* dans les poumons, même à faible taux, pourrait stimuler la réponse inflammatoire de l'hôte, induire une détérioration pulmonaire et jouer un rôle dans la progression de maladies pulmonaires (Morris *et al.*, 2008a).

6.2. Réactivation ou contamination *de novo*

La conception traditionnelle suggère que, dans un contexte d'immunodépression, la réactivation d'organismes latents constituerait le mode le plus courant d'acquisition de la pneumocystose (Frenkel, 1976). Cette hypothèse est soutenue par le fait que 90% des enfants en bas âge font une primo-infection par *Pneumocystis* (Meuwissen *et al.*, 1977 ; Pifer *et al.*, 1978 ; Peglow *et al.*, 1990 ; Vargas *et al.*, 2001). Il a également été observé que la mise sous immunodépression de rongeurs entraînait l'apparition d'une pneumocystose (Frenkel *et al.*, 1966 ; Reddy et Zammit, 1991 ; Dei-Cas *et al.*, 1998). Au demeurant, de plus en plus d'arguments en faveur d'une contamination *de novo* s'accumulent. Tout d'abord, une guérison clinique et une négativation de l'examen parasitologique ont été observées chez la souris SCID, chez le rat nude ainsi que chez l'homme, ce qui voudrait dire que l'hôte élimine efficacement le parasite des poumons (Chen *et al.*, 1993a ; Vargas *et al.*, 1995). L'ADN du champignon a été mis en évidence chez des hôtes immunocompétents, mais le portage ne serait que transitoire (Vargas *et al.*, 1995 ; Durand-Joly *et al.*, 2002) et apparemment inexistant chez des individus avec des tests fonctionnels respiratoires normaux (Nevez *et al.*, 2006). Enfin, lors d'épisodes successifs de PPC chez le même patient, des génotypes différents de *P. jirovecii* ont été retrouvés (Hughes *et al.* 1998 ; Keely *et al.*, 1995 ; Latouche *et al.*, 1997). Actuellement, il est généralement admis que la PPC résulterait plutôt d'infections *de novo*.

6.3. Transmission horizontale et verticale

La transmission horizontale a été bien étudiée grâce aux modèles animaux. Dans ces modèles, et en particulier dans le modèle murin, il a été démontré que *Pneumocystis* pouvait être transmis par voie aérienne d'un hôte infecté vers un hôte susceptible de la même espèce (Walzer *et al.*, 1977 ; Hughes, 1982 ; Soulez *et al.*, 1991 ; Vogel *et al.*, 1993 ; Dumoulin *et al.*, 2000 ; Chabé *et al.*, 2004 ; Kling *et al.*, 2009). Un seul jour de contact entre une souris SCID indemne et une souris parasitée par *P. murina* suffit pour que l'infection soit transmise (Soulez *et al.*, 1991 ; Dumoulin *et al.*, 2000). Ces modèles animaux ont également permis d'étudier le rôle des sujets immunocompétents dans la transmission. Ainsi, des souris SCID développant une pneumocystose ont été mises en contact étroit avec des souris immunocompétentes exemptes de *P. murina*. Les souris immunocompétentes porteuses du parasite ainsi obtenues pouvaient ensuite le transmettre à des souris SCID qui développent alors la maladie (Dumoulin *et al.*, 2000 ; Chabé *et al.*, 2004) ou à d'autres souris immunocompétentes (Chabé *et al.*, 2004). Ces dernières peuvent à leur tour transmettre *P.*

murina à un hôte susceptible (Chabé *et al.*, 2004). Ces hôtes immunocompétents peuvent donc constituer un réservoir dynamique de parasites car leurs *Pneumocystis* sont viables et peuvent se répliquer (Chabé *et al.*, 2004). Vingt jours après contact, des formes kystiques sont toujours présentes chez les hôtes immunocompétents, il faut en fait 5 à 6 semaines pour avoir une élimination totale des *Pneumocystis* (An *et al.*, 2003 ; Gigliotti *et al.*, 2003 ; Chabé *et al.*, 2004).

La transmission aérienne, bien établie chez l'animal, serait également celle qui permet la transmission du parasite chez l'homme. De nombreux cas groupés en milieu hospitalier ont été rapportés. Le génotypage des *P. jirovecii* identifiés chez ces patients renforce l'hypothèse de la transmission horizontale (Rabodonirina *et al.*, 2004 ; Hocker *et al.*, 2005 ; de Boer *et al.*, 2007). Des cas groupés ont également été retrouvés en milieu domestique (Latouche *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 2002 ; Mc Nally *et al.*, 2005). De l'ADN de *Pneumocystis* a en outre été détecté chez des sujets immunocompétents dans l'entourage étroit de patients VIH positifs ou négatifs atteints ou non de pneumocystose (Vargas *et al.*, 2000 ; Miller *et al.*, 2001 ; Durand-Joly *et al.*, 2003), suggérant le rôle potentiel de réservoir de ces populations immunocompétentes porteuses de *P. jirovecii* (Dei-Cas *et al.*, 2000 ; Miller *et al.*, 2001 ; Nevez *et al.*, 2003 ; Totet *et al.*, 2003 ; Le Gal *et al.*, 2012 ; Le Gal *et al.*, 2012a).

L'hypothèse d'une transmission interhumaine de *Pneumocystis jirovecii* nécessite la mise en oeuvre de procédures préventives afin d'éviter la transmission aérienne dans les structures de soins. Des mesures simples sont à envisager comme par exemple l'isolement de type respiratoire ou la séparation géographique des malades atteints de PPC des patients susceptibles d'être contaminés (immunodéprimés) (Chabé *et al.*, 2004 ; Choukri *et al.*, 2010). Aucune recommandation nationale n'existe à ce jour au sujet de l'isolement respiratoire. En pratique courante, les patients présentant une pneumocystose sont hospitalisés seuls dans une chambre pour éviter les cas secondaires (Catherinot *et al.*, 2010).

Par ailleurs, une transmission verticale par voie transplacentaire est également suspectée chez l'homme. Des kystes de *Pneumocystis* ont ainsi été retrouvés dans les poumons d'un fœtus et dans le placenta d'une mère HIV+ (Mortier *et al.*, 1995), mais les résultats furent mis en doute à cause des techniques de détection employées (Hughes, 1995). Une étude prospective, réalisée sur 33 femmes immunocompétentes au troisième trimestre de grossesse et 28 femmes non enceintes du même âge, a permis de retrouver l'ADN de *P. jirovecii* dans 15,5% des écouvillonnages nasaux des femmes enceintes alors que tous les prélèvements étaient négatifs pour les femmes contrôle non enceintes (Vargas *et al.*, 2003).

Une étude menée sur des fœtus issus de fausses couches a révélé la présence d'ADN de *P. jirovecii* dans 35% des poumons fœtaux et 5% des placentas (Montes-Cano *et al.*, 2009), montrant l'intérêt de rechercher un lien éventuel entre transmission *in utero* de *Pneumocystis* et la fausse couche.

Un passage transplacentaire relativement fréquent a été assez bien documenté chez le lapin, qui présente la particularité de développer une pneumocystose spontanée au sevrage (Soulez *et al.*, 1989 ; Dei-Cas *et al.*, 2006). Chez ce lagomorphe, *Pneumocystis* a été identifié par PCR dans les poumons des fœtus, dans le placenta et dans le liquide amniotique dès le 10^{ème} jour de gestation (Céré *et al.*, 1997). La transmission serait plus fréquente chez la lapine multipare (Sanchez *et al.*, 2007). En somme, la transmission transplacentaire de *Pneumocystis* aurait lieu chez le lapin (Céré *et al.*, 1997, Sanchez *et al.*, 2007), chez des primates humains (Montes-Cano *et al.*, 2009) et non-humains (Demanche *et al.*, 2003), mais pas chez les rongeurs (Ito *et al.*, 1991 ; Icenhour *et al.*, 2002), cette divergence pouvant traduire des différences de perméabilité du placenta liées à sa structure différente chez ces mammifères (Carter *et al.*, 2004).

6.4. Source environnementale et forme infectante

L'infection *de novo* par voie aérienne, via un sujet infecté par la même espèce, a été établie (Dei-Cas, 2000 ; Aliouat-Denis *et al.*, 2008). Ainsi, le réservoir de *Pneumocystis* sp. serait en fait un réservoir dynamique constitué par l'ensemble des membres des populations d'hôtes. Plus ou moins susceptibles à *Pneumocystis* en fonction de leur statut immunitaire, ils permettraient le développement parasitaire, la production de formes infectantes et la transmission de l'infection à de nouveaux hôtes.

La contamination par une source environnementale n'est cependant pas exclue. En effet, de l'ADN de *Pneumocystis* a été retrouvé dans des filtrats d'air en milieu rural et dans de l'eau (Wakefield, 1996 ; Casanova-Cardiel et Leibowitz, 1997). De nombreuses études ont permis de retrouver de l'ADN de *Pneumocystis*, que ce soit dans l'air d'animaleries hébergeant des animaux infectés (Olsson *et al.*, 1998 ; Latouche *et al.*, 2001) ou dans des chambres de patients atteints de PPc (Bartlett *et al.*, 1994 ; Olsson *et al.*, 1998). Dans ce dernier cas, la détection d'ARNm suggérerait même que le parasite conserverait sa viabilité dans l'air (Latouche *et al.*, 2001, Maher *et al.*, 2001). En fait, l'hypothèse la plus probable est que ces parasites seraient exhalés par les hôtes contaminés (Bartlett *et al.*, 1994 ; Olsson *et*

al., 1998 ; Sing *et al.*, 1999). Une transmission inter-hôte est plus vraisemblable que l'existence d'une forme environnementale hypothétique se développant sur un substrat inconnu.

La forme exhalée demeure inconnue : aucun stade n'a été clairement identifié dans l'air. Un kyste mature de *Pneumocystis* a été retrouvé dans la lumière bronchique d'une souris SCID atteinte de pneumocystose, suggérant que ces formes kystiques pourraient être exhalées par les sujets infectés (Creusy *et al.*, 1996 ; Dei-Cas, 2000).

Les kystes matures ne présentant plus de filopodes, ils seraient donc plus susceptibles d'être exhalés que les formes trophiques. Leur paroi épaisse leur confèrerait également une plus grande résistance aux conditions du milieu extérieur. Des travaux récents ont montré que l'utilisation d'échinocandines, qui inhibent la synthèse des β -1,3-glucanes dans la paroi des kystes, limite le développement de la pneumocystose, confortant le rôle des formes kystiques dans la transmission (Cushion *et al.*, 2010). Cette hypothèse est confirmée par des expériences de transmission naturelle de *P. carinii* réalisées par Martinez *et al.* en 2013, qui montrent que des rats nus inoculés avec des formes kystiques pures (ou une population totale de *P. carinii* : formes trophiques + formes kystiques) sont capables de transmettre le microchampignon par voie aérienne à des rats indemnes de *Pneumocystis*. A l'inverse, aucune transmission du microchampignon n'a été observée lorsque les rats nus sont inoculés uniquement avec des formes trophiques pures (Martinez *et al.*, 2013).

6.5 Variations génétiques des isolats de *Pneumocystis* et conséquences sur la transmission

L'étude de la diversité génétique de *Pneumocystis* est d'un grand intérêt pour mieux comprendre la circulation potentielle du champignon dans le réservoir humain et améliorer la prévention de la PPc. Elle est cependant compliquée par l'absence de système de culture *in vitro* ainsi que par l'existence probable de co-infections par plusieurs génotypes chez le même hôte (Hauser *et al.*, 1998). L'analyse de séquences d'ADN est particulièrement adaptée et a été largement utilisée.

L'un des marqueurs les plus utilisés pour le typage moléculaire est le gène *mtLSUrRNA*. Ce gène mitochondrial a l'avantage d'être en multicopies et par conséquent plus facile à détecter par PCR. Le typage au locus *mtLSUrRNA* est la méthode la plus sensible et l'approche moléculaire la plus utilisée au laboratoire (Robberts *et al.*, 2007 ; Morris et Norris, 2012). Cinq génotypes *mtLSUrRNA* de *Pneumocystis* sont décrits (Miller *et al.*, 2001). Les

génotypes à ce locus ont été identifiés sur la base des polymorphismes nucléotidiques aux positions 85 et 248.

La diversité génétique de *Pneumocystis jirovecii* peut également être étudiée à l'aide des loci des espaceurs internes transcrit (ITS) (Beard *et al.*, 2004). On retrouve une grande variabilité au niveau des ITS1 et ITS2 se trouvant sur l'ARN ribosomal cytoplasmique (Tsolaki *et al.*, 1996). Ces marqueurs sont très utilisés pour le typage de *P. jirovecii* (Tsolaki *et al.*, 1996 ; Tsolaki *et al.*, 1998 ; Tsolaki *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 1998 ; Nimri *et al.*, 2002). En effet 27 et 30 génotypes différents ont été identifiés respectivement pour ITS1 et ITS2 (Nimri *et al.*, 2002).

Le locus de la dihydroptéroate synthase est également intéressant car la DHPS est la cible des sulfamides, principaux médicaments utilisés pour traiter la PPC. Les mutations identifiées sont localisées au niveau des positions nucléotidiques 165 et 171, conférant une sensibilité potentiellement plus faible aux sulfamides (Iliades *et al.*, 2005). L'analyse du locus *dhps* peut être utilisé comme un marqueur pour l'étude de l'émergence potentielle de la résistance aux sulfamides (Beard *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000). En effet, le traitement aux sulfamides a été identifié comme un facteur prédictif de génotypes mutants (Huang *et al.*, 2000; Kazanjian *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 1999). Cependant, la ville de résidence du patient ayant également été identifié comme un facteur de risque indépendant, les mutants de *P. jirovecii* pourraient également être transmis de patients infectés et traités à des patients non traités sensibles (Totet *et al.*, 2004).

Bien que de nombreuses méthodes de typage ont été développés, le typage génomique multilocus (MLST) est maintenant considéré comme « *Gold standard* » (Phipps *et al.*, 2011 ; Matos et Esteves, 2010). De plus, il offre de nombreux avantages par rapport à d'autres méthodes, telles que la reproductibilité et la possibilité d'échanger des données provenant de différents laboratoires. Jusqu'à 17 régions codantes et non codantes du génome de *P. jirovecii* ont été explorées pour leurs polymorphismes alléliques: le gène codant pour l'ARNr mitochondrial (mt26S, aussi appelé *mtLSU rRNA*), l'espaceur interne transcrit ITS1, ITS2, la β - tubuline (β -TUB), l'ARNr de la grande sous-unité (26SrRNA), l'ARNr de la petite sous-unité mitochondrial (*mtSSU*), la superoxyde dismutase (SOD), le cytochrome b (CYB), la thymidylate synthase (TS), le 5.8S rRNA, AROM, TRR1, UCS, MSG, KEX1, la dihydrofolate réductase (DHFR), et la dihydroptéroate synthase (DHPS) (Helweg-Larsen *et al.*, 1998 ; Matos et Esteves, 2010).

7. MODELES D'ETUDE

7.1. Modèles animaux

Aucun modèle de culture continue n'étant disponible, les expérimentations animales s'avèrent incontournables afin d'approfondir les connaissances sur *Pneumocystis*. Le parasite est retrouvé dans les poumons de nombreux mammifères (Hughes, 1987), comme par exemple les rats (Weller, 1956), les souris (Walzer *et al.*, 1979), les furets (Stokes *et al.*, 1987), les lapereaux (Soulez *et al.*, 1989), les porcelets (Settness 1991), le poulain (Shively 1973), le singe, le chien ou le chat (Hagler *et al.*, 1987 ; Shiota *et al.*, 1990).

Au laboratoire, plusieurs espèces de mammifères sont utilisées comme modèles de pneumocystose après traitement par des corticostéroïdes, essentiellement les rats et souris de laboratoire ainsi que les furets. Ces animaux sont des sources de parasites et apportent des informations sur la transmission de la maladie, la physiopathologie de la pneumocystose, les relations hôte/parasite et le polymorphisme génétique des *Pneumocystis* spp.

Chez le rat et la souris, modèles les plus employés, les corticoïdes s'avèrent être les traitements immunosuppresseurs les plus efficaces pour induire une pneumocystose (Hughes, 1987) par comparaison avec la cyclophosphamide (Frenkel *et al.*, 1966) ou à la cyclosporine (Hughes, 1982). Ils peuvent être administrés par voie sous-cutanée (Hughes, 1987) ou, plus couramment, par voie orale dans l'eau de boisson (Armstrong *et al.*, 1991 ; Oz et Hughes, 1996 ; Aliouat *et al.*, 1997). Soumis à ce traitement, un animal qui héberge *Pneumocystis* à l'état latent développe une pneumocystose en 6 à 12 semaines, suggérant la réactivation du parasite (Walzer *et al.*, 1977, Walzer *et al.*, 1983, Walzer et Rutledge, 1982).

Le furet développe également une pneumocystose lorsqu'il est sous corticothérapie (Gigliotti et Hughes, 1988), traitement qu'il supporte mieux que le rat et la souris. De plus, l'évolution de la maladie peut être suivie chez cet animal qui supporte les lavages broncho-alvéolaires (Armstrong et Cushion, 1994). Cela a permis l'étude des variations antigéniques notamment au niveau des MSG de *Pneumocystis* (Wright *et al.*, 1995).

Les lapins déclarent une pneumocystose spontanée au début de leur sevrage (Soulez *et al.*, 1989, Ceré *et al.*, 1997). Ils constituent un modèle intéressant pour étudier la réponse immune de l'hôte, la primo-infection à *Pneumocystis* et les interactions parasite/surfactant, car il ne nécessite pas d'administration de corticostéroïdes, susceptibles d'altérer la réponse immune et la composition du surfactant (Aliouat *et al.*, 1998). Dans les semaines qui suivent

le sevrage, le lapin guérit spontanément et produit des anticorps spécifiques (Dei-Cas *et al.*, 1990). Bon modèle pour étudier la transmission (horizontale ou verticale) de la pneumocystose (Ceré *et al.*, 1997), il ne permet pas d'obtenir de grandes quantités de parasites.

Enfin, les primates non humains représentent une source de parasites plus proches génotypiquement et phénotypiquement de *Pneumocystis jirovecii* (Dei-Cas *et al.*, 1998). La maladie survient chez les très jeunes animaux ou chez les individus immunodéficients à la suite d'un stress, d'une infection naturelle ou expérimentale par un rétrovirus (Chandler *et al.*, 1976 ; Matsumoto *et al.*, 1987 ; Furuta *et al.*, 1993 ; Durand-Joly *et al.*, 2000 ; Board *et al.*, 2003). Pour des raisons éthiques et économiques, ce modèle animal ne peut être utilisé en routine au laboratoire.

L'inconvénient majeur de ces modèles animaux sous corticoïdes est la grande variabilité des quantités de parasites obtenues, mais également les infections latentes, bactériennes, virales ou fongiques, qui peuvent se développer en parallèle de la pneumocystose. Pour pallier à ces problèmes, d'autres modèles ont été développés : ils utilisent des animaux génétiquement immunodéprimés de statut SOPF (« *Specific and Opportunistic Pathogen Free* ») et non porteurs latents de *Pneumocystis* : (i) le modèle de pneumocystose chez le rat athymique, animaux homozygotes pour la mutation nude (rnu) (ne produisant pas de lymphocytes T), fut établi d'abord par inoculation nasale de *P. carinii* (Furuta *et al.*, 1984) puis confirmé par inoculation intratrachéale du microchampignon (Aliouat *et al.*, 1995) ; (ii) chez la souris, des infections furent décrites chez des colonies immunodéficientes homozygotes pour la mutation nude (nu) (Walzer *et al.*, 1977) ou d'autres pour la mutation SCID (*Severe Combine ImmunoDeficiency*), ce second modèle est plus reproductible et permet le développement d'une pneumocystose plus importante (Aliouat *et al.*, 1993 ; Beck *et al.*, 1996). Les rats nude et les souris SCID subissent généralement un traitement additionnel aux corticostéroïdes qui permet d'intensifier l'infection (Aliouat *et al.*, 1997). En effet, les corticostéroïdes, comme la dexaméthasone, sont fréquemment utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Ils diminuent l'activité des cellules phagocytaires et modifient la distribution lymphocytaire (Balloy *et al.*, 2005, Löwenberg *et al.*, 2007).

7.2. Modèles de culture *in vitro*

De nombreux aspects de la biologie et du métabolisme de *Pneumocystis* demeurent mal connus du fait de l'absence de système de culture continue. Les recherches demeurent très dépendantes des modèles animaux : les parasites ainsi obtenus sont en quantité limitée et mélangés à des débris pulmonaires.

Dès les années 1950, de nombreux essais furent menés pour cultiver *Pneumocystis* à partir de prélèvements humains. Différents auteurs pensèrent obtenir des « colonies » à partir de milieux de culture classiques pour champignon (Biermengrader, 1953 ; Bauch et Ladstatter, 1953). Ces résultats ne furent jamais reproduits et finalement remis en cause.

Les tentatives de culture connurent un véritable essor à partir des années 1970. Plusieurs défis étaient à relever afin de suivre la croissance de *Pneumocystis* en culture cellulaire : (i) quantifier précisément le nombre de parasites par examen microscopique direct, seule méthode permettant l'obtention de valeurs fiables ; (ii) mesurer la viabilité des parasites ; (iii) éviter la contamination, plus fréquente que dans le modèle de culture cellulaire de mammifères, par des agents infectieux provenant souvent du poumon des animaux immunodéprimés desquels étaient extraits les parasites (Armstrong et Cushion, 1994). Deux stratégies sont aujourd'hui essentiellement utilisées : les cultures sur lignées primaires ou continues de cellules nourricières (co-cultures) et les cultures axéniques.

7.2.1. Les co-cultures

Les premières cellules utilisées furent une lignée primaire embryonnaire de cellules épithéliales pulmonaires de poulet (Pifer *et al.*, 1977). Furent ensuite testées des cellules Vero (fibroblastes de rein de singe vert africain) (Pifer *et al.*, 1978). De très nombreuses lignées cellulaires continues ont par la suite été testées, pour la plupart des cellules fibroblastiques ou épithéliales de poumons de mammifères, adultes ou fœtales (Cushion, 1989 ; Sloand *et al.*, 1993 ; Aliouat *et al.*, 1993 ; Aliouat *et al.*, 1995).

En général, les co-cultures sont réalisées dans des boîtes de culture ou sur des billes, dans une atmosphère enrichie à 5% de CO₂, à une température comprise entre 35 et 37 °C, dans un milieu complémenté avec 10 à 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Pifer *et al.*, 1977 ; Latorre *et al.*, 1977 ; Cushion *et al.*, 1985 ; Cushion, 1989 ; Mirovsky et Fishman, 1993 ; Aliouat *et al.*, 1995). Dans ces systèmes, le nombre de parasites augmente de 2 à 10 fois après 7 à 10 jours de culture. Leur nombre stagne ensuite avant de décroître après 7 à 14 jours. Si des repiquages sont réalisés, la croissance diminue progressivement et s'arrête après

2 à 3 passages (Cushion et Walzer, 1984 ; Mirovsky *et al.*, 1993 ; Aliouat *et al.*, 1995). L'infectivité de ces parasites en co-culture a été peu étudiée (Mirovsky *et al.*, 1993 ; Aliouat *et al.*, 1995). La lignée L2 de cellules épithéliales alvéolaires (ATCC CCL 149) de rat est parmi celles qui donnent les meilleurs résultats en permettant une croissance parasitaire de l'ordre de 7 jours (Aliouat *et al.*, 1995 ; Atzori *et al.*, 1998).

7.2.2. Les cultures axéniques

Les cultures axéniques permettent un développement parasitaire équivalent ou inférieur à celui obtenu dans les systèmes de co-cultures. Deux types de milieu sont utilisés : (i) un milieu comme le DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) enrichi avec du sérum de veau fœtal; ces cultures permettent une prolifération du parasite pendant 3 à 4 jours (Aliouat *et al.*, 1999), (ii) un milieu de culture composé de néopeptone ou de N-acetylglucosamine à pH 4,6, permettant une augmentation du nombre de parasites de 8 à 10 fois en 24 heures puis une stabilisation jusqu'à 72 heures (Cushion et Ebbets, 1990).

Un seul modèle de culture continue a été proposé, modèle qui n'a cependant jamais pu être reproduit (Merali *et al.*, 1999). Dans cette culture axénique, les parasites étaient cultivés sur une membrane poreuse recouverte de collagène, dans du milieu complétement notamment avec de la S-adénosylmethionine (AdoMet), à 31°C dans l'air ambiant. L'AdoMet est l'un des premiers composés impliqués dans le métabolisme des polyamines, métabolisme qui n'est apparemment pas régulé chez *Pneumocystis* (Merali, 1999a). Des études ont montré l'importance de l'AdoMet pour le développement de *Pneumocystis*. *In vitro*, l'AdoMet du milieu est fortement consommée et l'on retrouve deux transporteurs pour ce composé chez le parasite. En revanche aucune activité de synthèse de l'AdoMet n'est détectée. Chez l'animal, la multiplication de *Pneumocystis* est corrélée avec la diminution de la concentration en AdoMet dans le plasma, tous ces éléments suggérant une auxotrophie de *Pneumocystis* pour l'AdoMet (Merali *et al.*, 2000). Cependant, une étude récente a mis en évidence la présence chez *Pneumocystis* du gène *Sam1*, codant pour la S-adenosylmethionine synthétase. Ce gène est transcrit et la protéine produite, suggérant que finalement, *Pneumocystis* ne dépendrait pas d'une source exogène d'AdoMet (Kutty *et al.*, 2008).

INTRODUCTION DU SUJET

INTRODUCTION DU SUJET

Le genre *Pneumocystis* rassemble des microchampignons unicellulaires non cultivables en continu qui colonisent par voie respiratoire les alvéoles pulmonaires de nombreux mammifères (Rabodonirina et al., 2004 ; Chabe et al., 2004 ; Rivero et al., 2008). Ils s'avèrent particulièrement dangereux lorsque le système immunitaire de l'hôte est déficient. Dans ce cas, ils provoquent de graves pneumopathies à issue fatale en l'absence de traitement, appelées pneumonies à *Pneumocystis* (PPc) ou pneumocystoses. Cette pathologie touche principalement les patients greffés sous immunosuppresseurs, les sujets traités par chimiothérapie anticancéreuse ou atteints du SIDA (Catherinot et al., 2010; Calderon et al., 2010a). Ces microchampignons seraient aussi impliqués, en partie, dans les apnées du nourrisson (Vargas et al., 1999 ; Chabé et al., 2004a ; Vargas et al., 2005, Morris et al., 2008), et joueraient également un rôle aggravant dans les bronchiolites des petits enfants (Totet et al., 2001), et dans les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) (Morris et al., 2009).

L'état du système immunitaire est l'élément clé dans le développement de la PPc. Chez les patients VIH positifs, le risque de survenue de cette pneumonie est particulièrement élevé lorsque le taux de lymphocytes T CD4+ (LTCD4) est en dessous de 200 / mm³ et de 300 / mm³ de sang chez les sujets immunodéprimés non infectés par le VIH (Walzer, 1994 ; Mansharamani et al., 2000).

Chez les patients VIH positifs, des études ont révélé des prévalences de colonisation de 10% lorsque le taux de LTCD4 est supérieur à 400 /mm³, une prévalence de 20 % lorsque le taux de LTCD4 est compris entre 60 et 400 /mm³, et une prévalence de 40 % lorsque le taux de LTCD4 est inférieur à 60 / mm³. (Leigh et al., 1993). De plus 30% des patients VIH négatifs sont colonisés par *Pneumocystis* quand le taux de CD4 est inférieur à 400 / mm³ ou lorsque le rapport CD4/CD8 est inférieur à 1 (Nevez et al., 1999a). Toutefois, d'autres études n'ont trouvé aucune association entre les taux de colonisation et celui des LTCD4 chez les patients VIH positifs. (Morris et al., 2004 ; Huang et al., 2003 ; Wakefield et al., 2003).

Il est maintenant bien connu que la réponse lymphocytaire est essentielle dans la défense immunitaire de l'hôte contre *Pneumocystis* spp, ainsi la forte incidence de la PPc chez les patients infectés par le VIH ou l'infection chez l'animal de laboratoire (Thullen et al., 2003) confirme clairement le rôle critique des lymphocytes LTCD4 dans la pathogenèse de

l'infection, avec une relation inverse entre leur nombre dans le sang et le risque de développer ultérieurement une PPc (Masur *et al.*, 1989).

Les lymphocytes T CD8 (LTCD8), qui sont recrutés dans les poumons en grand nombre en réponse à l'infection à *P. jirovecii*, ont été associés à des lésions pulmonaires chez des modèles murins. (Gigliotti *et al.*, 2006 ; Meissner *et al.*, 2005). En effet, l'inflammation médiée par les lymphocytes T CD8 qui inclus un afflux important des lymphocytes et des cellules polymorphonucléaires au niveau des poumons, a été associée à une augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire, et à une diminution de la compliance pulmonaire, de l'oxygénation, et de l'activité du surfactant pulmonaire. En résumé Les LT CD8⁺ ont un effet inflammatoire en l'absence de LT CD4⁺, proportionnel au nombre de récepteurs au TNF- α (Wright *et al.*, 2004 ; Pryhuber *et al.*, 2008). Des taux élevés de TNF- α ont été associés à une augmentation des concentrations pulmonaires des chimiokines, des protéines chimiotactiques monocytaires du type 1 (MCP-1), des protéines inflammatoires de macrophage du type 2, et des facteurs chimiotactiques CINC, ce qui augmente le recrutement de cellules inflammatoires dans les alvéoles, et augmente la preuve histologique d'une PPc liés à l'alvéolite. (Wright *et al.*, 2004).

Les techniques de biologie moléculaire ont également permis de mettre en évidence l'ADN de *Pneumocystis* chez des patients hospitalisés sans pneumocystose, des femmes enceintes, des enfants en bas-âge (on sait d'ailleurs que la primo-infection par *Pneumocystis* a lieu chez 90 % des enfants normaux avant l'âge de 4 ans (Pifer *et al.*, 1978), ainsi que chez des sujets immunocompétents, colonisés par le microchampignon. Dans la littérature, la prévalence de la colonisation par *Pneumocystis* chez les adultes sains (non immunodéprimés et sans maladie pulmonaire) est très variable ; les différences dans les études pourraient être expliquées par la variation du travail ou expositions géographiques des populations, les différences dans les techniques de détection, dans la nature des prélèvements analysés ou différentes caractéristiques des sujets (Morris *et al.*, 2008). Cependant une des plus grandes études menées montre que 20 % des patients sains non immunodéprimés sont colonisés par *Pneumocystis* (Medrano *et al.*, 2005).

En dépit de son importance en santé humaine, l'impact clinico-épidémiologique réel de l'infection par *Pneumocystis* est très probablement sous-estimé. Les travaux du laboratoire ont montré, expérimentalement, que ces hôtes immunocompétents pouvaient contracter par voie respiratoire une infection transitoire après contact étroit avec des hôtes développant une pneumocystose, et qu'ils pouvaient ensuite la transmettre soit à des hôtes susceptibles, soit à d'autres hôtes immunocompétents qui à leur tour pouvaient transmettre le microchampignon

à des hôtes susceptibles qui développaient ensuite la PPc (Dumoulin *et al.*, 2000 ; Chabé *et al.*, 2004). Dans leur ensemble, ces observations nous ont permis de formuler l'hypothèse d'un réservoir dynamique pour *Pneumocystis* représenté par l'ensemble des membres des populations d'hôtes aux statuts immunitaires variés.

L'étroite spécificité d'hôte des populations naturelles de *Pneumocystis* spp. suggère par ailleurs que les populations humaines représentent le réservoir de *P. jirovecii*, seule espèce du genre identifiée chez l'homme. Ainsi, dans les populations humaines, *P. jirovecii* pourrait circuler activement entre les patients atteints de PPc, des sujets immunodéprimés porteurs du microchampignon et des individus immunocompétents, tous pouvant jouer le rôle de source d'infection et de réservoir (Aliouat-Denis *et al.*, 2008).

Par ailleurs, des aspects fondamentaux de la biologie de *Pneumocystis* restent à élucider. Une meilleure connaissance de ces aspects aurait évidemment des retombées sur le plan épidémiologique, diagnostique et thérapeutique. Le mode de développement et le cycle biologique de *Pneumocystis* restent mal connus et nous amènent à nous poser de nombreuses questions biologiques : quelle est la forme infectante ? Quelle relation existe-t-il entre le risque d'infection (portage, maladie) par *Pneumocystis* et le degré d'immunodépression ? Quels signaux permettent l'installation des formes trophiques dans l'alvéole et leur différenciation en formes kystiques ? Pour répondre à ces questions, les difficultés sont nombreuses et liées essentiellement à l'absence de système de culture continue pour *Pneumocystis*, et l'impossibilité de travailler expérimentalement (modèle animal) avec *P. jirovecii*. Ainsi, la fonction des gènes d'intérêts de *Pneumocystis* ne peut être étudiée qu'après leur expression en système hétérologue.

Mon projet de thèse s'inscrit dans un cadre général qui vise à clarifier le mode de vie de *Pneumocystis* en s'intéressant aux mécanismes utiles à sa prolifération dans l'alvéole pulmonaire ainsi qu'à la transmission et la colonisation de *Pneumocystis* sp chez des hôtes aux statuts immunitaires variés. Ce travail de thèse s'est réalisé en cotutelle entre le laboratoire de Biologie et Diversité des Eucaryotes Pathogènes Emergents (BDEEP, CIIL, Institut Pasteur de Lille) et le Laboratoire de Microbiologie Santé et Environnement (Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, Université Libanaise, Tripoli, Liban). Ainsi, les objectifs précis de mon travail s'articulent en deux volets :

1. **Un volet fondamental** qui se déroule à Lille (Laboratoire BDEEP, CIIL, Institut Pasteur de Lille) avec pour objectifs (i) de parvenir à une appréciation quantitative du risque

de contamination par *Pneumocystis* en fonction du degré d'immunodépression de l'hôte exposé. Elle est faite par une approche expérimentale dans un modèle de transmission naturelle de *P. carinii*. Nous avons évalué ainsi l'influence du degré d'immunodépression des hôtes sur le niveau de colonisation par *Pneumocystis*. (ii) de mettre en place dans le laboratoire un modèle d'expression hétérologue des gènes de *P. carinii* afin de pouvoir réaliser prochainement l'étude fonctionnelle des gènes impliqués dans le cycle biologique du microchampignon (résistance au choc oxydant dans l'environnement alvéolaire, mitose, méiose, notamment). La levure *Saccharomyces cerevisiae* a été choisie car phylogénétiquement proche de *Pneumocystis*. Nous avons étudié dans un premier temps le gène *Sod2* qui code pour une MnSOD qui assure une protection contre le stress oxydant et permettrait au microchampignon de proliférer dans l'alvéole pulmonaire.

2. Un volet clinico-épidémiologique qui se déroule au Liban (Université Libanaise, Centre AZM pour la recherche en biotechnologie et ses applications) et dont l'objectif principal est de mesurer le portage de *P. jirovecii* et les facteurs de risque qui y sont associés chez des adultes et enfants atteints de pathologies respiratoires. Il s'agit d'une étude multicentrique prospective, qui est menée dans les Services de Pneumologie adulte de quatre hôpitaux de Tripoli (Liban) : l'Hôpital Nini, l'Hôpital Gouvernemental de Tripoli, l'Hôpital Mazloum et l'Hôpital Monla au cours d'une consultation et/ou d'une hospitalisation pour une pathologie respiratoire.

Les chapitres qui suivent décrivent l'avancée de mon travail de thèse pour chacun des objectifs cités.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

Chapitre 1 : Mise au point d'un système d'expression hétérologue en levure permettant l'étude fonctionnelle de gènes de *Pneumocystis carinii*

Afin de mettre en place un modèle d'expression hétérologue au laboratoire, nous avons choisi un gène connu de *P.carinii*, le gène *Pcsod2* dont la séquence a été identifiée par un chercheur de l'équipe (Denis *et al.*, 1998), dont la fonction est connue (il code pour la superoxyde dismutase à manganèse ou MnSOD) et pour lequel des mutants existent chez *S. cerevisiae*.

1. Provenance des souches fongiques

1.1. Source de *Pneumocystis carinii*

Des rats athymiques nude Lou (Institut Pasteur de Lille) infectés par *P. carinii* sont utilisés comme source de parasites. Les rats sont mis sous dexaméthasone (Merck Sharp & Dohme Chibret, Paris) à une concentration de 1 mg/l dans l'eau de boisson (Dei-Cas *et al.*, 1998). Après deux semaines de traitement, les rats sont inoculés directement par voie endotrachéale avec $10 \cdot 10^6$ *P. carinii*, après une anesthésie courte à l'isoflurane. Le traitement aux corticoïdes est maintenu jusqu'à la fin de l'expérience. Dans ces conditions, les rats développent une pneumocystose intense 6 à 8 semaines après inoculation.

Les rats parasités sont euthanasiés par injection intra-péritonéale par du pentobarbital sodique (600 mg/kg, Sanofi, France). Les poumons sont ensuite prélevés stérilement et transportés à 4°C dans du milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Bio-whittaker, France) sans sérum et contenant des antibiotiques (pénicilline 100 UI/ml, streptomycine 100 µg/ml, France). Puis, ils sont découpés en petits morceaux et mis sous agitation (barreau magnétique) à 4°C pendant 30 à 40 min. dans le même milieu. Après filtration sur gaze, puis successivement sur tamis métalliques de 250 µm et 63 µm, la suspension parasitaire est centrifugée (10 min. à 2900xg, 4°C) et le culot est repris dans un tampon d'hémolyse (NH₄Cl 0,15 M: 9 volumes; Tris/HCl 20 mM pH 7,4: 1 volume), puis incubé 10 min. à 4°C et centrifugé dans les mêmes conditions. Les parasites sont ensuite

purifiés par centrifugation (15 min. à 1000xg, 4°C) sur gradient de polysucrose (Histopaque®-1077, Sigma, France). Les parasites accumulés à l'interface entre le milieu de culture et la solution de polysucrose sont récupérés et lavés deux fois dans du DMEM (10 min. à 2900xg, 4°C). Le culot est repris dans un volume défini de DMEM et les parasites sont quantifiés après coloration au RAL-555 (réactifs RAL, France), colorant panoptique similaire au méthanol-Giemsa (Soulez *et al.*, 1991), mettant en évidence tous les stades parasitaires. Enfin, les parasites ont été cryopréservés dans du sérum de veau fœtal comprenant 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) à l'aide du Cryo 1C Freezing Container (Nalgene®). Ces parasites cryopréservés sont utilisés dans toutes nos expériences.

De ces parasites purifiés sont extraits les ARN messagers, à partir desquels les ADN complémentaires sont synthétisés afin de pouvoir amplifier le gène *Pcsod2* qui code pour la MnSOD.

1.2. Souches de levures et conditions de culture

Une souche de *Saccharomyces cerevisiae* haploïde nommée BY4742, (numéro d'accèsion Y10000 ; génotype: MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0) a été obtenue auprès d'une banque européenne de souches de levures (EUROSCARF, Frankfurt, Allemagne). Elle a été utilisée pour l'extraction de l'ADNg afin d'amplifier le gène (*Scsod2*) codant pour la MnSOD de *S. cerevisiae* qui nous servira de contrôle positif.

Une souche de levure sauvage nommée EG103 (DBY746 ; génotype : Mat α , leu 2-3, 112his3 Δ 1, trp 1-289, ura 3-52, GAL+) et une souche mutante, délétée pour le gène *sod2* EG110 (*sod2 Δ ::TRP1*) ont été obtenues du Pr Edith Gralla (Université de Californie, Los Angeles) pour réaliser l'expression hétérologue du gène *Pcsod2*. La souche EG110 est génétiquement identique à EG103 avec remplacement de la séquence codante pour la MnSOD par celle codant pour TRP1 chez EG110.

Les souches BY4742, EG103 et EG110 sont cultivées sur milieu YPD liquide ou solide (1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Dextrose). Lorsque la souche EG110 est transformée avec le vecteur d'expression portant le gène *Pcsod2* ou *Scsod2*, elle est cultivée sur un milieu synthétique complet supplémenté ou non d'Uracile selon le besoin. On utilise le Glucose comme source de carbone dans le cas d'une culture de routine et le Galactose en cas d'induction de la protéine recombinante (voir paragraphe 4).

2. Extraction des acides nucléiques et amplification des gènes codant pour la MnSOD

2.1. *Pneumocystis carinii*

La première étape de l'étude a consisté à amplifier la séquence du gène codant pour la MnSOD. Pour cela, nous avons extrait les ARN totaux de *P. carinii* en utilisant le Rneasy® Minikit (Qiagen) après lyse de la paroi cellulaire par une méthode de broyage par agitation mécanique en utilisant le *bead mill* (Retsch) à une fréquence de 30 Hz pendant 30 s. Ensuite, l'extraction d'ADN génomique de *P. carinii* a été effectuée en utilisant le QIAamp DNA miniKit (QIAGEN).

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Les ARN totaux de *S. cerevisiae* BY4742 ont été extraits en utilisant le Rneasy® Minikit (Qiagen) après lyse de la paroi cellulaire, plus rigide que celle de *P. carinii*, par une méthode de broyage par agitation mécanique en utilisant le *bead mill* (MM301, Retsch France, Eragny-sur-Oise, France) à une fréquence de 30 Hz pendant 5 min. avec une remise dans de la glace toutes les 30 s. ou par digestion enzymatique de la paroi cellulaire de la levure en utilisant la zymoliase 20T d'*Arthrobacter luteus* (MP Biomedicals, Santa Anna, CA, USA) et la Lyticase d'*Arthrobacter luteus* (25000U, Sigma-Aldrich). Ces deux enzymes hydrolysent les polysaccharides de la paroi des levures, elles possèdent une activité glucanase et coupent les liaisons entre les β -1,3-D glucanes.

En parallèle, comme les introns sont absents dans le gène *Scsod2* de *Saccharomyces cerevisiae* une extraction de l'ADN génomique a été effectuée par une méthode chimique basée sur l'utilisation de l'acétate de lithium (Looke et al., 2011).

Enfin, nous avons synthétisés les ADN complémentaires du microchampignon et de la levure grâce à une RT-PCR à partir des ARN totaux extraits en utilisant le Smarter® pico cDNA synthesis kit (Clontech).

L'amplification des gènes cibles à partir des ADN_g et ADN_c obtenus, nécessite le choix crucial des amorces pour la réussite de cette PCR. Les amorces ont été conçues sur la base de données de séquences disponibles (Denis et al., 1998 ; Johnston et al., 1994) en utilisant le logiciel FastPCR 6.2 et ont été synthétisées et commandées auprès d'Eurogentec (Belgique) :

SodSc-45F (forward) 5'-AAA ATG TTC GCG AAA ACA GCA GCT -3'

SodSc-46R (Reverse) 5'- GAT CTT GCC AGC ATC GAA TCT TCT -3'

SodPc-43F (Forward) 5' - AAA ATG TTA AAG TCA TTT AGA GAT TTG GTT-3'

SodPc-44R (Reverse) 5' - TTG CTC AAA TCG TTG ATT CAT AAC -3'

Les températures d'hybridation de ces amorces sur les matrices d'ADNc ou d'ADNg provenant de *P. carinii* et de *S. cerevisiae* ont été calculées grâce au logiciel FastPCR 6.2.

Les mélanges réactionnels de la PCR étaient identiques pour les deux paires d'amorces: tampon 1X PCR (HotStarTaq plus DNA Polymerase, Qiagen, France), une concentration finale de 2mM pour MgCl₂, 0,4 µM de chaque amorce, 250 µM de chaque dNTP, 2,5 U HotStarTaq plus DNA Polymerase (Qiagen, France). Deux microlitres de la matrice d'ADN de *P. carinii* ou de *S. cerevisiae* ont été ajoutés au mélange réactionnel pour donner un volume final de 50 µl. Les conditions de réaction de PCR étaient les suivantes: étape initiale de dénaturation de l'ADN et activation de la Taq polymérase à 94°C pendant 5 min., suivie de 40 cycles à 94°C pendant 15 s., 53°C (pour l'amplification de *Pcsod2*) ou 58°C (pour l'amplification de *Scsod2*) pendant 15 s., 72°C pendant 1 min., et une étape d'extension finale de 5 min. à 72°C. L'amplification de l'ADN a été réalisée en utilisant un thermocycleur PTC 200 (MJ Research, Foster City, CA, USA). Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et visualisés après coloration au bromure d'éthidium. Les produits amplifiés ont ensuite été purifiés en utilisant le kit Qiaquick PCR purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) avant le clonage.

3. Clonage et contrôle des clones bactériens

Cette étape consistait à insérer *Pcsod2* et *Scsod2* dans un vecteur plasmidique afin d'exprimer ces gènes chez la levure *S. cerevisiae*. Le vecteur plasmidique choisi pour ce clonage (pYES 2.1/V5-His-TOPO®, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) est une molécule d'ADN double brin circulaire de 5886 paires de bases (bp). Ce vecteur possède la particularité de pouvoir se répliquer dans les bactéries *E. coli* mais également dans les levures *S. cerevisiae* : c'est un vecteur navette ou '*shuttle vector*'. Chez la levure, ce vecteur permet l'expression de l'insert sous contrôle du promoteur GAL1. C'est donc un outil de choix pour réaliser le clonage de nos gènes d'intérêt chez la bactérie puis d'étudier leur expression chez la levure. L'insert sera ligué au vecteur par l'action de la topoisomérase I qui est liée de façon covalente sur le vecteur au niveau du site de clonage. Lors de l'amplification des gènes *Pcsod2* et *Scsod2* par PCR, la Taq polymérase ajoute un A à chaque extrémité de l'insert ce

qui facilite la ligation au niveau du site de clonage du vecteur qui comporte des T protrudants à chaque extrémité. Ainsi, le clonage effectué sera non directionnel.

Une fois que les gènes *Pcsod2* et *Scsod2* sont ligués dans le vecteur pYES 2.1, nous procédons à l'étape de transformation, qui correspond à l'intégration de l'ADN recombinant dans un microorganisme. Des bactéries *E. coli* sont rendues « compétentes », c'est-à-dire aptes à intégrer un fragment d'ADN après fragilisation de la paroi. Un choc thermique permet de créer des micropores afin de rendre possible la pénétration du fragment d'ADN (vecteur plasmidique) dans les bactéries. Celles-ci sont alors incubées sous agitation (1 h., 37°C) dans 250 µl de SOC liquide (« *Super Optimal broth with Catabolite repression* »), un milieu riche leur permettant de réparer leur paroi et de reprendre une croissance normale plus rapidement. Les bactéries transformées seront alors étalées sur les boîtes de Pétri contenant du milieu LB (Lysogeny Broth) Agar additionné d'Ampicilline (100µg/ml). Cet antibiotique permet la sélection des bactéries *E. coli*, transformées par le vecteur pYES2.1 puisque celui-ci porte le gène de résistance à l'ampicilline.

Après une nuit d'incubation à 37°C, les bactéries résistantes à l'ampicilline et ayant intégré le plasmide pYES 2.1/V5-His-TOPO® ont formé des colonies que l'on prélève stérilement afin de purifier le vecteur plasmidique qu'elles contiennent et vérifier si l'insert (*Pcsod2* ou *Scsod2*) y est présent. Après mise en culture des colonies bactériennes résistantes dans du milieu LB liquide additionné d'ampicilline (100µg/ml) à 37°C durant une nuit, les plasmides sont purifiés en utilisant le QIAPREP® spin miniprep kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

Une étape importante consiste à vérifier si l'insert est bien présent dans le plasmide, dans le bon sens de lecture et à la bonne place c'est-à-dire sous contrôle du promoteur GAL1 qui induit l'expression du gène en présence de galactose. Ceci est réalisé par digestion enzymatique à l'aide de l'enzyme de restriction *Age I* (Promega, Madison, WI, USA) ou par l'amplification de l'insert en utilisant des amorces universelles (GAL1-F et V5-R) situées sur le vecteur de part et d'autre du site de clonage. Nous vérifions également par séquençage que le gène soit inséré dans le bon cadre de lecture (absence de délétion/insertion) et qu'il n'y ait pas de mutations (dus aux erreurs de copie de la Taq polymérase) qui induiraient des changements de la séquence en acides aminés et pourrait alors affecter la conformation et la fonction de la MnSOD.

4. Transformation de la levure *S. cerevisiae* déficiente en MnSOD avec les vecteurs plasmidiques d'expression portant les gènes *Pcsod2* et *Scsod2*.

Les vecteurs plasmidiques ont été purifiés à partir d'*E. coli* puis transformés dans la souche *S. cerevisiae* EG110 déficiente en activité MnSOD. La méthode de transformation des levures par l'acétate de lithium (Gietz *et al.*, 1995) consiste à créer des pores dans la paroi des levures afin qu'à la suite d'un choc thermique l'ADN plasmidique portant le gène à exprimer puisse entrer dans les cellules. Ainsi, les cellules de *S. cerevisiae* EG110 ont été cultivées pendant une nuit à 30°C dans un milieu YPD liquide, puis diluées à une DO₆₀₀ de 0,4 dans un volume de 50µl de YPD et cultivées 2 à 4h. supplémentaires à 30°C. Le culot cellulaire est ensuite lavé dans 40 ml de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, et mis en suspension dans 2 ml de tampon d'acétate de lithium 0,1 M, Tris-HCl 5mM (pH 7,5) – 0,5 mM EDTA. Après 10 min. d'incubation à température ambiante, 1 µg d'ADN de plasmide recombinant (portant le gène *Pcsod2* ou *Scsod2* ou sans insert) et 100 µg d'ADN de sperme de saumon (Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO, USA) sont ajoutés à 100 µl de la suspension de levures. Ensuite 700 µl d'acétate de lithium 0,1M - 40% PEG 3350, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) - EDTA 1 mM sont ajoutés à la suspension. Les cellules ont ensuite été incubées à 30°C pendant 30 min., puis soumises à un choc thermique à 42°C pendant 7 min., avant d'être étalées sur un milieu sélectif (milieu synthétique complet sans uracile, SC-U).

La sélection des transformants-levures ayant intégré le plasmide peut se faire grâce au gène *ura3* présent sur pYES 2.1 qui permet à la levure de compléter l'auxotrophie pour l'uracile et donc de pouvoir croître sur un milieu ne contenant pas d'uracile.

5. Détection de la protéine recombinante MnSOD par Western Blot.

L'induction de l'expression des protéines recombinantes MnSOD a été réalisée pour les transformants levures ayant intégré le gène *Pcsod2* (EG110-Pc) ou *Scsod2* (EG110-Sc). Une fois la culture de *S. cerevisiae* en début de phase exponentielle de croissance, 2 % de galactose ont été ajoutés dans le milieu de culture pour induire l'expression des gènes *Pcsod2* et *Scsod2* puisque l'expression de l'insert est sous contrôle du promoteur GAL1. L'expression des MnSOD recombinantes a été induite à 30°C pendant 24h. et a été confirmée par une analyse en Western blot. A cet effet, une extraction des protéines totales a été réalisée, les levures transformées ont été culotées par centrifugation (1600xg, 10 min., 4 ° C) et lavées deux fois dans de l'eau distillée stérile à 4°C. Le culot a été mis en suspension dans 500 µl de tampon RIPA (150 mM NaCl, 1,0% IGEPAL ® CA - 630, 0,5% désoxycholate de sodium, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8,0) contenant des inhibiteurs de protéases (protease inhibitor

cocktail set IV; Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Les cellules de levure ont ensuite été lysées par une agitation vigoureuse avec des billes en verre (0,4 à 0,6 mm, Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO, USA) dans un *bead mill* (Retsch) pendant 2 min. à une fréquence de 30 Hz (séparés par 1 min. de refroidissement sur de la glace pilée). Après centrifugation pendant 5 min. à 10 000xg, le surnageant a été transféré dans un nouveau tube. Les cellules lysées et les billes en verre ont été lavées avec 300 µl de tampon RIPA, et le surnageant recueilli a été mis en commun avec le précédent. Les protéines solubles totales obtenues ont été quantifiées en utilisant bicinchoninic acid protein (BCA) assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA), en utilisant de l'albumine de sérum bovin comme standard.

Trente-cinq µg d'extrait protéique total de chacune des souches de levure transformées ont été dilués dans du tampon-SDS (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % glycerol, 2 % SDS, 5 % β- mercaptoethanol), et dénaturés au bain marie à 100°C pendant 5 min. Le SDS-PAGE a été réalisé selon le protocole décrit par Laemmli (Laemmli, 1970) dans un système mini-protean (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Les extraits protéiques ont été séparés sur gel de polyacrylamide 10 % (p/v) à 30 mA pendant 45 min. et transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les sites antigéniques aspécifiques ont été bloqués pendant 30 min. avec du tampon TNT (Tris 20 mM, NaCl 500 mM et 0,1% de Tween, pH 7,5) contenant 1 % de lait. Les membranes ont été rincées trois fois pendant 5 min. à chaque fois avec du TNT – 0,5% de lait. La détection des protéines recombinantes s'effectue en réalisant une incubation avec l'anticorps anti-V5 (mouse monoclonal IgG, dilution 1:5000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pendant 1 h. à température ambiante ; en effet, les MnSOD de *P. carinii* et *S. cerevisiae* sont traduites en fusion avec un épitope de 14 acides aminés appelé l'épitope V5 situé du côté N-terminal. Le complexe MnSOD-épitope V5-anticorps anti-V5 a ensuite été révélé par incubation avec un anticorps secondaire anti- IgG de souris (dilution 1:5000; Zymed Laboratories™, Life technologies, Carlsbad, CA, USA) conjugué à la peroxydase de raifort (HRP). Après addition du substrat ECL (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Pierce™ ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA), le signal chimioluminescent a été mesuré par un analyseur d'images luminescentes (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany).

6. Séquençage N-terminal de la protéine recombinante MnSOD de *P. carinii*

Une fois séparée par électrophorèse sur SDS-PAGE, la bande correspondante à la protéine MnSOD recombinante de *P. carinii* et exprimée chez la souche de levure EG110 a été excisée et envoyée à l'unité d'immunochimie MRC, (département de Biochimie, Université d'Oxford, Royaume-Uni) pour le séquençage N-terminal par une dégradation d'Edman en utilisant un séquenceur en phase gazeuse (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

7. Immunolocalisation des protéines recombinantes exprimées chez la levure

Afin de faciliter l'immunolocalisation de la MnSOD recombinante, des sphéroplastes sont produits à partir des souches de levures transformées. Le protocole utilisé se base sur celui décrit par Li et Cutler (Li et Cutler, 1991). Ainsi, les levures transformées ont été cultivées jusqu'à la phase exponentielle de croissance pendant 24 h. à 30°C en milieu Synthétique Complet (SC) contenant 2% de glucose, mais dépourvu d'uracile. Ensuite, l'expression de protéines recombinantes a été induite par la commutation de source de carbone à 2% de galactose (24 h. à 30°C). Les cultures cellulaires induites sont ensuite lavées 3 fois dans l'EDTA 0,1 M, puis 2 ml d'EDTA 0,1 M 1% β -mercaptoéthanol sont ajoutés par gramme de culot cellulaire et la suspension de levures est incubée pendant 15 min. à température ambiante.

Après centrifugation (2000xg, 5 min.), les levures sont suspendues en EDTA (0,1 M) / sorbitol (1 M) supplémenté par 80 UI.g⁻¹ de zymoliase 20T d'*Arthrobacter luteus* (MP Biomedicals, Santa Anna, CA, USA). La digestion des parois cellulaires de levure est réalisée pendant 30 min. à 30°C et est arrêtée sur glace (10 min.) ce qui permet ainsi la conversion des levures en sphéroplastes. Enfin, ceux-ci sont centrifugés (2000xg, 5 min.), lavés trois fois et suspendus dans 0,6 M KCl pour obtenir une concentration finale de 10⁶ cellules/mL. Des gouttes calibrées de 20 μ l (environ 2x10⁴ sphéroplastes) sont déposées sur des lames d'immunofluorescence, séchées puis fixées 30 min. dans du méthanol 100 %.

Les sphéroplastes sont ensuite incubés pendant 30 min. à 37°C avec 20 μ l d'anticorps monoclonal anti-Cox IV (anti-yeast complex IV subunit III mouse monoclonal antibody, (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) à une dilution au 1/50^e. Cet anticorps est une IgG2a de souris qui reconnaît le complexe mitochondrial IV de l'homme, des bovins, de la souris, du rat et de *S. cerevisiae* et permet ainsi de marquer les mitochondries. Après lavages, les sphéroplastes sont incubés 30 min. à 37°C avec 20 μ l d'anti-IgG de souris marqué avec

l'Alexa 647 (Molecular probes®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) dilué au 1/25^e. Après lavages, les sphéropastes sont incubés 30 min. à 37°C avec l'anti-V5 tag-FITC (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dilué au 1/250^e additionné de DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dilué au 1/5000^e puis visualisés en utilisant l'Apotome-AxioImager Z1 (Zeiss, Oberkochen, Germany) équipé d'une caméra AxioCam MRm (12 bits, 24 MHz).

8. Etude fonctionnelle : tests de sensibilité à la ménadione

Les souches de levure transformées ont été étudiées pour leur capacité à croître dans des milieux liquides ou solides en présence de ménadione (menadione sodium bisulfite, Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO, USA), un inducteur d'anion superoxyde.

Après 24 h. d'expression des protéines recombinantes, les cultures cellulaires sont centrifugées à 1125xg pendant 5 min. à température ambiante, le culot cellulaire est resuspendu dans 5 ml du PBS-1X stérile puis dilué pour arriver à une concentration finale de 10⁴ levures à déposer dans chaque puits d'une plaque 96 puits à fond plat. La croissance des transformants levures dans un milieu synthétique sans uracile, supplémenté en glucose est suivie pendant 50 h. à 30°C. Cette étude est réalisée en sextuplets. Le stress oxydant est créé par l'ajout de différentes concentrations finales (0 mM, 0,5 mM et 1 mM) de ménadione sodium bisulfite (Sigma). Afin de suivre la croissance des levures, les densités optiques des cultures sont mesurées à 595nm et enregistrées toutes les heures par un spectrophotomètre (EL 808 ultra microplate reader, BioTek instruments, Inc., USA) piloté par le logiciel Gen 5TM BioTek. Les cinétiques de croissance ont été réalisées sur 6 réplicats par souche testée.

Le temps de doublement a été calculé, pour chaque réplica expérimental, à partir de la phase exponentielle de croissance en utilisant la formule suivante: Temps * (Ln2 / (Ln (DO finale / DO initiale))). La moyenne et les écarts-types des 6 temps de doublement de chaque souche ont ensuite été calculés.

La sensibilité à la ménadione est également testée en milieu solide (*yeast spotting*) Les levures transformées sont préalablement induites pour l'expression de ScMnSOD ou PcMnSOD. Les levures sont ensuite diluées pour atteindre une concentration finale de 2.10⁶ cellules/ mL puis diluée en série jusqu'à atteindre 2.10² cellules/ mL. Cinq microlitres de suspensions de levures à différentes concentrations sont déposés sur des boîtes de Pétri contenant un milieu synthétique solide sans uracile supplémenté en glucose sans ou avec 0,5 mM de ménadione. Les boîtes sont incubées pendant 72 h. à 30°C avant lecture.

9. Analyse statistique

Les valeurs moyennes des temps de doublement de la souche parentale sauvage EG103 et des souches mutées EG110 complémentées soit avec le vecteur seul, soit avec le vecteur contenant le gène *Pcsod2* ou le gène *Scsod2* ont été comparées entre elles en utilisant le test non paramétrique de rangs de Kruskal-Wallis. Les comparaisons ont été faites entre les différentes souches aux différentes concentrations de ménadione. Les analyses ont été réalisées par le logiciel SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque la valeur de p (p -value) était inférieure à 0,05.

Chapitre 2 : Etude de la colonisation par *Pneumocystis* en fonction du statut immunitaire de l'hôte exposé

Cette partie de mon travail de thèse vise à rechercher la relation qui existe entre le degré d'immunodépression des hôtes et le risque d'infection par *Pneumocystis* sp.

Dans un premier temps, un modèle animal a été développé afin d'obtenir plusieurs niveaux d'immunodépression suffisamment stables dans le temps pour permettre l'étude de susceptibilité vis-à-vis de *P. carinii*. Pour cela, une première expérience a été menée en utilisant différents doses de dexaméthasone (Merck Scharp & Dohme Chibret, Paris) : 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, et 2 mg/l nous permettant ainsi de choisir les doses adaptées pour la seconde étape consistant à explorer la colonisation des rats en fonction du degré d'immunodépression, dans un modèle de transmission naturelle de *P. carinii*.

1. Mise en place d'un modèle expérimental d'immunodépression graduelle chez le rat

Notre étude a été réalisée sur 72 rats femelles Sprague-Dawley OFA *Pneumocystis*-free de 250 g (Charles River, France). Les doses de dexaméthasone à 0.1, 0.3 et 2 mg/l ont été choisies pour notre étude. En effet, les résultats de notre expérience préliminaire montrent que les doses 0.2 et 0.4 mg/l donnent des résultats similaires aux doses 0.1 et 0.3 mg/l, respectivement. Les biberons contenant la dexaméthasone sont renouvelés trois fois par semaine.

Huit lots de 9 rats sont préparés comme suit :

- Dexaméthasone 0.1 mg/L dans l'eau de boisson (2 lots)
- Dexaméthasone 0.3 mg/L dans l'eau de boisson (2 lots)
- Dexaméthasone 2 mg/L dans l'eau de boisson (2 lots)
- Lot contrôle sans dexaméthasone (2 lots)

Deux lots ont été préparés pour chaque dose sachant qu'un lot est destiné à être mis en contact avec des rats développant la pneumocystose et un lot sans aucun contact (groupes contrôles). Chaque rat est suivi de manière individuelle (marquage à l'oreille).

Le schéma global de l'expérience est montré sur la **figure 7**. Le degré d'immunodépression des rats est apprécié après une Numération Formule Sanguine (NFS) suivie d'un comptage précis des lymphocytes TCD4 et TCD8. Pour cela, 1,5 ml de sang (soit 7,5% du volume sanguin total) est prélevé au niveau du sinus retro-orbital à l'aide d'une pipette Pasteur coupée court et rincée avec de l'héparine (Héparine Choay® , 25000 UI/5mL, Sanofi Aventis) puis collecté dans des tubes EDTA (Venosafe™, 5ml, 13x75mm, ref : VF-053SDK, Terumo) ; cet acte s'effectue sous anesthésie à l'isoflurane (AErrane, Baxter – Belgique). Ces prélèvements sanguins sont réalisés avant (S0) puis toutes les 2 semaines, pendant 4 semaines, post-administration des corticoïdes (S2, S4) (**Figure 7**). Les NFS sont réalisées immédiatement dans le laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Lille, puis le comptage absolu des lymphocytes TCD4 et TCD8 est réalisé au laboratoire après immunomarquages spécifiques et analyse en cytométrie de flux.

Enfin, des sérologies *P. carinii* (immunofluorescence indirecte) sont réalisées à S0, S2 et S4 pour les IgM et les IgG anti-*Pneumocystis* (**Figure 7**).

1.2. Détermination du nombre absolu de lymphocytes TCD4 et TCD8

1.2.1. Numération Formule Sanguine (NFS)

Un millilitre de chaque échantillon sanguin est analysé par un automate (Beckman Coulter) du Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Pasteur de Lille pour avoir une Numération Formule Sanguine (NFS). Cet automate mesure le nombre de globules rouges, de globules blancs et de plaquettes, ainsi que la concentration en hémoglobine et le volume Globulaire Moyen (VGM), puis en déduit l'hématocrite, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH). La formule leucocytaire est déterminée sur un frottis sanguin coloré de manière automatisée.

1.2.2. Immunomarquage et analyse par cytométrie de flux

La détermination du nombre absolu de lymphocytes TCD4 et TCD8 a nécessité une mise au point complète au laboratoire notamment pour les méthodes de lyse des globules rouges et des marquages des populations lymphocytaires.

Tout d'abord, 500 µl de sang de rat sont incubés pendant 15 min. à température ambiante avec 45 ml de tampon de lyse des globules rouges (Tris/HCl 20 mM pH 7,4 : 1volume + 900 NH₄Cl 0,15 M : 9 volumes). Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS, (290xg, 15 min. 4°C) puis le culot est repris par 1 ml de PBS enrichi avec 2% de sérum de

veau fœtal (PBS/SVF) pour comptage des cellules sanguines sur cyturine (FAST-READ 102[®], Biosigma, Cona Ve, Italie). Les cellules lymphocytaires obtenues sont ensuite réparties dans les puits d'une plaque 96 puits à fond rond à raison de 500 000 cellules/puits et culotées par centrifugation à 458xg, pendant 5 min. à 4°C.

Les anticorps utilisés pour marquer les populations lymphocytaires sont les suivants :

- Un anticorps TCR conjugué au FITC (Mouse anti-rat TCR alpha, SeroTec) qui marque les lymphocytes T.
- Un anticorps anti-CD4 marqué à la Phycoérythrine, PE (Rat CD4 R-PE conjugate, Invitrogen) qui marque les lymphocytes TCD4.
- Un anticorps monoclonal anti-CD8, (OX8CD8-Biotine) et révélé par la streptavidine APC (BD Biosciences Pharmingen[™]) qui marque les lymphocytes TCD8.

Un triple marquage est ainsi réalisé pour l'ensemble des populations lymphocytaires où 100 µl d'un mélange d'Ac (TFITC au 1/500, CD4PE au 1/500, OX8CD8 BIOT au 1/100) est rajouté, les cellules sont ensuite incubées 30 min. sur glace et à l'obscurité. Les dilutions d'anticorps sont réalisées dans du PBS/SVF. Après deux lavages dans du PBS/SVF, de la streptavidine a été ajoutée dans les puits concernés suivi d'une incubation de 10 min. sur de la glace pour détecter l'anticorps monoclonal biotinylé. Enfin les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS/SVF, (458xg, 5 min. 4°C) et reprises dans 150 µl du PBS/SVF2% pour une analyse en cytométrie de Flux (FacsCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). L'analyse de la fluorescence a été effectuée avec le logiciel CellQuest (FACScan; BD Biosciences) sur un total de 10 000 événements acquis.

2. Etude de la colonisation par *Pneumocystis carinii* en fonction du degré d'immunodépression

2.1. Protocole de transmission naturelle de *P. carinii* par voie aérienne

Des rats nude développant la pneumocystose sont mis en contact direct (même cage) durant 2 semaines avec des rats Sprague-Dawley OFA *Pneumocystis* free soumis aux différentes doses de dexaméthasone (**Figure 7**). Le ratio est établi à 2 rats nude développant une PPc pour 3 rats Sprague Dawley.

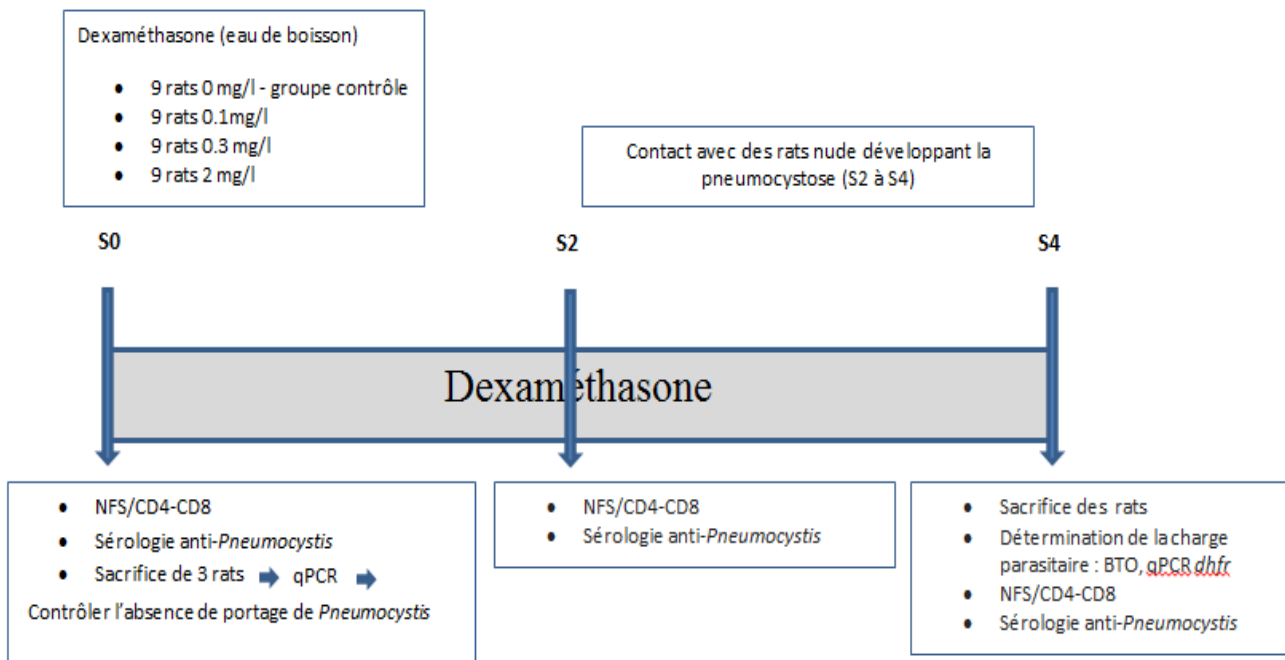


Figure 7. Schéma descriptif de la mise en place et du suivi du modèle animal d'étude de la colonisation par *P. carinii* en fonction de la dose de corticoïdes. La même expérience est réalisée sans que les rats soient en contact avec des animaux développant la pneumocystose. Cette étude a été réalisée sur 72 rats femelles Sprague-Dawley OFA *Pneumocystis*-free de 250 g (Charles River, France). Quatre lots de 9 rats ont été préparés et mis sous dexaméthasone aux doses suivantes : 0, 0.1, 0.3 et 2mg/L dans l'eau de boisson. Après 2 semaines de traitement (S2), les rats sont mis en contact direct pendant une durée de 2 semaines avec des rats nude développant la pneumocystose (S2 => S4). Quatre autres lots identiques sont constitués et correspondent aux rats sans contact (groupes contrôles). Des prélèvements sanguins sont réalisés au sinus rétro-orbital chez les 72 rats à S0, S2 et S4. Le statut immunitaire des rats est suivi en réalisant une Numération Formule Sanguine, et un comptage absolu des lymphocytes TCD4 et TCD8 après des immunomarquages spécifiques et analyse en cytométrie de flux. Des sérologies *P. carinii* (immunofluorescence indirecte) sont également réalisées à S0, S2 et S4 pour les IgM et les IgG anti-*Pneumocystis*. Au temps S4, tous les rats sont sacrifiés et la charge parasitaire est déterminée après coloration au BTO ou par qPCR sur le gène *dhfr* de *P. carinii*. A S0, une qPCR DHFR est également réalisée sur un lot de rat afin de vérifier le statut *Pneumocystis*-free garantie par Charles River.

Les animaux sont hébergés dans des armoires ventilées à flux d'air stérile (Flux France, Wissous, France) mises en surpression. Les rats sans contact sont placés dans des armoires différentes que ceux co-herbergés avec les rats nude infectés par *P. carinii*.

2.2. Etude de la colonisation des rats Sprague-Dawley par *P. carinii*

A la fin de l'expérience (S4) les rats sont euthanasiés par injection intra-péritonéale d'une dose létale de pentobarbital sodique (600 mg/kg, Sanofi, France), Les poumons sont ensuite prélevés stérilement et transportés à 4°C dans du milieu de culture DMEM, Bio-whittaker, France) pour une extraction de *P. carinii* (Aliouat *et al.*, 1993). Brièvement, les poumons sont découpés en petits morceaux puis broyés à l'aide du Stomacher pendant 10 min. dans 10 ml de PBS. Le broyat est alors filtré sur gaze puis successivement sur tamis métalliques de 250 µm et 63 µm, et centrifugé 10 min. à 2900xg à 4°C. Le culot est repris par 10 ml de tampon d'hémolyse (NH₄Cl 0,15 M: 9 volumes; Tris/HCl 20 mM pH 7,4: 1 volume), puis incubé 10 min. à 4°C et centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot est ensuite repris dans un volume précis de PBS et des gouttes calibrées sont réalisées pour être colorées au RAL-555 et au Bleu de Toluidine Ortho (BTO). Le culot de l'extrait parasitaire est ensuite congelé à -80°C pour les analyses moléculaires ultérieures.

En effet, deux méthodes d'évaluation de la colonisation par *Pneumocystis* ont été utilisées, elles sont décrites dans les paragraphes suivants.

2.2.1. Comptage microscopique des kystes après coloration au Bleu de Toluidine Ortho

Le BTO colore spécifiquement la paroi, riche en β-glucanes, des kystes de *Pneumocystis*. Cependant les kystes ne représentent que 3 à 5% de la population parasitaire totale, la majorité des formes étant représentée par les formes trophiques. Le RAL-555 est un Giemsa rapide qui colore tous les stades parasitaires mais malheureusement, du fait de la richesse en débris pulmonaires et la pauvreté en microchampignons, la lecture au RAL-555 a été rendue très difficile et surtout peu fiable. Ce constat nous a obligé à trouver une alternative pour estimer autrement et plus précisément la charge fongique chez les rats Sprague Dawley mis en contact.

2.2.2. Détection et quantification de *P. carinii* par qPCR au locus *dhfr* (Dihydrofolate réductase).

Pour estimer précisément la charge parasitaire en *P. carinii* dans les poumons des rats, nous avons choisi d'amplifier et de quantifier le gène monocopie codant pour la DHFR (dihydrofolate réductase) de *P. carinii*, à partir de l'ADN extrait du culot parasitaire. Pour réaliser cette qPCR (quantitative PCR), une méthode basée sur l'utilisation du Sybr green[®],

un agent intercalant capable d'émettre un signal fluorescent une fois lié à l'ADN double brin sans toutefois reconnaître une séquence particulière, a été utilisée.

Une fois la PCR terminée, il est possible d'identifier et de contrôler la spécificité de la qPCR, et le ou les produits amplifiés en établissant une courbe de fusion. Chaque amplifiat double brin à une température de fusion ou T_m (melting temperature) spécifique définie comme étant la température pour laquelle 50% de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin. Le T_m dépend du milieu réactionnel, de la concentration en sels, du pourcentage en guanine et cytosine (GC%) et est propre à chaque produit amplifié.

L'avantage du Sybr green® est sa très grande sensibilité. Il nous permet ainsi de détecter *Pneumocystis* chez des rats qui sont très faiblement colonisés.

Cette qPCR est systématiquement couplée à un dosage préalable de l'ADN extrait du culot parasitaire par picogreen® pour normaliser nos résultats et éviter notamment un biais de quantité de matrice. Les résultats sont rendus sous forme d'un rapport : nombre de copies du gène de *dhfr* par ng d'ADN. La taille du génome de *P. carinii* (8.2 Mb) (Stringer et Cushion, 1998), étant négligeable par rapport à celle de génome du rat, *Rattus norvegicus* (2.8 Gb), cela revient à rapporter le nombre de copies du gène de *dhfr* par ng d'ADN de rat.

Pour mettre au point cette qPCR nous avons aligné dans Seaview v.4.2.12 les séquences du gène *dhfr* de *P. carinii* qui sont disponibles dans les bases de données. Nous avons conçu les nouvelles paires d'amorces dans les régions conservées du gène. Après analyse des différents paramètres de qualité des « primers » avec FastPCR v.6.0 et Oligocalc (par exemple, T_m , GC%, structure en épingles à cheveux, homo- ou hétéro-dimères), nous avons choisi une paire d'amorces optimale et avons vérifié sa spécificité vis-à-vis de *P. carinii* par une recherche BLAST contre la base de données nr du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les amorces choisies sont décrites ci-dessous :

Amorce sens *dhfrPc* : 5'-GTATTCCTTTGCAATTTTCGGCCCCCTTAAA-3' (29 bases)

Amorce anti-sens *dhfrPc* : 5'-AGCATGATCCAAGGATTTTGCAGAATGAATT-3' (31 bases)

La sensibilité de notre nouvelle qPCR a été évaluée après clonage du produit de PCR ciblant le gène *dhfr* de *P. carinii* dans le vecteur PCR ® 2.1-TOPO ® en utilisant le TOPO ®

TA Cloning ® kit (Invitrogen, France) et en analysant une série de dilutions de la séquence clonée (10^6 - 10^0 nombre de copies / réaction).

Les essais de qPCR ont été effectués sur Rotor-gene™ 6000 (Life science, Australia), dans un volume final de 20 µl en utilisant 10 µl du SybrGreen 2X (Brilliant II Sybr®Green qPCR Master Mix, Agilent Technologies), avec une concentration finale en amorces de 500nM, et de 2 µl de prise d'essai des échantillons d'ADN normalisés à 35 ng/ µl.

Après une dénaturation de 95°C pendant 10 min. pour activer la Taq polymerase, deux étapes se succèdent : l'amplification comprenant une dénaturation à 95°C pendant 15 s. suivie d'une hybridation à 56°C pendant 15 s., puis d'une élongation à 72°C pendant 22 s. (*42 cycles), et l'étape de fusion (90 s. à 95°C puis ramping de 52°C à 95°C, augmentation de 1°C / étape). L'acquisition se fait à la fin de l'hybridation. Chaque échantillon est testé en triplicat. Cette méthodologie a également été appliquée à des lots de rats dès leur arrivée dans notre animalerie afin de vérifier leur statut « *Pneumocystis*-free » garantie par la société Charles River France (**Figure 7**).

2.3. Détermination du taux d'anticorps anti-*Pneumocystis carinii*

Les titres en anticorps (IgM, IgG) anti-*Pneumocystis* ont été déterminés par un test d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur lame où chaque puits contient 2.10^6 *P. carinii*. Des dilutions en série des sérums (pur à 1/400) ont été préparées dans du tampon PBS puis incubées sur les lames de *P. carinii*. Les anti-IgM ou anti-IgG de rat couplés à l'Alexa 488 (Alexa 488 goat anti-rat IgM (chaîne µ) ou IgG (H+L), Invitrogen) ont été utilisés en tant que anticorps secondaires. Les sérums et les conjugués ont été incubés à 37°C dans une chambre humide pendant 30 min., les lames ont été rincées et lavées après chaque période d'incubation (2 x 5 min.) avec du PBS. Un contrôle positif (sérum polyclonal de rat anti-*P. carinii*) ainsi qu'un témoin conjugué sont inclus dans chaque test. Le titre en anticorps correspond à la plus haute dilution offrant encore une fluorescence positive.

4. Analyse statistique

Les variables continues sont décrites par leur moyenne ± déviation standard ou leur médiane [25e-75e percentiles].

L'analyse de l'évolution du nombre de CD4 et du nombre de CD8 a été réalisée par Dr. Claire Pinçon de l'Université Lille 2 et Dr. Sani Hlais de l'Université Libanaise, par une analyse de covariance avec mesures répétées (PROC MIXED). Chaque modèle incluait la

semaine de mesure, le groupe d'expérience et leur interaction. En raison de la distribution non symétrique des nombres de CD4 et CD8, une transformation log a été utilisée. La structure de la matrice de covariance des mesures répétées a été spécifiée comme étant de symétrie composée (type CS). Les nombres de parasites moyens selon la dose en semaine 4 ont été comparés par une analyse de variance à un facteur à effets fixes (PROC MIXED). En raison de la non-normalité des variables, une transformation log a été utilisée. Les paramètres des modèles (à mesures répétées ou pour échantillons indépendants) ont été testés par des contrastes polynomiaux. Les hypothèses sous-jacentes de chaque régression ont été vérifiées graphiquement à l'aide des résidus. Les corrélations entre les variables ont été testées en utilisant le coefficient de Spearman en raison de l'absence de normalité des variables. Le degré de signification a été fixé à 5%. Cette partie de l'analyse a été effectuée avec SAS (SAS Institute, Cary, NC, États-Unis).

Chapitre 3 : Evaluation du portage de *Pneumocystis jirovecii* chez les enfants et les adultes atteints de pathologies respiratoires dans plusieurs hôpitaux de Tripoli (Liban).

1. Inclusion des patients

Cette étude a été approuvée par des commissions d'examen institutionnels entre l'Université Libanaise d'une part et chacun des hôpitaux suivants d'autre part : hôpital gouvernemental de Tripoli, hôpital Nini, hôpital al Mazloum et hôpital el Monla.

Les patients ont été recrutés entre Juillet 2012 et Octobre 2013. Ils étaient inclus dans l'étude s'ils (i) étaient vus en consultation ou hospitalisés, et (ii) présentaient une infection ou affection respiratoire (asthme, allergie, bronchite, grippe, pneumonie, rhinopharyngite, fibrose pulmonaire, BPCO, cancer pulmonaire).

Par contre les patients étaient exclus de notre étude s'ils (i) étaient hospitalisés depuis plus de 48h, (ii) présentaient une infection respiratoire d'origine nosocomiale ou (iii) avaient reçu un traitement anti-*Pneumocystis* (par exemple par sulfaméthoxazole et/ou triméthoprime, atovaquone, pentamidine) dans les 6 mois précédant la date d'inclusion.

2. Collection des données cliniques et biologiques

La collecte des données à partir des dossiers cliniques a été réalisée grâce à un questionnaire standardisé (Annexe 1). Ce questionnaire regroupe les données épidémiologiques et sociodémographiques du patient (âge, sexe, cadre de vie), les résultats des différents examens biologiques (bactériologie, mycologie, hématologie, virologie), les données cliniques (affections avec déficit de l'immunité, pathologie respiratoire, autres pathologies, symptômes), les traitements en cours, ainsi que les facteurs de risques potentiels de colonisation par *Pneumocystis* (tabagisme, grossesse). Les principales caractéristiques recueillies pour l'ensemble des patients sont regroupées dans le **Tableau 3**.

3. Types de prélèvements réalisés chez les patients

Cent trente-quatre échantillons respiratoires provenant de 134 patients ont été recueillis. Ils incluaient 56 liquides de lavage oropharyngé (LROP), 37 crachats, 14 lavages broncho-alvéolaires (LBA), 15 aspirations endo-trachéales, et 12 écouvillons nasaux. Sur ces 134 patients, 56 étaient des femmes et 78 étaient des hommes. L'âge moyen était de 52 ans.

Tableau 3- Caractéristiques des patients inclus

Pathologies respiratoires sous-jacentes	Lieux de recrutement des patients						Age moyen	Sex ratio	Facteurs de risque potentiels de colonisation par <i>Pneumocystis</i>			
	Hôpitaux			Centre de soins médicaux	Total (n=134)	Cancer ^a			Déficits immunitaires ^b	Cortico-thérapie	Antibio-thérapie ^c	
	Nini	Gouvernemental	Mazloun									Monla
BPCO	17	5	0	1	23 (17,1%)	0	1,9	0	1/23 (4,3%)	4/23 (17,3%)		
Bronchite	17	4	2	2	27 (20,1%)	2	2,4	0	0	3/27 (11,1%)		
Fibrose pulmonaire	0	1	0	0	1 (0,7%)	0	1/0	0	0	0		
Grippe	13	0	3	1	17 (12,7%)	0	1,1	8/17 (47,0%)	1/17 (5,9%)	1/17 (5,88%)		
Rhinopharyngites	7	0	4	4	33 (24,6%)	18	0,9	5/33 (15,1%)	1/33 (0,03%)	1/33 (3,0%)		
Asthme	4	1	1	2	14 (10,4%)	6	0,8	1/14 (7,1%)	1/14 (7,1%)	1/14 (7,1%)		
Pneumonie	1	2	0	1	4 (2,9%)	0	0,5	0	1 (sarcoïdose) (25%)	1/4 (25%)		
Infections respiratoires	6	0	2	0	8 (6,0%)	0	1,7	0	0	0		
Œdème aigu pulmonaire	0	0	0	1	1 (0,7%)	0	1/0	0	0	0		
Syndrome de détresse respiratoire	2	0	2	0	4 (3,0%)	0	1	0	0	0		
Cancer pulmonaire	2	0	0	0	2 (1,5%)	0	2/0	2/2 (100%)	0	0		
Total	69	13	14	12	134 (100%)	26	1,4	16/134 (11,9%)	1/134 (0,7%)	10/134 (7,4%)		

BPCO: Broncho-pneumopathie chronique obstructive

a: Cancer hors pulmonaire, b: déficits immunitaire hors cancer, c: Antibiotiques les plus utilisés : colistine, amoxicilline/acide clavulanique, ciprofloxacine, norfloxacine

L'ensemble des échantillons a été acheminés au laboratoire de microbiologie, santé et environnement (école doctorale des sciences et de technologies de l'Université Libanaise, Plateforme AZM pour la recherche en biotechnologie et ses applications, Tripoli) pour une extraction d'ADN et une détection de *P. jirovecii* par PCR nichée ciblant le gène *mtLSUrRNA* (Wakefield *et al.*, 1990 ; Montes-Cano *et al.*, 2004).

Le LROP était effectué le matin à jeun, avant tout soin buccal et lavage de dents. Il s'agit d'un rinçage et gargarisme de la bouche avec 10 ml de sérum physiologique stérile pendant 30 s. à 1 min. Le liquide de rinçage est ensuite recueilli le plus stérilement possible dans un récipient stérile bien identifié. Le prélèvement doit être mis immédiatement sur glace et acheminé très rapidement au laboratoire. Dès son arrivée, le LROP est vortexé puis divisé stérilement en 2 aliquots, l'un utilisé pour l'extraction d'ADN et la détection par PCR nichée, et l'autre servant de réserve pour, en cas de positivité, une 2^{nde} extraction d'ADN pour la quantification de la charge fongique par PCR en temps réel et le typage. Après centrifugation 10 min. à 2900xg, chaque culot de centrifugation est récupéré avec un peu de surnageant (500µL environ) et congelé à -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

Les autres types d'échantillons ont été directement congelés à -80°C avant l'extraction de l'ADN.

4. Diagnostic moléculaire de *Pneumocystis jirovecii* par PCR nichée

4.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée sous hotte à flux laminaire à l'aide du kit Nucleospin® Tissue (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Dans chaque série, un témoin d'extraction constitué par 200 µL d'eau ou de PBS stérile était inclus pour vérifier l'absence de contamination des réactifs utilisés lors de l'extraction.

4.2. Diagnostic par PCR nichée ciblant le gène *mtLSUrRNA*

La détection de *Pneumocystis* par PCR est basée sur une PCR nichée ciblant la grande sous-unité de l'ARN ribosomal mitochondrial (gène *mtLSUrRNA*) comme décrit ailleurs (Wakefield *et al.*, 1990, Montes-Cano *et al.*, 2004), en utilisant un thermocycleur T100™ Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA).

La sensibilité de cette PCR nichée est de 1 organisme / µl (Medrano *et al.*, 2005). En bref, dans le premier tour d'amplification, les amorces externes pAZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3 ') et pAZ102-H (5'-GTG TAC TAC GTT GCA AAG TC-3') ont

été utilisées. Ceci génère une bande de 346 paires de base (pb). Le second tour d'amplification utilise les amorces pAZ102-X (5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAG G-3') et pAZ102-Y (5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3') et donne un produit de 260 pb. Quarante cycles d'amplification ont été réalisés pour chacune des deux PCR. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium et les bandes ont été visualisées sous lumière UV.

4.3. Quantification de la charge fongique par PCR en temps réel

Pour les échantillons positifs en PCR nichée, nous avons quantifié la charge fongique, à l'aide d'une technique de PCR en temps réel dont la sensibilité est de 1 à 10 copies/ μ L, qui utilise une sonde d'hydrolyse de type TaqManTM MGB (Minor Groove Binder). Les sondes MGB sont d'environ 12 à 20 bases monobrins et linéaires. A la différence des sondes TaqManTM classiques qui sont le plus souvent marquées par un fluorophore TAMRA, les sondes TaqManTM- MGB sont marquées à l'extrémité par un quencher non fluorescent couplé à un groupement MGB. Ce groupement MGB a une structure moléculaire qui lui permet de s'insérer dans le petit sillon de la double hélice formée par la sonde et sa séquence cible complémentaire. Cette insertion est stabilisée par les forces de type Van der Waals qui rendent le duplex ADN cible- sonde très stable. Cette stabilisation est beaucoup plus efficace lorsque les duplex sont parfaitement appariés, d'où la plus grande spécificité d'hybridation des sondes TaqManTM – MGB, qui assurent une meilleure discrimination des cibles. La PCR en temps réel utilisée pour cette étude amplifie un fragment de 121 pb du gène *mtLSUrRNA* de *P. jirovecii*. (Alanio *et al.*, 2011). Les séquences des amorces et la sonde utilisées sont les suivantes :

Amorce sens « PjF1 » : 5'-CTGTTTCCCTTTCGACTATCTACCTT-3'

Amorce anti-sens « PjR1 » : (5'-CACTGAATATCTCGAGGGAGTATGAA-3')

Sonde MGB-mtLSU « PjmtLSU » : 5'FAM-TCGCACATAGTCTGATTAT-3'MGB

La qPCR a été effectuée sur un système de PCR CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad), dans un volume final de 25 μ L, en utilisant le TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France), avec 0,4 μ M de chaque amorce, 0,2 μ M de sonde, et 5 μ L de prise d'essai. Après 2 min à 50°C et 10 min à 95°C, l'amplification a lieu avec 45 cycles de 15 secondes de dénaturation à 95°C, suivies par 1 minute d'hybridation et d'élongation à 60°C. Tous les échantillons ont été testés en duplicat au pur et au 1/2. Une

série de dilutions d'un contrôle positif (plasmide recombinant portant la fraction amplifiée par les amorces pAZ102-E et pAZ102-H du gène *mtLSUrRNA* de *P. jirovecii*) allant de 10^2 à 10^4 copies/ μ l a été utilisée dans chaque expérience.

5. Génotypage

5.1. Choix des gènes cibles

Le typage des isolats de *Pneumocystis* isolés de patients colonisés a été effectué en utilisant différents marqueurs permettant de discriminer des variants intra-spécifiques chez *P. jirovecii*. Dans ce travail, différentes approches ont été explorées selon les données de la littérature. Ainsi, le typage moléculaire a été effectué après amplification par PCR nichée du gène *mtLSUrRNA* (Tamburrini et al., 1996 ; Wakefield et al., 1990 ; Wakefield, 1996), ainsi que des séquences nucléaires ITS1 et ITS2 (Tsolaki et al., 1998 ; Tsolaki et al., 1999), et également un typage DHPS (Latouche et al., 2003) selon les protocoles suivants en utilisant le biorad T100TM Thermal Cycler ».

Pour les ITS :

Dans le premier tour d'amplification, les amorces externes N18SF (5'- GGT CTT CGG ACT GGC AGC -3') et N26SRX (5'- TTA CTA AGG GAA TCC TTG TTA -3') ont été utilisées. Ceci génère une bande de 580 pb. Le mélange réactionnel de la PCR 1 était le suivant: tampon 1X PCR (Diamond Taq polymerase, Eurogentec, Seraing, Belgium), une concentration finale de 3 mM pour $MgCl_2$, 1 μ M de chaque amorce, 400 μ M de chaque dNTP, 1 U Diamond Taq polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). vingt microlitres de la matrice d'ADN ont été ajoutés au mélange réactionnel. Le volume final est de 50 μ l. Après une dénaturation de 94°C pendant 10 min. pour activer la Taq polymerase, deux étapes se succèdent : l'amplification comprenant une dénaturation à 94°C pendant 1 min. suivie d'une hybridation à 55°C pendant 1 min. puis une élongation à 72°C pendant 1 min. (*40 cycles), et l'étape d'extension finale (15 min. à 72°C)

Le second tour d'amplification utilise les amorces ITSF3 (5'- CTG CGG AAG GAT CAT TAG AAA -3') et ITS2R3 (5'- GAT TTG AGA TTA AAA TTC TTG -3') et donne un produit de 530 pb. Le même mélange réactionnel a été utilisé en prenant 2 μ l de l'amplifiât de la PCR 1 et en ajustant le volume final à 50 μ l par de l'eau. Le programme d'amplification de la PCR 1 a été utilisé sauf que la température d'hybridation dans la

seconde PCR est de 56°C. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium et les bandes ont été visualisées sous lumière UV.

Pour la DHPS :

Dans le premier tour d'amplification, les amorces externes DHPS-ExtF (5'-TTTTCGATGGGGGTGTTTCATT -3') et DHPS-ExtR (5'-ACATCACCTGTAAGACACCCTG -3') ont été utilisées. Ceci génère une bande de 628 pb. Le mélange réactionnel de la PCR 1 était le suivant: tampon 1X PCR (Diamond Taq polymerase, Eurogentec, Seraing, Belgium), une concentration finale de 3 mM pour MgCl₂, 0,4 µM de chaque amorce, 400 µM de chaque dNTP, 1 U Diamond Taq polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). vingt microlitres de la matrice d'ADN ont été ajoutés au mélange réactionnel. Le volume final est de 50 µl.

Le second tour d'amplification utilise les amorces DHPS-NF (5'-AAATGCAGGGGCGACGATAAT -3') et DHPS-NR (5'-GCCTTAATTGCTTGTTCTGCAA -3') et donne un produit de 165 pb. Le même mélange réactionnel a été utilisé en prenant 2 µl de l'amplifiât de la PCR 1 et en ajustant le volume final à 50 µl par de l'eau.

Les conditions de réaction étaient similaires pour la PCR 1 et 2 : 40 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 s. suivie d'une hybridation à 55°C pendant 30 s. puis une élongation à 72°C pendant 45 s. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium et les bandes ont été visualisées sous lumière UV.

5.2. Séquençage et analyse des génotypes

Les amplicons obtenus par PCR ont été analysés par séquençage direct par la société GenoScreen (Lille, France). Pour chaque gène, la séquence consensus était déterminée à partir des séquences sens et anti-sens à l'aide du logiciel BioEdit v7.2.5. L'analyse des séquences obtenues a été réalisée par comparaison avec les séquences de références GenBank pour chaque gène. Les séquences ont été déposées dans GenBank et portent les numéros d'accès KM023735 à KM023742.

6. Analyses statistiques

Pour l'analyse des facteurs de risque, les fréquences ont été comparées entre les groupes colonisé/non colonisé à l'aide d'un test de Fisher exact. Le seuil de significativité a été fixé à 5%.

RESULTATS

RESULTATS

Chapitre 1 : Complémentation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* déficiente en *sod2* avec le gène *sod2* de *Pneumocystis carinii*.

1. Construction des vecteurs plasmidiques d'expression de MnSOD et transformation de *S. cerevisiae*.

Comme il n'est pas possible de cultiver en continu ou de manipuler directement les gènes de *Pneumocystis* spp, l'expression hétérologue de la protéine MnSOD de *P. carinii* dans la levure *S. cerevisiae* a été utilisée pour confirmer la fonction du gène *Pcsod2* et notamment montrer que ce gène pourrait compléter la fonction du gène *sod2* de la levure dans une souche EG110 Δ *sod2*.

Comme la séquence du gène *Pcsod2* présente sept introns (Denis *et al.*, 1998), l'ARN total a été isolé à partir de *P. carinii*, et l'ADNc correspondant a été synthétisé. La séquence codante *Pcsod2* a ensuite été amplifiée par PCR avec les amorces SODPc-43F et SODPc-44R et clonée dans le vecteur d'expression pYES2.1/V5-His-TOPO®. Le plasmide reliqué pYES2.1/*Pcsod2* est ensuite transformé dans la bactérie compétente *E. coli*.

La présence de l'insert *Pcsod2* a été confirmée dans les clones positifs par extraction d'ADN plasmidique, et digestion enzymatique à l'aide de l'enzyme de restriction *Age I* ou par amplification de l'insert en utilisant des amorces universelles (GAL1-F et V5-R) situées sur le vecteur de part et d'autre du site de clonage. Nous vérifions également par séquençage que le gène soit inséré dans le bon cadre de lecture (absence de délétion/insertion) et qu'il n'y ait pas de mutations (dus aux erreurs de copie de la Taq polymérase) qui induiraient des changements de la séquence d'acides aminés et pourrait alors affecter la conformation et la fonction de la MnSOD. La construction correcte pYES2.1/*Pcsod2* a ensuite été transformée dans la souche *S. cerevisiae* EG110 Δ *sod2* en utilisant la méthode de l'acétate de lithium / PEG (Gietz *et al.*, 2007). La présence du plasmide pYES2.1/*Pcsod2* a été vérifiée par PCR. La même procédure a été appliquée pour cloner *Scsod2* dans pYES2.1/V5-His-TOPO® et

pour exprimer la ScMnSOD dans la souche EG110 Δ *sod2* pour être utilisé en tant que contrôle positif.

2. Expression de la protéine recombinante MnSOD

L'expression des gènes *Pcsod2* et *Scsod2* est sous le contrôle du promoteur *GALI* dans les levures transformées. Après induction en milieu de culture supplémenté avec 2% de galactose, les SDS-PAGE et Western blot ont été réalisés pour déterminer si les PcMnSOD et ScMnSOD recombinantes étaient exprimées par les souches transformées. Comme le montre la **figure 8**, les souches complémentées EG110-Pc et EG110-Sc expriment les protéines recombinantes PcMnSOD et ScMnSOD, respectivement. L'immuno-détection a révélé une bande correspondant au poids moléculaire calculé d'un monomère de la MnSOD (environ 23 kDa). L'intensité du signal est plus forte pour la ScMnSOD que pour la PcMnSOD mais, comme attendu, aucun signal n'est détecté pour la souche de type sauvage EG103 et pour EG110-pYES contenant le plasmide seul (**Figure 8**).

3. Séquençage N-terminal de la protéine recombinante

Le séquençage N-terminal a identifié les 20 premiers acides aminés de la PcMnSOD exprimée par la levure. La comparaison avec la séquence complète PcMnSOD (Denis *et al.*, 1998) a permis de définir précisément le site de clivage de cette protéine (**Figure 9**). Le peptide signal mitochondrial a été correctement clivé par les enzymes de *S. cerevisiae* au niveau du site de reconnaissance R-2 comme prévu (Gavel *et von Heijne*, 1990 ; Gakh *et al.*, 2002). La pré-séquence de la PcMnSOD est longue de 19 acides aminés et présente une teneur élevée (47%) de résidus chargés positivement, deux caractéristiques du peptide signal mitochondrial (Gavel *et von Heijne.*, 1990; Gakh *et al.*, 2002).

4. Localisation cellulaire de la protéine recombinante MnSOD de *P. carinii* chez la levure.

La localisation intracellulaire de la protéine recombinante PcMnSOD exprimée chez *S. cerevisiae* (souche EG110) a été comparée à la localisation de la ScMnSOD en utilisant la microscopie à fluorescence (**Figure 10**). Le co-immunomarquage du complexe IV (cytochrome *c* oxydoréductase) de localisation mitochondriale et des deux protéines MnSOD-V5 recombinantes, sur des sphéropastes de *S. cerevisiae*, montre une parfaite co-localisation indiquant ainsi que les deux protéines recombinantes PcMnSOD et ScMnSOD

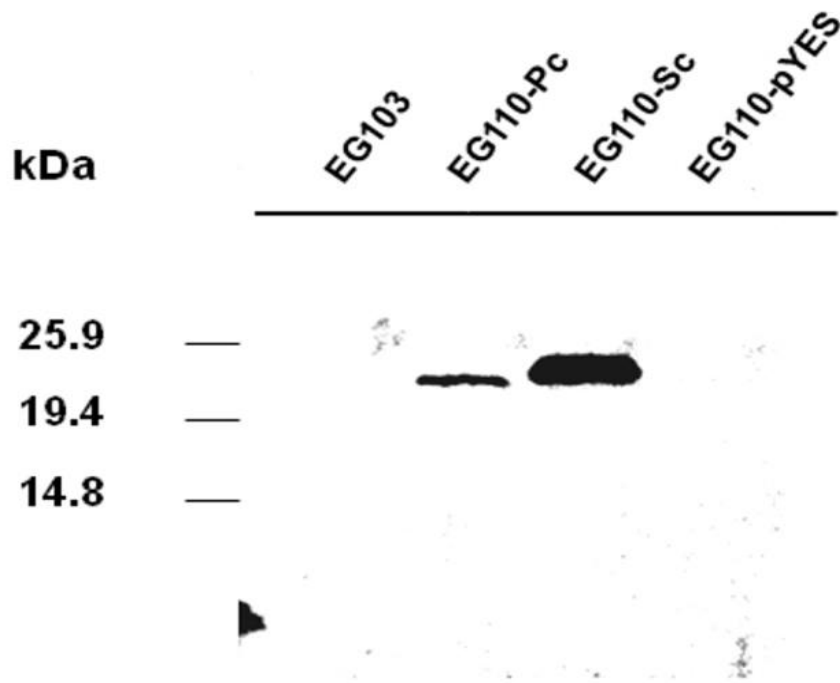


Figure 8. Immuno-détection des protéines recombinantes PcMnSOD et ScMnSOD exprimées chez *S. cerevisiae* souche EG110 Δ Sod2. L'expression des protéines recombinantes MnSOD-V5 a été induite par la commutation de source de carbone en galactose. Trente-cinq μ g de protéines totales, extraites de la souche sauvage EG103, des transformants EG110 pYES2.1/*Pcsod2* (EG110-Pc), EG110 pYES2.1/*Scsod2* (EG110-Sc) et EG110-pYES (plasmide seul) ont été déposés sur un gel SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose. L'empreinte a été incubée avec un anticorps monoclonal anti-V5 (Invitrogen). Les résultats affichés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

A

```
                SHSKHVLPSLPYDYQALEPY 40
LSADLIELHYNQHHRAYVTNLNKTIEKYYEGNESSLDSFI 80
NRLNLLTSIKFFAGGHIHNSLYWENLLPNKQGGGEIINGP 120
LVEAIKKEWKSVDDEFIRIFNMQLAGIQGSGWAWLVKSPFS 160
QRLSIQITMNQDVVTQGKVLGIDAWEHSYYVQYLNKTK 200
YFENIWNVINWKVMNQRFEQ 220
```

B

```
                R-2
                ↓
MLKSFRDLVFKKTIKNSRFSHSKHVLPSLPYDYQALEPY
```

Figure 9. Séquençage N-terminal de la MnSOD recombinante de *P. carinii*. La MnSOD recombinante de *P. carinii* a été exprimée chez la souche de levure EG110, séparée par SDS-PAGE et envoyée pour le séquençage N-terminal par dégradation d'Edman (département de biochimie, Université d'Oxford, Royaume-Uni). **(A)** : La séquence de 220 résidus d'acide aminés déduite du gène *sod2* de *P. carinii* (Denis *et al.*, 1998). **(B)** : La séquence N-terminale de la PcMnSOD recombinante. Le clivage par les enzymes de la levure se produit à la position R-2 comme attendue (flèche, Gakh *et al.*, 2002; Gavel et von Heijne, 1990) délimitant ainsi le peptide signal mitochondrial de *P. carinii* (en gras).

sont localisées dans la matrice mitochondriale de la levure EG110. Aucune fluorescence n'a été détectée avec l'anticorps anti-V5 dans les cellules EG110-pYES (**Figure 10**).

5. Evaluation de la résistance au stress oxydant de la levure *S. cerevisiae* EG110 Δ *sod2* complétement avec le gène *sod2* de *P. carinii*.

La délétion du gène *sod2* de la levure provoque une croissance fortement retardée de la souche EG110 sur un milieu contenant de la ménadione (Demir et Koc, 2010). (**Figures 11 et 12**). Nous avons alors étudié si l'expression du gène *Pcsod2* pouvait suppléer l'absence de la protéine MnSOD chez la souche EG110 cultivée en présence de ménadione. Pour cela, nous avons utilisé deux approches pour comparer la croissance des levures exprimant soit la MnSOD de *P. carinii* ou celle de *S. cerevisiae* (EG110-Pc et EG110-Sc, respectivement) à celles qui portent le plasmide seul (EG110-pYES) : la première utilise des cultures de levures en milieu solide (*yeast spotting*), la seconde consiste à réaliser des courbes de croissance en milieu liquide afin de déterminer le temps de doublement.

Les souches de levure ont été cultivées sur un milieu SC solide avec ou sans la ménadione (**Figure 11**). La croissance des souches EG110-Pc, EG110-Sc (contrôle positif) et les souches de type sauvage EG103 étaient comparables après 3 jours d'incubation, alors que la souche EG110-pYES était incapable de croître en présence de 0,5 mM de ménadione. Ainsi, une fois que l'expression de *Pcsod2* est induite, la PcMnSOD complémente le défaut de croissance de la souche EG110 Δ *sod2* en présence de ménadione.

Ce phénotype a été ensuite confirmé lors du suivi de la cinétique de croissance de ces mêmes suspensions de levure dans un milieu liquide en présence de différentes concentrations de ménadione (**Figure 12**). En absence du stress oxydant, toutes les souches de levures croissent de façon exponentielle (**Figure 12A**). Les temps de doublement, qui ont été calculés pendant la phase exponentielle de croissance, ont tous été compris entre 3,72 et 4,44 h. pour toutes les souches (**Tableau 4**). L'addition de 0,5 mM de ménadione dans le milieu n'a pas d'incidence sur la croissance des souches EG103, EG110-Sc ou EG110- Pc (**Figure 12B**). A l'inverse, la ménadione retarde considérablement la croissance de la souche EG110 Δ *sod2* qui a commencé à croître quelques heures seulement avant la fin de l'expérience (**Figure 12B**). Aucune différence significative ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis test) n'a été observée entre les temps de doublement d'EG110-Pc ($4,16 \pm 1,07$ h.), EG110-Sc ($3,88 \pm 0,39$ h.) et EG103 ($3,85 \pm 0,14$ h.) (**Tableau 4**).

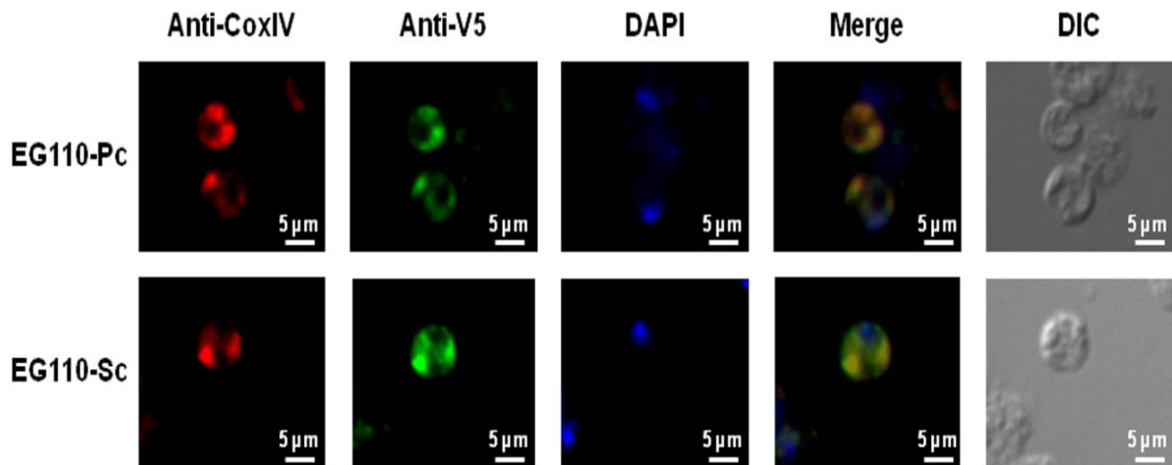


Figure 10. Localisation cellulaire des protéines recombinantes PcMnSOD et ScMnSOD dans des sphéropastes de *S. cerevisiae* souche EG110. Les MnSOD recombinantes de *S. cerevisiae* et de *P. carinii* ont été exprimées dans des cellules de levure souche EG110 et leurs localisations intracellulaires ont été déterminées par marquage avec un anticorps anti-V5. Un second marquage a été réalisé avec un anticorps anti-complexe IV cytochrome c oxydoréductase (cox IV) afin de confirmer leur localisation mitochondriale. Le DAPI est utilisé pour marquer le noyau. Les images fusionnées (*Merge*) ainsi que le DIC (*Differential Interference Contrast* ou contraste interférentiel) sont également présentés dans cette figure.

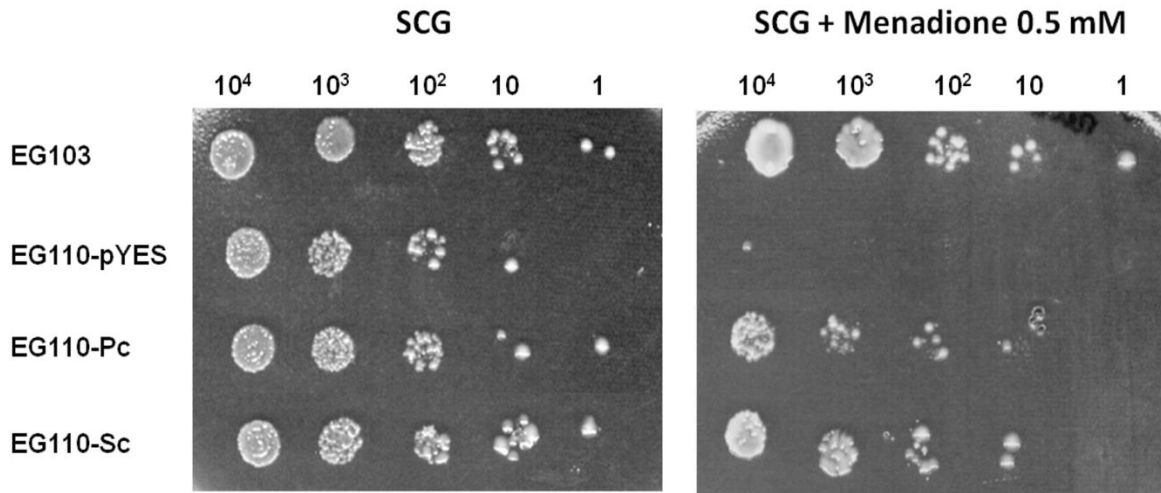


Figure 11. Etude comparative de la croissance sur milieu solide (*yeast spotting*), en présence ou en absence de ménadione, des souches de levures déficientes (EG110) en MnSOD complémentées par *PcSod2* ou *ScSod2*. La croissance des différentes souches de levures a été testée en étalant des dilutions en série de la souche sauvage (EG103) ou des levures transformées portant soit un plasmide exprimant la MnSOD de *P. carinii* (EG110-Pc) ou celle de *S. cerevisiae* (EG110-Sc) ou le vecteur seul (EG110-pYES). Avant l'étalement, l'expression de la MnSOD de *P. carinii* ou de *S. cerevisiae* a été induite pendant 24 heures dans un milieu synthétique complet (SC) complété avec 2% de galactose (SCG). Cinq µl de chaque suspension ont été déposés sur un milieu synthétique solide complet avec ou sans 0,5 mM de ménadione. La concentration de chaque suspension de levures déposées varie de 1 à 10⁴ levures/mL. L'aptitude des transformants à croître pendant 3 jours à 30°C a été évaluée en triplicat.

Les souches EG103, EG110-Pc et EG110-Sc continuent à croître de façon exponentielle, même en présence de 1 mM de ménadione, toutefois ce stress oxydant est nuisible à la croissance de la souche mutante EG110 Δ *sod2* (**Figure 12C**). Les temps de doublement de la souche EG103 et la souche EG110-Sc (3.77 ± 0.82 h. et 3.93 ± 0.22 h., respectivement) étaient comparables en présence de 1 mM de ménadione ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis tests). Cependant, le temps de doublement de la souche EG110-Pc était légèrement plus long mais la différence n'était pas significative (**Tableau 4**).

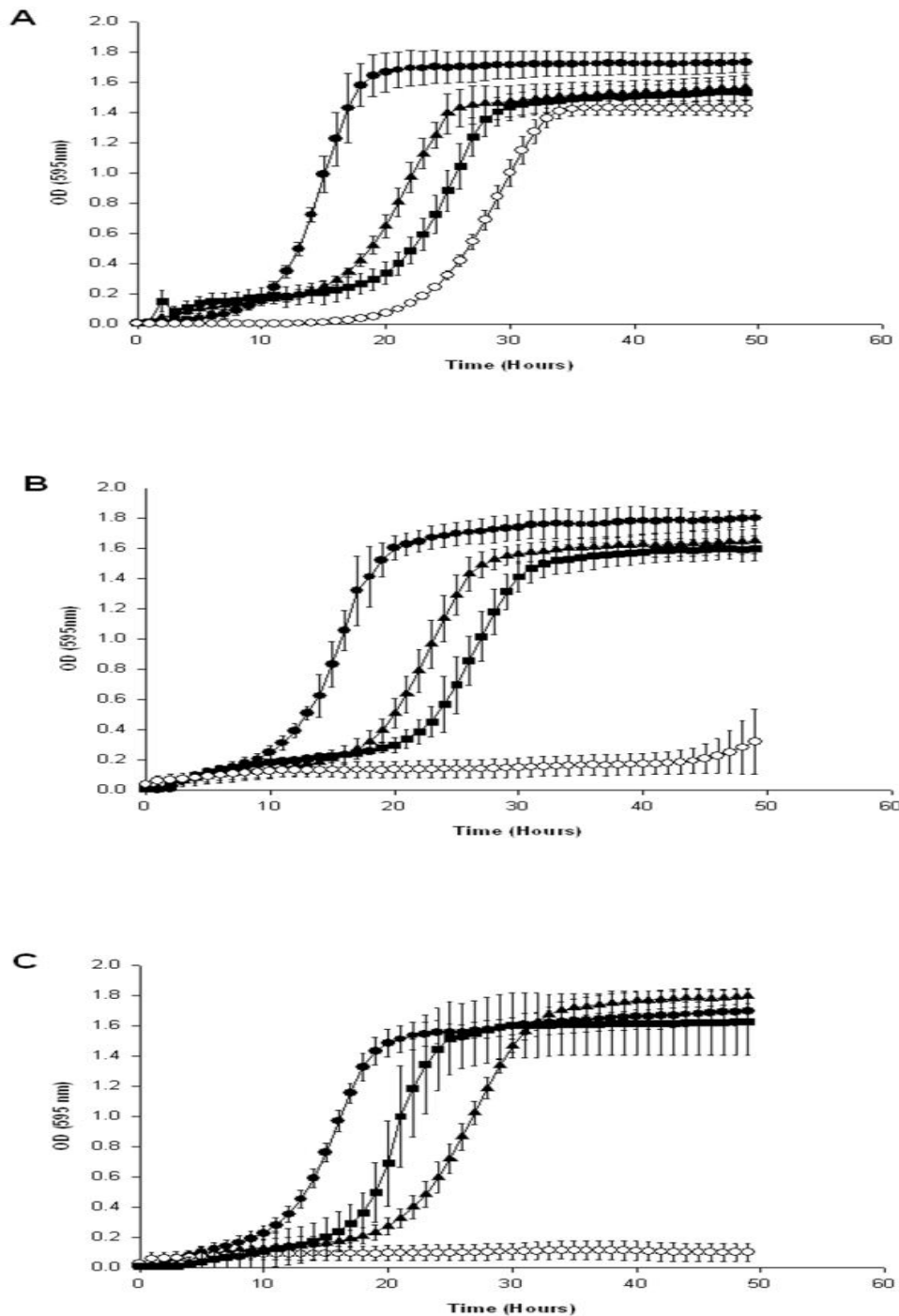


Figure 12. Impact de la ménadione sur la cinétique de croissance des souches de levures déficientes (EG110) en MnSOD complétées par *PcSod2* ou *ScSod2*. Les cinétiques de croissance de la souche sauvage EG103 (●) et de la souche mutée EG110 Δ *Sod2*, complétée avec le plasmide recombiné pYES2.1/*Pcsod2* (▲), le plasmide recombiné pYES2.1/*Scsod2* (■) ou le plasmide non recombiné pYes2.1 (○), ont été réalisées dans un milieu liquide SC-U supplémenté avec 2% de glucose à 30°C pendant 50 h. La souche sauvage EG103 a été cultivée dans un milieu liquide SC avec 2% de glucose (Figure 12A). La résistance de chaque souche à un stress oxydant a été mesurée en ajoutant 0,5 mM (Figure 12B) ou 1 mM (Figure 12C) de ménadione. Chaque point correspond à la moyenne de 6 microcultures. Les densités optiques ont été mesurées à 595 nm.

Tableau 4- Temps de doublement des souches de levure de type sauvage ou transformées soumises à un stress oxydatif

Souches	Temps de doublement (heures)		
	sans Menadione	Menadione 0.5mM	Menadione 1mM
EG103	3.72 ± 0.54	3.85 ± 0.14	3.77 ± 0.33
EG110-pYES	3.78 ± 0.09	Late growth	No growth
EG110-Pc	4.44 ± 1.17	4.16 ± 1.07	4.67 ± 0.82
EG110-Sc	4.09 ± 0.62	3.88 ± 0.39	3.93 ± 0.22

Le temps de doublement a été calculé, à partir de la phase exponentielle de croissance en utilisant la formule suivante: $\text{Temps} * (\ln 2 / (\ln (\text{DO finale} / \text{DO initiale})))$.

Chapitre 2 : Etude de la relation entre la colonisation par *Pneumocystis* et le degré d'immunodépression de l'hôte exposé

1. Détermination du nombre absolu de lymphocytes TCD4 et TCD8

Un des paramètres essentiels à notre étude était la détermination du nombre absolu des lymphocytes TCD4 (LTCD4) et TCD8 (LTCD8). La cytométrie de flux, après immunomarquages spécifiques, ne donne pas accès directement au nombre absolu de cellules présentes initialement par mm³ de sang mais à des pourcentages de répartition des populations cellulaires. Il est possible toutefois d'accéder à une numération absolue des LTCD4 et LTCD8 en nombre de cellules/mm³ de sang, à condition de disposer d'une Numération Formule Sanguine (NFS) qui fournit le nombre absolu de lymphocytes présents dans le sang analysé.

Il s'agit alors de combiner les résultats de la NFS et ceux de la cytométrie de flux pour accéder à une numération absolue des LTCD4 et des LTCD8.

La NFS réalisée par l'automate et une lecture manuelle des frottis (Beckman Coulter ; Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Pasteur de Lille) nous a donné un nombre important de paramètres parmi lesquels le nombre de lymphocytes en G/L (**Figure 13**). Précisons, comme décrit dans la littérature que les lymphocytes représentent la population cellulaire majoritaire parmi les leucocytes (entre 72,6 et 100%).

Après un triple marquage des lymphocytes T totaux, LTCD4 et LTCD8, les cellules sont analysées en cytométrie de flux. La **figure 14** présente la répartition caractéristique des populations leucocytaires (et des hématies résiduelles non lysées) sur une représentation graphique FSC (*forward scatter*, taille) / SSC (*side scatter*, granularité). Cette première étape de l'analyse nous permet de dessiner une fenêtre (R2) délimitant notre population lymphocytaire d'intérêt (**Figure 14**).

Les lymphocytes T sont marqués par le FITC (Mouse anti-rat TCR alpha, SeroTec), une fluorescence verte analysée sur le canal FL1. Les LTCD4 sont marqués par un anticorps anti-CD4-PE (Invitrogen), une fluorescence jaune analysée sur le canal FL2 ; alors que les LTCD8 sont marqués par l'anticorps monoclonal OX8CD8-Biotine et révélés par la streptavidine APC (BD Biosciences Pharmingen™), une fluorescence rouge analysée sur le

<u>Numération (LH 780 - Beckman Coulter)</u>			Valeurs de référence
Prélèvement : Sang EDTA du 25/03/2013			
Globules blancs	6,0	G/L	2,6 - 12,6
Globules rouges	7,41	T/L	6,18 - 8,54
Hémoglobine	142	g/L	136 - 164
Hématocrite	0,41	L/L	0,38 - 0,48
Volume Globulaire Moyen	55,1	fL	52,0 - 66,0
T.C.M.H	19,2	pg	17,8 - 23,0
C.C.M.H	34,8	g/dL	31,7 - 37,3
Plaquettes	971	G/L	683 - 1 399
<u>Formule sanguine</u>			Valeurs de référence
Prélèvement : Sang EDTA du 25/03/2013			
Polynucléaires Neutrophiles	8,0	%	0,0 - 20,9
	Soit	0,5	G/L
Polynucléaires Eosinophiles	0,0	%	0,0 - 4,2
	Soit	0,0	G/L
Polynucléaires Basophiles	0,0	%	0,0 - 0,5
	Soit	0,0	G/L
Lymphocytes	92,0	%	72,6 - 100,0
	Soit	5,5	G/L
Monocytes	0,0	%	0,0 - 4,9
	Soit	0,0	G/L

Figure 13. Un exemple représentatif des résultats de la Numération Formule Sanguine (NFS) réalisée chez un rat Sprague Dawley contrôle. Les valeurs de référence ont été choisies à partir de la littérature (Groner W. *et al* 1986 ; Jain N.C. 1993 & 1986, Matsuzawa *et al.*, 1993 ; Balilly Y *et al.*, 1990 ; Eccleston E. 1977 ; tableau 8). L'automate Beckman Coulter mesure le nombre de globules rouges, de globules blancs, de plaquettes et de lymphocytes, ainsi que la concentration en hémoglobine et le volume Globulaire moyen (VGM), puis en déduit l'hématocrite, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH). La formule leucocytaire est réalisée manuellement sur frottis sanguin. On remarque que chez le rat adulte, les lymphocytes représentent les cellules majoritaires parmi la population leucocytaire.

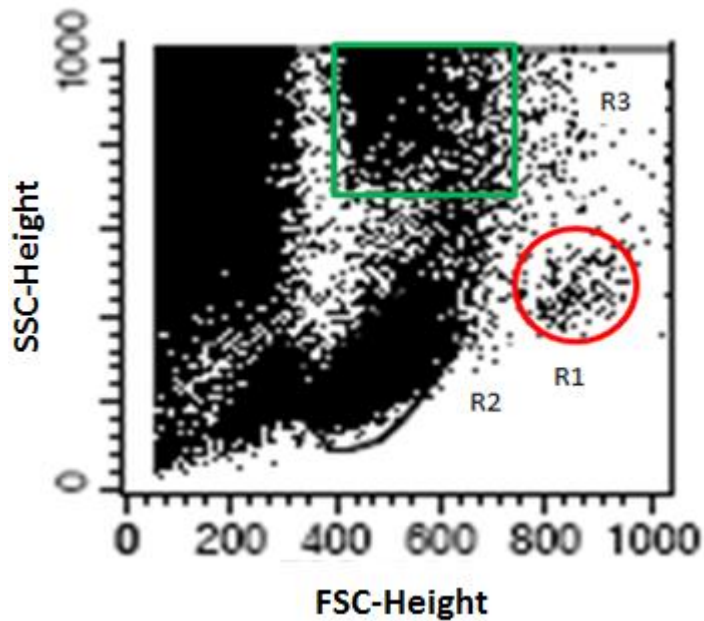


Figure 14. Analyse FSC (taille) *versus* SSC (granulométrie) en cytométrie de flux des populations lymphocytaires chez le rat Sprague Dawley. Les lymphocytes, localisés dans la fenêtre R2, possèdent un faible FSC et SSC ; les granulocytes, représentés en R3, possèdent un SSC élevé ; les monocytes représentés en R1 sont des cellules plus larges avec un cytoplasme abondant mais non granulaire et peuvent être remarqués comme une petite population entre les lymphocytes et les granulocytes. Le graphe représente l'acquisition de 10 000 évènements.

canal FL4. Ces marquages sont analysés au sein de la population lymphocytaire R2. La **figure 15** montre les histogrammes d'analyse en cytométrie de flux et la manière de sélectionner les populations cellulaires d'intérêt. Les lymphocytes T totaux sont analysés dans l'histogramme FSH/FL1 (**Figure 15A**), les lymphocytes TCD4 sur l'histogramme FL1/FL2 (**Figure 15B**) et les lymphocytes TCD8 sur l'histogramme FL1/FL4 (**Figure 15C**). Le pourcentage de chaque population est alors déterminé à l'aide du cadran LR (*lower right*, lymphocytes T) et des cadrans UR (*upper right*, lymphocytes TCD4 et TCD8) des tableaux d'analyse statistique. (**Figure 15**).

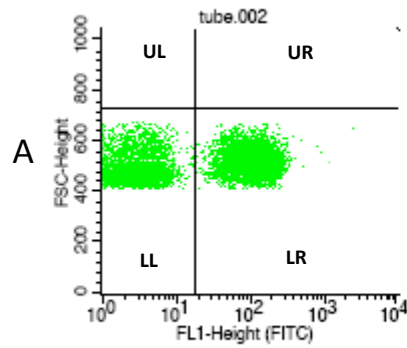
On peut ainsi déduire le nombre de lymphocytes T (NLT) par mm^3 de sang en se basant sur les résultats des lymphocytes totaux obtenu avec la NFS, selon la formule suivante : taux de lymphocytes totaux (NFS en G/L) x % lymphocytes T (cadran LR) x1000. De même, le calcul du nombre absolu des LTCD4 ou LTCD8 se fait selon la formule : NLT x % LTCD4 et NLT x % LTCD8 (cadran UR), respectivement.

2. Cinétique de l'évolution des taux de leucocytes, lymphocytes T totaux, lymphocytes TCD4 et TCD8 en fonction de la dose de dexaméthasone.

Les résultats que nous avons obtenus sont intéressants à double titre (i) un effet-dose de corticoïdes est clairement observé aussi bien pour les taux de globules blancs, lymphocytes T, TCD4 et TCD8 ; (ii) de plus, cet effet est marqué dès la 2^{ème} semaine post-traitement et se stabilise généralement jusqu'à la 4^{ème} semaine post-traitement (**Figure 16**). Nous avons ainsi réussi à mettre en place un modèle animal d'immunodépression graduelle où les taux de TCD4 et TCD8, notamment, sont stabilisés pendant au moins deux semaines (entre la semaine 2 et la semaine 4 suivant l'administration des corticoïdes). Les analyses statistiques montrent que les taux de lymphocytes T, TCD4 et TCD8 après 2 ou 4 semaines de traitement par les corticoïdes sont significativement différents entre les doses 0, 0.1, 0.3 et 2 mg/L ($P \leq 0,0001$).

3. Relation entre colonisation et degré d'immunodépression

Après la mise au point de ce nouveau modèle expérimental nous permettant de travailler avec des rats graduellement immunodéprimés, la seconde étape a consisté, dans des conditions de transmission naturelle de *P. carinii*, à étudier la relation entre le degré d'immunodépression de l'hôte et son niveau de susceptibilité vis-à-vis de l'infection par *Pneumocystis*. En effet, des rats aux différentes doses de dexaméthasone ont été mis en

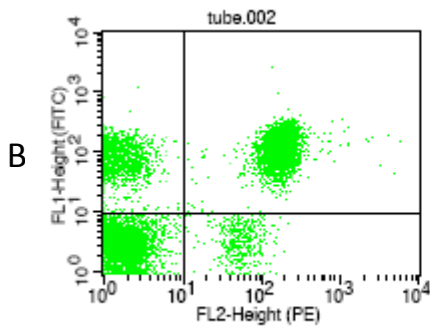


Quadrant Statistics

File: tube.002
Sample ID:
Tube:
Acquisition Date: 23-May-12
Gated Events: 10146
X Parameter: FL1-Height (FITC) (Log)
Quad Location: 17, 725

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel:
Gate: G2
Total Events: 29967
Y Parameter: FSC-Height (Linear)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	0	0.00	0.00	***	***	***	***
LL	3952	38.95	13.19	3.53	2.97	482.76	479.81
LR	6194	61.05	20.67	124.89	109.49	508.36	506.45

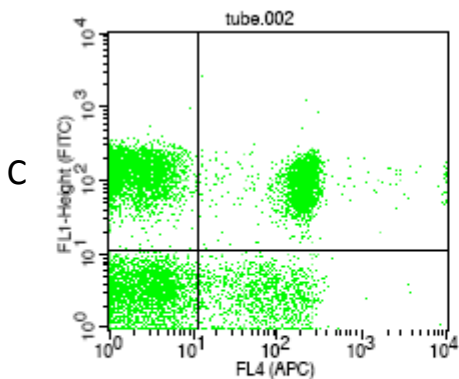


Quadrant Statistics

File: tube.002
Sample ID:
Tube:
Acquisition Date: 23-May-12
Gated Events: 10146
X Parameter: FL2-Height (PE) (Log)
Quad Location: 10, 9

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel:
Gate: G2
Total Events: 29967
Y Parameter: FL1-Height (FITC) (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	2239	22.07	7.47	1.51	1.35	98.65	85.69
UR	4007	39.49	13.37	201.17	185.39	138.08	122.03
LL	3474	34.24	11.59	1.91	1.67	3.35	2.87
LR	426	4.20	1.42	61.29	55.64	3.89	3.35



Quadrant Statistics

File: tube.002
Sample ID:
Tube:
Acquisition Date: 23-May-12
Gated Events: 10146
X Parameter: FL4 (APC) (Log)
Quad Location: 11, 11

Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel:
Gate: G2
Total Events: 29967
Y Parameter: FL1-Height (FITC) (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	3900	38.44	13.01	2.28	1.86	138.00	122.52
UR	2318	22.85	7.74	312.11	201.62	101.68	88.72
LL	2840	27.99	9.48	2.90	2.25	3.55	3.03
LR	1088	10.72	3.63	111.82	68.10	3.23	2.74

Figure 15. Analyse par cytométrie de flux après un triple marquage des lymphocytes T totaux, TCD4 et TCD8 réalisé à partir du sang hémolysé prélevé chez un rat Sprague Dawley. Ces marquages sont analysés au sein de la population lymphocytaire total R2 (voir Figure 14). Les lymphocytes T totaux sont analysés dans l'histogramme FSH/FL1 (A), les lymphocytes TCD4 sur l'histogramme FL1/FL2 (B) et les lymphocytes TCD8 sur l'histogramme FL1/FL4 (C). Le pourcentage de chaque population est alors déterminé à l'aide du cadran LR (lymphocytes T) et des cadrans UR (lymphocytes TCD4 et TCD8) des tableaux d'analyse statistique.

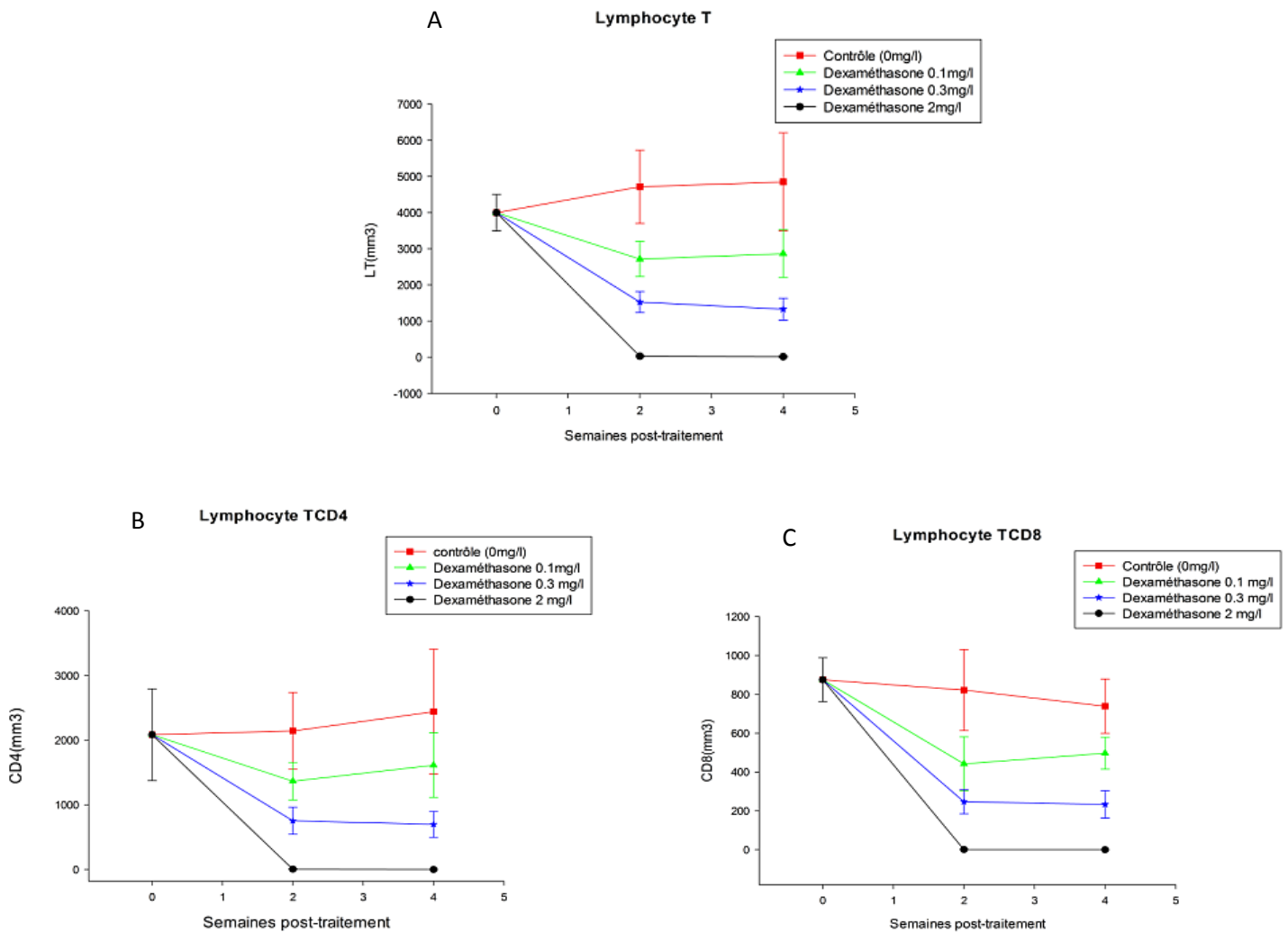


Figure 16. Cinétique de l'évolution des taux de lymphocytes T, TCD4 et TCD8 chez des rats Sprague Dawley soumis à des doses croissantes de dexaméthasone. Les taux de lymphocytes T (A), TCD4 (B) et TCD8 (C) chutent rapidement sous l'effet de l'administration de dexaméthasone et diminuent d'avantage lorsque que la dose administrée est plus forte. Les différents niveaux d'immunodépression créés apparaissent clairement dans ce graphe à partir de la deuxième semaine post-traitement. On peut également constater que leurs taux tendent à se stabiliser entre la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine post-traitement par les corticoïdes.

contact durant 2 semaines avec des rats nude développant la pneumocystose. La charge parasitaire a été déterminée après coloration au BTO et par une qPCR ciblant le gène *dhfr* de *P. carinii* au bout des 2 semaines de contact.

3.1. Comptage microscopique des kystes de *Pneumocystis*

Nos résultats, après comptage au BTO, montrent une corrélation entre la dose de corticoïdes administrée aux animaux et le niveau de colonisation par *Pneumocystis*. Toutefois on n'a pas pu montrer une significativité pour toutes les doses (**Figure 17**).

Mais d'une manière plus intéressante, une relation inverse entre les taux de LTCD4 ou LTCD8 et le niveau de colonisation par *Pneumocystis* (p -value $\leq 0,0006$) a pu être montrée (**Figure 17**).

3.2. Détection et quantification de *P. carinii* par qPCR au locus *dhfr*

Nous avons réalisé une gamme de dilution du témoin positif qui correspond à un fragment de 156 bp du gène de la *dhfr* de *P.carinii* cloné dans un vecteur plasmidique allant de 10^6 jusqu'à 10^0 copies/ μ l, afin d'évaluer la sensibilité et l'efficacité de détection de *P. carinii* par la technique de qPCR. La limite de sensibilité de la qPCR, calculée après analyse de la courbe étalon, est de 1 copie du gène *dhfr* dans 2 μ l.

Les qPCR ciblant le locus *dhfr* ont été ensuite normalisées à l'aide de dosages de l'ADN total extrait du culot pulmonaire par la méthode picogreen®, et le résultat final est rendu sous forme du nombre de copies *dhfr* par nanogramme d'ADN.

Les résultats obtenus avec la qPCR sont statistiquement concordants avec ceux obtenus par comptage au BTO (p -value = 0,003), ce qui renforce l'hypothèse d'une relation inverse entre les taux de LTCD4 et le niveau de colonisation par *Pneumocystis* (p -value $< 0,0001$), ou LTCD8 et le niveau de colonisation par *Pneumocystis* (p -value = 0,0001) (**Figure 18**).

Tous les rats contrôles sans contact sont négatifs après comptage au BTO ou par qPCR. Ce résultat important confirme l'absence de contamination inter-cages.

4. Détermination du taux d'anticorps anti-*Pneumocystis carinii*

Tous les rats mis en contact et colonisés par *P. carinii* se sont avérés séronégatifs (IgM et IgG) pour *Pneumocystis*. En conséquence, l'interprétation des résultats de

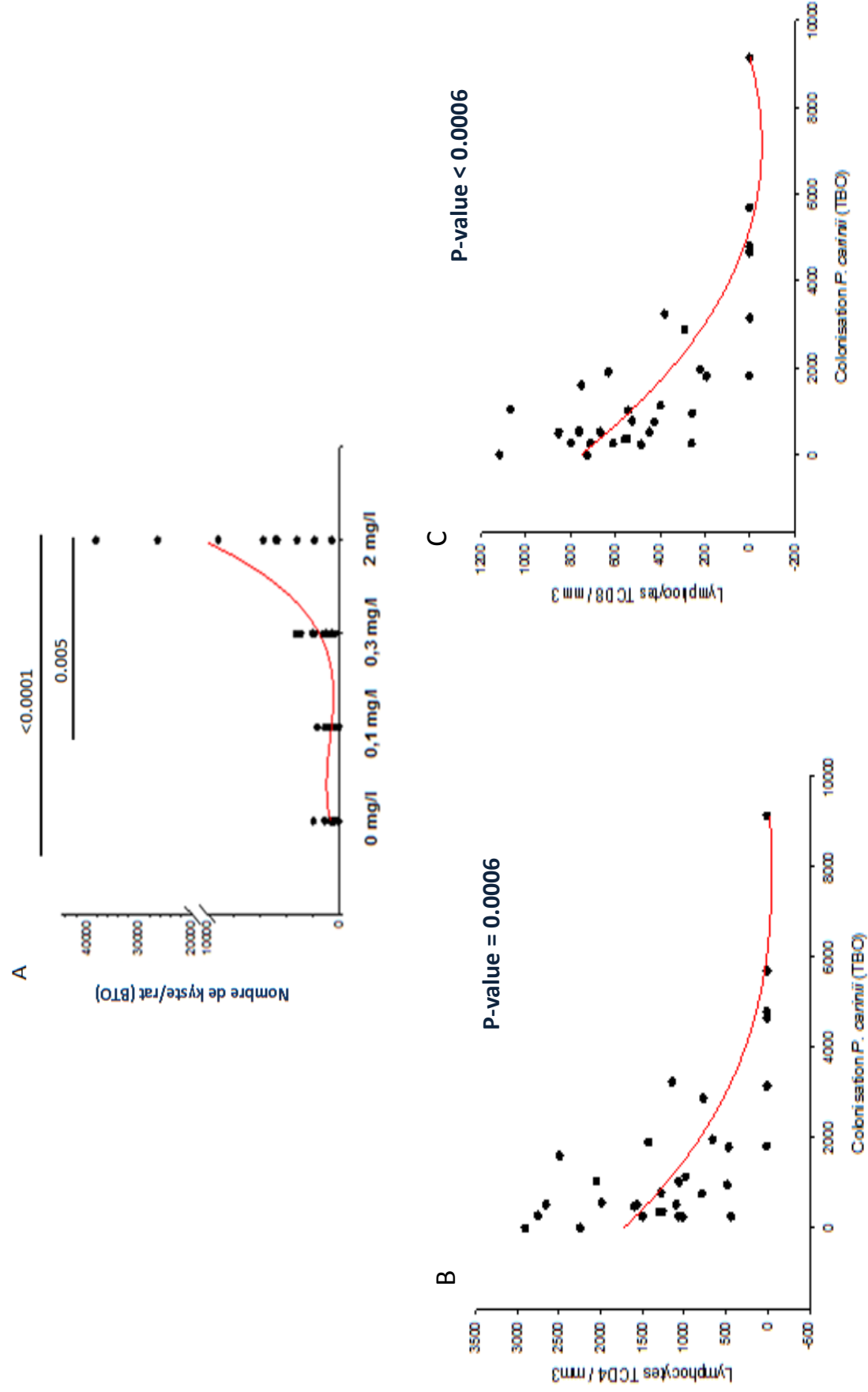


Figure 17. Colonisation pulmonaire des rats Sprague-Dawley par *P. carinii* en fonction de la dose administrée de corticoïdes(A) ou du taux de LTCD4 (B) et de LTCD8 (C). Des rats immunodéprimés de manière graduelle (doses : 0 ; 0,1 ; 0,3 et 2 mg/L de dexaméthasone dans l'eau de boisson) sont mis en contact pendant 2 semaines avec des rats nude développant une pneumocystose. Puis, les rats sont sacrifiés et la colonisation par *P. carinii* dans les poumons est déterminée après comptage au BTO.

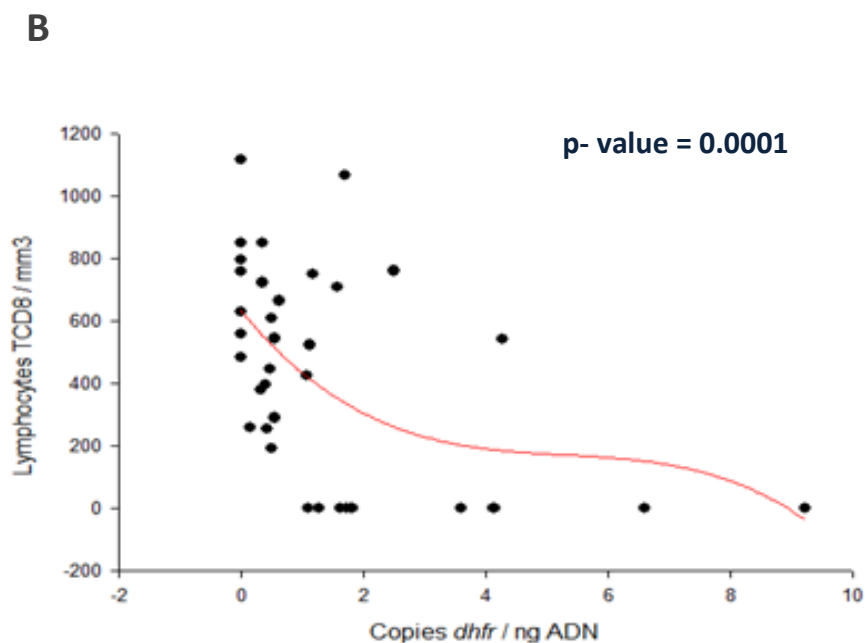
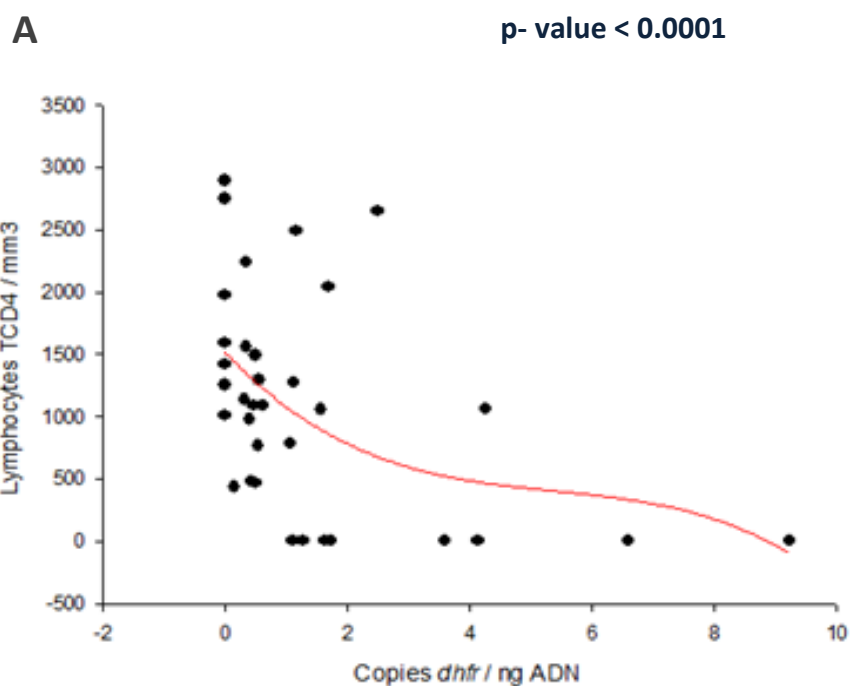


Figure 18 : Colonisation pulmonaire des rats Sprague-Dawley par *P. carinii* en fonction du taux de LTCD4 (A) ou LTCD8 (B). Nos résultats montrent une relation inverse entre les taux de LTCD4 ou LTCD8 et le niveau de colonisation par *Pneumocystis* (p -value ≤ 0.0001) qui est mesuré ici par la qPCR au locus *dhfr* de *P. carinii*.

colonisation en fonction du degré d'immunodépression n'est pas biaisée par l'apparition éventuelle d'anticorps spécifiques anti-*Pneumocystis* (Menotti *et al.*, 2013).

Chapitre 3 : Evaluation du portage de *Pneumocystis jirovecii* chez les enfants et les adultes atteints de pathologies respiratoires à Tripoli (Liban)

1. Fréquence du portage par *P. jirovecii*

Entre juillet 2012 et octobre 2013, 134 patients ayant différentes pathologies respiratoires ont été inclus dans notre étude (voir critères d'inclusion dans le questionnaire standardisé en **Annexe 1**).

Ces patients étaient pour la majorité hospitalisés dans différents hôpitaux de Tripoli, notamment dans les services de pneumologie ou de maladies respiratoires (n= 108) ou ils étaient vus en consultation dans des centres de soins médicaux à Tripoli (n=26).

Les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, et thérapeutiques des patients étudiés sont détaillées dans le **tableau 3**. En résumé, il s'agissait de 78 hommes ou garçons et 56 femmes ou filles, d'un âge moyen global de 52 ans, qui présentaient des pathologies sous-jacentes variées réparties ainsi : rhinopharyngite (24,6%), bronchite (20,1%), BPCO (17,9%), grippe (12,7%), asthme (10,4%), infection respiratoire non précisée (6,0%), syndrome de détresse respiratoire (3,0%), pneumonie (2,2%), cancer pulmonaire (1,5%), fibrose pulmonaire (0,7%) et œdème pulmonaire aigu (0,7%) (**Tableau 3**). La population étudiée comprenait 8 enfants âgés de 1 jour à 15 ans (sex ratio = 0,6) qui consultaient essentiellement pour les pathologies respiratoires suivantes : rhinopharyngite (25%), détresse respiratoire (25%), infection respiratoire non précisée (25%), pneumonie (12,5%) et bronchite (12,5%).

Sept (5,2%) prélèvements pulmonaires étaient positifs pour *P. jirovecii* par PCR nichée ciblant le gène *mtLSUrRNA*. Aucun enfant n'a été trouvé positif pour *P. jirovecii* et l'âge moyen des patients colonisés était de 69 ans (**Tableau 5**). Les échantillons positifs incluaient 3 LROP, 2 crachats, 1 LBA, et 1 écouvillon nasal. La fréquence de positivité (5,4%, 5,4%, 7,1%, et 8,3%, respectivement) était donc similaire pour ces différents types d'échantillons. Aucune aspiration endo-trachéale n'était cependant positive. Les pathologies respiratoires sous-jacentes incluaient BPCO (n=4), rhinopharyngite (n=1), bronchite (n=1), et grippe (n=1). La prévalence de la colonisation par *Pneumocystis* était respectivement de 17,3%, 3,0%, 3,7% et 5,9% dans ces sous-populations. Aucun des patients colonisés par *P. jirovecii* n'avait reçu de traitement immunosuppresseur, d'antibiothérapie, de corticothérapie ou n'avait une déficience immunitaire, y compris le cancer. Trois avait été admis à l'hôpital Nini, un à l'hôpital Monla, un à l'hôpital Mazloum, un à l'hôpital gouvernemental de Tripoli,

Tableau 5- Caractéristiques des patients colonisés par *P. jirovecii* : données épidémiologiques, biologiques et cliniques; quantification de la charge fongique par qPCR et résultats des géotypages aux loci *mtLSUrRNA*, *DHPS* et *ITS*.

Identifiant	Provenance des patients	Age	Sexe	Pathologie respiratoire sous-jacente	Tabagisme	Autres facteurs de risque (cancer, déficits immunitaires, corticothérapie, traitement immunosuppresseur, antibiothérapie)			Prélèvement		Géotype		
						Données microbiologiques	Date	Type	qPCR <i>P. jirovecii</i> (copies/µl)	<i>mtLSU rRNA</i>	<i>DHPS</i>	<i>ITS</i>	
V1	Hôpital Monla	75	M	BPCO SIII	oui	Non	ND	12/09/13	Crachat	9.71.10 ⁰	2	S	NA
X3	Hôpital Nini	78	M	BPCO SIII	oui	Non	Neg	04/06/13	Écouvillon nasal	3.95.10 ¹	2	NA	NA
O3	Hôpital Nini	57	M	BPCO SI	oui	Non	Neg	11/07/13	Crachat	7.97.10 ⁰	Mixte (2 & 3)	NA	NA
P3	Hôpital Mazloum	70	M	Grippe	NA	Non	Neg	25/08/13	LBA	Neg	2	NA	NA
50	Centre de soins médicaux	53	M	Rhino-pharyngite	oui	Non	Neg	01/03/13	LROP	5.37.10 ²	1	NA	NA
3	Hôpital Nini	75	F	BPCO SIII	oui	Non	ND	30/10/12	LROP	4.47.10 ³	1	NA	NA
2	Hôpital gouverne-mental	75	M	Bronchite	Passif	Non	ND	16/11/12	LROP	3.51.10 ⁴	2	NA	NA

BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive, DHPS : dihydropteroate synthase, ITS : internal transcribed spacer, LBA : lavage broncho-alvéolaire ; LROP : liquide de rinçage oro-pharyngé ; *mtLSUrRNA* : grande sous-unité de l'ARN ribosomal mitochondrial; NA : non amplifié ; ND : non disponible, Neg : négatif ; S : sauvage ; SI : stade 1 ; SIII : stade 3.

et un dans un centre de soins médicaux. Sur les 7 patients, la colonisation par *P. jirovecii* a été confirmée par qPCR (Alanio *et al.*, 2011) pour 6 patients (85,7%). Chez ces patients, le nombre de copies du gène *mtLSUrRNA* varie entre 7,97 et $3,51.10^4$ copies/ μ L (Tableau 5). Les charges fongiques les plus élevées étaient détectées chez un patient avec rhinopharyngite, un avec bronchite aiguë, et un avec BPCO, mais 3 autres patients BPCO avait une charge fongique faible. Les charges fongiques étaient plus élevées dans les LROP ($5,37.10^2$ à $3,51.10^4$ copies/ μ l) que dans les autres types d'échantillons (0 à $3,95.10^1$ copies/ μ l).

2. Identification de facteurs de risque de colonisation par *P. jirovecii*

Une comparaison a été faite entre les patients colonisés par *P. jirovecii* (n=7) et ceux non colonisés (n= 127), en ce qui concerne la provenance des patients, leurs pathologies respiratoires sous-jacentes, d'autres facteurs de risque potentiels (cancers, déficits immunitaires, traitements immunosuppresseurs, corticothérapies, antibiothérapies) afin de rechercher la présence éventuelle d'un ou plusieurs facteurs de risque associés à la colonisation. Les données concernant le type d'échantillons analysés ont également été comparées entre les 2 groupes (Tableau 6).

Les fréquences étaient similaires ou plus faibles pour les patients colonisés pour tous les critères étudiés sauf la BPCO (57,1% versus 15,7% pour les patients non colonisés) et le sex ratio (6 versus 1,30) (Tableau 6). Le nombre de patients positifs étant très faible, seuls ces deux critères ont été testés statistiquement à l'aide d'un test de Fisher-Exact qui a révélé une fréquence significativement plus élevée de la colonisation par *Pneumocystis* chez les patients BPCO (p=0,019). La plus grande proportion d'individus de sexe masculin dans le groupe de patients colonisés par *P. jirovecii* n'était cependant pas statistiquement significative (p=0,238).

La consommation de tabac a été déterminée avec succès pour 71 patients. Cinquante-trois des 65 patients non colonisés étaient des fumeurs actifs ou passifs (81,5%), 5 étaient des ex-fumeurs (7,7%), et 7 étaient non-fumeurs (10,8%). Par comparaison, sur 6 patients colonisés pour lesquels une information sur le tabagisme a pu être recueillie, tous (100%) étaient fumeurs actifs ou passifs (Tableau 5).

Tableau 6- Comparaison de la provenance des patients, des pathologies respiratoires sous-jacentes, d'autres facteurs de risque potentiels, et du type de prélèvement entre les patients colonisés ou non par *P. jirovecii*

		Patients colonisés par <i>P. jirovecii</i> (n=7)	Patients non colonisés par <i>P. jirovecii</i> (n=127)	P-Value
Age moyen		69,0 ± 9,9	51,0 ± 20,9	
Sex ratio		6	1,3	p=0,238
Localisation	Hôpital gouvernemental de Tripoli	1 (14,3%)	12 (9,4%)	
	Nini	3 (42,8%)	66 (52,0%)	
	Monla	1 (14,3%)	11 (8,7%)	
	Mazloun	1 (14,3%)	13 (10,2%)	
	Centres de soins médicaux	1 (14,3%)	25 (19,7%)	
Caractéristiques de la population	BPCO	4 (57,1%)	19 (14,9%)	p=0,019
	Bronchite aiguë	1 (14,3%)	26 (20,5%)	
	Fibrose pulmonaire	0 (0%)	1 (0,8%)	
	Grippe	1 (14,3%)	16 (12,6%)	
	Rhinopharyngite	1 (14,3%)	32 (25,2%)	
	Asthme	0 (0%)	14 (11,0%)	
	Pneumonie	0 (0%)	4 (3,1%)	
	Infection respiratoire (localisation non spécifiée)	0 (0%)	8 (6,3%)	
	Œdème pulmonaire aigu	0 (0%)	1 (0,8%)	
	Syndrome de détresse respiratoire	0 (0%)	4 (3,1%)	
	Cancer pulmonaire	0 (0%)	2 (1,6%)	
Autres facteurs de risque	Cancer	0 (0%)	16 (12,6%)	
	Déficits immunitaires	0 (0%)	1 (0,8%)	
	Corticothérapie	0 (0%)	5 (3,9%)	
	Traitement immunosuppresseur	0 (0%)	16 (12,6%)	
	Antibiothérapie	0 (0%)	10 (7,9%)	
Types de prélèvement	LROP	3 (42,8%)	53 (41,7%)	
	Crachat	2 (28,6%)	35 (27,5%)	
	LBA	1 (14,3%)	13 (10,8%)	
	Ecouvillon nasal	1 (14,3%)	11 (8,7%)	
	Aspiration endo-trachéale	0 (0%)	15 (11,8%)	

BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive ; LBA : lavage broncho-alvéolaire ; LROP : Liquide de rinçage oro-pharyngé.

3. Génotypage des prélèvements positifs en PCR nichée *mtLSUrARN*

- Typage au locus *mtLSUrARN*

Il existe un polymorphisme dans cette séquence (positions 85 et 248) pour différencier les isolats de *P. jirovecii* entre eux (Keely *et al.*, 1995, Montes-Cano *et al.*, 2009). Dans notre étude, seule la position 85 était variable. Le génotypage au locus *mtLSUrRNA* a ainsi révélé une forte prévalence du génotype 2 (71,4%), alors que les génotypes 1 et 3 ont été trouvés chez moins de patients (28,6% et 14,3%, respectivement). Les isolats de génotype 2 provenaient principalement d'échantillons prélevés pendant la saison sèche (entre juin et septembre) alors que les 2 isolats de génotype 1 correspondaient à des échantillons prélevés pendant la saison humide (en mars et octobre) (**Tableau 5**).

- Typage aux loci *DHPS* et *ITS*

Ces marqueurs étant des gènes monocopie, leur amplification nécessite la présence de charges fongiques plus élevées que pour le gène *mtLSUrARN* (gène multicopie). Dans notre étude, le génotypage DHPS a pu être effectué pour un seul des 7 patients positifs en PCR nichée *mtLSUrRNA*, qui présentait une DHPS de type sauvage. Aucune amplification n'a été obtenue pour le locus *ITS* (**Tableau 5**).

DISCUSSION

DISCUSSION

Chapitre 1 : étude fonctionnelle de la MnSOD de *Pneumocystis carinii*

Dans l'environnement alvéolaire, les champignons sont confrontés aux macrophages alvéolaires et aux granulocytes neutrophiles qui sont l'une des premières lignes de défense contre ces infections (Hasenberg *et al.*, 2013).

Les microchampignons du genre *Pneumocystis*, transmissibles par voie aérienne, ne font pas exception. Plusieurs études ont démontré qu'ils sont phagocytés par les macrophages alvéolaires (MA). Ce processus implique les récepteurs au mannose (Mannose Receptor) ou aux β -glucanes (Dectine-1) présents à la surface des MA (Ezekowitz *et al.*, 1991; O'Riordan *et al.*, 1995; Steele *et al.*, 2003).

In vitro, *Pneumocystis* est capable d'induire la production d'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les monocytes et les macrophages humains ou de rongeurs (Hidalgo *et al.*, 1992; Koziel *et al.*, 2000; Laursen *et al.*, 1994) et par les neutrophiles humains (Jensen *et al.*, 1998; Laursen *et al.*, 1993). Différents auteurs ont alors proposé que l'induction d'un stress oxydatif puisse être l'un des moyens par lequel les macrophages tuent *Pneumocystis* (Koziel *et al.*, 2000; Hidalgo *et al.*, 1992; Pesanti, 1984). En outre, les souris Dectine-1^{-/-} se sont montrées plus sensibles à l'infection par *Pneumocystis*, et les macrophages Dectine-1^{-/-}, une fois incubés avec *Pneumocystis*, montraient une production défectueuse des EROs (Saijo *et al.*, 2007). Ainsi, la signalisation induite par la Dectine-1 est essentielle pour la production des EROs et la protection contre *Pneumocystis*.

En dehors d'une production importante dans le contexte d'un stress oxydant, les EROs sont aussi générées de façon endogène et basale comme des produits du métabolisme aérobie (Haliwell et Gutteridge, 2006). Il est maintenant acquis que la production basale des EROs par la cellule participe au maintien de l'homéostasie cellulaire (Natan et Cunningham-Bussel, 2013).

Pour se protéger contre les radicaux libres de l'oxygène ($O_2^{\cdot-}$) produits en excès, la plupart des eucaryotes ont développé des systèmes enzymatiques antioxydants (**Tableau 7**). Parmi eux, les SOD sont considérées comme des enzymes détoxifiantes de premier ordre

Tableau 7- les systèmes enzymatiques antioxydants (Li *et al.*, 1995 ; Radi *et al.*, 1991 ; Fréalle *et al.*, 2005 ; Knopp *et al.*, 1999).

Enzyme	Co-facteur	rôle	Organismes	localisation
Superoxyde Dismutase	Mn	catalysent la dismutation du radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$ en générant O_2 et H_2O_2	Eucaryotes	mitochondriales
			Bactéries	cytosoliques
	CuZn		Eucaryotes	cytosoliques, extracellulaires
			Bactéries	périplasmiques
	Fe		Plantes, algues	chloroplastes, peroxysomes
			Bactéries	cytosoliques
			Protistes	
Catalases		catalysent la décomposition du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en H_2O et O_2 (niveau H_2O_2 élevé)	Eucaryotes Procaryotes	mitochondriales cytosoliques peroxysomes
Peroxidases		catalysent la décomposition du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en H_2O et O_2 (niveau H_2O_2 faible)	Plantes, algues Procaryotes Eucaryotes	chloroplastes cytosoliques extracellulaires mitochondriales

puisqu'elles sont responsables de la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 . En effet, les SOD sont des métalloprotéines avec différents groupes prosthétiques. La FeSOD est présente dans les organelles subcellulaires, et dans l'espace périplasmique des procaryotes, la MnSOD est présente dans la matrice mitochondriale des eucaryotes et dans le cytosol des procaryotes, et la Cu/ZnSOD est généralement présente dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, et dans les chloroplastes des plantes (Amano *et al.*, 1990). La détoxification de H_2O_2 est ensuite faite par la glutathion peroxydase ou GPx qui réduit H_2O_2 en eau (H_2O) ou bien par la catalase (CAT) qui décompose le H_2O_2 en eau et oxygène ($H_2O + O_2$).

Pesanti a mesuré une activité SOD faible mais significative (2 U/mg) chez *Pneumocystis* (Pesanti, 1984). Des expériences d'inhibition par le cyanure (CN^-) ou l' H_2O_2 ont révélé que l'activité SOD est majoritairement attribuée à une MnSOD (Denis *et al.*, 1996). De plus, des études réalisées en 1995 chez la levure *S. cerevisiae* ont montré que les deux enzymes Cu/ZnSOD, MnSOD coopèrent entre elles, mais sans que l'une puisse entièrement remplacer l'autre (Longo *et al.*, 1995). Enfin, même si des dommages importants ont été observés chez des cellules dépourvues de Cu/ZnSOD cytoplasmique ($\Delta sod1$), la MnSOD joue néanmoins un rôle essentiel dans son compartiment cellulaire, la mitochondrie (Longo *et al.*, 1995).

Plus tard, un gène *sod2* de *P. carinii* a été amplifié et caractérisé. Sa séquence en acides aminés déduite a montré une plus forte similarité (70,3%) avec la séquence MnSOD de *S. cerevisiae* (Denis *et al.*, 1998). Mon travail de thèse a consisté à poursuivre la caractérisation fonctionnelle de la MnSOD de *P. carinii*. Dans un premier temps, nous avons réussi à faire exprimer le gène *Pcsod2* dans une souche de *S. cerevisiae* déficiente pour la MnSOD ($\Delta sod2$). Nous avons ensuite montré que la souche complémentée était protégée contre les anions superoxyde générés par la ménadione. La ménadione (2-méthyl-1,4-naphtoquinone) est une cétone aromatique polycyclique qui subit une réduction au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Brière *et al.*, 2004 ; Floreani *et al.*, 1992). Comme une quinone, la ménadione peut subir une réduction d'électrons produisant un radical semiquinone, qui à son tour réduit l'oxygène moléculaire en anion superoxyde, tout en étant oxydé sous la forme initiale de quinone (**Figure 19**). Ce cycle d'oxydoréduction intracellulaire qui génère des EROs peut provoquer une oxydation rapide de molécules biologiques à la fois dans la matrice mitochondriale et dans le cytosol, justifiant ainsi l'utilisation de la ménadione comme un composé modèle pour étudier les mécanismes de

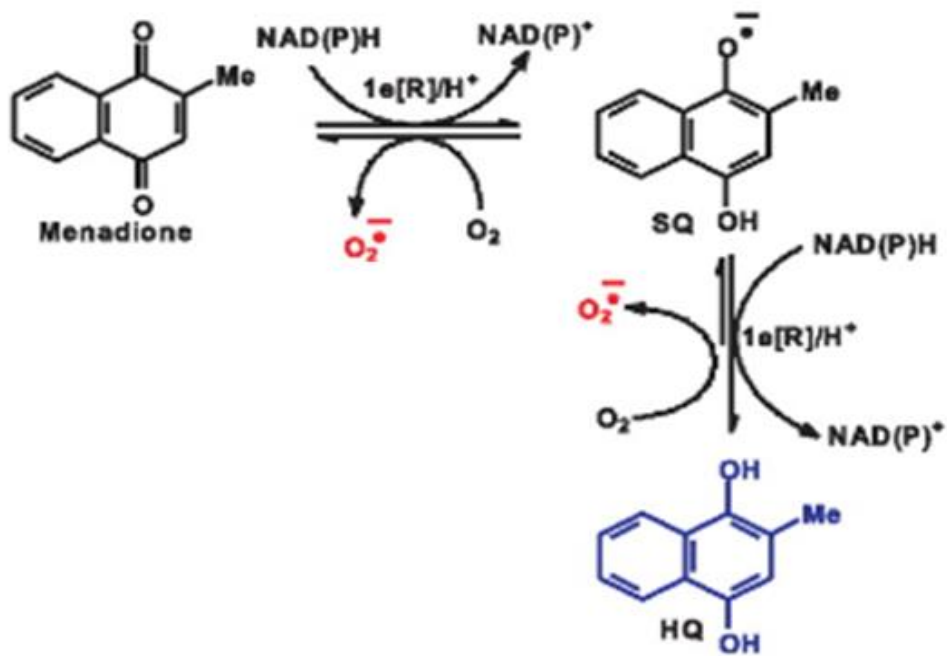


Figure 19. Mécanisme d'action de la ménadione (Criddle *et al.*, 2006 modifié). La ménadione peut subir une réduction d'électrons produisant un radical semiquinone, qui à son tour réduit l'oxygène moléculaire en anion superoxyde, tout en étant oxydé à la forme initiale de quinone.

stress oxydatif et de l'apoptose (Boelsterli, 2003). Compte tenu du caractère lipophile de la ménadione, elle a une grande propension à s'intégrer dans les membranes. Cette incorporation augmente la fluidité membranaire (Monteiro *et al.*, 2013) et affecte la respiration mitochondriale. Ainsi, la ménadione augmente la perméabilité basale de la membrane mitochondriale interne, ce qui peut provoquer des perturbations physiques de la membrane (Monteiro *et al.*, 2013).

Après induction de la protéine recombinante dans la levure déficiente EG110, l'analyse par Western Blot a montré que le niveau d'expression de la protéine MnSOD de *P. carinii* (PcMnSOD chez EG110-Pc) était plus faible que celui observé pour la MnSOD de *S. cerevisiae* (ScMnSOD chez EG110-Sc) (**Figure 8**). Cette différence de niveau d'expression pourrait s'expliquer par un biais d'usage des codons dans le système hétérologue ; il est probable que les codons de *Pcsod2* n'étaient pas tout à fait optimisés pour être exprimés chez la levure (Lanza *et al.*, 2014).

Toutefois, la quantité de PcMnSOD exprimée par *S. cerevisiae* a été suffisante pour restaurer la déficience en MnSOD de la souche $\Delta sod2$, permettant ainsi aux levures complémentées avec la MnSOD de *P. carinii* (ou celle de *S. cerevisiae*) de croître de manière exponentielle en présence de ménadione contrairement à la souche mutante transformée avec le vecteur seul (**Figure 12**). De plus, les temps de doublement, calculés sur les cinétiques de croissance des souches complémentées, n'étaient pas significativement différents de ceux de la souche sauvage. Cependant, les souches EG110 atteignent la phase exponentielle avec un décalage par rapport à la souche de type sauvage. Ces différences observées sur les cinétiques de croissance pourraient être dues à la composition du milieu de culture utilisé pour les souches de type sauvage et les souches complémentées. En effet, les transformants EG110 qui croissent sur milieu synthétique sans uracile (SC-U) doivent produire de l'uracile à partir du gène plasmidique *Ura3*, alors que la souche de type sauvage EG103 utilise directement l'uracile qui est disponible dans le milieu. Ceci pourrait expliquer le décalage temporel avec lequel les souches mutantes atteignent la phase exponentielle par rapport à la souche sauvage.

Ces résultats, ainsi que ceux obtenus dans les études antérieures de l'équipe (Denis *et al.*, 1998 ; Denis *et al.*, 1996) indiquent que le gène *Pcsod2* code pour une MnSOD active qui complète efficacement la fonction MnSOD manquante dans la souche de levure déficiente et permet sa croissance en présence d'un stress oxydatif.

La localisation cellulaire de la PcMnSOD recombinante exprimée a ensuite été étudiée par co-immunomarquage. La PcMnSOD est co-localisée avec l'enzyme cytochrome oxydase de *S. cerevisiae*, CoxIV, confirmant ainsi la localisation mitochondriale attendue de

la MnSOD de *Pneumocystis*. De plus, le séquençage N-terminal de la PcMnSOD indique que *S. cerevisiae* a été capable de cliver le peptide signal mitochondrial de PcMnSOD au niveau du site de clivage prévu, libérant ainsi une protéine fonctionnelle à l'intérieur de la matrice mitochondriale de la levure. Bien que *Pneumocystis* soit phylogénétiquement plus proche de *Schizosaccharomyces pombe* que de *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2013), elle apparaît comme un modèle simple et pratique pour étudier la fonction des gènes de *Pneumocystis* d'autant que de nombreuses souches déficientes sont aujourd'hui disponibles.

D'autres espèces de champignons telles que *Cryptococcus neoformans* (Narasipura *et al.*, 2005), *Schizosaccharomyces pombe* (Jeong *et al.*, 2001), *Candida albicans* (Rhie *et al.*, 1999), *Aspergillus fumigatus* (Lambou *et al.*, 2010) possèdent une MnSOD mitochondriale comme en témoignent (i) la présence des peptides signaux N-terminaux ciblant les enzymes dans la matrice mitochondriale, et dans certains cas, (ii) la détection d'une activité MnSOD dans les fractions mitochondriales. Cependant, des MnSOD cytosoliques ont également été décrites chez de nombreuses espèces de champignons comme *Beauveria bassiana* (Xie *et al.*, 2010), *A. fumigatus* (Lambou *et al.*, 2010) ou *C. albicans* (Lamarre *et al.*, 2001). Le rôle respectif des MnSOD cytosolique et mitochondriale n'est pas encore clairement établi. Cependant, comme O₂^{•-} diffuse mal à travers les compartiments subcellulaires, sa détoxification doit se faire *in situ* (c'est-à-dire à l'endroit de sa production). De cette façon, il est raisonnable d'affirmer que la fonction principale de la MnSOD mitochondriale de *Pneumocystis* est de protéger le micro-champignon contre les radicaux oxygénés produits par la chaîne respiratoire de la cellule lors de son métabolisme aérobie. Toutefois, l'existence d'une SOD cytosolique et/ou de SOD(s) extracellulaire(s) chez *P. carinii* ne peut être exclue.

D'autre part, des auteurs ont complété la déficience en MnSOD mitochondriale de *S. cerevisiae* par une FeSOD d'*E. coli*, qu'ils ont réussi à exprimer au niveau de l'espace inter-membranaire mitochondrial (IMS) de la levure. Dans ces conditions, les levures transformées sont capables de croître dans un environnement pauvre en O₂. Toutefois, en présence de ménadione, les levures sont incapables de supporter ce stress oxydatif. Ces résultats montrent l'importance métabolique de la MnSOD, localisée dans la matrice mitochondriale (Balzan *et al.*, 1999).

Si le rôle des MnSODs dans la détoxification intracellulaire des EROs est clairement établi, certains auteurs associent certaines MnSODs à un facteur de virulence. Par exemple, chez le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*, une MnSOD mitochondriale (*BbSod3*) et une MnSOD cytosolique (*BbSod2*) ont été identifiées comme les principaux acteurs de l'activité globale SOD chez *B. bassiana* (Xie *et al.*, 2012). La virulence envers une

espèce de pucerons des mutants de *B. bassiana* était plus fortement réduite chez le double mutant *BbSod2/Sod3* que lorsque les deux gènes étaient délétés séparément, suggérant ainsi un rôle synergique des deux MnSODs dans la virulence de ces champignons vis-à-vis des pucerons (Xie *et al.*, 2012). Pour *Cryptococcus neoformans*, les souches délétées en *Sod2* (gène codant pour une MnSOD mitochondriale) présentaient une sensibilité accrue au stress oxydatif, à une température d'incubation plus élevée et devenaient surtout avirulentes chez l'animal (Giles *et al.*, 2005 ; Narasipura *et al.*, 2005). Ces résultats mettent en évidence que la fonction antioxydante de la MnSOD est cruciale dans le maintien de l'homéostasie des mitochondries, elles-mêmes primordiales pour la viabilité du champignon (Giles *et al.*, 2005). Cependant, d'autres études menées chez d'autres champignons contredisent ce rôle joué par la MnSOD dans la virulence. Chez *Aspergillus fumigatus*, un triple mutant $\Delta Sod1 / \Delta Sod2 / \Delta Sod3$ a été construit, dans lequel la Cu/ZnSOD (AfSOD1) et à la fois les MnSODs mitochondriale (AfSOD2) et cytosolique (AfSOD3) ont été supprimées (Lambou *et al.* 2010). La virulence du triple mutant n'a pas été affectée chez des souris immunodéprimées alors que, *in vitro*, il présente une forte sensibilité à la ménadione et une inhibition de la croissance à 45°C. Enfin, parmi les six gènes codant pour des SODs identifiées dans le génome de *Candida albicans*, *CaSod1* (Cu/ZnSOD cytosolique) et *CaSod5* (Cu/ZnSOD extracellulaire) ont été étudiées plus en détail à l'égard de leur rôle dans la pathogenèse (Frohner *et al.*, 2009). Ces deux gènes ont été présentés comme étant requis pour la virulence dans des modèles murins d'infections à *Candida* (Hwang *et al.*, 2002 ; Martchenko *et al.*, 2004). A l'inverse, le gène *CaSod2* qui code pour une MnSOD mitochondriale, jouerait un rôle dans l'adaptation au stress environnemental. En effet, la souche $\Delta Sod2$ de *C. albicans* est sensible à divers stress (composés redox cycliques, chaleur, fortes concentrations en sel ou en éthanol), mais n'a pas montré de défaut de virulence chez la souris (Hwang *et al.*, 2003).

A partir de ces études de virulence réalisées chez plusieurs champignons, la (les) fonction(s) exacte (s) de la MnSOD mitochondriale de *P. carinii* dans la pathogenèse est difficile à prévoir. Très probablement, son rôle principal est de détoxifier les $O_2^{\cdot -}$ générés à la suite de la respiration oxydative propre à ce microchampignon, mais l'étude de son rôle potentiel dans la virulence nécessite la délétion ou l'inactivation du gène chez *Pneumocystis*, deux approches actuellement hors de portée pour ce champignon non cultivable.

La MnSOD mitochondriale n'est probablement pas le composant unique du système antioxydant de *Pneumocystis*. À cet égard, quelques gènes ont déjà été identifiés. Les études transcriptomique de *Pneumocystis* ont mis en évidence une séquence codante pour une

catalase putative (Cushion *et al.*, 2007). Un autre gène de *P. carinii*, *Trr1* qui code pour une thiorédoxine réductase pourrait également participer à la protection du champignon contre le stress oxydatif (Kutty *et al.*, 2003). Enfin, le rôle d'une MAP kinase de *Pneumocystis*, Mkp1, dans le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire en réponse à des EROs a été rapporté (Fox et Smulian, 1999).

En conclusion, la caractérisation fonctionnelle de la PcMnSOD réalisée dans ce travail de thèse, permet d'améliorer nos connaissances sur le système antioxydant de *Pneumocystis*. Des études plus approfondies sur la fonction et l'interaction entre la PcMnSOD mitochondriale et les autres composants du système antioxydant devrait fournir de nouvelles perspectives dans la régulation de l'homéostasie des EROs chez *Pneumocystis*. De plus, cette étude nous a permis de mettre en place le système d'expression hétérologue au laboratoire qui pourra être utilisé pour l'étude fonctionnelle d'autres gènes d'intérêt chez *Pneumocystis*.

Chapitre 2: colonisation par *Pneumocystis* en fonction du statut immunitaire de l'hôte

La recherche de *Pneumocystis* par PCR pour le diagnostic de pneumocystose pose parfois des difficultés d'interprétation. Celle-ci est illustrée lorsque l'on trouve un résultat de PCR positive associée à un examen microscopique négatif chez un patient. En dehors des difficultés liées à l'interprétation d'une PCR *Pneumocystis* positive observée chez un patient, il apparaît important de s'interroger sur la signification de la colonisation pulmonaire par *Pneumocystis* (Olsson *et al.*, 2001).

Ainsi, dans mon travail de thèse, nous avons voulu évaluer l'influence du degré d'immunodépression des hôtes sur le risque d'infection par *Pneumocystis* sp., avec pour objectif principal de parvenir à une appréciation quantitative du risque de contamination par *Pneumocystis* sp. en fonction du degré d'immunodépression de l'hôte exposé.

Comme il est impossible de travailler dans ce contexte avec *P. jirovecii*, plusieurs espèces de mammifères sont utilisées comme modèles de pneumocystose après traitement par des corticostéroïdes, essentiellement les rats et les souris de laboratoire. Ces animaux sont des sources de parasites et apportent des informations sur la transmission, la physiopathologie de la pneumocystose, les relations hôte/parasite et le polymorphisme génétique des *Pneumocystis* sp. associé aux études sur la spécificité d'hôte, une caractéristique importante observée chez *Pneumocystis* spp (Dei-Cas *et al.*, 1998 ; Aliouat-Denis *et al.*, 2008). De plus, la physiopathologie de la maladie décrite chez ces modèles animaux est proche de celle observée chez l'homme (Pohlmeyer *et al.*, 1993 ; Aliouat *et al.*, 1997).

Dans notre étude, un modèle de transmission naturelle de *P. carinii*, qui mime efficacement l'infection humaine par *P. jirovecii*, est employé. Ce modèle, consiste à mettre en contact étroit, des rats non infectés par *P. carinii* présentant des niveaux variés d'immunodépression avec des rats développant la pneumocystose.

Dans un premier temps, il a été nécessaire de mettre en place un modèle animal d'immunodépression graduel chez le rat tout en gardant des niveaux d'immunodépression stables dans le temps. Cet objectif a été atteint et nous a permis par la suite d'étudier la susceptibilité de ces animaux vis-à-vis de *P. carinii*. Pour développer ce nouveau modèle animal nous avons (i) mis au point au laboratoire les méthodes de marquages spécifiques des lymphocytes TCD4 (LTCD4) et TCD8 (LTCD8) et (ii) adapté l'automate dédié aux

échantillons humains à ceux du rat pour déterminer les paramètres d'une Numération Formule Sanguine (NFS). L'ensemble de ces données nous a permis de calculer le nombre absolu de LTCD4 et LTCD8 pour apprécier le niveau d'immunodépression des rats. La littérature ne manque pas de références sur les paramètres hématologiques du rat (Bailly et Duprat 1990 ; Eccleston 1977 ; Groner *et al.*, 1986 ; Jain 1993 ; Matsuzawa *et al.*, 1993 ; **Tableau 8**). Cependant, il peut y avoir de grandes variations d'une étude à l'autre et il semblait à priori difficile d'établir une NFS de référence pour l'espèce *Rattus norvegicus*. Il existe un très grand nombre de facteurs de variation tel que le sexe, l'âge, le site de ponction, la lignée, le statut médical, et bien sûr la méthode d'étude de ces paramètres sanguins, manuelle ou automatisée. Tous ces facteurs ne peuvent pas être contrôlés de manière semblable par tous les laboratoires et pour toutes les expérimentations. Toutefois, les valeurs biologiques de référence présentées dans ce travail (**Figure 13, Tableau 8**) sont une moyenne des données obtenues par certains auteurs sur des rats Sprague Dawley (SD) de sexe femelle et de poids proches des rats utilisés dans notre étude (Eccleston, 1977, Groner *et al.*, 1986 ; Jain, 1986 ; Jain, 1993 ; Balilly *et al.*, 1990 ; Matsuzawa *et al.*, 1993).

Dans un second temps, les rats SD graduellement immunodéprimés ont été mis en contact direct (même cage) pendant 2 semaines avec des rats nude développant la pneumocystose (« rats donneurs »). Ces derniers ont été inoculés par voie endotrachéale avec *P. carinii* et mis en contact avec les rats SD 3 semaines post-inoculation ; cet intervalle de temps (3 à 5 semaines post-inoculation) a été choisi car il correspond à la période d'excrétion aérienne maximale de *P. carinii* (Choukri *et al.*, 2011). A la fin de l'expérience, les rats ont été sacrifiés et la charge fongique pulmonaire a été évaluée par microscopie ou par qPCR. Nous avons combiné ces deux méthodes, traditionnellement utilisées pour le diagnostic, afin de travailler dans des conditions optimales d'objectivité et de sensibilité.

Les résultats obtenus (microscopie ou qPCR) sont intéressants et originaux à double titre (i) ils montrent, pour la première fois dans un modèle expérimental, une relation positive entre la dose de corticoïdes administrés aux animaux et le niveau de colonisation par *Pneumocystis* et (ii) une relation inverse entre le taux de LTCD4 ou LTCD8 et le niveau de colonisation par *Pneumocystis*. De plus, le fait d'observer le même phénomène avec les LTCD8 renforce le rôle de ces cellules dans l'immunité anti-*Pneumocystis*. Enfin, d'un point de vue purement technique, les deux méthodes utilisées pour déterminer la charge parasitaire (BTO, qPCR *dhfr*) se sont avérées statistiquement concordantes. Les avantages majeurs de la qPCR sont sa spécificité, sa relative rapidité, son objectivité et sa sensibilité ; contrairement à

Tableau 8 : Résultats regroupés de la NFS pour des rats femelles Sprague Dawley 250 g de 10 à 12 semaines

	Hémoglobine (g/dL)	Hématocrite (%)	VGM (fL)	TCMH (pg)	CCMH (g/dL)
1. C. River (1997) (2s)	15 [13,6 – 16,4]	43,5 [38,5 – 48,5]	59,2 [52,4 – 66]	20,4 [17,8 – 23]	34,5 [31,7 – 37,3]
1. C. River (1997) (1s)	15 [14,3 – 15,7]	43,5 [41 – 46]	59,2 [55,8 – 62,6]	20,4 [19,1 – 21,7]	34,5 [33,1 – 35,9]
2. T. Matsuzawa (1993)	15,5 [14,5 – 16,5]	45,1 [42,3 – 47,9]			
3. Bailly et Duprat (1990)	16,6 [15 – 18]	46 [41 – 50]	59 [55 – 64]	21,4 [19,4 – 24,2]	36,2 [34,3 – 39]
4. Wolfensohn et Lloyd (1994)					
(Moyenne données 1 (1s),2,3)	15,7 [14,6 – 16,7]	44,9 [41,4 – 48]	59,1 [55,4 – 63,3]	20,9 [19,2 – 22,9]	35,3 [33,7 – 37,4]
(Moyenne données 1 (2s),2,3)	15,7 [14,4 – 17]	44,9 [40,6 – 48,8]	59,1 [53,7 – 65]	20,9 [18,6 – 23,6]	35,3 [33 – 38,1]
	Globules rouges (T/L)	Globules blancs (G/L)	PNN (%)	PN éosinophiles (%)	PN basophiles (%)
1. C. River (1997) (2s)	7,36 [6,18 – 8,54]	7,6 [2,6 – 12,6]	10,3 [0 – 20,9]	1,6 [0 – 4,2]	0,1 [0 – 0,5]
1. C. River (1997) (1s)	7,36 [6,77 – 7,95]	7,6 [5,1 – 10,1]	10,3 [5 – 15,6]	1,6 [0,3 – 2,9]	0,1 [0 – 0,3]
2. T. Matsuzawa (1993)	8,17 [7,55 – 8,79]	6,1 [3,4 – 7,8]			
3. Bailly et Duprat 1990	7,77 [6,67 – 8,8]	8,8 [4,8 – 16,6]	8 [3 – 21,3]	0 [0 – 2]	0
4. Wolfensohn et Lloyd (1994)					
(Moyenne données 1 (1s),2,3)	7,8 [7 – 8,5]	7,5 [4,4 – 11,5]	9,1 [4 – 18,4]	0,8 [0,1 – 2,4]	0 [0 – 0,2]
(Moyenne données 1 (2s),2,3)	7,8 [6,8 – 8,7]	7,5 [3,6 – 12,3]	9,1 [2,7 – 19,3]	0,8 [0,1 – 3,1]	0 [0 – 0,3]
	Lymphocytes (%)	Monocytes (%)	Plaquettes (G/L)		
1. C. River (1997) (2s)	86,4 [72,6 – 100,2]	1,3 [0 – 4,9]	1041 [683 – 1399]		
1. C. River (1997) (1s)	86,4 [79,5 – 93,3]	1,3 [0 – 3,1]	1041 [862 – 1220]		
2. T. Matsuzawa (1993)			984,1 [795–1173,3]		
3. Bailly et Duprat 1990	90 [77 – 96]	1 [0 – 4]	1281 [971 – 1656]		
4. Wolfensohn et Lloyd (1994)					
(Moyenne données 1 (1s),2,3)	88,2 [78,2 – 94,6]	1,1 [0 – 3,5]	1102 [876 – 1350]		
(Moyenne données 1 (2s),2,3)	88,2 [74,8 – 98,1]	1,1 [0 – 4,5]	1102 [816,3–1409]		

VGM : volume globulaire moyen, TCMH : taux corpusculaire moyen en hémoglobine, CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, PNN : polynucléaires neutrophiles.

la lecture microscopique qui nécessite une expertise pointue et présente l'inconvénient d'être très chronophage.

Les études publiées sur la relation LTCD4 / colonisation par *Pneumocystis* sont parfois contradictoires. Leigh et collaborateurs ont signalé que la colonisation par *Pneumocystis* augmente quand le nombre de LTCD4 diminue (Leigh *et al.*, 1993). En effet, ils ont constaté que la prévalence de colonisation était de 10% chez les patients VIH + ayant un taux de LTCD4 >400 cellules/ mm³ de sang, 20% chez ceux ayant un taux de LTCD4 compris entre 60 et 400 cellules/ mm³, et une prévalence de 40% chez ceux ayant un taux de LTCD4 <60/ mm³. Cependant, d'autres études n'ont pas pu montrer cette relation, et il est clair que la colonisation peut se produire également chez les personnes ayant un nombre plus élevé de LTCD4 ainsi que chez ceux qui sont sous traitement antirétroviral ou sous prophylaxie anti-*Pneumocystis* (Huang *et al.*, 2003, Morris *et al.*, 2004).

De manière intéressante, Nevez et collaborateurs ont montré que le taux de LTCD4 jouait un rôle important chez les sujets VIH-négatifs colonisés par *Pneumocystis*. Chez les patients pour lesquels l'immunité cellulaire a pu être évaluée, une prévalence de 30% de colonisation par *P. jirovecii* a été observée avec un taux de LTCD4 de 400 cellules/ mm³ (Nevez *et al.*, 1999a). De plus, certaines études ont montré que le facteur de risque le plus important pour le développement de la pneumocystose était un taux de LTCD4 inférieur à 200 cellules/mm³, avec un risque croissant lorsque ce taux baisse en dessous de ce seuil (Phair *et al.*, 1990 ; Stansell *et al.*, 1997).

Notre étude conforte ces observations en montrant une relation inverse entre la charge fongique et le taux de LTCD4 et apporte l'avantage de pouvoir travailler avec un modèle animal reproductible où le système immunitaire peut être manipulé. De plus, contrairement à la plupart des études publiées chez l'homme, notre démarche permet une analyse quantitative de la charge fongique pulmonaire, étape importante vers une appréciation du risque.

La réponse adaptative de l'hôte à l'infection par *Pneumocystis* implique des réponses immunitaires humorales et cellulaires, impliquant également les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques, les neutrophiles, et les cytokines qui agissent en concertation pour promouvoir la clairance du microchampignon. Le rôle central des LTCD4 dans le contrôle de l'infection par *Pneumocystis* a été bien établi. En effet, une forte corrélation existe entre la diminution importante du nombre de LTCD4 périphériques et le risque accru de développement d'une PPc (Phair *et al.*, 1990). A notre connaissance, taux de LTCD4 mis à part, il n'y a pas d'autres facteurs de risque connus pour la PPc chez les patients VIH +. La

physiopathologie de la PPc comprend une étape de colonisation avant le développement de la maladie, et par conséquent, une étude de la colonisation chez ces patients immunodéprimés pourrait être un outil intéressant pour la prévention de la PPc (Mekinian *et al.*, 2010). L'introduction de la thérapie antirétrovirale et la remontée significative du taux de LTCD4 ont considérablement diminué la fréquence de PPc chez ces patients, démontrant une nouvelle fois l'importance des LTCD4 dans la prévention et le contrôle de l'infection à *Pneumocystis* (Kaplan *et al.*, 2000). D'autres études ont montré une corrélation similaire entre le nombre de LTCD4 et la susceptibilité à la PPc chez les patients non infectés par le VIH recevant un traitement immunosuppresseur après une transplantation ou après une chimiothérapie anti-cancéreuse (Mansharamani *et al.*, 2000).

La déplétion des LTCD8 dans un modèle murin n'a pas abouti à une augmentation de la charge fongique pulmonaire, ce qui suggère que ces cellules ne contribuent pas directement au contrôle de l'infection (Rose *et al.*, 2006). Ces études soulignent la nécessité d'une signalisation optimale des LTCD4 pour le contrôle précoce de l'infection par *Pneumocystis*. Bien que le rôle central des LTCD4 dans le contrôle de l'infection soit bien établi, la contribution des LTCD8 dans la protection est plus controversée, en particulier dans le contexte de déficits en LTCD4. Des expériences réalisées chez des souris immunocompétentes infectées par *P. murina* montrent que les LTCD4 et LTCD8 s'accumulent dans les alvéoles pulmonaires et contrôlent ainsi l'infection (Beck *et al.*, 1998a). Contrairement à la susceptibilité excessive des souris LTCD4 knock-out à l'infection par *Pneumocystis* (Beck *et al.*, 1993), les souris microglobuline-2 knock-out (déficientes en LTCD8) ne sont pas susceptibles à *Pneumocystis* (Hanano *et al.*, 1996). De plus, chez les souris déficientes en LTCD4, l'infection à *Pneumocystis* conduit à un afflux des LTCD8 dans les poumons, bien que ces souris ne parviennent pas à la contrôler (Beck *et al.*, 1991). D'autres études de reconstitution des cellules T chez les souris ayant une immunodéficience combinée sévère (SCID) en utilisant des splénocytes déficients en LTCD4 ou LTCD8, ont également échoué à montrer un rôle des LTCD8 dans la protection contre l'infection à *Pneumocystis* (Roths *et al.*, 1992). Enfin, dans le cadre de co-infections SIV/*Pneumocystis*, des études ont montré que chez des primates (Macaque rhesus, *Macaca mulatta*), infectés par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), l'infection par *Pneumocystis* entraîne une accumulation significative des LTCD8 dans les LBA comparé à ceux infectés par le SIV seul. Toutefois, l'afflux considérable des LTCD8 dans les poumons du singe ne semble pas être suffisant pour induire la clairance de *Pneumocystis* (Croix *et al.*, 2002).

A l'inverse, d'autres études suggèrent que les LTCD8 peuvent contribuer à une réponse protectrice contre l'infection par *Pneumocystis*, en particulier dans un contexte d'immunodépression (Beck *et al.*, 1996). Des preuves à l'appui du rôle protecteur des LTCD8 sont fournies par des études réalisées chez un modèle murin d'infection à *Pneumocystis* avec déplétion sélective des LTCD4 ou/et LTCD8. Alors que les souris déficientes en LTCD8 seuls ne sont pas sensibles à l'infection, les souris déficientes pour les deux types de cellules avaient une charge fongique plus élevée que celles qui étaient déficientes en LTCD4 seuls, ce qui suggère un rôle protecteur, au moins partiel, des LTCD8 (Beck *et al.*, 1996). Dans des études plus détaillées qui examinent la fonction des cellules T, Kolls et collaborateurs ont démontré que l'administration d'IFN γ dans les poumons aboutissait à un contrôle de l'infection dans un modèle murin de cellules déficientes en LTCD4 et que l'effet protecteur était associé à un recrutement accru des LTCD8 (Kolls *et al.*, 1999). D'autres études ont démontré un effet protecteur des LTCD8 cytotoxiques de type 1 et que ces cellules facilitaient la mort de *Pneumocystis* médiée par les macrophages *in vitro*, alors que les cellules TCD8 cytotoxiques de type 2 rendaient l'hôte susceptible aux infections pulmonaires (McAllister *et al.*, 2004). Ainsi, les études de Kolls et collaborateurs qui décortiquent le rôle de chacun des sous-types de LTCD8 peuvent expliquer certaines divergences observées dans les études antérieures (McAllister *et al.*, 2004).

Nos résultats, qui montrent une relation inverse entre la colonisation par *P. carinii* et le taux de LTCD4 et LTCD8 confortent ces hypothèses et l'implication des LTCD8 dans l'immunité anti-*Pneumocystis*. Toutefois, comme la dexaméthasone agit globalement sur le système immunitaire et sur l'ensemble des lymphocytes T (Chinenov et Rogastsky, 2007), notre étude ne permet pas d'affirmer un rôle unique des LTCD8 mais tout au moins suggère une coopération efficace entre les LTCD4 et LTCD8 dans le contrôle de l'infection et/ou la clairance du microchampignon.

Les pneumocystoses rapportées chez les patients présentant des mutations génétiques affectant la production d'immunoglobulines (Milledge *et al.*, 2003), et le fait que 70% des adultes, ainsi que 70 à 100% des enfants en bonne santé soient séropositifs et présentent rarement une infection à *Pneumocystis*, fournissent des preuves solides que l'immunité humorale anti-*Pneumocystis* est une composante essentielle de l'immunité protectrice contre *Pneumocystis* (Morris et Norris, 2012 ; Pifer *et al.*, 1978 ; Wakefield *et al.*, 1990a ; Peglow *et al.*, 1990). Plusieurs études expérimentales sur les réponses anticorps après exposition des animaux à *Pneumocystis*, supportent également la corrélation entre une augmentation des titres d'anticorps anti-*Pneumocystis* et la prévention de l'infection (Furuta *et al.*, 1985 ; Kling

et al., 2009). Dans les premières études réalisées chez des rats traités par les corticoïdes, Walzer et Rutledge ont démontré que la diminution de la corticothérapie chez les rats infectés par *Pneumocystis* entraînait une augmentation des titres en anticorps anti-*Pneumocystis* et une réduction de la charge fongique concomitante (Walzer et Rutledge, 1982). D'autres preuves directes de la protection médiée par les anticorps ont été rapportées par Gigliotti et Hughes, qui ont montré que le transfert passif d'un anticorps monoclonal anti-*Pneumocystis* promouvait la clairance de *Pneumocystis* chez les rats et les furets immunodéprimés par des corticoïdes (Gigliotti et Hughes, 1988). Ces résultats ont également été confortés par des études dans lesquelles le transfert passif de sérum hyperimmun contre *Pneumocystis*, ou des anticorps monoclonaux conférait une protection contre la PPc dans des modèles murins (Bartlett *et al.*, 1998 ; Gigliotti *et al.*, 2002, Roths *et al.*, 1993). Enfin, une étude récente réalisée en collaboration avec notre équipe de recherche, avait pour objectif principal de comprendre le rôle de sujets immunocompétents dans la diffusion de *Pneumocystis* dans l'environnement (Menotti *et al.*, 2013). Pour cela, les auteurs ont quantifié par qPCR l'excrétion aérienne de *P. carinii* dans l'air environnant de rats SD infectés expérimentalement, parallèlement à la quantification des charges fongiques dans les poumons et aux titres d'anticorps sériques spécifiques. Les résultats montrent clairement une augmentation du titre des anticorps anti-*Pneumocystis* précédant la clairance pulmonaire de *P. carinii* et l'arrêt de son excrétion aérienne (Menotti *et al.*, 2013). Dans mon travail de thèse, nous avons pris la précaution de déterminer le titre en anticorps anti-*Pneumocystis* (IgM et IgG) car l'apparition d'anticorps spécifiques pouvait influencer l'interprétation de nos résultats concernant le niveau de colonisation par *P. carinii* des rats SD mis en contact. Comme tous nos rats se sont révélés séronégatifs pour *Pneumocystis*, l'interprétation de nos résultats n'est donc pas biaisée par une éventuelle réponse humorale.

La pneumonie à *Pneumocystis* reste la plus fréquente maladie définissant le SIDA dans les pays développés chez les patients infectés par le VIH. En France, 32% des cas de SIDA, qui ont été enregistrés par l'Institut de Veille Sanitaire en 2009, étaient liés à la PPc (Cazein *et al.*, 2010). Elle est également observée chez les patients non infectés par le VIH qui reçoivent une thérapie immunosuppressive en particulier pour la transplantation d'organes (Gordon *et al.*, 1999). En l'absence de prophylaxie, la PPc se produit chez 2 à 24% des transplantés rénaux, avec un taux de mortalité allant jusqu'à 49% (Gordon *et al.*, 1999). Ces données montrent que la PPc demeure un problème de santé publique et nous incitent à améliorer toujours plus la prise en charge de ces patients. En effet, les infections à *P. jirovecii*

couvrent de larges manifestations cliniques dont la PPc représente une partie mineure, et les infections bénignes, comme la colonisation pulmonaire, représentent la partie principale (Nevez *et al.*, 1999).

P. jirovecii continue d'être un microchampignon souvent mortel chez les patients immunodéprimés, notamment les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et les patients recevant une transplantation de cellules souches humaines ou d'organes solides associée à un traitement immunosuppresseur (Kovacs *et al.*, 2009 ; Krajicek *et al.*, 2008). Bien que la prophylaxie ait été très efficace pour la prévention de la PPc chez les patients VIH +, l'identification des patients qui sont à risque de PPc, et donc des candidats appropriés pour la prophylaxie dans les populations non-VIH, est plus difficile. Au cours des deux dernières décennies, des foyers notables de PPc sont apparus, en particulier chez les transplantés rénaux, principalement dans des centres hospitaliers européens et japonais (Arichi *et al.*, 2009 ; de Boer *et al.*, 2011). Ce phénomène est en partie dû à l'évolution des traitements immunosuppresseurs (et leur utilisation grandissante) et l'emploi irrégulier d'une prophylaxie anti-*Pneumocystis*.

Au cours de ces dernières années, des cas groupés de PPc nosocomiales ont été rapportés chez des patients immunodéprimés. La transmission horizontale interhumaine de *P. jirovecii* est le mode de contamination le plus probable (Helweg-Larsen *et al.*, 1998 ; Miller *et al.*, 2002 ; Vargas *et al.*, 2000), même par contact entre individus immunocompétents (par exemple, les membres de l'équipe hospitalière) transitoirement colonisés par *Pneumocystis* (Chabe *et al.*, 2004). En effet, la détection de l'ADN de *P. jirovecii* dans les échantillons d'air collectés dans les chambres des hôpitaux et celles de patients atteints de PPc indique la possibilité de propagation d'aérosol (Bartlett *et al.*, 1997 ; Olsson *et al.*, 1998 ; Sing *et al.*, 1999), et un mode d'acquisition aéroporté a également été observé avec des modèles animaux (Hughes 1982, Martinez *et al.*, 2013). Choukri et collaborateurs ont récemment fourni des arguments contre l'existence de sources environnementales de *P. jirovecii*. Les auteurs ont montré que plus on s'éloignait de la chambre d'un patient atteint de pneumocystose, moins il était possible de détecter *P. jirovecii* dans l'air (79,8% de positivité à 1m du patient *versus* 33,3% à 8m). Ces résultats confortent à la fois l'hypothèse du risque accru de contamination par *Pneumocystis* lors d'un contact étroit avec un patient infecté et la propagation aérienne relativement large (1-8m) de *P. jirovecii* dans l'environnement proche du patient (Choukri *et al.*, 2010).

De manière intéressante, les greffés rénaux semblent être à risque accru de contracter une infection asymptomatique à *Pneumocystis* ou une pneumocystose. Le risque de

développer une PPc chez les patients qui ne reçoivent pas de prophylaxie après une transplantation rénale est d'environ 5%, et plusieurs travaux rapportent des cas groupés chez des patients greffés rénaux (Chave *et al.*, 1991 ; de Boer *et al.*, 2007 ; Hardy *et al.*, 1984 ; Hennequin *et al.*, 1995 ; Hocker *et al.*, 2005 ; Olsson *et al.*, 2001a, Rabodonirina *et al.*, 2004). La prophylaxie contre la PPc après transplantation rénale n'est pas systématiquement réalisée pour tous les patients, probablement en raison des effets néphrotoxiques résultant du traitement de choix, le triméthoprime-sulfaméthoxazole, par exemple, une augmentation de la créatinine sérique ou l'inhibition de la sécrétion du potassium rénal, provoquant parfois une hyperkaliémie. Néanmoins, il y a un consensus international pour préconiser une prophylaxie contre la PPc pendant au minimum 4 mois après la transplantation rénale ainsi que pour les patients traités pour un rejet de greffe (EBPG, 2002 ; Masur *et al.*, 2002).

En conclusion, les pathogènes opportunistes peuvent avoir un impact dévastateur sur les populations immunodéprimées. Dans notre cas, cela souligne la nécessité de connaître le niveau de susceptibilité vis-à-vis de *Pneumocystis* et le risque associé de développer une PPc afin de mettre en œuvre, dès que possible, une prophylaxie adaptée. Notre travail suggère que le suivi régulier des taux de LTCD4, LTCD8 chez ce type de patient combiné à la détection/quantification (qPCR) de *P. jirovecii* pourraient servir d'indicateurs biologiques pour établir le risque de développer ultérieurement une pneumocystose.

Chapitre 3 : Evaluation du portage de *Pneumocystis jirovecii* chez les enfants et les adultes atteints de pathologies respiratoires au Nord du Liban (Tripoli)

Nous avons rapporté les premières données sur la prévalence de *P. jirovecii* chez les adultes et enfants atteints de pathologies respiratoires au Liban. Notre étude a révélé une faible prévalence de colonisation de 5,2%, qui est cependant similaire à celle observée chez les patients atteints de pathologies respiratoires dans d'autres pays en développement tels que l'Iran (7,3%) (Khodadadi *et al.*, 2013). Nos données confirment la fréquence élevée (17,3%) de la colonisation par *Pneumocystis* chez les patients atteints de BPCO (16 à 55% selon Calderon *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2004b; Nevez *et al.*, 2006; Sivam *et al.*, 2011), pour lesquels une association entre la colonisation par *Pneumocystis* et la sévérité de la BPCO a été rapportée (Calderon *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2006) et soulève la possibilité de l'implication de *Pneumocystis* dans la pathogenèse de cette maladie (Morris *et al.*, 2004b). La prévalence élevée de la colonisation par *Pneumocystis* chez les patients atteints de BPCO confirme par ailleurs leur rôle potentiel de réservoir pour le maintien du champignon et sa transmission dans la population (Morris *et al.*, 2008a). Nos données mettent également en évidence la colonisation possible par *Pneumocystis* des patients atteints de grippe, qui a déjà été rapportée précédemment (Pulcini *et al.*, 2012). De façon intéressante, *Pneumocystis* n'a pas été retrouvé chez les patients asthmatiques, suggérant un risque plus faible de colonisation chez ces patients. Bien qu'une forte prévalence de la colonisation par *Pneumocystis* ait été rapportée chez les patients atteints de cancer pulmonaire (De la Horra *et al.*, 2004 ; Mori *et al.*, 2010), aucun patient atteint de cancer pulmonaire n'était colonisé dans notre étude, mais ce sous-groupe ne comprenait que 2 patients.

Compte tenu de la faible prévalence de la PPc au Liban chez les patients infectés par le VIH (10,9%) (Naba *et al.*, 2010), qui constituent un réservoir majeur de transmission de *Pneumocystis*, la faible prévalence de la colonisation chez les patients libanais et iraniens pourrait être expliquée par une charge globale faible de *Pneumocystis* dans ces pays et par suite une transmission limitée de ce microchampignon. De plus, la PPc ayant été signalée comme une étiologie rare de pneumonie dans plusieurs pays africains comme l'Ouganda (3 à

3,9%) (Kyekyune *et al.*, 2010, Taylor *et al.*, 2011) ou le Malawi (6.7%) (Van Oosterhout *et al.*, 2007), une influence des facteurs climatiques pourraient également être suggérée. Toutefois, les données actuellement disponibles sur l'impact des facteurs climatiques sur les infections à *P. jirovecii* sont contradictoires et difficiles à interpréter (Hoover *et al.*, 1991 ; Lubis *et al.*, 2003 ; Miller *et al.*, 1992 ; Sing *et al.*, 2009 ; Vanhems *et al.*, 1992 ; Varela *et al.*, 2004). Bien qu'en Espagne, un plus grand nombre de cas de PPc ait été rapporté en hiver, ce qui suggère une corrélation négative entre la PPc et la température (Varela *et al.*, 2004), les données les plus récentes de l'Allemagne ou du Royaume-Uni ont trouvé une corrélation positive entre l'incidence de la PPc et la température moyenne, avec une incidence maximale de la PPc en été (Sing *et al.*, 2009, Djawe *et al.*, 2013). Les effets des facteurs environnementaux semblent donc complexes et d'autres études seront nécessaires pour préciser leur rôle. Compte tenu de l'incidence significativement plus faible de la PPc chez les africains infectés par le VIH et résidant aux Pays-Bas par rapport aux patients occidentaux, des différences de susceptibilité génétique pourraient également être envisagées pour expliquer la faible prévalence de la colonisation par *P. jirovecii* au Liban (Schoffelen *et al.*, 2013). Le rôle des facteurs génétiques serait intéressant à explorer dans cette population.

En outre, la faible prévalence de colonisation par *P. jirovecii* que nous avons obtenue chez les patients atteints de pathologies respiratoires peut être due au faible nombre de patients connus pour être à risque élevé de colonisation, tels que les patients atteints de cancer, de mucoviscidose ou de pathologies interstitielles (Gutierrez *et al.*, 2011) et au nombre élevé de patients atteints de rhinopharyngite, d'asthme ou de grippe, qui ont probablement un risque plus faible d'être colonisés par *Pneumocystis*. Ceci pourrait ainsi expliquer au moins partiellement la prévalence globale inférieure que nous avons obtenue par rapport aux études qui ont été menées chez des patients atteints de maladies respiratoires en Espagne (27,1% dans une population de patients atteints de cancer pulmonaire, mucoviscidose, pathologie interstitielle et BPCO) (Montes-Cano *et al.*, 2004), au Royaume-Uni (18% dans une population incluant principalement des patients atteints de cancer pulmonaire ou de pneumonie (Maskell *et al.*, 2003), en Allemagne (21,3% dans une population comprenant un grand nombre de patients atteint de BPCO, mucoviscidose, cancer pulmonaire, ou tuberculose) (Probst *et al.*, 2000) ou en Italie (25,5% dans une population incluant principalement des patients suspectés avec des infections pulmonaires) (Dimonte *et al.*, 2013). Ces différences dans le « *design* » des études pourraient donc contribuer à la variation des résultats inter-études, mais nous pensons que notre étude reflète fortement

l'épidémiologie de la colonisation par *P. jirovecii* au Liban en raison de l'inclusion d'un grand nombre de patients avec des critères d'inclusions clairs, une standardisation du recueil des données et l'emploi de méthodes hautement sensibles pour la détection de *P. jirovecii*.

Dans cette étude, la colonisation par *Pneumocystis* a été détectée chez des sujets atteints de diverses pathologies respiratoires (BPCO, asthme, pneumonie, grippe, rhinopharyngite, bronchite). Cependant, la BPCO a été montrée comme étant la seule pathologie respiratoire associée à un risque accru de colonisation par *P. jirovecii* (p -value<0,05). Ce résultat confirme l'analyse multivariée de Morris et collaborateurs qui ont identifié la BPCO comme le seul facteur prédictif important de colonisation (Morris *et al.*, 2004b). En revanche, une autre étude n'a montré aucune association entre la colonisation par *Pneumocystis* et la BPCO. Toutefois, cette étude comprenait des patients atteints de BPCO modérée (Maskell *et al.*, 2003).

Étonnamment, malgré une prévalence élevée de la colonisation par *P. jirovecii* rapportée chez les patients atteints de maladies auto-immunes recevant un traitement immunosuppresseur (18%) (Mekinian *et al.*, 2011) ou traités par corticothérapie (prévalence de 44% chez les patients recevant plus de 20 mg par jour de prednisolone versus 12% pour les patients ne recevant pas de corticostéroïdes) (Maskell *et al.*, 2003) et l'existence d'une association entre la corticothérapie et la colonisation par *Pneumocystis* rapportée par plusieurs études (Maskell *et al.*, 2003, Medrano *et al.*, 2005, Mekinian *et al.*, 2011, Wissmann *et al.*, 2011), ces critères n'ont pas été identifiés comme facteurs de risque dans notre étude. Ce résultat confirme les données de Morris et collaborateurs qui ont constaté que l'utilisation de corticostéroïdes par voie orale n'était pas un facteur de risque de colonisation (Morris *et al.* 2004b). Dans notre étude, cette absence de relation est aussi probablement liée au faible nombre de patients subissant une corticothérapie (seulement 5). Une autre particularité de la population libanaise était la fréquence très élevée des fumeurs actifs ou passifs. Cependant, les fréquences similaires des fumeurs chez les patients colonisés et non colonisés vont dans le sens des données antérieures montrant que le tabagisme n'est pas un facteur de risque de colonisation par *Pneumocystis* (Mekinian *et al.*, 2011, Morris *et al.*, 2004b).

Enfin, la détection de *Pneumocystis* dans le LROP et sur écouvillon nasal, avec une fréquence similaire à celle obtenue dans le crachat ou le LBA, a permis de confirmer l'utilité de ces prélèvements non invasifs pour la détection de *Pneumocystis* (Vargas *et al.*, 2010).

Le génotypage au locus *mtLSUrRNA* a révélé une forte prévalence du génotype 2 (71,4%), alors que les génotypes 1 et 3 ont été retrouvés chez moins de patients (28,6% et 14,3% respectivement). Nos résultats sont en contraste avec l'étude publiée en Ouganda où le génotypage des amplicons *mtLSUrRNA* a montré la présence de 2 génotypes seulement (1 et 3), avec 3 des 7 patients colonisés ayant une infection mixte par ces 2 génotypes (Taylor *et al.*, 2012), et avec les études épidémiologiques réalisées en Espagne sur (i) des patients atteints de diverses pathologies pulmonaires, pour lesquels une forte prévalence du génotype 1 (45%) et du génotype 3 (40%) et une faible prévalence du génotype 2 (10%) ont été retrouvées (Montes-Cano *et al.*, 2004), et (ii) chez les patients immunodéprimés (Esteves *et al.*, 2008), pour lesquels la prévalence des génotypes 1, 2 et 3 était de 64%, 11% et 25%, respectivement. Le génotype 1 a également été retrouvé prédominant chez les patients immunodéprimés au Portugal (49% vs 22% pour le génotype 2) (Esteves *et al.*, 2008), chez les patients brésiliens atteints de mucoviscidose (41,6% vs 16,6% pour le génotype 2) (Pederiva *et al.*, 2012), et en Australie où il représente 87% (van Hal *et al.*, 2009).

Mais nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Medrano et collaborateurs en 2005, qui ont retrouvé en Espagne une forte prévalence du génotype 2 (40%) et du génotype 1 (30%) et une fréquence plus faible du génotype 3 (20%) (Medrano *et al.*, 2005). De même, aux Etats-Unis, des prévalences similaires ont été retrouvées pour les génotypes 1 et 2 (38% et 36,7%, respectivement) au cours d'une vaste étude menée sur les cas de PPc associés au SIDA dans cinq villes (Beard *et al.*, 2000). Le génotype 2 est le plus fréquemment retrouvé en Italie (Dimonte *et al.*, 2013). Les données aux États-Unis et, plus récemment, dans le nord de l'Inde ont montré que le génotype 2 a été le plus fréquemment observé dans les échantillons obtenus des adultes (environ 42% des échantillons) (Beard *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2011). En revanche, le génotype 3, retrouvé chez 1 seul patient dans notre étude, a été identifié comme étant le plus fréquent (57%) dans une enquête en Afrique (Miller *et al.*, 2003).

Comme le montrent nos résultats, un patient sur 7 (14,3%) a été co-infecté avec 2 génotypes de *P. jirovecii*. Les infections mixtes (avec plus d'un génotype dans un échantillon, sur la base de l'analyse de séquence du gène multicopie de la *mtLSUrRNA*) ont été signalées dans de nombreuses études (Beard *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2003; Volpe *et al.*, 2001). Le taux est très variable, allant de 3,7% en Espagne (Montes-Cano *et al.*, 2004), 6% dans le nord de l'Inde (Gupta *et al.*, 2011), jusqu'à plus de 10% aux États-Unis (Beard *et al.*, 2000). Ces échantillons pourraient contenir soit deux

souches différentes de *P. jirovecii*, soit une seule souche contenant plus d'une mitochondrie par organisme (avec des variations génotypiques entre les copies).

Dans 2 études examinant les effets des changements climatiques sur la fréquence des génotypes de *P. jirovecii* et sur la mortalité due à la PPc, menées sur une grande cohorte de patients VIH au Royaume-Uni (Miller *et al.*, 2007 ; Miller *et al.*, 2010), les données de génotypage ont montré qu'il y avait une variation mensuelle et saisonnière significative de la présence du génotype 2 (associée à des températures plus élevées) et des génotypes mixtes, mais pas des génotypes 1, 3, ou 4 (Miller *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent un rôle potentiel des facteurs liés à l'hôte (réponse immune, maladies/traitements sous-jacents) mais également des exigences environnementales pour la survie des différents génotypes de *P. jirovecii* et leur transmission.

Dans notre expérience, l'amplification d'ADN de *Pneumocystis* pour les marqueurs ITS et DHPS dans les prélèvements provenant des patients colonisés n'a été possible que pour un seul des 7 patients positifs en PCR nichée ciblant le gène *mtLSUrRNA*, pour lequel seul le marqueur DHPS a pu être séquencé. Et on sait que ce résultat est probablement lié à la quantité insuffisante d'ADN du champignon qui n'a pas permis d'amplifier ces séquences monocopies. D'autres auteurs ont rapporté un succès réduit dans l'amplification de ces gènes (Beard *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000). En tenant compte des mutations les plus fréquemment identifiées, positionnées sur les acides aminés 55 et 57 de la protéine DHPS, et qui peuvent être liées à une résistance aux sulfamides, notre échantillon présentait un génotype sauvage (non muté).

Ce résultat est le reflet d'un problème majeur pour tracer et identifier valablement les souches humaines de *Pneumocystis*, qui est l'absence de marqueur moléculaire fiable, suffisamment sensible pour détecter les patients avec PPc mais surtout les porteurs de ce microchampignon, et suffisamment discriminant pour différencier les isolats du parasite. En effet dans notre étude, le gène multicopie *mtLSUrRNA* semble assez sensible pour amplifier de l'ADN même dans les prélèvements non invasifs et chez les porteurs. Cependant, l'utilisation d'un gène multicopie pour le typage peut créer un biais dans la mesure où les différentes copies d'un même gène chez un même individu peuvent être polymorphes. Seule l'utilisation de séquences monocopies pourrait permettre de contourner cet obstacle. En plus des marqueurs ITS ou DHPS, l'utilisation d'autres marqueurs tels que le cytochrome b (CYB) ou la superoxyde dismutase (SOD), dont le séquençage ajouté à celui du gène

mtLSUrRNA s'est récemment révélé suffisamment discriminant pour permettre l'investigation préliminaire de cas groupés de PPc nosocomiales (Maitte *et al.* 2013), aurait également pu être contributive.

A notre connaissance, il s'agit de la première étude sur la colonisation par *Pneumocystis* au Liban. Elle a permis de mettre en évidence une prévalence faible, et une prédominance du génotype 2, qui sont probablement le résultat d'une écologie locale complexe et de facteurs liés à l'hôte spécifiques de la population étudiée. Ces premières données confirment cependant la circulation de *P. jirovecii* chez les patients atteints de pathologies respiratoires et le risque de la transmission potentielle à des patients immunodéprimés ou des enfants ayant un système immunitaire naïf, qui pourraient développer la pneumocystose.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVE

Ce travail de thèse nous a permis d'aborder (i) un volet fondamental sur la biologie de *Pneumocystis* à travers un de ses moyens de lutte contre le choc oxydant et la colonisation de l'espace alvéolaire chez l'hôte, en fonction du degré d'immunodépression et (ii) un volet clinico-épidémiologique réalisé au Liban et dont l'objectif principal est d'évaluer la prévalence du portage par *P. jirovecii* chez les adultes et enfants atteints de pathologies respiratoires. Ce travail entre dans un cadre plus général qui vise à clarifier la dynamique de transmission ainsi que les mécanismes de multiplication et de différenciation de *Pneumocystis* sp.

La première partie de notre projet, nous a permis de développer au laboratoire l'ensemble des outils nous permettant d'étudier, en système d'expression hétérologue (suppléant ainsi l'absence de culture continue pour ces microchampignons), la fonction des gènes d'intérêt de *P. carinii*. Du fait de l'expérience de l'équipe dans ce domaine, c'est le gène codant pour la MnSOD de *P. carinii* (PcMnSOD) qui a été choisi pour ce travail de thèse. Nous avons alors montré une bonne complémentarité du gène *sod2* de *P. carinii* chez une levure déficiente en MnSOD à savoir (i) la reprise de la culture en conditions de stress oxydant, (ii) la mise en évidence de la protéine traduite (Western Blot) et (iii) l'adressage mitochondrial de la protéine hétérologue.

Afin de compléter ce travail, nous envisageons d'explorer l'activité MnSOD *in situ* soit (i) par des mesures d'activité enzymatique à partir d'extrait parasitaire (Bécuwe *et al.*, 1993 ; Denis *et al.*, 1996) soit (ii) en quantifiant son expression par RT-PCR quantitative en temps réel au cours de la cinétique de l'infection chez le rat. Ces études se feront en comparaison sur *P. carinii* cultivé *in vitro* en système axénique. *In vitro*, l'étude cinétique de l'expression et de l'activité de la PcMnSOD permettraient de savoir si une expression faible ou inexistante de cette enzyme (ou de tout autre enzyme du système anti-oxydant) peut expliquer l'incapacité de ces microchampignons à croître de manière continue.

Dans un second temps, pour une meilleure compréhension du cycle de vie de *Pneumocystis* sp., notre équipe a déjà pu identifier, par la stratégie des banques soustractives et puces à ADN, plusieurs gènes exprimés différemment entre les formes trophiques et

les formes kystiques de *P. carinii*, mais peu de candidats intéressants ont pu être sélectionnés. Une troisième stratégie consistant à séquencer (séquenceur à haut débit Gs-FLX, Roche) les transcrits chez les deux populations de stades parasitaires préalablement triés a été mise en oeuvre. L'équipe a alors obtenu près de 50 000 et 30 000 « *expressed sequence tags* » (ESTs) pour les formes trophiques et les formes kystiques de *P. carinii*, respectivement. L'analyse de ces ESTs, actuellement en cours, devrait nous permettre d'identifier un plus grand nombre de gènes candidats dont nous confirmerons la surexpression par RT-PCR quantitative en temps réel. Puis, l'étude fonctionnelle de ces gènes pourra alors être réalisée, par complémentation hétérologue, si des mutants existent chez *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*, levures phylogénétiquement proches des *Pneumocystis* sp. (Grigore et Meade, 2006 ; Lo Presti *et al.*, 2007). Nous pourrions également cibler spécifiquement les gènes codant pour des protéines impliquées dans la division cellulaire, en utilisant le modèle ovocyte de *Xenopus laevis*. Cellule géante de stade IV, facilement manipulable, elle présente l'avantage d'être bloquée au stade prophase de méiose I. La reprise méiotique (transition G2/M) peut être induite *in vitro* par stimulation hormonale (progestérone, insuline) ou par l'expression hétérologue de notre gène d'intérêt (Cailliau *et al.*, 2001 ; Cailliau et Browaeys-Poly, 2009) (Collaboration avec les Drs K. Cailliau et E. Browaeys-Poly, Université de Lille 1).

Notre deuxième objectif était de parvenir à une appréciation quantitative du risque de contamination par *P. carinii* en fonction du degré d'immunodépression (ID) du rat exposé. Pour atteindre cet objectif, il nous a fallu (i) mettre au point les méthodes d'analyses biologiques pour la NFS ainsi que les marquages spécifiques des LTCD4 et LTCD8 chez le rat, (ii) développer un modèle animal de transmission naturelle de *P. carinii* où des rats *nude* développant une pneumocystose (« rats donneurs ») sont mis en contact direct avec des rats Sprague Dawley OFA *Pneumocystis*-free (« rats receveurs ») présentant différents degrés d'immunodépression. De plus, pour apprécier le niveau de colonisation des rats par *Pneumocystis*, nous avons également mis en place une méthode de quantification par qPCR ciblant le gène monocopie codant pour la DHFR (Dihydrofolate Reductase) de *P. carinii*. Ainsi, cette étude a permis tout d'abord de valider notre modèle d'ID graduelle chez le rat, dans le sens où nous avons réussi à maintenir pendant 4 semaines des taux stables de LTCD4 et LTCD8 circulants pour chaque dose de dexaméthasone testée. De plus, et pour la première fois dans un modèle expérimental chez le rat, nous avons observé une relation inverse entre le niveau de colonisation par *P. carinii* et le taux de LTCD4 ou LTCD8 circulants.

Notre projet est de poursuivre cette étude pour déterminer à partir de quel niveau d'immunodépression (taux de LTCD4, LTCD8, notamment) l'hôte est capable de contrôler l'infection à *P. carinii* ou au contraire laisser *Pneumocystis* proliférer jusqu'à la phase d'état de la maladie. Ainsi, il sera plus aisé d'établir un facteur de risque de développer une pneumocystose en combinant les niveaux d'immunodépression et de colonisation par *Pneumocystis*. En outre, ce nouveau modèle animal nous offre la possibilité d'explorer l'inflammation pulmonaire liée à la présence de *Pneumocystis* et si cette inflammation est un facteur aggravant des fonctions respiratoires. Des marqueurs de l'inflammation tels que TNF α , INF γ , et IL-8 semblent être de bons indicateurs pour étudier cette réponse inflammatoire locale (Patil *et al.*, 2003). En effet, une étude réalisée chez les singes montre que les taux de ces cytokines augmentent dans les LBA suite à la colonisation par *Pneumocystis* (Patil *et al.*, 2003). L'intensité et la persistance de la réponse inflammatoire observée dans ce modèle suggèrent que les dommages pulmonaires sont liés à la colonisation par *Pneumocystis* (Morris *et al.*, 2008). De plus, des études histopathologiques permettant d'explorer l'inflammation locale peuvent compléter le dosage des cytokines dans le LBA ou le sérum des animaux. Toutefois, ce modèle a ses limites, car ce type d'étude ne pourra pas se faire si l'immunodépression, et donc l'administration des corticoïdes, est trop importante. Les doses inférieures à 0,3 mg/l dans l'eau de boisson semblent être les plus appropriées.

Enfin, nous avons réalisé la première étude épidémiologique portant sur *P. jirovecii* au Liban. Cette étude réalisée dans la région du Nord-Liban a permis de déterminer la prévalence de ce microchampignon, le génotype le plus fréquemment rencontré, et en parallèle, en couplant les données cliniques des patients et les données moléculaires, nous avons tenté de mettre en évidence une corrélation entre la colonisation par *Pneumocystis* et les pathologies respiratoires sous-jacentes. Une corrélation positive a été observée entre la colonisation par *P. jirovecii* et la BPCO.

Après avoir déterminé la prévalence de *P. jirovecii* chez les adultes et enfants atteints de pathologies respiratoires dans des hôpitaux ou les centres de soins médicaux de Tripoli, il nous paraît intéressant d'étudier la présence éventuelle d'une colonisation par *P. jirovecii* chez les adultes en bonne santé par détection de l'ADN de *P. jirovecii* dans les liquides de rinçage oro-pharyngé ou les écouvillons nasaux. Ceci pourrait conforter l'hypothèse que la population générale serait un réservoir et une source d'infection par *Pneumocystis*.

Finalement, comme notre étude montre que les patients atteints de BPCO ont une forte prévalence de colonisation par *P. jirovecii*, nous envisageons de travailler sur une cohorte ciblant un large nombre de patients atteints de BPCO, pour étudier la prévalence de colonisation dans cette population et éventuellement la relier à la classe de sévérité de la maladie (stade 0, I, II ou III).

Nevez et collaborateurs ont montré que la colonisation pulmonaire par *P. jirovecii* chez les patients non-infectés par le VIH a lieu principalement chez les patients ayant des pathologies sous-jacentes ou un taux faible de Lymphocyte TCD4 (Nevez *et al.*, 1999a). Dans mon travail de thèse, le taux de LTCD4 des patients n'a malheureusement pas été systématiquement évalué. Cependant, il paraît intéressant de monitorer ce taux, pour pouvoir conforter l'hypothèse d'une relation inverse entre la colonisation par *Pneumocystis* et le taux de LTCD4.

En outre, des études séro-épidémiologiques ont été menées dès les années 1970 et ont montré que l'Homme développait généralement très tôt dans la vie une primo-infection à *Pneumocystis* (Pifer *et al.*, 1978). Il a également été montré que *P. jirovecii* pouvait être détecté dans des aspirations nasopharyngées de nourrissons immunocompétents à risque de primo-infection (Vargas *et al.*, 2001 ; Nevez *et al.*, 2001). En conséquence, il serait intéressant de mener une étude portant sur les nourrissons au Liban afin de déterminer la prévalence de portage de *P. jirovecii* en ciblant le liquide de l'aspiration naso-pharyngée et d'analyser en parallèle la présence d'anticorps sériques anti-*P. jirovecii*. Cette étude nous permettra ainsi de déterminer l'âge de survenue de la primo-infection à *P. jirovecii* au Liban. Une association entre un taux élevé d'anticorps et la présence de facteurs de risque sous-jacents, d'autres agents infectieux ou d'atteintes respiratoires graves peuvent également être recherchés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abrégés Masson, Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Association Française des enseignants de parasitologie médicales. ANOFEL. ISBN : 9782294708800.

Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, Molina J.M, Derouin F and Menotti J. 2011. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect. 17: 1531–37.

Albelda SM, Buck CA. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. FASEB J. 4: 2868-80.

Aliouat E.M., Escamilla R., Cariven C., Vieu C., Dei-Cas E., Prevost M.C. 1998. Surfactant changes during experimental pneumocystosis are related to *Pneumocystis* development. Eur Respir J. 11: 542-47.

Aliouat EM, Dei-Cas E, Billaut P, Dujardin L, Camus D. 1995. *Pneumocystitis carinii* organisms from in vitro culture are highly infectious to the nude rat. Parasitol Res. 81: 82-85.

Aliouat EM, Dujardin L, Martinez A, Duriez T, Ricard I, Dei-Cas E. 1999. *Pneumocystis carinii* growth kinetics in culture systems and in hosts: involvement of each life cycle parasite stage. J Eukaryot Microbiol. 46: 116-17.

Aliouat EM, Martinez A, Jimenez E, Dei-Cas E, Mullet C, Delcourt P, Gargallo-Viola D. 1997. Development of pneumocystosis animal models: corticosteroid-treated Wistar rat; SCID mouse and nude rat. J Eukaryot Microbiol. 44: 41-42.

Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, Cesbron JY, Camus D. 1993. Intranasal inoculation of mouse, rat or rabbit-derived *Pneumocystis* to SCID mice. J Protozool Res. 3: 94-98.

Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, Delcourt P, Billaut P, Camus D. 1994. *Pneumocystis* cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. J Eukaryot Microbiol. 41: 71.

Aliouat-Denis CM, Chabe M, Demanche C, Aliouat EM, Viscogliosi E, Guillot J, Delhaes L, Dei-Cas E. 2008. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. Infect Genet Evol. 8: 708–26.

Aliouat-Denis CM, Martinez A, Aliouat el M, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas E. 2009. The *Pneumocystis* life cycle. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104: 419-26.

Alvarez-Martínez MJ, Miró JM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Solé M, Benito N, Domingo P, Muñoz C, Rivera E, Zar HJ, Wissmann G, Diehl AR, Prolla JC, de Anta MT, Gatell JM, Wilson PE, Meshnick SR; Spanish PCP Working Group. 2006. Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 56: 153-60.

Amano A, Shizukuishi S, Tamagawa H, Iwakura K, Tsunasawa S and Tsunemitsu A. 1990. Characterization of superoxide dismutases purified from either anaerobically maintained or aerated *Bacteroides gingivalis*. J. Bacteriol. 172: 1457–63.

Ammich O. 1938. Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 302: 539-54.

An CL, Gigliotti F, Harmsen AG. 2003. Exposure of Immunocompetent Adult Mice to *Pneumocystis carinii* f. sp. muris by Cohousing: Growth of *P. carinii* f. sp. muris and Host Immune Response. Infect Immun. 71: 2065-70.

- Arcenas RC**, Uhl JR, Buckwalter SP, Limper AH, Crino D, Roberts GD, Wengenack NL. 2006. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 54: 169-75.
- Arichi N**, Kishikawa H, Mitsui Y, et al. 2009. Cluster outbreak of *Pneumocystis* pneumonia among kidney transplant patients within a single center. *Transplant Proc*. 41: 170–72.
- Armstrong M**, Cushion MT. 1994. In. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Ed. Walzer PD. Dekker Inc, New York.
- Armstrong MY**, Smith AL, Richards FF. 1991. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the rat model. *J Protozool*. Nov-Dec. 38: 136-38.
- Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL)**. 2014. *Pneumocystose*. © UMVF - Université Médicale Virtuelle Francophone.
- Association française des enseignants de parasitologie médicale**. 2010. *Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales*. Abrégés connaissances pratiques. Elsevier Masson. 2ème édition.
- Atochina EN**, Beck J, Scanlon ST, Preston AM, Beers MF. 2001. *Pneumocystis carinii* pneumonia alters expression and distribution of lung collectins SP-A and SP-D. *J Lab Clin Med*. 137: 429-39.
- Atochina EN**, Beck JM, Preston AM, Haczku A, Tomer Y, Scanlon ST, Fusaro T, Casey J, Hawgood S, Gow AJ, Beers MF. 2004. Enhanced lung injury and delayed clearance of *Pneumocystis carinii* in surfactant protein A-deficient mice: attenuation of cytokine responses and reactive oxygen-nitrogen species. *Infect Immun*. 72: 6002-11.
- Atochina EN**, Beers MF, Scanlon ST, Preston AM, Beck JM. 2000. *P. carinii* induces selective alterations in component expression and biophysical activity of lung surfactant. *Am J Physiol*. 278: 599-09.
- Atzori C**, Aliouat EM, Bartlett MS, Dujardin L, Cargnel A, Dei-Cas E. 1998. Current in vitro culture systems for *Pneumocystis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 22: 169-72.
- Aviles P**, Aliouat EM, Martinez A, Dei-Cas E, Herreros E, Dujardin L, Gargallo-Viola D. 2000. In vitro pharmacodynamic parameters of sordarin derivatives in comparison with those of marketed compounds against *Pneumocystis carinii* isolated from rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 44: 1284-90.
- Balilly Y**, Duprat P. 1990. Normal blood cell values, Rat- In: Jones, Ward, Mohr, Hunt. Hemopoietic system- Springer Verlag. 27-38.
- Balloy V**, Huerre M, Latgé JP, Chignard M. 2005. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*. 73: 494-03.
- Balzan R**, Agius DR, Bannister WH. 1999. Cloned prokaryotic iron Superoxide Dismutase protects yeast cells against oxidative stress depending on mitochondrial location. *Biochem Biophys Res Commun*. 256: 63-67.
- Bandt D**, Monecke S. 2007. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jiroveci*. *Transpl Infect Dis*. 9:196-02.
- Bartlett MS**, Angus WC, Shaw MM, Durant PJ, Lee CH, Pascale JM, Smith JW. 1998. Antibody to *Pneumocystis carinii* protects rats and mice from developing pneumonia. *Clin. Diagn. Lab Immunol*. 5: 74 –77.
- Bartlett MS**, Lee CH, Lu JJ, Bauer NL, Bettz JF, McLaughlin GL, et al. 1994. *Pneumocystis carinii* detected in air. *J Eukaryot Microbiol*. 41:75.
- Bartlett MS**, Vermund SH, Jacobs R, Durant PJ, Shaw MM, Smith JW, Tang X, Lu JJ, Li B, Jin S, and Lee CH. 1997. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *J Clin Microbiol*. 35:2511–13.

- Barton EG Jr**, Campbell WG Jr. 1967. Further observations on the ultrastructure of *Pneumocystis*. Arch Pathol. 83: 527-34.
- Bauch R**, Ladstatter L. 1953. *Pneumocystis carinii* and interstitial plasma cell pneumonia in premature infant. Klin Wochenschr. 31: 900-02.
- Beard CB**, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, Roberts JM, Hightower AW, Bens MS, Freeman AR, Lee S, Stringer JR, Duchin JS, del Rio C, Rimland D, Baughman RP, Levy DA, Dietz VJ, Simon P, Navin TR. 2000. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. Emerg Infect Dis. 6: 265–72.
- Beard CB**, Fox MR, Lawrence GG, Guarner J, Hanzlick RL, Huang L, del Rio C, Rimland D, Duchin JS, Colley DG. 2005. Genetic differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immunocompetent infants and from adults with AIDS: epidemiological Implications. J Infect Dis. 192: 1815–18.
- Beard CB**, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs JA, Unnasch TR, Lundgren B. 2004. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. Emerg Infect Dis. 10: 1729-35.
- Beck JM**, Blackmon MB, Rose CM, Kimzey SL, Preston AM, Green JM. 2003. T cell costimulatory molecule function determines susceptibility to infection with *Pneumocystis carinii* in mice. J Immunol. 171: 1969-77.
- Beck JM, Harmsen AG**. 1998a. Lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii*. Semin Respir Infect. 13: 330 –38.
- Beck JM**, Newbury RL, Palmer BE, Warnock ML, Byrd PK, Kaltreider HB. 1996. Role of CD8+ lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. J Lab Clin Med. 128: 477-87.
- Beck JM**, Preston AM, Wagner JG, Wilcoxon SE, Hossler P, Meshnick SR, Paine R 3rd. 1998. Interaction of rat *Pneumocystis carinii* and rat alveolar epithelial cells in vitro. Am J Physiol. 275: 118-25.
- Beck JM**, Preston AM, Wilcoxon SE, Morris SB, Sturrock A, Paine R 3rd. 2009. Critical roles of inflammation and apoptosis in improved survival in a model of hyperoxia-induced acute lung injury in *Pneumocystis murina*- infected mice. Infect Immun. 77: 1053-60.
- Beck JM**, Warnock ML, Curtis JL, Sniezek MJ, Arraj-Peffer SM, Kaltreider HB, Shellito JE. 1991. Inflammatory responses to *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. Am J Respir. Cell Mol Biol. 5: 186 –97.
- Beck JM**, Warnock ML, Kaltreider HB, Shellito JE. 1993. Host defenses against *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of CD4_ lymphocytes. Chest. 103:116–18.
- Becuwe P**, Slomianny C, Valentin A, Schrevel J, Camus D, Dive D. 1993. Endogenous superoxide dismutase activity in two Babesia species. Parasitology. 106:541.
- Beers MF**, Atochina EN, Preston AM, Beck JM. 1999. Inhibition of lung surfactant protein B expression during *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. J Lab Clin Med. 133: 423-33.
- Benfield TL**, Lundgren B, Shelhamer JH, Lundgren JD. 1999. *Pneumocystis carinii* major surface glycoprotein induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 release from a human alveolar epithelial cell line. Eur J Clin Invest. 29: 717-22.
- Benson CA**, Kaplan JE, Masur H, Pau A, Holmes KK. 2004. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. MMWR Recomm Rep. 53: 1-112.
- Bensousan T**, Garo B, Islam S, Bourbigot B, Cledes J, Garre M. 1990. Possible transfer of *Pneumocystis carinii* between kidney transplant recipients. Lancet. 336: 1066- 67.
- Biermengrader A**. 1953. Beitrag zar enzephalitis bei fruhkindlicher interstitieller pneumonie. Zentralbl Allg Pathol. 89 : 287-88.

- Board KF**, Patil S, Lebedeva I, Capuano S 3rd, Trichel AM, Murphey-Corb M, Rajakumar PA, Flynn JL, Haidaris CG, Norris KA. 2003. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Infect Dis.* 187: 576-88.
- Boelsterli UA.** 2003. Mechanistic toxicology: The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets, second edition CRC Press, Boca Raton, USA.
- Bommer W.** 1966. *Pneumocystis carinii* in plasma-cell pneumonia. *Pediatr Dig.* 4: 71.
- Brière JJ**, Schlemmer D, Chretien D, Rustin P. 2004. Quinone analogues regulate mitochondrial substrate competitive oxidation. *Biochem Biophys Res Commun.* 316: 1138-42.
- Brown GD**, Gordon S. Immune recognition. 2001. A new receptor for beta-glucans. *Nature.* 413: 36-37.
- Burgess JW**, Kottom TJ, Limper AH. 2008. *Pneumocystis carinii* exhibits a conserved meiotic control pathway. *Infect Immun.* 76: 417-25.
- Burgess JW**, Kottom TJ, Villegas LR, Lamont JD, Baden EM, Ramirez-Alvarado M, Limper AH. 2009. The *Pneumocystis* meiotic PCRA1p kinase exhibits unique temperature-regulated activity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 41: 714-21.
- Cailliau K**, Browayes-Poly E, Broutin-L'Hermitte I, Nioche P, Garbay C, Ducruix A, Vilain JP. 2001. Grb2 promotes reinitiation of meiosis in *Xenopus laevis*. *Cell Signal.* 13: 51-55.
- Cailliau K**, Browayes-Poly E. 2009. A microinjectable biological system, the *Xenopus* oocyte, as an approach to understanding signal transduction protein function. *Methods Mol Biol.* 518: 43-55.
- Calderon EJ**, Dei-Cas E. 2010. *Pneumocystis* infection: unraveling the colonization-to-disease shift. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 8: 259-62.
- Calderón EJ**, Gutiérrez-Rivero S, Durand-Joly I, Dei-Cas E. 2010a. *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 8: 683-01.
- Calderon EJ**, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, Varela JM. 1996. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet.* 347: 977.
- Calderon EJ**, Rivero L, Respaldiza N, Morilla R, Montes-Cano MA, Friaza V, Muñoz-Lobato F, Varela JM, Medrano FJ, Horra C de L. 2007. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis.* 45: 17-19.
- Calderon EJ**, Varela JM, Medrano FJ et al. 2004. Epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia in southern Spain. *Clin Microbiol Infect.* 10: 673-76.
- Calderon-Sandubete EJ**, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, Nieto-Guerrero V, Respaldiza Salas N, de la Horra-Padilla C, Dei-Cas E. 2002. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist.* 153: 303-10.
- Campbell WG Jr.** 1972. Ultrastructure of *Pneumocystis* in human lung. Life cycle in human pneumocystosis. *Arch Pathol.* 93: 312-24.
- Carini A.** 1910. Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*. *Bol Soc de Med e Cir de Sao Paulo.* 18: 204.
- Carmona EM**, Limper AH. 2010. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. *Ther Adv Respir Dis.* 5: 41-59.
- Carmona EM**, Vassallo R, Vuk-Pavlovic Z, Standing JE, Kottom TJ, Limper AH. 2006. *Pneumocystis* cell wall beta-glucans induce dendritic cell costimulatory molecule expression and inflammatory activation through a Fas-Fas ligand mechanism. *J Immunol.* 177: 459-67.
- Carter AM**, Enders AC. 2004. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2:46.

- Casanova-Cardiel L**, Leibowitz MJ. 1997. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J Eukaryot Microbiol.* 44:28.
- Catherinot E**, Lanternier F, Bougnoux ME, Lecuit M, Couderc LJ, Lortholary O. 2010. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Infect Dis Clin North Am.* 24: 107-38.
- Cazein F**, Lot F, Pillonel J, et al. 2010. Surveillance de l'infection à VIH-sida en France, 2009. *Bull Epidemiol Hebd.* 45: 467-72.
- Cere N**, Polack B, Coudert P. 1997. Rabbit model of induced *Pneumocystis carinii* development followed by reinfection. *J Eukaryot Microbiol.* 44: 21.
- Chabé M**, Aliouat-Denis CM, Delhaes L, Aliouat el M, Viscogliosi E, Dei-Cas E. 2010. *Pneumocystis*: from a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. *FEMS Yeast Res.* 11: 2-17.
- Chabé M**, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D & Durand-Joly I. 2004. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and RT-PCR data demonstrate active replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23: 89-97.
- Chabé M**, Vargas SL, Eyzaguirre I, Aliouat EM, Follet-Dumoulin A, Creusy C, Fleurisse L, Recourt C, Camus D, Dei-Cas E, Durand-Joly I. 2004a. Molecular typing of *Pneumocystis jirovecii* found in formalin-fixed paraffin-embedded lung tissue sections from sudden infant death victims. *Microbiology.* 150: 1167-72.
- Chagas C.** 1909. Nova tripanozomiazaea humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1: 159-18.
- Chagas C.** 1911. Nova entidade morbida do homem: regumo general de estudos etiologicose clinicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 3: 219-75.
- Chalvardjian AM**, Grawe LA. 1963. A nex procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cysts in tissue sections and smears. *J Clin Pathol.* 16:383-84.
- Chandler FW**, McClure HM, Campbell WG, Watts JC. 1976. Pulmonary pneumocystosis in nonhuman primates. *Arch Pathol Lab Med.* 100: 163-7.
- Charles River.** 1997: Rat OFA-SD, rats femelles Sprague Dawley 6-13 semaines (n=550).
- Charles River.** 1997: Rat OFA-SD, rats femelles Sprague Dawley 6-13 semaines. 1s.
- Chave JP**, David S, Wauters JP, van Melle G, and Francioli P. 1991. Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients: a cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. *AIDS.* 5:927-32.
- Chen W**, Gigliotti F, Harmsen AG. 1993a. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 61: 5406-09.
- Chen W**, Havell EA, Gigliotti F, Harmsen AG. 1993. Interleukin-6 production in a murine model of *Pneumocystis carinii* pneumonia: relation to resistance and inflammatory response. *Infect Immun.* 61: 97-102.
- Chen W**, Havell EA, Moldawer LL, McIntyre KW, Chizzonite RA, Harmsen AG. 1992. Interleukin 1: an important mediator of host resistance against *Pneumocystis carinii*. *J Exp Med.* 176: 713-18.
- Chinenov Y**, Rogatsky I. 2007. Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the toll-like receptor signaling network. *Mol Cell Endocrinol.* 275: 30-42.
- Choukri F**, Aliouat EM, Menotti J, Totet A, Gantois N, Garin YJF, Bergeron V, Dei-cas E, Derouin F. 2011. Dynamics of *Pneumocystis carinii* air shedding during experimental pneumocystosis. *J Infect Dis.* 203: 1333-36.
- Choukri F**, Menotti J, Sarfati C, et al. 2010. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Clin Infect Dis.* 51: 259-65.

- Cohen OJ**, Stoeckle MY. 1991. Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections in the acquired immunodeficiency syndrome. Arch Intern Med. 151: 1205-14.
- Cornillot E**, Keller B, Cushion M, Méténier G, Vivarès C. 2002. Fine analysis of the *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* genome by two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis. Gene. 293 : 87-95.
- Creusy C**, Bahun-le Capon J, Fleurisse L, Mullet C, Dridba M, Cailliez JC, et al. 1996. *Pneumocystis carinii* pneumonia in four mammal species: histopathology and ultrastructure. J Eukaryot Microbiol. 43: 47-48.
- Criddle D**, Gillies S, Wilson H, Jaffar M, Chinje E, Passmore S, Chvanov M, Barrow S, Gerasimenko O, Tepikin A, Sutton R, Petersen O. 2006. Menadione-induced Reactive Oxygen Species Generation via Redox Cycling Promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells. J BIOL CHEM. 281: 40485-92.
- Croix DA**, Board K, Capuano S 3rd, Murphey-Corb M, Haidaris CG, Flynn JL, Reinhart T, Norris KA. 2002. Alterations in T lymphocyte profiles of bronchoalveolar lavage fluid from SIV- and *Pneumocystis carinii*-coinfected rhesus macaques. AIDS Res Hum. 18: 391– 01.
- Crothers K**, Beard CB, Turner J, Groner G, Fox M, Morris A, Eiser S, Huang L. 2005. Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. AIDS. 19: 801-15.
- Cushion MT**, Arnold J. 1997. Proposal for a *Pneumocystis* genome project. J Eukaryot Microbiol. 44: 7.
- Cushion MT**, Collins MS, Linke MJ. 2009. Biofilm formation by *Pneumocystis* spp. Eukaryot Cell. 8: 197-06.
- Cushion MT**, DeStefano JA, Walzer PD. 1988. *Pneumocystis carinii*: surface reactive carbohydrates detected by lectin probes. Exp Parasitol. 67: 137-47.
- Cushion MT**, Ebbets D. 1990. Growth and metabolism of *Pneumocystis carinii* in axenic culture. J Clin Microbiol. 28: 1385-94.
- Cushion MT**, Linke MJ, Ashbaugh A, Sesterhenn T, Collins MS, Lynch K, Brubaker R, Walzer PD. 2010. Echinocandin treatment of *pneumocystis* pneumonia in rodent models depletes cysts leaving trophic burdens that cannot transmit the infection. PLoS One. 5: 8524.
- Cushion MT**, Ruffolo JJ, Linke MJ, Walzer PD. 1985. *Pneumocystis carinii*: growth variables and estimates in the A549 and WI-38 VA13 human cell lines. Exp Parasitol. 60(1):43-54.
- Cushion MT**, Smulian AG, Slaven BE, Sesterhenn T, Arnold J, Staben C, Porollo A, Adamczak R, Meller J. 2007. Transcriptome of *Pneumocystis carinii* during fulminate infection: carbohydrate metabolism and the concept of a compatible parasite. PLoS One. 2: 423.
- Cushion MT**, Smulian AG. 2006. *Pneumocystis*: summary of the research presented at the ninth International Workshop on Opportunistic Protists. J Eukaryot Microbiol. 53: 80-84.
- Cushion MT**, Stringer JR. 2010. Stealth and opportunism: alternative lifestyles of species in the fungal genus *Pneumocystis*. Annu Rev Microbiol. 64: 431-52.
- Cushion MT**, Walzer PD. 1984. Growth and serial passage of *Pneumocystis carinii* in the A549 cell line Infect Immun. 44: 245-51.
- Cushion MT**. 1989. In vitro studies of *Pneumocystis carinii*. J Protozool. 36: 45-52.
- Cushion MT**. 2004. *Pneumocystis*: unraveling the cloak of obscurity. Trends Microbiol. 12: 243-49.
- Daly KR**, Koch JV, Shire NJ, Levin L, Walzer PD. 2006. Human immunodeficiency virus-infected patients with prior *Pneumocystis* pneumonia exhibit increased serologic reactivity to several major surface glycoprotein clones. Clin. Vaccine Immunol. 13:1071–78.

- Damiani C**, Le Gal S, Lejeune D, Brahimi N, Virmaux M, Nevez G, Totet A. 2011. Serum (1-3)-beta-D-glucan levels in primary infection and pulmonary colonization with *Pneumocystis jirovecii*. J Clin Microbiol. 49: 2000-02.
- Damiani C**, Le Gal S, Da Costa C, Virmaux M, Nevez G, Totet A. 2013. Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1-3)- β -D-glucan for differential diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia and *Pneumocystis* colonization. J Clin Microbiol. 51: 3380-88.
- De Boer MG**, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Gaasbeek A, Berger SP, Gelinck LB, van Houwelingen HC, van den Broek P, Kuijper EJ, Kroon FP, Vandenbroucke JP. 2007. An outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia with 1 predominant genotype among renal transplant recipients: interhuman transmission or a common environmental source? Clin Infect Dis. 44: 1143-49.
- De Boer MGJ**, de Fijter JW, Kroon FP. 2011. Outbreaks and clustering of *Pneumocystis* pneumonia in kidney transplant recipients: a systematic review. Med Mycol. 49: 673–80.
- De la Horra C**, Varela JM, Fernández-Alonso J, Medrano FJ, Respaldiza N, Montes-Cano MA, Calderón EJ. 2004. Association between human-*Pneumocystis* infection and small-cell lung carcinoma. Eur J Clin. Invest. 34: 229–235.
- De Oliveira A**, Unnasch TR, Crothers K, Eiser S, Zucchi P, Moir J, Beard CB, Lawrence GG, Huang L. 2007. Performance of a molecular viability assay for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 57: 169-76.
- De Souza W**, Benchimol M. 2005. Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 100: 903-08.
- De Stefano JA**, Cushion MT, Sleight RG, Walzer PD. 1990. Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. I. Evidence for an outer surface membrane. J Protozool. 37: 428-35.
- Dei-Cas E**, Aliouat EM, Cailliez JC. 2004. *Pneumocystis* Cellular Structure. In: ‘*Pneumocystis carinii* Pneumonia’ 3rd edition, Walzer PD, Cushion MT (eds), Marcel Dekker, Inc., New York. 61-94.
- Dei-Cas E**, Brun-Pascaud M, Bille-Hansen V, Allaert A, Aliouat EM. 1998. Animal models of pneumocystosis. Special issue, *Pneumocystis* and pneumocystosis: advances in *Pneumocystis* research, FEMS immunol Medical Microbiol. 22: 163-68.
- Dei-Cas E**, Chabé M, Moukhliis R, Durand-Joly I, Aliouat el M, Stringer JR, Cushion M, Noël C, de Hoog GS, Guillot J, Viscogliosi E. 2006. *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: review of current knowledge, and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. FEMS Microbiol Rev. 30: 853-71.
- Dei-Cas E**, Jackson H, Palluault F, Aliouat EM, Hancock V, Soulez B, Camus D. 1991. Ultrastructural observations on the attachment of *Pneumocystis carinii* in vitro. J Protozool. 38: 205-07.
- Dei-Cas E**, Soulez B, Palluault F, Charet P, Camus D. 1990. *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. Med Sci. 6: 517-25.
- Dei-Cas E**. 2000. *Pneumocystis* infections: the iceberg? Med Mycol. 38: 23-32.
- Delanoë P** & Delanoë M. 1912. Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. CR acad Sci (Paris). 155: 658-60.
- Delaporte F**. 1999. La maladie de Chagas. Histoire d’un fléau continental. Payot & Rivages, Paris.
- Delmas MC**, Schwoebel V, Heisterkamp SH, Downs AM, Ancelle-Park RA, Brunet JB. 1995. Recent trends in *Pneumocystis carinii* pneumonia as AIDS-defining disease in nine European countries. J AIDS. 9: 74-80.
- Demanche C**, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakefield AE, Dei-Cas E & Guillot J. 2001. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. J Clin Microbiol. 39: 2126-33.

- Demanche C**, Petit T, Moisson P, Ollivet F, Rigoulet J, Chermette R, et al. 2003. Assessment of *Pneumocystis* species carriage in captive primates. *Vet Rec.* 152: 811-13.
- DeMasi JM**, Cox JA, Leonard D, Koh AY, Aquino VM. 2013. Intravenous pentamidine is safe and effective as primary *pneumocystis* pneumonia prophylaxis in children and adolescents undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Infect Dis J.* 32: 933-36.
- Demir AB**, Koc A. 2010. Assessment of chronological lifespan dependent molecular damages in yeast lacking mitochondrial antioxidant genes. *Biochem. Biophys Res Commun.* 400: 106–10.
- Denis CM**, Guyot K, Wakefield AE, Dive D, Dei-Cas E, Camus D, Odberg-Ferragut C. 1998. Molecular cloning and characterization of a superoxide dismutase (*sod*) gene in *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol.* 45: 475–83.
- Denis CM**, Odberg-Ferragut C, Guyot K, Dei-Cas E, Camus D, Dive D. 1996. Manganese-cofactored superoxide dismutase activity in rat-derived *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol.* 43: 26.
- Descat F**. 2002. Thèse : Hématologie du rat : hémogramme et myélogramme, TOU 3 – 4011, rats femelles Sprague Dawley 7-10 semaines (n= 784).
- Dieckman H**, Lindner E, Stopka E. 1954. Befunde bei interstitieller plasmacellulärer Pneumonie. *Beitr Pathol Anat.* 114: 48-64.
- Dimonte S**, Berrilli F, D'Orazi C, D'Alfonso R, Placco F, Bordi E, Perno CF, Di Cave D. 2013. Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infect Genet Evol.* 14: 68-72.
- Djawa K**, Levin L, Swartzman A, Fong S, Roth B, Subramanian A, Grieco K, Jarlsberg L, Miller RF, Huang L, Walzer PD. 2013. Environmental risk factors for *Pneumocystis* pneumonia hospitalizations in HIV patients. *Clin Infect Dis.* 56: 74-81.
- Döskaya M**, Caner A, Degirmenci A, Wengenack N, Yolasıgımaz A, Turgay N, Ozensoy Toz S, Guruz Y. 2011. Degree and frequency of inhibition in a routine realtime PCR detecting *Pneumocystis jirovecii* for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in Turkey. *J Med Microbiol.* 60: 937–44.
- Downing JF**, Kachel DL, Pasula R, Martin WJ 2nd. 1999. Gamma interferon stimulates rat alveolar macrophages to kill *Pneumocystis carinii* by L-arginine- and tumor necrosis factor dependent mechanisms. *Infect Immun.* 67: 1347-52.
- Dumoulin A**, Mazars E, Seguy N, et al. 2000. Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 19: 671–78.
- Duncan RA**, Von Reyn CF, Alliegro GM, Toossi Z, Sugar AM, Levitz SM. 1993. Idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia—four patients with opportunistic infections and no evidence of HIV infection. *N Engl J Med.* 328: 393-98.
- Dungarwalla M**, Marsh JC, Tooze JA, Lucas G, Ouwehand W, Pettengell R, Dearden CE, Gordon Smith EC, Elebute MO. 2007. Lack of clinical efficacy of rituximab in the treatment of autoimmune neutropenia and pure red cell aplasia: implications for their pathophysiology. *Ann Hematol.* 3: 191-97.
- Durand-Joly I**, Aliouat EM, Recourt C, Guyot K, François N, Wauquier M, Camus D, Dei- Cas E. 2002. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* is not infectious for SCID mice. *J Clin Microbiol.* 40: 1862–65.
- Durand-Joly I**, Soula F, Chabe M, Dalle JH, Lafitte JJ, SenechalM, et al. 2003. Long-term colonization with *Pneumocystis jirovecii* in hospital staffs: a challenge to prevent nosocomial pneumocystosis. *J Eukaryot Microbiol.* 50: 614-5.
- Durand-Joly I**, Wakefield AE, Palmer RJ, Denis CM, Creusy C, Fleurisse L, Ricard I, Gut JP, Dei-Cas E. 2000. Ultrastructural and molecular characterization of *Pneumocystis carinii* isolated from a rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Med Mycol.* 38: 61-72.

- EBPG Expert Group on Renal Transplantation.** 2002. European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: long-term management.
- Eccleston E.** 1977. Normal hematological values in rats, mice and marmosets- In: Archer R.K., Jeffcott L.B. Comparative Clinical Hematology- Blacwell Scientific. 611-617.
- Edman JC,** Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature. 334: 519-22.
- Edman U,** Edman JC, Lundgren B, Santi DV. 1989. Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 86: 6503-07.
- Elnadi N,** Almasry A, Abosdera M. 2013. Prevalence and effect of a combined treatment on *Pneumocystis* pneumonia. J Egypt Soc Parasitol. 43: 457-462.
- Enomoto T,** Azuma A, Kohno A, Kaneko K, Saito H, Kametaka M, Usuki J, Gemma A, Kudoh S, Nakamura S. 2010. Differences in the clinical characteristics of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients with and without HIV infection. Respirology. 15: 126-31.
- Escamilla R,** Prevost MC, Hermant C, Caratero A, Cariven C, Krempf M. 1992. Surfactant analysis during *pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. Chest. 1011: 1558-62.
- Esteves F,** Montes-Cano MA, de la Horra C, Costa MC, Calderón EJ, Antunes F, Matos O. 2008. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. Clin Microbiol Infect. 14: 356-62.
- Evans SE,** Hahn PY, McCann F, Kottom TJ, Pavlovic' ZV, Limper AH. 2005. *Pneumocystis* cell wall beta-glucans stimulate alveolar epithelial cell chemokine generation through nuclear factor-kappaB-dependent mechanisms. Am J Respir Cell Mol Biol. 32: 490-97.
- Ezekowitz RA,** Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM. 1991. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. Nature. 351: 155-8.
- Festic E,** Gajic O, Limper AH, Aksamit TR. 2005. Acute respiratory failure due to *Pneumocystis* pneumonia in patients without human immunodeficiency virus infection: outcome and associated features. Chest. 128: 573-79.
- Fishman JA.** 1998. Prevention of infection due to *Pneumocystis carinii*. Antimicrob Agents Chemother. 42: 995-04.
- Fleury J,** Escudier E, Pocholle MJ, Carre C, Bernaudin JF. 1985. Cell population obtained by bronchoalveolar lavage in *Pneumocystis carinii* pneumonitis. Acta Cytol. 29: 721-26.
- Floreani M,** Carpenedo F. 1992. One-and two-electron reduction of menadione in guinea-pig and rat cardiac tissue, Gen. Pharmacol. 23: 757-62.
- Fox D,** Smulian AG. 1999. Mitogen-activated protein kinase Mkp1 of *Pneumocystis carinii* complements the slt2Delta defect in the cell integrity pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 34: 451-62.
- Fréalte E,** Noël C, Viscogliosi E, Camus D, Dei-Cas E, Delhaes L. 2005. Manganese superoxide dismutase in pathogenic fungi: an issue with pathophysiological and phylogenetic involvements. FEMS Immunol Med Microbiol. 45:411-22.
- Frenkel JK,** Good JT, Shultz JA. 1966. Latent *Pneumocystis* infection of rats, relapse, and chemotherapy. Lab Invest. 15: 1559-77.
- Frenkel JK.** 1976. *Pneumocystis jirovecii* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. Natl Cancer Inst Monogr. 43: 13-30.
- Frenkel JK.** 1999. *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. J Eukaryot Microbiol. 46: 89-92.
- Frerking I,** Gunther A, Seeger W, Pison U. 2001. Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. Intensive Care Med. 27: 1699-17.

- Fridovich I.** 1995. *Annu Rev Biochem.* 64: 97–12.
- Frohner IE,** Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K. 2009. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol.* 71: 240–52.
- Furuta T,** Fujita M, Mukai R, Sakakibara I, Sata T, Miki K, Hayami M, Kojima S, Yoshikawa Y. 1993. Severe pulmonary pneumocystosis in simian acquired immunodeficiency syndrome induced by simian immunodeficiency virus: its characterization by the polymerase chain-reaction method and failure of experimental transmission to immunodeficient animals. *Parasitol Res.* 79: 624–28.
- Furuta T,** Fujiwara K, Yamanouchi K, Ueda K. 1985. Detection of antibodies to *Pneumocystis carinii* by enzyme-linked immunosorbent assay in experimentally infected mice. *J Parasitol.* 71: 522–23.
- Furuta T,** Ueda K, Fujiwara K. 1984. Experimental *Pneumocystis carinii* infection in nude rats. *Jpn J Exp Med.* 54: 65–72.
- Gajdusek DC.** 1957. *Pneumocystis carinii*- Etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. *Pediatrics* 19: 543–565.
- Gakh O,** Cavadini P, Isaya G. 2002. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys. Acta* 1592: 63–77.
- Gavel Y,** von Heijne G. 1990. Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng.* 4: 33–37.
- Gietz RD,** Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast.* 11: 355–60.
- Gietz RD,** Schiestl RH. 2007. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc.* 2: 38–41.
- Gigliotti F,** Crow EL, Bhagwat SP, Wright TW. 2006. Sensitized CD8⁺ T cells fail to control organism burden but accelerate the onset of lung injury during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun.* 74: 6310–16.
- Gigliotti F,** Haidaris CG, Wright TW, Harmsen AG. 2002. Passive intranasal monoclonal antibody prophylaxis against murine *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun.* 70: 1069–74.
- Gigliotti F,** Haidaris PJ, Haidaris CG, Wright TW, Van der Meid KR. 1993. Further evidence of host species-specific variation in antigens of *Pneumocystis carinii* using the polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 168: 191–94.
- Gigliotti F,** Harmsen AG, Wright TW. 2003. Characterization of transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* through immunocompetent BALB/c mice. *Infect Immun.* 71: 3852–56.
- Gigliotti F,** Hughes WT. 1988. Passive immunoprophylaxis with specific monoclonal antibody confers partial protection against *Pneumocystis carinii* pneumonitis in animal models. *J Clin Invest.* 81: 1666–68.
- Giles SS,** Batinic-Haberle I, Perfect JR, Cox GM. 2005. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. *Eukaryotic Cell.* 4: 46–54.
- Godeau B,** Coutant-Perrone V, Le Thi Huong D, Guillevin L, Magadur G, De Bandt M, Dellion S, Rossert J, Rostoker G, Piette JC, et al. 1994. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the course of connective tissue disease : Report of 34 cases. *J rheumatol.* 21:246–51.
- Gordon SM,** LaRosa SP, Kalmadi S, et al. 1999. Should prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in solid organ transplant recipients ever be discontinued? *Clin Infect Dis.* 28: 240–46.

- Gottlieb MS**, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305:1425-31.
- Gralla E** and Kosman D. 1992. *Adv. Genet.* 30: 251–319.
- Greenberg D**, Broides A, Blancovich I, Peled N, Givon-Lavi N, Dagan R. 2004. Relative importance of nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling for isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from healthy and sick individuals varies with age. *J Clin Microbiol.* 42:4604–09.
- Grigore D**, Meade J.C. 2006. Functional complementation of the yeast P-type H-ATPase, PMA1, by the *Pneumocystis carinii* P-type H-ATPase, PCA1, *J Eukaryot Microbiol.* 53: 157-64.
- Grocott RG**. 1955. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol.* 25: 975-79.
- Groner W**, Boyett J, Johnson A, Scantlebury M. 1986. Variability of erythrocyte size and hemoglobin content observed in Man and four selected animals- *Blood. Cells.* 12: 65-80.
- Guillot J**, Demanche C, Hugot JP, Berthelemy M, Wakefield AE, Dei-Cas E, Chermette R. 2001. Parallel phylogenies of *Pneumocystis* species and their mammalian hosts. *J Eukaryot Microbiol.* 47: 113-15.
- Gupta R**, Mirdha BR, Guleria R, Agarwal SK, Samantaray JC, Kumar L, Kabra SK, Luthra K, Sreenivas V, Iyer VK. 2011. Genotypic variation of *Pneumocystis jirovecii* isolates in India based on sequence diversity at mitochondrial large subunit rRNA. *Int J Med Microbiol.* 301: 267-72.
- Gutiérrez S**, Respaldiza N, Campano E, Martínez-Risquez MT, Calderón EJ, De La Horra C. 2011. *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. *Parasite.* 18: 121-26.
- Hagler DN**, Kim CK, Walzer PD. 1987. Feline leukemia virus and *Pneumocystis carinii* infection. *J Parasitol.* 73: 1284-86.
- Hahn PY**, Evans SE, Kottom TJ, Standing JE, Pagano RE, Limper AH. 2003. *Pneumocystis carinii* cell wall beta-glucan induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. *J Biol Chem.* 278: 2043-50.
- Haliwell B**, Gutteridge J. 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press., Oxford, UK.
- Hamperl H**. 1956. *Pneumocystis* infection and cytomegaly of the lungs in the newborn and adult. *Am J Pathol.* 32: 1-13.
- Hanano R**, Reifenberg K, Kaufmann SH. 1996. Naturally acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia in gene disruption mutant mice: roles of distinct T-cell populations in infection. *Infect Immun.* 64: 3201–09.
- Hardy AM**, Wajszczuk CP, Suffredini AF, Hakala TR, and Ho M. 1984. *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and steroids. *J. Infect. Dis.* 149: 143-47.
- Harigai M**, Koike R, Miyasaka N. 2007. *Pneumocystis* Pneumonia under Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy (PAT) Study Group. *Pneumocystis* pneumonia associated with infliximab in Japan. *N Engl J Med.* 357: 1874-76.
- Harigaya Y**, Yamamoto M. 2007. Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Res.* 15: 523-37.
- Harmsen AG**, Chen W, Gigliotti F. 1995. Active immunity to *Pneumocystis carinii* reinfection in T-cell-depleted mice. *Infect Immun.* 63: 2391-95.
- Hasenberg M**, Stegemann-Koniszewski S, Gunzer M. 2013. Cellular immune reactions in the lung. *Immunol Rev.* 251: 189-14.

- Hasleton PS**, Curry A, Rankin EM. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a light microscopical and ultrastructural study. *J Clin Pathol.* 34: 1138-46.
- Hauser PM**, Blanc DS, Sudre P, Senggen ME, Nahimana A, Bille J, Weber R, Francioli P. 2001. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. *AIDS.* 15: 461-66.
- Hauser PM**, Francioli P, Bille J, Telenti A, Blanc DS. 1997. Typing of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis by single-strand conformation polymorphism of four genomic regions. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3086-91.
- Hauser PM**, Blanc DS, Bille J, Francioli P. 1998. Typing methods to approach *Pneumocystis carinii* genetic heterogeneity. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 22: 27-35.
- Helweg-Larsen J**, Tsolaki AG, Miller RF, Lundgren B, and Wakefield AE. 1998. Clusters of *Pneumocystis carinii* pneumonia: analysis of person-to-person transmission by genotyping. *QJM* 91:813-20.
- Hennequin C**, Page B, Roux P, Legendre C, and Kreis H. 1995. Outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a renal transplant unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:122-26.
- Hidalgo HA**, Helmke RJ, German VF, Mangos JA. 1992. *Pneumocystis carinii* induces an oxidative burst in alveolar macrophages. *Infect Immun.* 60: 1-7.
- Higgins CM**, Jung C, Ding H, Xu Z. 2002. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci.* 22: 215.
- Höcker B**, Wendt C, Nahimana A, Tönshoff B, Hauser PM. 2005. Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. *Emerg Infect Dis.* 11: 330-2.
- Hoffman AG**, Lawrence MG, Ognibene FP, Suffredini AF, Lipschik GY, Kavacs JA, Masur H, Shelhamer JH. 1992. Reduction of pulmonary surfactant in patient with human immunodeficiency virus infection and *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest.* 102: 1730-36.
- Hollifield M**, Bou Ghanem E, de Villiers WJ, Garvy BA. 2007. Scavenger receptor A dampens induction of inflammation in response to the fungal pathogen *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun.* 75: 3999-05.
- Hoover DR**, Graham NM, Bacellar H, Schragger LK, Kaslow R, Visscher B, Murphy R, Anderson R, & Saah A. 1991. Epidemiologic patterns of upper respiratory illness and *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men. *Am Rev Respir Dis.* 144: 756-59.
- Horowitz AD**, Moussavian B, Whitsett JA. 1996. Roles of SP-A, SP-B and SP-C in modulation of lipid uptake by pulmonary epithelial cells in vitro. *Am J Physiol.* 273: 69-79.
- Hoyte JS**, Standing JE, Limper AH. 1997. Steady-state effects of vitronectin and fibronectin on the binding, uptake, and degradation of *Pneumocystis carinii* in rat alveolar macrophages. *Inflammation.* 21: 335-45.
- Huang L**, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, Pieniazek N, Carter JL, del RC, Rimland D, Navin TR. 2000. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis.* 182: 1192-98.
- Huang L**, Crothers K, Atzori C, Benfield T, Miller R, Rabodonirina M, Helweg-Larsen J. 2004. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. *Emerg Infect Dis.* 10: 1721-28.
- Huang L**, Crothers K, Morris A, et al. 2003. *Pneumocystis* colonization in HIV-infected patients. *J Eukaryot Microbiol.* 50: 616-17.
- Huang L**, Crothers K. 2009. HIV-associated opportunistic pneumonias. *Respirology.* 14: 474-85.

- Huang L**, Morris A, Limper AH, Beck JM. 2006. An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in *Pneumocystis pneumonia* (PCP). *Proc Am Thorac Soc.* 3: 655-64.
- Huang L**, Welsh DA, Miller RF, Beard CB, Lawrence GG, Fox M, Swartzman A, Bensley MR, Carbonnet D, Davis JL, Chi A, Yoo BJ, Jones JL. 2006a. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations and human immunodeficiency virus-associated *Pneumocystis pneumonia*. *J Eukaryot Microbiol.* 53: 114-16.
- Huggett JF**, Taylor MS, Kocjan G, Evans HE, Morris-Jones S, Gant V, Novak T, Costello AM, Zumla A, Miller RF. 2008. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax.* 63: 154-59.
- Hughes WT**, Price RA, Kim HK, Coburn TP, Grigsby D, Feldman S. 1973. *Pneumocystis carinii* pneumonitis in children with malignancies. *J Pediatr.* 82: 404-15.
- Hughes WT**. 1982. Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis.* 145: 842-48.
- Hughes WT**. 1987. *Pneumocystis carinii* Pneumonitis. *N Engl J Med.* 317: 1021-23.
- Hughes WT**. 1991. *Pneumocystis carinii* pneumonia: new approaches to diagnosis, treatment and prevention. *Pediatr Infect Dis J.* 10: 391-9.
- Hughes WT**. 1995. *Pneumocystis* in infants and children. *N Engl J Med.* 333: 320-21.
- Hughes WT**. 1996. Recent advances in the prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Adv Pediatr Infect Dis.* 11: 163-86.
- Hughes WT**. 1998. Current issues in the epidemiology, transmission, and reactivation of *Pneumocystis carinii*. *Semin Respir Infect.* 13: 283-88.
- Hugot JP**, Demanche C, Barriel V, Dei-Cas E & Guillot J. 2003. Phylogenetic systematics and evolution of primate-derived *Pneumocystis* based on mitochondrial or nuclear DNA sequence comparison. *Syst Biol.* 52: 735-44.
- Hwang CS**, Baek YU, Yim HS, Kang SO. 2003. Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast.* 20: 929-41.
- Hwang CS**, Rhie G, Oh JH, Huh WK, Yim HS, Kang SO. 2002. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology.* 148: 3705-13.
- Icenhour CR**, Rebholz SL, Collins MS, Cushion MT. 2002. Early acquisition of *Pneumocystis carinii* in neonatal rats as evidenced by PCR and oral swabs. *Eukaryot Cell.* 1: 414-19.
- Iliades P**, Meshnick SR, Macreadie IG. 2005. Mutations in the *Pneumocystis jirovecii* DHPS gene confer cross-resistance to sulfa drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 741-48.
- Ishimine T**, Kawakami K, Nakamoto A, Saito A. 1995. Analysis of cellular response and gamma interferon synthesis in bronchoalveolar lavage fluid and lung homogenate of mice infected with *Pneumocystis carinii*. *Microbiol Immunol.* 39: 49-58.
- Itatani CA**, Marshall GJ. 1988. Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* in situ and from bronchoalveolar lavage. *J Parasitol.* 74: 700-12.
- Itatani CA**. 1994. Ultrastructural demonstration of a pore in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. *J Parasitol.* 80: 644-48.
- Itatani CA**. 1996. Ultrastructural morphology of intermediate forms and forms suggestive of conjugation in the life cycle of *Pneumocystis carinii*. *J Parasitol.* 82: 163-71.

- Ito M**, Tsugane T, Kobayashi K, Kuramochi T, Hioki K, Furuta T, et al. 1991. Study on placental transmission of *Pneumocystis carinii* in mice using immunodeficient SCID mice as a new animal model. *J Protozool.* 38: 218-19.
- Ivady G**, Paldy L. 1958. Ein neues Behandlungsverfahren der interstitiellen plasmazelligen Pneumonie Frühgeborener mit fünfwertigem Stibium und aromatischen Diamidinen. *M Schr Kinderheilk.* 106: 10-14.
- Jaffe HW**, Bregman DJ, Selik RM. 1983. Acquired immune deficiency syndrome in the United states: the first 1,000 cases. *J Infect Dis.* 148: 339-45.
- Jain NC**. 1986. *Schalm's veterinary hematology - 4ième Edition-Philadelphie: Lea andFebiger*, 25-27, 91-94, 383, 518.
- Jain NC**. 1993. *Essentials of veterinary hematology -Philadelphie: Lea and Febiger*, 1: 7-77, 3: 55-71, 12: 288-98.
- Jensen T**, Aliouat EM, Lundgren B, Settnes OP, Karlsson A, Dahlgren C, Dei-Cas E, Obel N. 1998. Cultured rat and purified human *Pneumocystis carinii* stimulate intra- but not extracellular free radical production in human neutrophils. *J Eukaryot Microbiol.* 45: 544-47.
- Jeong JH**, Kwon ES, Roe JH. 2001. Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys Res Commun.* 283 : 908-14.
- Johansson J**, Curstedt T, Robertson B. 1994. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J.* 7: 372-91.
- Kalyoncu U**, Karadag O, Akdogan A, Kisacik B, Erman M, Erguven S, Ertenli AI. 2007. *Pneumocystis carinii* pneumonia in a rheumatoid arthritis patient treated with adalimumab. *Scand J Infect Dis.* 39: 475-78.
- Kaplan JE**, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, Lindegren ML, Holmberg S, Jones JL. 2000. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 30: 5-14.
- Kaplan JE**, Masur H, Holmes KK. 2002. USPHS; Infectious Disease Society of America. Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons-2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep.* 51: 1-52.
- Kaur N**, Mahl TC. 2007. *Pneumocystis jirovecii* (carinii) pneumonia after infliximab therapy: a review of 84 cases. *Dig Dis Sci.* 56: 1481-84.
- Kazanjian P**, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee CH, Crane L, Katz J, Meshnick SR. 2000. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis.* 182: 551-57.
- Keely SP**, Fischer JM & Stringer JR. 2003. Evolution and speciation of *Pneumocystis*. *J Eukaryot Microbiol.* 50: 24-26.
- Keely SP**, Fischer JM, Cushion MT, Stringer JR. 2004. Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. *Microbiology.* 150:1153-65.
- Keely SP**, Stringer JR, Baughman RP, Linke MJ, Walzer PD, and Smulian AG. 1995. Genetic variation among *Pneumocystis carinii hominis* isolates in recurrent pneumocystosis. *J Infect Dis.* 172: 595-98.
- Kessl JJ**, Hill P, Lange BB, Meshnick SR, Meunier B, Trumpower BL. 2004. Molecular basis for atovaquone resistance in *Pneumocystis jirovecii* modeled in the cytochrome bc (1) complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279: 2817-24.

- Khodadadi H1**, Mirhendi H, Mohebbali M, Kordbacheh P, Zarrinfar H, Makimura K. 2013. *Pneumocystis jirovecii* Colonization in Non-HIV-Infected Patients Based on Nested-PCR Detection in Bronchoalveolar Lavage Samples. *Iran J Public Health*. 42: 298-305.
- Kling HM**, Shipley TW, Patil S, Morris A, Norris KA. 2009. *Pneumocystis* colonization in immunocompetent and simian immunodeficiency virus-infected cynomolgus macaques. *J Infect Dis*. 199: 89-96.
- Knopp EA**, Arndt TL, Eng KL, Caldwell M, Leboef RC, Deeb SS, O'Brien KD. 1999. Murine phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase: cDNA sequence, tissue expression, and mapping. *Mamm Genome*. 10: 601-05.
- Kolls JK**, Habetz S, Shean MK, Vazquez C, Brown JA, Lei D, Schwarzenberger P, Ye P, Nelson S, Summer WR, Shellito JE. 1999. IFN-gamma and CD8+ T cells restore host defenses against *Pneumocystis carinii* in mice depleted of CD4+ T cells. *J Immunol*. 162: 2890-94.
- Kolls JK**, Lei D, Vazquez C, Odom G, Summer WR, Nelson S, Shellito J. 1997. Exacerbation of murine *Pneumocystis carinii* infection by adenoviral-mediated gene transfer of a TNF inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 16: 112-18.
- Kolstad A**, Holte H, Fosså A, Lauritzen GF, Gaustad P, Torfoss D. 2007. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in B-cell lymphoma patients treated with the rituximab-CHOEP-14 regimen. *Haematologica*. 92:139-40.
- Komano Y**, Harigai M, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K, Sekiguchi N, Inoo M, Onishi I, Ohashi H, Amamoto F, Miyata M, Ohtsubo H, Hiramatsu K, Iwamoto M, Minota S, Matsuoka N, Kageyama G, Imaizumi K, Tokuda H, Okochi Y, Kudo K, Tanaka Y, Takeuchi T, Miyasaka N. 2009. *Pneumocystis Jirovecii* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: A retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis Rheum*. 61: 305-12.
- Kondo H**, Ishikawa A. 2005. Post-marketing surveillance of Infliximab: Appearance rate and appearance pattern of side effect according to period. *Bunshi Ryumachi (Molecular Rheumatology)*. 2: 259-64. (in Japanese).
- Kottom TJ**, Kennedy CC, Limper AH. 2008. *Pneumocystis* PCINT1, a molecule with integrin-like features that mediates organism adhesion to fibronectin. *Mol Microbiol*. 67: 747-61.
- Kottom TJ**, Köhler JR, Thomas CF Jr, Fink GR, Limper AH. 2003. Lung epithelial cells and extracellular matrix components induce expression of *Pneumocystis carinii* STE20, a gene complementing the mating and pseudohyphal growth defects of STE20 mutant yeast. *Infect Immun*. 71: 6463-71.
- Kovacs JA**, Masur H. 2009. Evolving health effects of *Pneumocystis*: one hundred years of progress in diagnosis and treatment. *JAMA*. 301: 2578–85.
- Koziel H**, Li X, Armstrong MY, Richards FF, Rose RM. 2000. Alveolar macrophages from human immunodeficiency virus-infected persons demonstrate impaired oxidative burst response to *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 23: 452–59.
- Krajicek BJ**, Limper AH, Thomas CF Jr. 2008. Advances in the biology, pathogenesis and identification of *Pneumocystis* pneumonia. *Curr Opin Pulm Med*. 14: 228–34.
- Kutty G**, Hernandez-Novoa B, Czapiga M, Kovacs JA. 2008. *Pneumocystis* encodes a functional S-adenosylmethionine synthetase gene. *Eukaryot Cell*. 7: 258–67.
- Kutty G**, Huang SN, Kovacs JA. 2003. Characterization of thioredoxin reductase genes (trr1) from *Pneumocystis carinii* and *Pneumocystis jirovecii*. *Gene* 310: 175–83.
- Kyeyune R**, den Boon S, Cattamanchi A, Davis JL, Worodria W, Yoo SD, Huang L. 2010. Causes of early mortality in HIV-infected TB suspects in an East African referral hospital. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 55: 446–50.

- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-85.
- Lahiff C,** Khiaron OB, Nolan N, Chadwick GA. 2007. *Pneumocystis carinii* pneumonia in a patient on etanercept for psoriatic arthritis. *Ir J Med Sci*. 176: 309-11.
- Lamarre C,** LeMay JD, Deslauriers N, Bourbonnais Y. 2001. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *J Biol Chem*. 276: 43784–91.
- Lambou K,** Lamarre C, Beau R, Dufour N, Latge JP. 2010. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol*. 75: 910–23.
- Lanza AM,** Curran KA, Rey LG, Alper HS. 2014. A condition-specific codon optimization approach for improved heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol*. 8: 33.
- Latorre CR,** Sulzer AJ, Norman LG. 1977. Serial propagation of *Pneumocystis carinii* in cell line cultures. *Appl Environ Microbiol*. 33: 1204-06.
- Latouche S,** Lacube P, Maury E, Bolognini J, Develoux M, Girard PM, Godet C, Lebrette MG, Mayaud C, Guillot J, Roux P. 2003. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in French patients with pneumocystosis: a 1998-2001 prospective study. *Med Mycol Dec*. 41: 533-7.
- Latouche S,** Ortona E, Mazars E, Margutti P, Tamburrini E, Siracusano A, Guyot K, Nigou M, Roux P. 1997. Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions. *J Clin Microbiol*. 35: 383-87.
- Latouche S,** Totet A, Lacube P, Bolognini J, Nevez G, Roux P. 2001. Development of an RT-PCR on the heat shock protein 70 gene for viability detection of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* in patients with pneumocystosis and in air sample. *J Eukaryot Microbiol*. 176-77.
- Laursen AL,** Møller B, Rungby J, Petersen CM, Andersen PL. 1994. *Pneumocystis carinii*-induced activation of the respiratory burst in human monocytes and macrophages. *Clin Exp Immunol*. 98: 196–02.
- Laursen AL,** Obel N, Rungby J, Andersen PL. 1993. Phagocytosis and stimulation of the respiratory burst in neutrophils by *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis*. 168 : 1466–71.
- Le Gal S,** Damiani C, Perrot M, Rouillé A, Virmaux M, Quinio D, Moalic E, Saliou P, Berthou C, Le Meur Y, Totet A, Nevez G. 2012. Circulation of *Pneumocystis* dihydropteroate Synthase mutants in France. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 74: 119-124.
- Le Gal S,** Damiani C, Rouillé A, Grall A, Tréguer L, Virmaux M, Moalic E, Quinio D, Moal MC, Berthou C, Saliou P, Le Meur Y, Totet A, Nevez G. 2012a. A cluster of *Pneumocystis* infections among renal transplant recipients: Molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis*. 54: 62-71.
- Lee CH,** Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, Lu JJ, Lundgren B, Lundgren JD, Olsson M, Lucas SB, Roux P, Cargnel A, Atzori C, Matos O, Smith JW. 1998. Update on *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 36: 734-41.
- Leigh TR,** Kangro HO, Gazzard BG, Jeffries DJ, Collins JV. 1993. DNA amplification by the polymerase chain reaction to detect subclinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-positive and HIV-negative male homosexuals with and without respiratory symptoms. *Respir Med*. 87: 525–29.
- Li L,** Wright SJ, Krystofova S, Park G, Borkovich KA. 2007. Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol*. 61: 423-52.
- Li RK, Cutler JE.** 1991. A cell surface/ plasma membrane antigen of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*. 137: 455-64.

- Li Y**, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, et al. 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 11: 376-81.
- Limper AH**, Offord KP, Smith TF, Martin WJ 2nd. 1989. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis.* 140: 1204-09.
- Limper AH**, Thomas CF Jr, Anders RA, Leof EB. 1997. Interactions of parasite and host epithelial cell cycle regulation during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Lab Clin Med.* 130: 132-8.
- Limper AH**, Weiss LM. 2011. Guidelines for the naming of genes, gene products, and mutants in the opportunistic protists. *J Eukaryot Microbiol.* 58: 537-38.
- Limper AH**. 1995. Adhesive glycoproteins in the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: host defense or microbial offense? *J Lab Clin Med.* 125: 12-13.
- Linke M**, Ashbaugh A, Koch J, Tanaka R, Walzer P. 2005. Surfactant protein A limits *Pneumocystis murina* infection in immunosuppressed C3H/HeN mice and modulates host response during infection. *Microbes Infect.* 7: 748-59.
- Linke M**, Ashbaugh A, Koch J, Tanaka R, Walzer P. 2006. Efficient resolution of *Pneumocystis murina* infection in surfactant protein A-deficient mice following withdrawal of corticosteroid-induced immunosuppression. *J Med Microbiol.* 55: 143-47.
- Linke M**, Ashbaugh AA, Koch JV, Levin L, Tanaka R, Walzer PD. 2009. Effects of surfactant protein-A on the interaction of *Pneumocystis murina* with its host at different stages of the infection in mice. *J Eukaryot Microbiol.* 56: 58-65.
- Linke M**, Cushion MT, Walzer PD. 1989. Properties of the major antigens of rat and human *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun.* 57: 1547-55.
- Linke M**, Harris CE, Korfhagen TR, McCormack FX, Ashbaugh AD, Steele P, Whitsett JA, Walzer PD. 2001. Immunosuppressed surfactant protein A-deficient mice have increased susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection. *J Infect Dis.* 183: 943- 52.
- Lipschik GY**, Moore SD, Trembl JF, Beers MF. 1998. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A inhibits surfactant phospholipid secretion by alveolar type II cells. *J Infect Dis.* 177: 182-87.
- Liu Y**, Leigh JW, Brinkmann H, Cushion MT, Rodriguez-Ezpeleta N, Philippe H, Lang BF. 2009. Phylogenomic analyses support the monophyly of Taphrinomycotina, including *Schizosaccharomyces* fission yeasts. *Mol Biol Evol.* 26: 27-34.
- Lo Presti L**, Cockell M, Cerutti L, Simanis V, Hauser P.M. 2007. Functional characterization of *Pneumocystis carinii* brl1 by transspecies complementation analysis. *Eukaryot Cell.* 6: 2448-52
- Longo V**, Gralla E, Valentine J. 1995. Superoxide Dismutase Activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 271: 12275-80.
- Löoke M**, Kristjuhan K, Kristjuhan A. 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques.* 50: 325-28.
- Löwenberg M**, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW. 2007. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med.* 13: 158-63.
- Lu JJ**, Lee CH. 2008. *Pneumocystis* pneumonia. *J Formos Med Assoc.* 107: 830-42.
- Lubis N**, Baylis D, Short A, Stebbing J, Teague A, Portsmouth S, Bower M, Nelson M, Gazzard B. 2003. Prospective cohort study showing changes in the monthly incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Postgrad Med J.* 79: 164-166.
- Luft V**, Kliem V, Behrend M, Pichlmayr R, Koch KM, Brunkhorst R. 1996. Incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia after renal transplantation. Impact of immunosuppression. *Transplantation.* 62: 421-23.

- Lund FE**, Hollifield M, Schuer K, Lines JL, Randall TD, Garvy BA. 2006. B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection. *J Immunol.* 176: 6147-54.
- Lund FE**, Schuer K, Hollifield M, Randall TD, Garvy BA. 2003. Clearance of *Pneumocystis carinii* in mice is dependent on B cells but not on *P carinii*-specific antibody. *J Immunol.* 171: 1423-30.
- Lundgren B**, Benfield T, Lundgren JD. 1996. Evaluation of PCR technique for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV positive patients using oropharyngeal washings. *J Eukaryot Microbiol.* 43:9.
- Lundgren B**, Cotton R, Lundgren JD, Edman JC, Kovacs JA. 1990. Identification of *Pneumocystis carinii* chromosomes and mapping of five genes. *Infect Immun.* 58: 1705-10.
- Ma L**, Borio L, Masur H, Kovacs JA. 1999. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. *J Infect Dis.* 180: 1969-78.
- Ma L**, Huang DW, Cuomo CA, Sykes S, Fantoni G, Das B, Sherman BT, Yang J, Huber C, Xia Y, Davey E, Kutty G, Bishop L, Sassi M, Lempicki RA, Kovacs JA. 2013. Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent *Pneumocystis*. *FASEB J.* 27: 1962-72.
- Magne D**, Angoulvant A, Botterel F, Bouges-Michel C, Bougnoux ME, Bouree P, Brun S, Chochillon C, Cornet M, Dannaoui E, Detry A, Dunand J, Galeazzi G, Lebuissou A, Sarfati C, Roux P. 2009. Réseau pneumocystose francilien : bilan de cinq années de surveillance (2003- 2007). *J Mycol Med.* 19: 290-293.
- Maher NH**, Vermund SH, Welsh DA, Dillon HK, Awooda A, Unnasch TR. 2001. Development and characterization of a molecular viability assay for *Pneumocystis carinii f sp hominis*. *J Infect Dis.* 183: 1825-27.
- Maitte C**, Leterrier M, Le Pape P, Miegerville M, Morio F. 2013. Multilocus sequence typing of *Pneumocystis jirovecii* from clinical samples: how many and which loci should be used? *J Clin Microbiol.* 51: 2843-49.
- Mansharamani NG**, Balachandran D, Vernovsky I, Garland R, Koziel H. 2000. Peripheral blood CD4+ T-lymphocyte counts during *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Chest.* 118: 712-20.
- Martchenko M**, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. 2004. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell* 15: 456–67.
- Martin SI**, Marty FM, Fiumara K, Treon SP, Gribben JG, Baden LR. 2006. Infectious complications associated with alemtuzumab use for lymphoproliferative disorders. *Clin Infect Dis.* 43: 16-24.
- Martinez A**, Aliouat EM, Pottier M, Gantois N, Pinçon C, Standaert-Vitse A, Dei-Cas E, Aliouat-Denis CM. 2009. High-speed cell sorting of infectious trophic and cystic forms of *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol.* 56: 446-53.
- Martinez A**, Aliouat EM, Standaert-Vitse A, Werkmeister E, Pottier M, et al. 2011. Ploidy of Cell-Sorted Trophic and Cystic Forms of *Pneumocystis carinii*. *PLoS ONE.* 6: 20935.
- Martinez A**, Halliez M, Aliouat EM, Chabé M, Vitse-Standaert A, Fréalle E, Gantois N, Pottier M, Pinon A, Dei-Cas E, Aliouat-Denis CM. 2013. Growth and airborne transmission of cell-sorted life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *PLoS One.* 8: 79958.
- Maskell NA**, Wayne DJ, Lindley A, Pepperell JC, Wakefield AE, Miller RF, Davies RJ. 2003. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax.* 58: 594–97.

- Masur H**, Kaplan JE, and Holmes KK. 2002. Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons—2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *Ann Intern Med.* 137: 435–78.
- Masur H**, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, Cunningham-Rundles S. 1981. An outbreak of community acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: Initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med.* 305:1431-38.
- Masur H**, Ognibene FP, Yarchoan R, et al. 1989. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med.* 111: 223–31.
- Matos O**, Esteves F. 2010. *Pneumocystis jirovecii* multilocus gene sequencing: findings and implications. *Future Microbiol.* 5: 1257-67.
- Matsumoto Y**, Yamada M, Tegoshi T, Yoshida Y, Gotoh S, Suzuki J, Matsubayashi K. 1987. *Pneumocystis* infection in macaque monkeys: *Macaca fuscata fuscata* and *Macaca fascicularis*. *Parasitol Res.* 73: 324-7.
- Matsumoto Y**, Yoshida Y. 1984. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J Protozool.* 31: 420-8.
- Matsuzawa T**, Nomura M, Unno T. 1993. Clinical pathology reference ranges of laboratory animals-*J Vet Med Sci.* 55: 351-62.
- May T**, Salmon D, Bonnet F, Cacoub P, Lewden C, Chene G. 2005. Mortalité 2005 >> study in collaboration with Mortavic. *Med Mal Infect.* 35: 28-30.
- Mazars E**, Guyot K, Durand I, Dei-Cas E, Boucher S, Abderrazak SB, Banuls AL, Tibayrenc M, Camus D. 1997. Isoenzyme diversity in *Pneumocystis carinii* from rats, mice, and rabbits. *J Infect Dis.* 175: 655-60.
- McAllister F**, Steele C, Zheng M, Young E, Shellito JE, Marrero L, Kolls JK. 2004. T cytotoxic-1 CD8₊ T cells are effector cells against *Pneumocystis* in mice. *J Immunol.* 172: 1132–38.
- McNally LM**, Jeena PM, Lalloo U, Nyamande K, Gajee K, Sturm AW, Goldblatt D, Tomkins AM, Coovadia HM. 2005. Probable mother to infant transmission of *Pneumocystis jirovecii* from an HIV-infected woman to her HIV-uninfected infant. *AIDS.* 19: 1548-49.
- Meade JC**, Stringer JR. 1991. PCR amplification of DNA sequences from the transcription factor IID and cation transporting ATPase genes in *Pneumocystis carinii*. *J Protozool.* 38: 66-68.
- Medrano F**, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, Perez-Lozano MJ, Varela JM, Calderon EJ. 2005. *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis.* 11: 245-50.
- Meissner NN**, Lund FE, Han S, Harmsen A. 2005. CD8 T cell-mediated lung damage in response to the extracellular pathogen *Pneumocystis* is dependent on MHC class I expression by radiation-resistant lung cells. *J Immunol.* 175: 8271–79.
- Mekinian A**, Durand-Joly I, Hatron PY, Moranne O, Denis G, Dei-Cas E, Morell-Dubois S, Lambert M, Launay D, Delhaes L, Hachulla E, and Queyrel V. 2011. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic autoimmune diseases: prevalence, risk factors of colonization and outcome. *Rheumatology (Oxford).* 50: 569-77.
- Mekinian A**, Queyrel V, Durand-Joly I, Moranne O, Denis G, Delhaes L, Morell-Dubois S, Lambert M, Launay D, Hachulla E, Hatron PY. 2010. Positive *Pneumocystis jirovecii* PCR in immunocompromised patients with a systemic disease: infection or colonisation? *Rev Med Interne.* 31:194-99.
- Menotti J**, Emmanuel A, Bouchekouk C, Chabe M, Choukri F, et al. 2013. Evidence of Airborne Excretion of *Pneumocystis carinii* during Infection in Immunocompetent Rats. Lung Involvement and Antibody Response. *PLoS ONE* 8: 62155.

- Merali S.** 1999a. *Pneumocystis carinii* polyamine catabolism. *J Biol Chem.* 274(30):21017-22.
- Merali S,** Frevert U, Williams JH, Chin K, Bryan R, Clarkson AB Jr. 1999. Continuous axenic cultivation of *Pneumocystis carinii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 : 402-07.
- Merali S,** Vargas D, Franklin M, Clarkson AB Jr. 2000. S-adenosylmethionine and *Pneumocystis carinii*. *J Biol Chem.* 275: 14958-63.
- Meuwissen JH,** Tauber I, Leeuwenberg AD, Beckers PJ, Sieben M. 1977. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J Infect Dis.* 136: 43-9.
- Milledge J,** Kakakios A, Gillis J, Fitzgerald DA. 2003. *Pneumocystis carinii* pneumonia as a presenting feature of X-linked hyper-IgM syndrome. *J. Paediatr. Child Health.* 39: 704–06.
- Miller RF,** Ambrose HE, Novelli V, Wakefield AE. 2002. Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* infection. *J Clin Microbiol.* 40: 1555- 57.
- Miller RF,** Ambrose HE, Wakefield AE. 2001. *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol.* 39: 3877-82.
- Miller RF,** Evans HE, Copas AJ, Cassell JA. 2007. Climate and genotypes of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Microbiol Infect.* 13: 445– 448.
- Miller RF,** Evans HE, Copas AJ, Huggett JF, Edwards SG, Walzer PD. 2010. Seasonal variation in mortality of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients. *Int J STD AIDS.* 21: 497–03.
- Miller RF,** Grant AD, Foley NM. 1992. Seasonal variation in presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet.* 339: 747-48.
- Miller RF,** Lindley AR, Ambrose HE, Malin AS, Wakefield AE. 2003. Genotypes of *Pneumocystis jirovecii* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3979–81.
- Miller RF,** Lindley AR, Copas A, Ambrose HE, Davies RJ, Wakefield AE. 2005. Genotypic variation in *Pneumocystis jirovecii* isolates in Britain. *Thorax.* 60: 679–82.
- Mirovsky P,** Fishman JA. 1993. An improved method for the prolonged maintenance of *Pneumocystis carinii* in vitro. *J Infect Dis.* 167: 1470-73.
- Monnet X,** Vidal-Petiot E, Osman D, Hamzaoui O, Durrbach A, Goujard C, Miceli C, Bourée P, Richard C. 2008. Critical care management and outcome of severe *Pneumocystis* pneumonia in patients with and without HIV infection. *Crit Care.* 12: 28.
- Monteiro JP,** Martins AF, Nunes C, Morais CM, Lucio M, Reis S, Teresa P, Geraldes C, Oliviera P, Jurado A. 2013. A biophysical approach to menadione membrane interactions: Relevance for menadione- induced mitochondria dysfunction and related deleterious/therapeutic effects. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1828: 1899-08.
- Montes- Cano MA,** de la Horra C, Martin- Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N et al. 2004. *Pneumocystis jirovecii* genotypes in spanish population. *Clin Infect Dis.* 39 :123-28.
- Montes-Cano MA,** Chabe M, Fontillon-Alberdi M, de la Horra C, Respaldiza N, Medrano F, Varela JM, Dei-Cas E, and Calderon E. 2009. Vertical Transmission of *Pneumocystis jirovecii* in Humans. *Emerg Infect Dis.* 15: 125-7.
- Mori H,** Ohno Y, Ito F, Endo J, Yanase K, Funaguchi N, Bai La BL, Minatoguchi S. 2010. Polymerase chain reaction positivity of *Pneumocystis jirovecii* during primary lung cancer treatment. *Jpn J Clin Oncol.* 40: 658-62.
- Morris A,** Alexander T, Radhi S, Lucht L, Sciruba FC, Kolls JK, Srivastava R, Steele C, Norris KA. 2009. Airway obstruction is increased in *Pneumocystis*-colonized human immunodeficiency virus-infected outpatients. *J Clin Microbiol.* 47: 3773-76.

- Morris A**, Kingsley LA, Groner G, Lebedeva IP, Beard CB, Norris KA. 2004. Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV-infected men. *AIDS*. 18: 793-98.
- Morris A**, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, Huang L, Beard CB, Kaplan JE. 2004a. Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg Infect Dis*. 10: 1713-20.
- Morris A**, Norris K. 2012. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and Its Role in Disease. *Clin Microbiol Rev*. 25: 297.
- Morris A**, Sciruba FC, Lebedeva IP, Githaiga A, Elliott WM, Hogg JC, Huang L, Norris KA. 2004b. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med*. 170: 408-13.
- Morris A**, Sciruba FC, Norris K.A. 2008. *Pneumocystis*: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? *COPD*. 5: 43-51.
- Morris A**, Wei K, Afshar K, Huang L. 2008a. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *J Infect Dis*. 197: 10-17.
- Mortier E**, Pouchot J, Bossi P, Molinie V. 1995. Maternal-fetal transmission of *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 332: 825.
- Naba M**, Kanafani Z, Awar G, Kanj S. 2010. Profile of opportunistic infections in HIV-infected patients at a tertiary care center in Lebanon. *J Infect Public Health*. 3: 130-33.
- Narasipura SD**, Chaturvedi V, Chaturvedi S. 2005. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Mol Microbiol*. 55: 1782-800.
- Nathan C**, Cunningham-Bussel A. 2013. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol*. 13: 349-61.
- Nevez G**, Magois E, Duwat H, Gouilleux V, Jounieaux V, Totet A. 2006. Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. *Clin Infect Dis*. 42: 99-101.
- Nevez G**, Raccurt C, Jounieaux V, Dei-Cas E, Mazars E. 1999. Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS*. 13: 535-36.
- Nevez G**, Raccurt C, Vincent P, Jounieaux V, Dei-Cas E. 1999a. Pulmonary colonization with *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus-negative patients: assessing risk with blood CD4T cell counts. *Clin Infect Dis*. 29:1331-32.
- Nevez G**, Totet A, Jounieaux V, Schmit JL, Dei-Cas E, Raccurt C. 2003. *Pneumocystis jirovecii* Internal Transcribed Spacer Types in Patients Colonized by the Fungus and in Patients with Pneumocystosis from the Same French Geographic Region. *J Clin Microbiol*. 41: 181-86.
- Nevez G**, Totet A, Pautard JC, Raccurt C. 2001. *Pneumocystis carinii* detection using nested-PCR in nasopharyngeal aspirates of immunocompetent infants with bronchiolitis. *J Eukaryot Microbiol*. 122-23.
- Nielsen MH**, Settnes OP. 1991. Morphology of *Pneumocystis carinii* and activation of the plasmalemmal vesicular system in alveolar epithelial cells of the host. An ultrastructural study. *APMIS*. 99: 219-25.
- Nimri LF**, Moura IN, Huang L, del Rio C, Rimland D, Duchin JS, Dotson EM, Beard CB. 2002. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis based on variations in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 40:1146-51.
- Olsson M**, Eriksson BM, Elvin K, Strandberg M, and Wahlgren M. 2001a. Genotypes of clustered cases of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Scand J Infect. Dis*. 33: 285-89.
- Olsson M**, Lidman C, Latouche S, Bjorkman A, Roux P, Linder E, and Wahlgren M. 1998. Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis gene sequences in filtered air in hospital environments. *J Clin Microbiol*. 36: 1737-40.

- Olsson M**, Stralin K, Holmberg H. 2001. Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 7: 492-97.
- O'Riordan DM**, Standing JE, Limper AH. 1995. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infect Immun.* 63: 779-84.
- Ortega-Barria E**, Pereira ME. 1992. Identification of a lectin activity in *Pneumocystis carinii*. *Trop Med Parasitol.* 43: 186-90.
- Oz HS**, Hughes WT. 1996. Effect of sex and dexamethasone dose on the experimental host for *Pneumocystis carinii*. *Lab Anim Sci.* 46: 109-10.
- Palluault F**, Pietrzyk B, Dei-Cas E, Slomianny C, Soulez B, Camus D. 1991. Three dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii* from serial-thin sections. II: Intermediate precyst. *J Protozool.* 38: 407-11.
- Palluault F**, Pietrzyk B, Dei-Cas E, Slomianny C, Soulez B, Camus D. 1991a. Three dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii* from serial-thin sections. I: Trophozoite. *J Protozool.* 38(4):402-7.
- Palluault F**, Slomianny C, Soulez B, Dei-Cas E, Camus D. 1992. High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embedding. *Parasitol Res.* 78: 437-44.
- Palluault F**, Soulez B, Slomianny C, Dei-Cas E, Cesbron JY, Camus D. 1992a. High osmotic pressure for *Pneumocystis carinii* London Resin White embedding enables fine immunocytochemistry studies: I. Golgi complex and cell-wall synthesis. *Parasitol Res.* 78: 482-8.
- Patil SP**, Board KF, Lebedeva IP, Norris KA. 2003. Immune responses to *Pneumocystis* colonization and infection in a simian model of AIDS. *J Eukaryot Microbiol.* 50: 661-62.
- Pederiva MA**, Wissmann G, Friaiza V, Morilla R, de La Horra C, Montes-Cano MA, Goldani LZ, Calderón EJ, Prolla JC. 2012. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Med Mycol.* 50: 556-60.
- Peglow SL**, Smulian AG, Linke MJ, Pogue CL, Nurre S, Crisler J, Phair J, Gold JW, Armstrong D, Walzer PD. 1990. Serologic responses to *Pneumocystis carinii* antigens in health and disease. *J Infect Dis.* 161: 296-306.
- Pesanti EL**. 1984. *Pneumocystis carinii*: oxygen uptake, antioxidant enzymes, and susceptibility to oxygen-mediated damage. *Infect Immun.* 44: 7-11.
- Pesanti EL**. 1991. Interaction of cytokines and alveolar cells with *Pneumocystis carinii* in vitro. *J Infect Dis.* 163: 611-16.
- Peters SE**, English K, Rana A, Akter S, Malik S, Warburton NC, Duckett JG. 2001. Synaptonemal complexes in the pre-cyst of *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol.* 134.
- Phair J**, Muñoz A, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A. 1990. The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *N Engl J Med.* 322: 161-65.
- Phelps DS**, Rose RM. 1991. Increased recovery of surfactant protein-A in AIDS-related pneumonia. *Am Rev Respir Dis.* 143: 1072-75.
- Phipps LM**, Chen SC, Kable K, Halliday CL, Firacative C, Meyer W, Wong G, Nankivell BJ. 2011. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: lessons from a cluster in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 92: 1327-34.
- Pifer LL**, Hughes WT, Murphy MJ Jr. 1977. Propagation of *Pneumocystis carinii* in vitro. *Pediatr Res.* 11: 305-16.

- Pifer LL**, Hughes WT, Stagno S, Woods D. 1978. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics*. 61: 35-41.
- Pixley FJ**, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. 1991. Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol*. 5: 1347-51.
- Pohlmeier G**, Deerberg F. 1993. Nude rats as a model of natural *Pneumocystis carinii* pneumonia: sequential morphological study of lung lesions. *J Comp Pathol*. 109: 217-30.
- Ponce CA**, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. 2010. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clin Infect Dis*. 50: 347-53.
- Pottratz ST**, Paulsrud J, Smith JS, Martin WJ 2nd. 1991. *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp 120, a fibronectin binding protein. *J Clin Invest*. 88: 403-7.
- Pottratz ST**, Paulsrud JR, Smith JS, Martin WJ 2nd. 1994. Evidence for *Pneumocystis carinii* binding to a cell-free substrate: role of the adhesive protein fibronectin. *J Lab Clin Med*. 123: 273-81.
- Pottratz ST**, Reese S, Sheldon JL. 1998. *Pneumocystis carinii* induces interleukin 6 production by an alveolar epithelial cell line. *Eur J Clin Invest*. 28: 424-9.
- Probst M**, Ries H, Schmidt-Wieland T, Serr A. 2000. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in patients with chronic lung diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 19: 644-45.
- Pryhuber GS**, Huyck HL, Bhagwat S, O'Reilly MA, Finkelstein JN, Gigliotti F, Wright TW. 2008. Parenchymal cell TNF receptors contribute to inflammatory cell recruitment and respiratory failure in *Pneumocystis carinii*-induced pneumonia. *J Immunol*. 181: 1409-19.
- Pulcini C**, Housseine L, Mondain V, Baudin G, Roger PM. 2012. Possible pandemic H1N1 influenza complicated by *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in an HIV-infected patient. *J Mycol Med*. 22: 88-91.
- Qureshi MH**, Harmsen AG, Garvy BA. 2003. IL-10 modulates host responses and lung damage induced by *Pneumocystis carinii* infection. *J Immunol*. 170: 1002-09.
- Rabodonirina M**, Vaillant L, Taffé P, Nahimana A, Gillibert RP, Vanhems P, Hauser PM. 2013. *Pneumocystis jirovecii* genotype associated with increased death rate of HIV-infected patients with pneumonia. *Emerg Infect Dis*. 19: 21-28.
- Rabodonirina M**, Vanhems P, Couray-Targe S, Gillibert RP, Ganne C, Nizard N, Colin C, Fabry J, Touraine JL, van Melle G, Nahimana A, Francioli P, Hauser PM. 2004. Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis*. 10: 1766-73.
- Radi R**, Turens JF, Chang LY, Bush KM, Crapoll JD, Freeman BA. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*. 266: 22028-34
- Radisic M**, Lattes R, Chapman JF, del Carmen Rial M, Guardia O, Seu F, Gutierrez P, Goldberg J, Casadei DH. 2003. Risk factors for *Pneumocystis carinii* pneumonia in kidney transplant recipients: A case-control study. *Transpl Infect Dis*. 5: 84-93.
- Rapaka RR**, Goetzman ES, Zheng M, Vockley J, McKinley L, Kolls JK, Steele C. 2007. Enhanced defense against *Pneumocystis carinii* mediated by a novel dectin-1 receptor Fc fusion protein. *J Immunol*. 178: 3702-12.
- Raviglione MC**. 1990. Extrapulmonary pneumocystosis: the first 50 cases. *Rev Infect Dis*. 12: 1127-38.
- Reddy LV**, Zammit C. 1991. Proliferation patterns of latent *Pneumocystis carinii* in rat organs during progressive stages of immunosuppression. *J Protozool*. 38: 43-47.

- Rhie GE**, Hwang CS, Brady MJ, Kim ST, Kim YR, Huh WK, Baek YU, Lee BH, Lee JS, Kang SO. 1999. Manganese-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*. 1426: 409-19.
- Richardson JD**, Queener SF, Bartlett M, Smith J. 1989. Binary fission of *Pneumocystis carinii* trophozoites grown in vitro. Workshop on *Pneumocystis carinii*.
- Rivero L**, de la Horra C, Montes-Cano MA, Rodríguez-Herrera A, Respaldiza N, Friaza V, Morilla R, Gutiérrez S, Varela JM, Medrano FJ, Calderón EJ. 2008. *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerg Infect Dis*. 14: 1116-18.
- Robberts FJ**, Liebowitz LD, Chalkley LJ. 2007. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 58: 385-92.
- Roblot F**, Godet C, Kauffmann C, Tattevin P, Boutoille D, Besnier JM, Hauet T, le GERICCO. 2009. Facteurs favorisants de la pneumocystose (PPC) chez les malades immunodéprimés non infectés par le VIH. *J Mycol Med*. 19: 285-89.
- Rodriguez M**, Fishman JA. 2004. Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 17: 770-82.
- Roman J**, McDonald JA. 1991. Fibronectins. In : the lung. R.G. Crystal, J.B. West, Etds, Raven press, Ltd, New York. 3: 399-411.
- Rose CM**, Kimzey SL, Green JM. 2006. The host response of CD28- deficient mice to *Pneumocystis* infection. *Microb Pathog*. 40: 23–28.
- Roths JB**, Sidman CL. 1992. Both immunity and hyper responsiveness to *Pneumocystis carinii* result from transfer of CD4 but not CD8T cells into severe combined immunodeficiency mice. *J. Clin. Invest*. 90: 673–78.
- Roths JB**, Sidman CL. 1993. Single and combined humoral and cell mediated immunotherapy of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunodeficient scid mice. *Infect Immun*. 61: 1641–49.
- Roux A**, Lemiale V, Kouatchet A, Vincent F, Bollee G, Roux P, Azoulay E. 2010. Pneumocystose pulmonaire en dehors de l'infection à VIH. *Réanimation*. 19: 327-338.
- Saijo S**, Fujikado N, Furuta T, Chung S, Kotaki H, Seki K, Sudo K, Akira S, Adachi Y, Ohno N, Kinjo T, Nakamura K, Kawakami K, Iwakura Y. 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat. Immunol*. 8: 39-46.
- Sanchez CA**, Chabé M, Aliouat EM, Durand-Joly I, Gantois N, Conseil V, et al. 2007. Exploring transplacental transmission of *Pneumocystis oryctolagi* in first-time pregnant and multiparous rabbit does. *Med Mycol*. 45:701-07.
- Schmatz DM**, Powles M, McFadden DC, Pittarelli LA, Liberator PA, Anderson JW. 1991. Treatment and prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia and further elucidation of the *P. carinii* life cycle with 1,3-beta-glucan synthesis inhibitor L-671,329. *J Protozool*. 38: 151-153.
- Schoffelen AF**, van Lelyveld SF, Barth RE, Gras L, de Wolf F, Netea MG, Hoepelman AI. 2013. ATHENA national observational cohort study. Lower incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among Africans in the Netherlands host or environmental factors? *AIDS*. 27: 1179-84.
- Seddik M**, Meliez H, Seguy D, Viget N, Cortot A, Colombel JF. 2004. *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) pneumonia following initiation of infliximab and azathioprine therapy in a patient with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 10: 436-437.
- Settnes OP**, Bille-Hansen V, Jorsal SE, Henriksen SA. 1991. The piglet as a potential model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Protozool*. 38: 140-141.
- Shellito J**, Suzara VV, Blumenfeld W, Beck JM, Steger HJ, Ermak TH. 1990. A new model of *Pneumocystis carinii* infection in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *J Clin Invest*. 85: 1686-93.

- Shellito JE**, Kolls JK, Olariu R, Beck JM. 1996. Nitric oxide and host defense against *Pneumocystis carinii* infection in a mouse model. *J Infect Dis.* 173: 432-9.
- Shiota T**, Shimada Y, Kurimoto H, Oikawa H. 1990. *Pneumocystis carinii* infection in corticosteroid-treated cats. *J Parasitol.* 76: 441-5.
- Shively JN**, Dellers RW, Buergelt CD, Hsu FS, Kabelac LP, Moe KK, Tennant B, Vaughan JT. 1973. *Pneumocystis carinii* pneumonia in two foals. *J Am Vet Med Assoc.* 162: 648-52.
- Sinclair K**, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. 1991. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol Biochem Parasitol.* 45: 183-84.
- Sing A**, Schmoldt S, Laubender RP, Heesemann J, Sing D, Wildner M. 2009. Seasonal variation of *Pneumocystis jirovecii* infection: analysis of underlying climatic factors. *Clin Microbiol Infect* 15: 957-60.
- Sing A**, Wonhas C, Bader L, Luther M, Heesemann J. 1999. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in the air filter of a ventilated patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* 29: 952-3.
- Singh M**, Madan T, Waters P, Parida SK, Sarma PU, Kishore U. 2003. Protective effects of a recombinant fragment of human surfactant protein D in a murine model of pulmonary hypersensitivity induced by dust mite allergens. *Immunol Lett.* 86: 299-307.
- Sivam S**, Scieurba FC, Lucht LA, Zhang Y, Duncan SR, Norris KA, Morris A. 2011. Distribution of *Pneumocystis jirovecii* in lungs from colonized COPD patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 71: 24-28.
- Sloand E**, Laughon B, Armstrong M, Bartlett MS, Blumenfeld W, Cushion M, Kalica A, Kovacs JA, Martin W, Pitt E, et al. 1993. The challenge of *Pneumocystis carinii* culture. *J Eukaryot Microbiol.* 40: 188-95.
- Smulian AG**, Sesterhenn T, Tanaka R, Cushion MT. 2001. The ste3 pheromone receptor gene of *Pneumocystis carinii* is surrounded by a cluster of signal transduction genes. *Genetics.* 157: 991-002.
- Soulez B**, Dei-Cas E, Camus D. 1988. Le lapin, hôte expérimental de *Pneumocystis carinii*. *Ann Parasitol Hum Comp.* 63:5-15.
- Soulez B**, Dei-Cas E, Charet P, Mougeot G, Caillaux M, Camus D. 1989. The young rabbit: a nonimmunosuppressed model for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Infect Dis.* 160: 355-56.
- Soulez B**, Dei-Cas E, Palluault F, Camus D. 1991. Morphological evaluation of *Pneumocystis carinii* after extraction from infected lung. *J Parasitol.* 77: 449-53.
- Stansell JD**, Osmond DH, Charlebois E, LaVange L, Wallace JM, Alexander BV. 1997. Predictors of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 155: 60-66.
- Steele C**, Marrero L, Swain S, Harmsen AG, Zheng M, Brown GD, Gordon S, Shellito JE, Kolls JK. 2003. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *Muris* involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med.* 198: 1677-88.
- Sternberg RI**, Whitsett JA, Hull WM, Baughman RP. 1995. *Pneumocystis carinii* alters surfactant protein A concentrations in bronchoalveolar lavage fluid. *J Lab Clin Med.* 125: 462-69.
- Stokes DC**, Gigliotti F, Rehg JE, Snellgrove RL, Hughes WT. 1987. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in the ferret. *Br J Exp Pathol.* 68: 267-76.
- Stringer JR**, Cushion MT, Wakefield AE. 2001. New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. *J Eukaryot Microbiol.* 184-89.
- Stringer JR**, Cushion MT. 1998. The genome of *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 22: 15-26.

- Stringer SL**, Stringer JR, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT. 1989. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp Parasitol.* 68: 450-61.
- Swain SD**, Wright TW, Degel PM, Gigliotti F, Harmsen AG. 2004. Neither neutrophils nor reactive oxygen species contribute to tissue damage during *Pneumocystis* pneumonia in mice. *Infect Immun.* 72: 5722-32.
- Sy ML**, Chin TW, Nussbaum E. 1995. *Pneumocystis carinii* pneumonia associated with inhaled corticosteroids in an immunocompetent child with asthma. *J Pediatr.* 127:1000-02.
- Tachado SD**, Zhang J, Zhu J, Patel N, Cushion M, Koziel H. 2007. *Pneumocystis*-mediated IL-8 release by macrophages requires coexpression of mannose receptors and TLR2. *J Leukoc Biol.* 81: 205-11.
- Tai TL**, O'Rourke KP, McWeeney M, Burke CM, Sheehan K, Barry M. 2002. *Pneumocystis carinii* pneumonia following a second infusion of infliximab. *Rheumatology (Oxford).* 41: 951-952.
- Tamburrini E**, De Luca A, Ventura G, Maiuro G, Siracusano A, Ortona E, Antinori A. 1991. *Pneumocystis carinii* stimulates in vitro production of tumor necrosis factor-alpha by human macrophages. *Med Microbiol Immunol.* 180: 15-20.
- Tamburrini E**, Mencarini P, Visconti E, Zolfo M, De Luca A, Siracusano A, Ortona E, Wakefield AE. 1996. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P.carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol.* 34: 1586-88.
- Tasaka S**, Tokuda H, Sakai F, Fujii T, Tateda K, Johkoh T, Ohmagari N, Ohta H, Araoka H, Kikuchi Y, Yasui M, Inuzuka K, Goto H. 2010. Comparison of clinical and radiological features of *Pneumocystis* pneumonia between malignancy cases and acquired immunodeficiency syndrome cases: a multicenter study. *Inter Med.* 49: 273-81.
- Taylor S**, Meshnick SR, Worodria W, Andama A, Davis JL, Cattamanchi A, den Boon S, Yoo S, Goodman C, Huang L. 2011. Low prevalence of *Pneumocystis jirovecii* lung colonization in Ugandan HIV-infected patients hospitalized with non-*Pneumocystis* pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 72: 139-43.
- Taylor SM**, Meshnick SR, Worodria W, Andama A, Cattamanchi A, Davis JL, Yoo SD, Byanyima P, Kaswabuli S, Goodman CD, Huang L. 2012. Low prevalence of *Pneumocystis* pneumonia (PCP) but high prevalence of *Pneumocystis* dihydropteroate synthase (dhps) gene mutations in HIV-infected persons in Uganda. *PLoS One.* 7: 49991.
- Telzac E**, Armstrong D. 1994. Extrapulmonary Infection and other Unusual Manifestations of *Pneumocystis carinii*. Walzer PD, Ed."*Pneumocystis carinii* Pneumonia", 2nd edn. New York:M. Dekker, Inc. 361-378.
- Thomas CF Jr**, Kottom TJ, Leof EB, Limper AH. 1998. Characterization of a mitogenactivated protein kinase from *Pneumocystis carinii*. *Am J Physiol.* 275: 193-99.
- Thomas CF Jr**, Limper AH. 2007. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis* pneumonia. *Nat Rev Microbiol.* 5: 298-308.
- Thomas CF**, Limper AH. 2004. Review article Medical progress *Pneumocystis* Pneumonia. *N Engl J Med.* 350: 2487-98.
- Thullen TD**, Ashbaugh AD, Daly KR, Linke MJ, Steele PE, Walzer PD. 2003. New rat model of *Pneumocystis* pneumonia induced by anti-CD41 T-lymphocyte antibodies. *Infect Immun.* 71: 6292-97.
- Tokuda H**, Sakai F, Yamada H, Johkoh T, Imamura A, Dohi M, Hirakata M, Yamada T, Kamatani N, Kikuchi Y, Sugii S, Takeuchi T, Tateda K, Goto H. 2008. Clinical and radiological features of *Pneumocystis* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis, in comparison with methotrexate pneumonitis and *Pneumocystis* pneumonia in acquired immunodeficiency syndrome : a multicenter study. *Inter Med.* 47: 915-23.

- Tollerud DJ**, Wesseler TA, Kim CK, Baughman RP. 1989. Use of a rapid differential stain for identifying *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage fluid. Diagnostic efficacy in patients with AIDS. *Chest*. 95: 494-97.
- Totet A**, Duwat H, Magois E, Jounieaux V, Roux P, Raccurt C, Nevez G. 2004. Similar genotypes of *Pneumocystis jirovecii* in different forms of *Pneumocystis* infection. *Microbiology*. 150: 1173-78.
- Totet A**, Latouche S, Lacube P, Bolognini J, Raccurt C, Nevez G, Roux P. 2001. Typing of *Pneumocystis carinii* f.sp. hominis isolates from nasopharyngeal aspirates of 213 immunocompetent infants with bronchiolitis by dihydropteroate synthase gene analysis. *J Eukaryot Microbiol*. 121.
- Totet A**, Respaldiza N, Pautard JC, Raccurt C, Nevez G. 2003. *Pneumocystis jirovecii* genotypes and primary infection. *Clin Infect Dis*. 36: 1340-42.
- Tsolaki AG**, Beckers P, Wakefield AE. 1998. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis: high genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol*. 36: 90-93.
- Tsolaki AG**, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. 1996. Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the ribosomal RNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *J Infect Dis*. 174:141-56.
- Tsolaki AG**, Miller RF, Wakefield AE. 1999. Oropharyngeal samples for genotyping and monitoring response to treatment in AIDS patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Med Microbiol*. 48: 897-905.
- Van der Meer G**, Brug SL. 1942. Infection à *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. *Ann Soc Belg Med Trop*. 22: 301-07.
- Van Hal SJ**, Gilgado F, Doyle T, Barratt J, Stark D, Meyer W, Harkness J. 2009. Clinical significance and phylogenetic relationship of novel Australian *Pneumocystis jirovecii* genotypes. *J Clin Microbiol*. 47: 1818-23.
- Van Oosterhout JJ**, Laufer MK, Perez MA, Graham SM, Chimbiya N, Thesing PC, Alvarez-Martinez MJ, Wilson PE, Chagomerana M, Zijlstra EE, Taylor TE, Plowe CV, Meshnick SR. 2007. *Pneumocystis* pneumonia in HIV-positive adults, Malawi. *Emerg infect dis*. 13: 325-38.
- Vanêk J**, Jirovec O, Lukes J. 1953. Interstitial plasma cell pneumonia in infants. *Ann Pediatr*. 180: 1-21.
- Vanhems P**, Hirschel B, Morabia A. 1992. Seasonal incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet*. 339:1182.
- Varela JM**, Regordan C, Medrano FJ, Respaldiza N, de La Horra C, Montes-Cano MA & Calderon EJ. 2004. Climatic factors and *Pneumocystis jirovecii* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect*. 10:770-72.
- Vargas S**, Pizarro P, Vieyra ML, Aviles P, Bustamante R, Ponce C. 2010. *Pneumocystis* Colonization in Older Adults and Diagnostic Yield of Single versus Paired Noninvasive Respiratory Sampling. *Clin Infect Dis*. 5: 19-21.
- Vargas SL**, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, Cumsille F, Gigliotti F. 2001. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis*. 32: 855-61.
- Vargas SL**, Hughes WT, Wakefield AE, Oz HS. 1995. Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. *J Infect Dis*. 172: 506-10.
- Vargas SL**, Ponce CA, Gálvez P, Ibarra C, Haas EA, Chadwick AE, Krous HF. 2007. *Pneumocystis* is not a direct cause of sudden infant death syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 26: 81-3.

- Vargas SL**, Ponce CA, Gigliotti F, Ulloa AV, Prieto S, Munoz MP, et al. 2000. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol.* 38: 1536-38.
- Vargas SL**, Ponce CA, Hughes WT, Wakefield AE, Weitz JC, Donoso S, Ulloa AV, Madrid P, Gould S, Latorre JJ, Avila R, Benveniste S, Gallo M, Belletti J, Lopez R. 1999. Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. *Clin Infect Dis.* 29:1489-93.
- Vargas SL**, Ponce CA, Luchsinger V, Silva C, Gallo M, Lopez R, Belletti J, Velozo L, Avila R, Palomino MA, Benveniste S, Avendano LF. 2005. Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis and viruses in presumably immunocompetent infants who died in the hospital or in the community. *J Infect Dis.* 191: 122-26.
- Vargas SL**, Ponce CA, Sanchez CA, Ulloa AV, Bustamante R, Juarez G. 2003. Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis.* 9:605-6.
- Vassallo R**, Kottom TJ, Standing JE, Limper AH. 2001. Vitronectin and fibronectin function as glucan binding proteins augmenting macrophage responses to *Pneumocystis carinii*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25: 203-11.
- Vassallo R**, Standing J, Limper AH. 1999. Beta-glucan from *Pneumocystis carinii* stimulates TNF alpha release from alveolar macrophages. *J Eukaryot Microbiol.* 46: 145.
- Vavra J**, Kucera K. 1970. *Pneumocystis carinii* delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J Protozool.* 17: 463-83.
- Veldhuizen R**, Possmayer F. 2004. Phospholipid metabolism in lung surfactant. *Subcell Biochem.* 37: 359-88.
- Vidal S**, de la Horra C, Martín J, Montes-Cano MA, Rodríguez E, Respaldiza N, Rodríguez F, Varela JM, Medrano FJ, Calderón EJ. 2006. *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microbiol Infect.* 12: 231-35.
- Vierbuchen M**, Ortmann M, Uhlenbruck G. 1990. Endogenous carbohydrate-binding proteins in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun.* 58: 3143-46.
- Vives MF**, Caspar-Bauguil S, Aliouat EM, Escamilla R, Perret B, Dei-Cas E, Prévost MC. 2008. Hypobaric hypoxia-related impairment of pulmonary surfactant proteins A and D did not favour *Pneumocystis carinii* Frenkel 1999 growth in non-immunocompromised rats. *Parasite.* 15: 53-64.
- Vogel P**, Miller CJ, Lowenstine LL, Lackner AA. 1993. Evidence of horizontal transmission of *Pneumocystis carinii* pneumonia in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Infect Dis.* 168: 836-43.
- Vohra PK**, Park JG, Sanyal B, Thomas CF Jr. 2004. Expression analysis of PCSTE3, a putative pheromone receptor from the lung pathogenic fungus *Pneumocystis carinii*. *Biochem Biophys Res Commun.* 319: 193-99.
- Vohra PK**, Puri V, Kottom TJ, Limper AH, Thomas CF Jr. 2003a. *Pneumocystis carinii* STE11, an HMG-box protein, is phosphorylated by the mitogen activated protein kinase PCM. *Gene.* 312: 173-79.
- Vohra PK**, Puri V, Thomas CF Jr. 2003. Complementation and characterization of the *Pneumocystis carinii* MAPK, PCM. *FEBS Lett.* 551:139-46.
- Volpe G**, Sbaiz L, Avanzini C, Caramello P, Savoia D. 2001. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* isolated from human immunodeficiency virus-positive patients in Turin, Italy. *J Clin Microbiol.* 39: 2995-98.
- Vossen ME**, Beckers PJ, Meuwissen JH, Stadhouders AM. 1978. Developmental biology of *Pneumocystis carinii*, and alternative view on the life cycle of the parasite. *Z Parasitenkd.* 55: 101-18.

- Wadhwa PD**, Morrison VA. 2006. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 33: 240-49.
- Wakefield AE**, Lindley AR, Ambrose HE, Denis CM, Miller RF. 2003. Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus–infected patients. *J Infect Dis.* 187: 901–08.
- Wakefield AE**, Miller RF, Guiver LA, Hopkin JM. 1993. Oropharyngeal samples for detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification. *Q J Med.* 86: 401-06.
- Wakefield AE**, Stewart TJ, Moxon ER, Marsh K, Hopkin JM. 1990a. Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 84: 800–02.
- Wakefield AE**. 1996. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii f. sp. carinii* and *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol.* 34: 1754-59.
- Wakefield AE**. 1998. Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 22: 59-65.
- Wakefield AE**, Pixley JF, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, Hopkin JM. 1990. Detection of *P. carinii* with DNA amplification. *Lancet.* 336: 451-53.
- Walzer PD**, Evans HE, Copas AJ, Edwards SG, Grant AD, Miller RF. 2008. Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985–2006. *Clin Infect Dis* 46: 625-33.
- Walzer PD**, Perl DP, Krogstad DJ, Rawson PG, Schultz MG. 1974. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic, and clinical features. *Ann Intern Med.* 80: 83-93.
- Walzer PD**, Powell RD Jr, Yoneda K. 1979. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in different strains of cortisonized mice. *Infect Immun.* 24: 939-47.
- Walzer PD**, Rutledge ME, Yoneda K. 1983. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in C3H/HeJ and C3HeB/FeJ mice. *J Reticuloendothel Soc.* 33:1-9.
- Walzer PD**, Rutledge ME. 1981. Humoral immunity in experimental *Pneumocystis carinii* infection. Serum and bronchial lavage fluid antibody responses in rats. *J Lab Clin Med.* 97: 820-33.
- Walzer PD**, Rutledge ME. 1982. Serum antibody responses to *Pneumocystis carinii* among different strains of normal and athymic mice. *Infect Immun.* 35: 620-26.
- Walzer PD**, Schnelle V, Armstrong D, Rosen PP. 1977. Nude mouse: a new experimental model for *Pneumocystis carinii* infection. *Science.* 197: 177-79.
- Walzer PD**. 1994. *Pneumocystis carinii* pneumonia, 2nd ed. New York : Marcel Dekker.
- Wang J**, Gigliotti F, Bhagwat SP, Maggirwar SB, Wright TW. 2007. *Pneumocystis* stimulates MCP-1 production by alveolar epithelial cells through a JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292: 1495-505.
- Wang J**, Gigliotti F, Maggirwar S, Johnston C, Finkelstein JN, Wright TW. 2005. *Pneumocystis carinii* activates the NF-kappaB signaling pathway in alveolar epithelial cells. *Infect Immun.* 73: 2766-77.
- Weller R**. 1955. Zur Erzeugung von Pneumocystosen im Tierversuch. *Z Kinderheilkd.* 76: 366-78.
- Weller R**. 1956. Weitere Untersuchungen über experimentelle Ratten pneumocystose in Hinblick, auf die interstitielle Pneumonie der FrÜngeborenen. *Z. Kinderheilkd.* 78: 166.
- Wiley JA**, Harmsen AG. 1995. CD40 ligand is required for resolution of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J Immunol.* 155: 3525-29.
- Wisniewski P**, Martin WJ 2nd. 1995. Interaction of vitronectin with *Pneumocystis carinii*: evidence for binding via the heparin binding domain. *J Lab Clin Med.* 125: 38-45.

- Wissmann G**, Morilla R, Martín-Garrido I, Friaiza V, Respaldiza N, Povedano J, Praena-Fernández JM, Montes-Cano MA, Medrano FJ, Goldani LZ, de la Horra C, Varela JM, Calderón EJ. 2011. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients treated with infliximab. *Eur J Clin Invest*. 41: 343-48.
- Wissmann G**, Varela JM, Calderon EJ. 2008. Prevention of *Pneumocystis* pneumonia in patients with inflammatory bowel disease based on the detection of *Pneumocystis* colonization. *Inflamm Bowel Dis*. 14: 1751- 52.
- Wolfensohn Sarah et Lloyd Maggie**. 1994. Handbook of laboratory animal management and welfare, Oxford University Press, ISBN: 0198548338.
- Wright T**, Pryhuber G, Chess P, Wang Z, Notter R, Gigliotti F. 2004. TNF receptor signaling contributes to chemokine secretion, inflammation, and respiratory deficits during *Pneumocystis* pneumonia. *J Immunol*. 172: 2511-21.
- Wright TW**, Bissoondial TY, Haidaris CG, Gigliotti F, Haidaris PJ. 1995. Isoform diversity and tandem duplication of the glycoprotein A gene in ferret *Pneumocystis carinii*. *DNA Res*. 2: 77-88.
- Wyder MA**, Rasch EM, Kaneshiro ES. 1994. Assessment of *Pneumocystis carinii* DNA content. *J Eukaryot Microbiol*. 41: 120.
- Wyder MA**, Rasch EM, Kaneshiro ES. 1998. Quantitation of absolute *Pneumocystis carinii* nuclear DNA content. Trophic and cystic forms isolated from infected rat lungs are haploid organisms. *J Euk Microbiol*. 45: 233-39.
- Xie XQ**, Li F, Ying SH, Feng MG. 2012. Additive contributions of two manganese-cored superoxide dismutases (MnSODs) to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. *PLoS ONE*. 7: 30298.
- Xie XQ**, Wang J, Huang BF, Ying SH, Feng MG. 2010. A new manganese superoxide dismutase identified from *Beauveria bassiana* enhances virulence and stress tolerance when overexpressed in the fungal pathogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 86: 1543-53.
- Yale SH**, Limper AH. 1996. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin Proc*. 71: 5-13.
- Yamada KM**. 1991. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In *Cell biology of extracellular matrix*. Edited by Hay E.D., Plenum Press, New York, 2nd edition. 111-39.
- Yamada M**, Matsumoto Y, Hamada S, Fujita S, Yoshida Y. 1986. Demonstration and determination of DNA in *Pneumocystis carinii* by fluorescence microscopy with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A*. 262: 240-46.
- Yong SJ**, Vuk-pavlovic Z, Standing JE, Crouch EC, Limper AH. 2003. Surfactant proteinD mediated aggregation of *Pneumocystis carinii* impairs phagocytosis by alveolar macrophages. *Infect Immun*. 71: 1662-71.
- Yoshida Y**. 1989. Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool*. 36: 53-60.
- Yoshikawa H**, Morioka H, Yoshida Y. 1987. Freeze-fracture localization of filipin-sterol complexes in plasma- and cyto-membranes of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool*. 34: 131-37.
- Young KR Jr**, Rankin JA, Naegel GP, Paul ES, Reynolds HY. 1985. Bronchoalveolar lavage cells and proteins in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. An immunologic analysis. *Ann Intern Med*. 103: 522-33.
- Ypma-Wong MF**, Sypherd PS. 1992. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun*. 60: 4140-45.
- Zhang C**, Wang SH, Liao CP, Lasbury ME, Durant PJ, Tschang D, Lee CH. 2006. Toll-like receptor 2 knockout reduces lung inflammation during *Pneumocystis* pneumonia but has no effect on phagocytosis of *Pneumocystis* organisms by alveolar macrophages. *J Eukaryot Microbiol*. 53:132-33.

Zimmerman PE, Voelker DR, McCormack FX, Paulsrud JR, Martin WIJ. 1992. 120 kDa surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* is a ligand for surfactant protein A. *J Clin Invest.* 89: 143-49.

Zolan ME. 1995. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol Rev.* 59: 686-98.

ANNEXES

ANNEXE 1

**Evaluation du portage de *Pneumocystis jirovecii* chez les enfants et adultes
atteints de pathologies respiratoires
« PNEULIB »**

Identification du Patient

N° d'inclusion

Date de l'inclusion

Nom : (première lettre)

Prénom : (première lettre)

Sexe : Masculin Féminin

Responsable :

Pr. Monzer HAMZE

Tel :

Fax :

Mail :

Contact :

Sara KHALIFE

Tel :

Fax :

Mail :

CRITERES D'INCLUSION :

- Homme ou femme, enfant âgé de plus d'1 mois : **Oui** **Non**
- Patient vu en consultation ou hospitalisé, présentant une infection respiratoire communautaire ou une affection respiratoire (asthme, allergie, bronchite) : **Oui** **Non**

Si une de ces cases est cochée « Non », le patient ne pourra pas être inclus dans l'étude.

Merci de préciser : **Consultation** **Hospitalisation**
 Infection respiratoire **Suivi de pathologie respiratoire**
Avec exacerbation : **Oui** **Non**

CRITERES D'EXCLUSION:

- Patient hospitalisé depuis plus de 48h ou présentant une infection respiratoire d'origine nosocomiale : **Oui** **Non**
- Patient ayant reçu un traitement anti-*Pneumocystis* (par exemple par sulfaméthoxazole et/ou triméthoprime, atovaquone, pentamidine) dans les 6 mois précédant la date d'inclusion : **Oui** **Non**

Si une de ces cases est cochée « Oui », le patient ne pourra pas être inclus dans l'étude.

I. DONNEES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES DU PATIENT

1. Age

Age : ans OU mois

2. Cadre de vie :

Membres de l'entourage proche (vivant sous le même toit à temps partiel ou temps plein) :

- Nombre total :
- Enfants : <6 mois: 6 mois à 2 ans: 2 à 5 ans:
5 à 10 ans: 10 à 15 ans:

Y a t il dans votre entourage proche :

- des membres qui exercent une activité professionnelle médicale, paramédicale ou en lien avec le milieu hospitalier ?

Non Oui : Si oui, Préciser :

- des membres qui ont une affection avec déficit de l'immunité (cf II.3)

Non Oui : Si oui, Préciser :

- des membres qui ont une pathologie respiratoire chronique (cf II.3)

Non Oui : Si oui, Préciser :

- des femmes enceintes ?

Non Oui : Si oui, Préciser: Le nombre total :

Le nombre de femmes au 3^{ème} trimestre :

II.DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES ET CLINIQUES

1. Taille Cm

2. poids Kg

3. Pathologie sous-jacente

Affection avec déficit de l'immunité

VIH : Date de diagnostic

Maladie hématologique, Préciser :

Date de diagnostic :

Greffe de cellules souches (allogénique) Autogreffe

Immunodéficit congénital, Préciser :

Date de diagnostic :

Transplantation d'organe, Préciser : Rein Poumon Coeur Foie

Date :

Maladie auto-immune, Préciser :

Date de diagnostic :

Pathologie respiratoire

Asthme Date de diagnostic

Mucoviscidose Date de diagnostic

BPCO, stade : Date de diagnostic

Bronchite Date de diagnostic

Bronchiolite Date de diagnostic

Grippe saisonnière Date de diagnostic

Maladie pulmonaire interstitielle (fibrose pulmonaire idiopathique, pneumopathie organisée cryptogénique, hémorragie alvéolaire diffuse,...)

Date de diagnostic

Cancer pulmonaire Date de diagnostic

Tuberculose Date de diagnostic

Autres pathologies (diabète, maladies cardio-vasculaires,...) :

4. Traitements en cours ou dans les 30 jours précédents

Corticoïdes ≥ 20 mg/j équivalent prednisolone

Corticoïdes < 20 mg/j équivalent prednisolone

Chimiothérapie anticancéreuse, Préciser :

Anticorps anti-Lymphocytaires

Anti-TNF α : Infliximab Etanercept Adalimumab Autre

Autres biothérapies, Préciser :

Autres immunomodulateurs : Préciser :

Antibiotiques : Préciser :

Antifongiques : Préciser :

5. Grossesse en cours

Non Oui : Si oui, Préciser le trimestre : 1^{er} 2^{ème} 3^{ème}

6. Tabagisme

> Fumeur actif

Age de début : ans

Consommation actuelle : cigarette(s) / jour

> Ex-fumeur

Age de début : ans

Age de fin :

> Le patient est-il exposé au tabagisme passif : Non Oui

III. RECUEIL DES DONNEES DES BILANS CLINIQUE ET BIOLOGIQUE A L'INCLUSION

1. Symptômes respiratoires

- Toux Dyspnée Douleur thoracique Expectations Hémoptysie
 Polypnée Bradypnée Encombrement bronchique Apnée du sommeil
 Autre, Préciser :

2. Présence d'une gêne nasale

Non

- Oui Si **oui**,
- | | | |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Nez bouché | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui |
| Ecoulement postérieur | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui |
| Ecoulement antérieur | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui |
| Sinusite | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui |

3. Fièvre

Non

Oui, Préciser : , °C

4. Epreuves fonctionnelles respiratoires (pathologies respiratoires chroniques)

VEMS : , litre(s)
CVF : , litre(s)

5. Résultats des examens hématologiques

Nombre de Lymphocytes / mm³

Nombre de CD4 / mm³

Nombre de CD8 / mm³

6. Résultats des examens microbiologiques

Données microbiologiques des expectorations réalisées

Bactériologie : Négatif Positif, Préciser :

Mycologie : Négatif Positif, Préciser :

Virologie : Négatif Positif, Préciser :

Autres données microbiologiques disponibles :

Liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) :

Hémoculture :

Aspiration naso-pharyngée :

Autre, Préciser :

Synthèse et interprétation des données microbiologiques :

Infection à :

Colonisation par :

IV. RESULTATS DES ANALYSES REALISEES DANS LE CADRE DE L'ETUDE

1. Portage de *Pneumocystis jirovecii*

Prélèvement(s) effectué(s) : LROP Aspiration naso-pharyngée

Lavage nasal Ecouvillon naso-pharyngé

Détection de *P. jirovecii* par qPCR en temps réel

LROP

Négative Positive : Quantité détectée copies/μL

Aspiration naso-pharyngée

Négative Positive : Quantité détectée copies/μL

Lavage nasal

Négative Positive : Quantité détectée copies/μL

Ecouvillon naso-pharyngé

Négative Positive : Quantité détectée copies/μL

2. Détection d'anticorps anti-*Pneumocystis jirovecii* par IFI

Résultat : Négatif Positif : /

**ARTICLES PUBLIÉS OU EN COURS
DE PUBLICATION**

Medical Mycology Advance Access published June 25, 2014



Medical Mycology, 2014, 00, 1–6
doi: 10.1093/mmy/myu032
Advance Access Publication Date: 0 2014
Original Article



Original Article

An improved single-round PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Pneumocystis* spp.

Magali Chabé^{1,2,3,4,*}, Sara Khalife^{1,2,3,4,5}, Nausicaa Gantois^{1,2,3,4},
Gaël Even^{6,7} and Christophe Audebert^{6,7}

¹INSERM U1019, Lille, France, ²CNRS UMR 8204, Lille, France, ³Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France, ⁴Biology & Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens (BDEEP) Laboratory, Université Lille-Nord-de-France, Lille, France, ⁵Health and Environment Microbiology Laboratory, Azm Center for Research in Biotechnology and Its Applications, Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Tripoli, Lebanon, ⁶GENES DIFFUSION, Douai, France and ⁷PEGASE-Biosciences, Lille, France

*To whom correspondence should be addressed. Magali Chabé, Biology & Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens (BDEEP) Laboratory, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel : 33 3 20 87 71 56; Fax: 33 3 20 96 90 09; E-mail: magali.chabe@univ-lille2.fr

Received 24 January 2014; Revised 3 April 2014; Accepted 21 April 2014

Title

An improved single-round PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Pneumocystis* spp

Short title

Improved PCR protocol for *Pneumocystis* detection

Authors

Magali Chabé^{1,2,3,4}, Sara Khalife^{1,2,3,4,5}, Nausicaa Gantois^{1,2,3,4}, Gaël Even^{6,7}, Christophe Audebert^{6,7}

Authors' affiliations

1 INSERM U1019, Lille, France, **2** CNRS UMR 8204, Lille, France, **3** Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France, **4** Biology & Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens (BDEEP) Laboratory-EA4547, Université Lille-Nord-de-France, Lille, France, **5** Health and Environment Microbiology Laboratory, Azm Center for Research in Biotechnology and Its Applications, Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Tripoli, Lebanon, **6** GENES DIFFUSION, Douai, France, **7** PEGASE-Biosciences, Lille, France.

Corresponding author

Magali Chabé, Biology & Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens (BDEEP) Laboratory, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Pr. Calmette, BP245, 59019 Lille, France; Telephone number: 33 3 20 87 71 56; FAX number: 33 3 20 96 90 09; e-mail: magali.chabe@univ-lille2.fr

Keywords: *Pneumocystis* spp, mtLSUrRNA, single-round PCR, PneumoDB

Abstract

In order to standardize a PCR-based method of *Pneumocystis* detection, we report on the development of an improved PCR targeting the *Pneumocystis* mtLSUrRNA gene. Design of a new primer pair and PCR program with suitable parameters and optimization resulted in a simpler and faster single-round amplification assay. Sensitivity of the novel *Pneumocystis*-genus specific PCR proved non-inferior to that of the reference nested PCR. The improvement this new PCR assay offers in the detection and epidemiological studies of *Pneumocystis* spp infection in research laboratories is discussed.

Introduction

PCR-based approaches, combining high sensitivity and specificity, are a method of choice for diagnosis of *Pneumocystis* infection and epidemiological studies of this fungus which cannot be cultured continuously outside the mammalian lung.

Because of the unavailability of full-scale annotation of *Pneumocystis* genomes and scarcity of diverse *Pneumocystis* spp gene sequences in databases, the generally accepted method to detect *Pneumocystis* DNA in mammalian respiratory samples remains amplification of part of the gene coding for *Pneumocystis* mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mtLSUrRNA), of which the *Pneumocystis* spp specific primers (pAZ102-H and pAZ102-E) were first described in 1990 by Wakefield *et al.* [1]. The consistent genetic diversity detected between mtLSUrDNAs of *Pneumocystis* isolated from different mammals and correlated with the host species, also initiated the use of this target as a genotyping and phylogenetic tool in epidemiological studies of *Pneumocystis* infection [2]. The mtLSUrRNA target is of great interest in terms of PCR sensitivity as multiple copies of the mitochondrial genome of *Pneumocystis* are present in one organism [3]. It explains that, despite the evaluation of other gene targets and PCR methods, this mtLSUrRNA PCR has easily spread across worldwide clinical or research laboratories studying *Pneumocystis* infection in various mammals.

However, mtLSUrRNA PCR methods are not currently standardized across laboratories in terms of reaction conditions. They can be time-consuming and sometimes exhibit a poor sensitivity.

For example, nested PCR protocols are often used to detect very low parasite burdens encountered in human non-invasive samples like oropharyngeal washings or in lung samples from *Pneumocystis*-colonized wild mammals. However, nested PCR is time-consuming, open to

considerable risk of contamination and final Taq error frequency, and has low cost-efficiency. For all these reasons, single-round PCR is preferable to nested PCR in clinical or research routine laboratories.

Also of particular importance when optimizing a PCR protocol is the melting temperature (T_m) of primers. Unfortunately, we found that the two famous primers pAZ102-H and pAZ102-E have a T_m difference greater than 5 °C (*i.e.* respectively 48.68 °C and 54.01 °C, calculated with nearest-neighbor method [4]). Moreover, thanks to the recently fully sequenced *Pneumocystis* mitochondrial genomes [5,6], we highlighted a mismatch between primer pAZ102-H and the *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) mtLSUrRNA sequences (Fig.1A). Six mismatches were also encountered between the internal primer pAZ102-Y (initially designed to amplify *P. jirovecii* by nested PCR [11]) and *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) and *Pneumocystis murina* (*P. murina*) mtLSUrDNA sequences (Fig.1B). This could affect both the stability of the primer-template duplex and the efficiency with which the polymerase extends the primer, thus potentially leading to biased results or even PCR failure when using this primer to amplify *Pneumocystis* DNA from rodents. These mismatches could also have a substantial negative impact upon the exploitation of *Pneumocystis* mtLSUrDNA sequences for genotyping or phylogenetic studies. Thus, the aim of the present study was to develop an improved single-round, rapid, highly sensitive and *Pneumocystis*-genus specific PCR targeting mtLSUrRNA, for use in research laboratories, equipped or not with a real-time PCR thermal cycler.

Materials and Methods

Design of primers and PCR parameters

Primers were developed using multiple sequence alignments [7] of *Pneumocystis* mtLSUrRNA sequences available in databases and recovered from a wide range of mammal host species. New primer pairs in conserved regions of the gene were designed after assessing different parameters (e.g. T_m close to 60 °C, close T_m for the two primers, CG %, potential for hairpins, homo- or hetero-dimers, quality and linguistic complexity) with FastPCR v.6.0 [8] and Oligocalc [9]. PCR primer specificity was checked by a BLAST search at the NCBI against the nr database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). To check the target specificity of the novel primer pair, Primer-BLAST [10] was also performed using default specificity parameters against the entire NCBI nr database or against the NCBI nr database with organisms limited to other lung pathogens such as *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Scedosporium* spp, *Rhizopus oryzae* and *Coccidioides* spp.

Furthermore, the new primer pair was evaluated by SYBR[®] Green qPCR assay performed on a qPCR platform Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Australia). Reactions were achieved in a final volume of 15 µl containing 2 µl of the appropriate template (serial dilutions of plasmid in 25 ng of rat DNA), 1 X Brilliant II SYBR[®] Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies) and 500 nM of each of the primers. The optimal thermal cycling conditions were as follows: 10 min at 95 °C followed by 50 amplification cycles of 10 sec at 95 °C, 15 sec at 59 °C (data acquisition at the end of annealing step) and 24 sec at 72 °C.

To determine the optimal PCR conditions, a *P. carinii* mtLSUrRNA PCR product (obtained with primers pAZ102-H and pAZ102-E) was cloned into the pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vector with TOPO[®] TA Cloning[®] kit (Invitrogen, France) and ten-fold dilution series of the plasmid DNA were tested.

PCR sensitivity and limit of detection

The sensitivity and limit of detection (LOD) of our new PCR were assessed after analyzing ten-fold serial dilutions of *P. carinii* mtLSUrDNA plasmids (2.10^6 - 2.10^{-1} -copy number/reaction). In order to estimate the LOD concentration of target in a background matrix of DNA representative of the DNA that will be isolated from the lung samples being examined, one microliter of DNA extracted from a *Pneumocystis*-free Lou nu/nu rats lung (25 ng/ μ l) (Institut Pasteur de Lille, France) was added to each plasmid dilution in the reaction mixtures. DNA amplification was carried out using a PTC 200 thermocycler equipped with a heated lid (MJ Research, Foster City, CA, USA). PCR products were analyzed by electrophoresis in a 2 % agarose gel and visualized after ethidium-bromide staining. Then, PCR products were sequenced in both directions using a model ABI 377 automated sequencer with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. To better delineate the limit of detection of our new PCR, plasmid dilutions of 2.10^1 , 2.10^0 - and 2.10^{-1} -copy number/reaction were each tested in 10 replicates.

For comparison, the plasmid dilutions were tested following our in-house first-round (with primers pAZ102-H and pAZ102-E) and nested (with primers pAZ102-X and pAZ102-Y) PCRs following these conditions: 50 μ l reaction mixture containing 20 μ l of template DNA, 1 X Buffer (Diamond Taq[®] polymerase, Eurogentec, France), 3 mM MgCl₂, 400 μ M (each) dNTP, 1 μ M (each) oligonucleotide primer, and 1U of Diamond Taq[®] polymerase (Eurogentec, France). Conditions for amplification in first-round PCR were 10 cycles comprising 1.5 min at 94 °C, 1.5 min at 65 to 55 °C, 1 °C decrease per cycle and 2 min at 72 °C; followed by 30 cycles comprising 1.5 min at 94 °C, 1.5 min at 55 °C and 2 min at 72 °C [12]. Nested PCR was then performed as

described elsewhere [13]. Serial dilutions of plasmid were tested in duplicate by the novel and our in-house first-round and nested PCRs.

PCR specificity

The new PCR, followed by a direct sequencing of PCR products, was tested on DNA extracted from laboratory rats and mice lungs (*i.e. Rattus norvegicus* and *Mus musculus* from Pasteur Institute of Lille, France) infected respectively by *P. carinii* and *P. murina* [14]; and from lungs of wild rodents obtained in the framework of CERoPath ANR 07 BDIV 012 project, and infected by *P. carinii*, *Pneumocystis wakefieldiae* (*P. wakefieldiae*) and other *Pneumocystis* species.

Clinical samples were also screened for the presence of *P. jirovecii* by the new PCR assay and our in-house nested PCR protocols, followed by a direct sequencing of PCR products. The patient material used in this study had been collected between November 2012 and March 2013 at the Parasitology–Mycology Service of Lille-II University Hospital Center, Lille, France. It consisted of three oropharyngeal washings (OW) and two bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from three patients, previously tested positive for *P. jirovecii* by a real-time PCR assay described in [15] without performing the first-round PCR step. To note, direct microscopic examination of one of the two BALF samples was positive for *Aspergillus fumigatus*. We also tested the new PCR on 10 clinical samples known to be negative by real-time PCR and nested PCR assays.

To further test the specificity of the novel PCR, five different fungal DNA samples (*Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium prolificans*, *Rhizopus oryzae*, *Candida albicans* and *Absidia corymbifera*) were pooled and tested alone or together with *P. carinii* mtLSUrDNA plasmids in the novel and our in-house PCRs.

Exhaustive measures were applied for all PCR assays to ensure that carryover contamination did not occur. These included the use of (i) separate biosafety containment hoods and rooms for preparing specimens, setting up PCRs, and analyzing products; (ii) micropipettes with barrier tips; and (iii) several negative controls interspersed with specimens.

Results

The new primer pair

After analysis of various quality parameters of newly designed primer pairs, an optimal one has been chosen, and its *Pneumocystis* specificity was verified by a BLAST search at the NCBI against the nr database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). In order to amplify the longest fragment of the target, the best compromise we have found was to conserve the reverse primer pAZ102-E from Wakefield *et al.* and design a new forward primer, that we named pH207 (5'-ACAAATCGGACTAGGATATAGCTGGT-3').

When Primer-BLAST was used to check the target specificity of the new primer pair with the default specificity parameters, the primer pair showed perfect match to numerous *Pneumocystis* spp mtLSUrRNA sequences that would generate amplicons between 301- and 334-bp according to the *Pneumocystis* species amplified. Indeed, the new primers match perfectly mtLSUrRNA sequences from a lot of *Pneumocystis* species or isolates like: *Pneumocystis* sp. from *Microtus agrestis* (GenBank AY279099), *Sorex araneus* (GenBank AY279101, AY279102 and AY279103), *Apodemus sylvaticus* (GenBank AY279097), *Eliomys quercinus* (GenBank AY279098), *Talpa europae* (GenBank AY279100), *Capra hircus* (GenBank AB602435), *Microcoebus murinus* (GenBank AY265388), *Cercopithecus lhoesti* (GenBank

AY265382), *Macaca nemestrina* (GenBank AY265383), *Saguinus fuscicollis* (GenBank AF362462), *Callimico goeldii* (GenBank AF362461), *Callithrix geoffroyi* (GenBank AF362456), *Saguinus midas midas* (GenBank AF362455), *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* form 3 (GenBank U20171) and *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* form 4 (GenBank U20172), numerous *P. jirovecii* sequences, numerous *Macaca fascicularis* and rhesus macaques *Pneumocystis*-derived sequences, *P. wakefieldiae* (GenBank U20173), *P. murina* mitochondrial genome (GenBank NC_020332), *P. carinii* mitochondrial genomes (Genbank NC_013660 and JX499145) and *P. jirovecii* mitochondrial genomes (GenBank NC_020331, JX855938, JX855937, JX855936 and CAKN01000002).

When Primer-BLAST was performed against the NCBI nr database with organisms limited to other lung pathogens (see Materials and Methods section), no target templates were found, except for a 356-bp amplicon corresponding to a portion of the mitochondrial genome of *Rhizopus oryzae* (Genbank AY863212). However, there are up to five mismatches between primer pH207 and this target, which was, in our opinion, probably sufficient to prevent amplification interference or non-specific amplification.

The qPCR assays performed to test the new primer pair displayed PCR efficiency complying with the acceptance limits, with a limit of detection of two to five copies of mtLSUrRNA gene. Melting curve analysis revealed the specific amplicon melts at $78\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PCR conditions

After optimization of concentration of MgCl_2 , the new end-point PCR conditions considered optimal were as follows: 2 μl of template DNA, 1 X PCR buffer (HotStarTaq Plus DNA

Polymerase, Qiagen, France), a final MgCl₂ concentration of 3.5 mM, 0.4 μM of each primer, 250 μM of each dNTP, 2.5 U HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, France) and molecular grade H₂O to give a final volume of 50 μl. Annealing temperatures between 55 and 60 °C were tested and optimal cycle parameters were as follows: a first activation step 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles of denaturation at 94 °C for 15 sec, annealing at 57 °C for 15 sec, extension at 72 °C for 25 sec.

To note, the comparison between PCR protocols showed a marked increase in quickness of the new PCR program. Indeed, the new PCR gave a result in less than two hours versus four for first-round PCR and eight for nested PCR.

PCR sensitivity and limit of detection of the novel PCR

By testing serial dilutions of *P. carinii* mtLSUrDNA plasmids in 25 μg of rat lung genomic DNA by the three PCR protocols, we first noted that the sensitivity of the novel PCR is not lower than the sensitivity of our in-house nested-PCR (Table 1). Better yet, the lowest concentrations of plasmid DNA that yielded PCR products using the new PCR were 2.10⁰ plasmid copies whereas our in-house single-round and nested PCRs detected 2.10² and 2.10¹ plasmid copies, respectively (Table 1; Fig.2). Moreover, the new PCR had more defined bands than the nested PCR (Fig.2).

The PCR results for the dilution series containing from 2.10¹ to 2.10⁻¹ plasmid copies of *P. carinii* mtLSUrDNA in replicates of 10 for each dilution, allowed us to determine the LOD of our novel PCR. It detected 2.10¹ plasmid copies with 100 % sensitivity (10/10) and 2.10⁰ plasmid copies

with 80 % sensitivity (8/10), but failed to detect 2.10^{-1} plasmid copies (0/10) (Table 1). All positive results were confirmed by direct sequencing of the PCR products.

Negativity of controls consisting of genomic DNA extracted from the lungs of non-infected rats and prepared along with the positive samples also confirmed the accuracy of the novel PCR (Table 1).

PCR specificity of the novel PCR

New PCR test on DNA extracted from laboratory or wild rodent lungs infected by *P. murina*, *P. carinii*, *P. wakefieldiae* or other *Pneumocystis* species was conclusive in all cases. DNA sequencing of the positive amplicons confirmed the results of the PCR analysis (data not shown). New primers could successfully generate a 310-bp PCR product for *P. carinii*, and a 318-bp PCR product for *P. wakefieldiae* and *P. murina*.

No amplification was obtained from the new PCR when DNA extracted from *Pneumocystis*-free laboratory mice and rats were used as templates.

To compare the clinical performances of the three PCR assays, three OWs and two BALF specimens collected from patients already known positive for *P. jirovecii* by a real-time PCR, were tested by the three methods. New primers produced PCR amplicons from *P. jirovecii* DNA of the expected size (*i.e.* 301-bp PCR product) for all five samples. Interestingly, our in-house first-round PCR with primers pAZ-102H and pAZ102-E was positive for the two BALF samples but failed to detect *P. jirovecii* DNA in two out of three OWs. Our in-house nested PCR was positive for all five samples. Direct sequencing of the positive PCR products confirmed the results by obtaining *P. jirovecii* mtLSUrDNA sequences, even in the BALF sample co-infected with

Aspergillus fumigatus. No amplification was obtained from the new PCR when it was tested on negative clinical samples.

To further address the question of specificity, we have spiked a *Pneumocystis*-free lung DNA sample with a pool of fungal DNAs (*Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium prolificans*, *Rhizopus oryzae*, *Candida albicans* and *Absidia corymbifera*). No amplicons of the expected size (i.e. 310-bp) were obtained from both previous and new PCRs. However, a product of approximately 360-bp was observed with the new PCR. Direct sequencing of this PCR product showed that this non-specific band corresponded to a portion of the mitochondrial genome of *Rhizopus oryzae* (Genbank accession AY863212), as unfortunately, we might guess from the results of Primer-BLAST analysis (see New primer pair paragraph from the Results section). But more interestingly, no cross-amplification was obtained from both previous and new PCRs when 2.10^5 *P. carinii* mtLSUrDNA plasmid copies were added to the spiked DNA templates, and direct sequencing of these PCR products confirmed the amplification of *P. carinii* mitochondrial DNA.

Conclusion

This study supports the utilization of a single-round conventional PCR instead of nested PCR for detection of *Pneumocystis* spp. By designing this new amplification assay, the cost-efficiency, turnaround time, contamination risk, and the possibility of sequencing and technical errors are considerably reduced compared with the nested PCR reference method.

This simple and rapid PCR assay, with the advantages of high sensitivity and *Pneumocystis*-genus specificity, brings the opportunity for improve and standardize *Pneumocystis* detection and mtLSUrRNA direct sequencing in all laboratories.

We propose the creation of a new open public resource that we term PneumoDB, which will centralize a comprehensive and curated collection of *Pneumocystis* mtLSUrRNA sequences, allowing *Pneumocystis* researchers instant access to a single unified resource (www.pegase-biosciences.com/collaborations/PneumoDB). This publicly accessible database will greatly enhance the use of mtLSUrRNA target sequences in epidemiological studies of *Pneumocystis* infection.

Acknowledgments

We dedicate this paper to the memory of Dr Eduardo Dei-Cas who hopefully would have appreciated this kind of paradigm shift in *Pneumocystis* molecular biology research.

We thank Dr Isabelle Durand-Joly for providing the DNA extracts from human BALF samples and Dr Laurence Delhaes for providing the pool of fungal DNA samples. This work was supported by ANR 07 BDIV 012 'CERoPath' and the French Ministry of Research (EA4547, Lille-Nord-de-France University and Lille Pasteur Institute).

Conflict of interest: None.

References

1. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, *et al.* Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990; **336**:451–453.
2. Chabé M, Aliouat-Denis CM, Delhaes L, *et al.* *Pneumocystis*: from a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. *FEMS Yeast Res* 2011; **11**:2-17.

3. Lu JJ, Chen CH, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol* 1995; **33**:2785–2788.
4. Breslauer KJ, Frank R, Blöcker H, Marky LA. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci* 1986; **83**:3746-3750.
5. Cissé OH, Pagni M, Hauser PM. *De novo* assembly of the *Pneumocystis jirovecii* genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. *MBio* 2012; **4**:e00428-12.
6. Ma L, Huang DW, Cuomo CA, *et al.* Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent *Pneumocystis*. *FASEB J* 2013; **27**:1962-1972.
7. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 2010; **27**:221-224.
8. Kalendar R, Lee D, Schulman AH. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes & Genomics* 2009; **3**:1-14.
9. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**:W43-W46.
10. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012; **13**:134.
11. Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol* 1996; **34**:1754-1759.

12. Durand-Joly I. Epidémiologie moléculaire de la pneumocystose humaine. Caractéristique génétique et phénotypique de *Pneumocystis jirovecii* et espèces proches. PhD thesis, University of Lille 2, France, 2002.
13. Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, et al. Immunocompetent Hosts as a Reservoir of *Pneumocystis* Organisms: Histological and RT-PCR Data Demonstrate Active Replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; **23**:89–97.
14. Dei-Cas E, Brun-Pascaud M, Bille-Hansen V, Allaert A, Aliouat EM. Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; **22**:163-168.
15. Hernández-Hernández F, Fréalle E, Caneiro P, et al. Prospective multicenter study of *Pneumocystis jirovecii* colonization among cystic fibrosis patients in France. *J Clin Microbiol* 2012; **50**:4107-4110.

Legends

Fig.1. Multiple DNA sequence alignments of portions of *Pneumocystis jirovecii* (Pj), *Pneumocystis murina* (Pm) and *Pneumocystis carinii* (Pc) mtLSUrDNA sequences with (A) primers pAZ102-H [1] and the new primer pH207, (B) primers pAZ102-E [1] and pAZ102-Y [11]. *Pneumocystis* sequences were recovered from the newly sequenced *Pneumocystis* mitochondrial genomes from which Genbank accession are given [5-6]. Identical nucleotides between primers and *Pneumocystis* sequences are denoted by dots.

Fig.2. Ethidium bromide fluorescence image showing electrophoresis of *Pneumocystis carinii* mtLSUrRNA PCR amplification products obtained by single-round new PCR (a) and by our previous in-house single-round (b) and nested PCR (c). Lanes 1, 9, 17, 25 and 30, molecular weight ladder. Lanes 2-8 (a), 10-fold serial dilutions of *P. carinii* mtLSUrRNA plasmid DNA (2.10^0 to 2.10^6 copies, respectively) in 25 ng of rat lung DNA amplified with new PCR protocol. Lanes 10-16 (b), 10-fold serial dilutions of *P. carinii* mtLSUrRNA plasmid DNA (2.10^0 to 2.10^6 copies, respectively) in 25 ng of rat DNA amplified with an in-house first-round PCR. Lanes 18-24 (c), mtLSUrRNA PCR products of in-house first-round PCR (corresponding to lanes 10-16) amplified with a previous in-house nested PCR. Lanes 26, 27, 28 and 29 (d): negative controls for single and nested PCRs.

Table 1. Sensitivities of PCR assays for detecting *Pneumocystis carinii* mtLSUrDNA plasmid copies in 25 μ g of rat lung DNA. Serial dilutions of plasmid were tested in duplicate by the newly developed single-round PCR and our in-house first-round and nested-PCRs.

^aPlasmid dilutions of 2.10^1 -, 2.10^0 - and 2.10^{-1} -copy number/reaction were tested in 10 replicates to better delineate the limit of detection of the novel PCR.

(A)

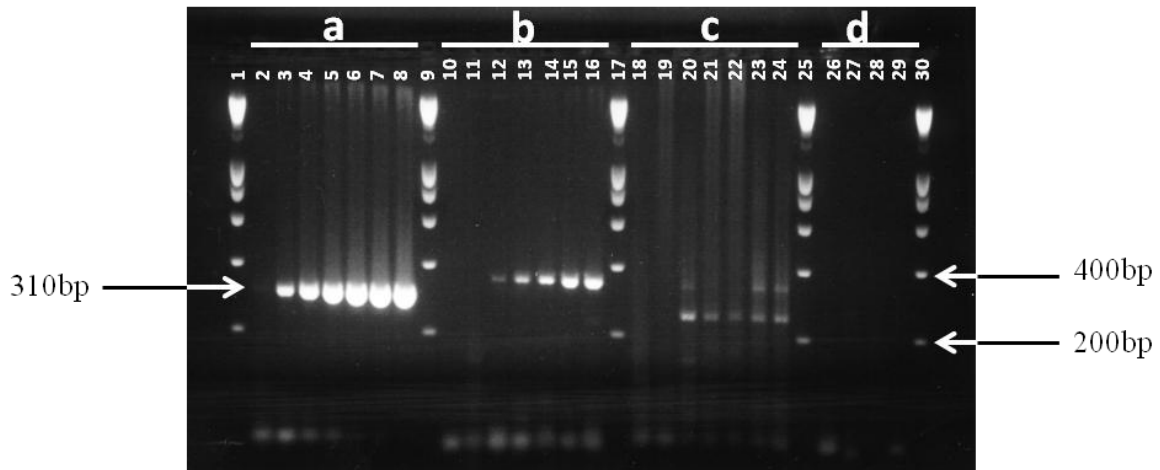
```

          10          20          30          40          50          60          70
pAZ102-H  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ..
          GTGTACGTTG CAAAGTACTC -----
Pj /NC_020331 .....C. .... AGAAGAATTG TGTAAGTAG TGAAT . . . . .
Pj /JX855936 .....C. .... AGAAGAATTG TGTAAGTAG TGAAT . . . . .
Pj /JX855937 .....C. .... AGAAGAATTG TGTAAGTAG TGAAT . . . . .
Pj /JX855938 .....C. .... AGAAGAATTG TGTAAGTAG TGAAT . . . . .
Pj /CAKN0100002 .....C. .... AGAAGAATTG TGTAAGTAG TGAAT . . . . .
Pm /NC_020332 .....G. .... GGATGAATTG TGTAAGTAG TGAAT . . . . .
Pc /C_NC_013660 .....G. .... AGATGAATTG TGTAAGGAG TGAAT . . . . .
Pc /JX499145 .....G. .... AGATGAATTG TGTAAGGAG TGAAT . . . . .
pH207     -----
          -----ACAA ATCGGACTAG GATATAGCTG GT
```

(B)

```

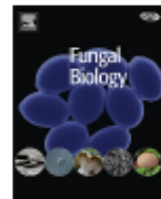
          10          20          30          40          50          60          70
pAZ102-Y  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          GCTCCCAAT TAATATTAAG TGA-----
Pj /NC_020331 .....AATAAAA GTTGTGGAT ATCTAAAACA GTTAAGAAG. ....
Pj /JX855936 .....T... ..AATAAAA GTTGTGGAT ATCTAAAACA GTTAAGAAG. ....
Pj /JX855937 .....AATAAAA GTTGTGGAT ATCTAAAACA GTTAAGAAG. ....
Pj /JX855938 .....T... ..AATAAAA GTTGTGGAT ATCTAAAACA GTTAAGAAG. ....
Pj /CAKN0100002 .....AATAAAA GTTGTGGAT ATCTAAAACA GTTAAGAAG. ....
Pm /NC_020332 .T...T... .GT..C.G.. ..AAGAAAA GAGTTTTTCT ATCTGAGACA ATCAAGAAG. ....
Pc /C_NC_013660 .T...AA... .GT...G... ..ATTAAAA GAAGTTTTCT TTCGTAGACA GTCAAGAAG. ....
Pc /JX499145 .T...AA... .GT...G... ..ATTAAAA GAAGTTTTCT TTCGTAGACA GTCAAGAAG. ....
pAZ102-E  -----
          -----T GGGCTTGAA ACAGCCATC
```



No. of <i>Pneumocystis carinii</i> mtLSUrDNA plasmid copy number per reaction	PCR results for assay:		
	New single-round PCR pH207/pAZ102-E	First-round PCR pAZ102-H/pAZ102-E	Nested-PCR pAZ102-X/pAZ102-Y
2.10 ⁻¹ + rat DNA	- (0/10) ^a	--	--
2.10 ⁰ + rat DNA	+ (8/10) ^a	--	--
2.10 ¹ + rat DNA	+ (10/10) ^a	--	- +
2.10 ² + rat DNA	++	- +	++
2.10 ³ + rat DNA	++	++	++
2.10 ⁴ + rat DNA	++	++	++
2.10 ⁵ + rat DNA	++	++	++
2.10 ⁶ + rat DNA	++	++	++
<i>Pneumocystis</i> -free rat lung DNA	--	--	--



ELSEVIER

British Mycological
Society promoting fungal sciencejournal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio

Complementation of a manganese-dependent superoxide dismutase-deficient yeast strain with *Pneumocystis carinii* *sod2* gene

Q11 Sara KHALIFE^{a,b}, El Moukhtar ALIOUAT^{a,c}, Nausicaa GANTOIS^a,
Hélène JAKOBCZYK^a, François DEMAY^a, Magali CHABÉ^{a,c},
Muriel POTTIER^{a,c}, Fouad DABBOUSSI^b, Monzer HAMZÉ^b,
Eduardo DEI-CAS^{a,d}, Annie STANDAERT-VITSE^{a,c,e,1},
Q2 Cécile-Marie ALIOUAT-DENIS^{a,c,1}

^aCentre d'Infection et d'Immunité de Lille, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Univ Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, Lille F-59019, France

^bLaboratoire de Microbiologie Santé et Environnement, Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon

^cLaboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Lille F-59006, France

^dLaboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Lille & Faculté de Médecine de Lille,

Q3 Univ Lille Nord de France, Lille F-59045, France

1 **COMPLEMENTATION OF A MANGANESE-DEPENDENT SUPEROXIDE DISMUTASE-DEFICIENT**
2 **YEAST STRAIN WITH *PNEUMOCYSTIS CARINII sod2* GENE.**

3
4 Sara Khalife^{1,2}, El Moukhtar Aliouat^{1,3}, Nausicaa Gantois¹, Hélène Jakobczyk¹, François
5 Demay¹, Magali Chab e^{1,3}, Muriel Pottier^{1,3}, Fouad Dabboussi², Monzer Hamze², Eduardo Dei-
6 Cas^{1,4}, Annie Standaert-Vitse^{1,3,*}, Cécile-Marie Aliouat-Denis^{1,3,*}

7
8 ¹ CIIL, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Univ Lille Nord de France, IPL, F-59019 Lille, France.

9 ² Laboratoire de Microbiologie Santé et Environnement, Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et
10 ses Applications, Université Libanaise, Tripoli, Liban.

11 ³ Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, F-59006 Lille, France.

12 ⁴ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Lille & Faculté de Médecine de Lille, Univ Lille Nord de
13 France, F-59045 Lille, France.

14 * These authors have equally contributed to this work.

15
16 **Corresponding author:** Dr Annie Standaert-Vitse, Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes
17 Emergents (BDPEE), Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), Inserm U1019, CNRS UMR 8204,
18 Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245,
19 F59019 Lille Cedex, France.

20 Tel : 33 3 20 85 71 56 ; Fax : 33 320 87 72 76 ; E-mail : annie.standaert-2@univ-lille2.fr

21
22
23 **Abstract**

24 Manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) is one of the key enzymes involved
25 in the cellular defense against oxidative stress. In a previous work, the *sod2* gene was
26 isolated and characterized from *Pneumocystis carinii*. Based on protein sequence
27 comparison, it has been suggested that *sod2* encoded a putative MnSOD protein likely to be
28 targeted into the mitochondrion. In the present work, the *sod2* gene from *Pneumocystis*
29 *carinii* was cloned and expressed as a recombinant protein in a *Saccharomyces cerevisiae*
30 strain (EG110) lacking the MnSOD-coding gene (*Scsod2*) in order to investigate the function
31 and the subcellular localization of *P. carinii* MnSOD (PcMnSOD). The *P. carinii sod2* gene was
32 amplified by PCR and cloned into the pYES2.1/V5-His-TOPO[ ] expression vector. The
33 recombinant construct was then transformed into *S. cerevisiae* EG110 strain. Once its
34 expression had been induced, PcMnSOD was able to complement the growth defect of
35 EG110 yeast cells that had been exposed to the redox-cycling compound menadione. N-term
36 sequencing of the PcMnSOD protein allowed identifying the cleavage site of a mitochondrial
37 targeting peptide. Immune-colocalization of PcMnSOD and yeast CoxIV further confirmed
38 the mitochondrial localization of the *Pneumocystis* MnSOD.

39 Heterologous expression of PcMnSOD in yeast indicates that *Pcsod2* encodes an active
40 MnSOD, targeted to the yeast mitochondrion that allows the yeast cells to grow in the
41 presence of reactive oxygen species.

42 **Keywords**

43 *Pneumocystis carinii*; superoxide dismutase; heterologous expression; MnSOD;
44 *Saccharomyces cerevisiae*; menadione; oxidative stress

45

46 **1. Introduction**

47 *Pneumocystis jirovecii* is an ubiquitous fungal microorganism that causes *Pneumocystis*
48 pneumonia (PcP) in immunosuppressed patients, notably those who are HIV-positive.
49 Despite the widespread use of HAART and anti-*Pneumocystis* therapy, PcP remains the
50 second most frequent opportunistic infection in AIDS patients (Antiretroviral Therapy Cohort
51 Collaboration (ART-CC) et al., 2009, Huang et al., 2011). Nowadays, patients without HIV
52 infection, such as transplant recipients and patients with primary or secondary
53 immunodeficiencies such as hematological malignancies or solid tumors, account for the
54 majority of PcP cases in industrialized countries (Catherinot et al., 2010). Besides active PcP,
55 *Pneumocystis* organisms are also present in the lungs of immunocompetent hosts. This
56 clinically silent state is defined as colonization or subclinical carriage (Morris et al., 2004a).
57 Notably, the prevalence of lung colonization by *P. jirovecii* is increased in patients suffering
58 from chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) (reviewed in Morris and Norris, 2012).
59 Moreover, in COPD experimental model, *Pneumocystis* colonization seems to lead to chronic
60 inflammation (Shipley et al., 2010) and to involve an irreversible decrease of pulmonary
61 function (Kling et al., 2014). Thus, *Pneumocystis* carriage is suggested to play a role in the
62 pathophysiology and progression of COPD (Calderón et al., 2007; Morris et al., 2004b) as well
63 as in the impairment of pulmonary function among patients with active tuberculosis (To et
64 al., 2013)

65 Although reactive oxygen species (ROS), including free radicals and peroxides, are now
66 considered as major cell signaling molecules that participate in cell homeostasis, they can
67 lead to oxidative damage in cells or tissues when produced in excess (Haliwell and
68 Gutteridge, 2006; Nathan and Cunningham-Bussel, 2013). They are generated as by-products
69 of aerobic metabolism (Venditti et al., 2013) or by stimulated host immune effectors cells,

70 such as neutrophils, monocytes and macrophages (Nathan and Cunningham-Bussel, 2013;
71 Hasenberg et al., 2013). Complex networks of ROS-detoxifying systems have been developed
72 by pathogens to cope with this detrimental oxidative stress. These defense mechanisms
73 include superoxide dismutases (SODs), catalases and glutathione peroxidases. In many
74 organisms including pathogenic fungi, three main isoforms of SOD have been described
75 depending on the cofactor metal: manganese- (MnSOD), iron- (FeSOD) and copper/zinc –
76 (Cu/ZnSOD) (Fréalles et al., 2005). MnSODs are mostly mitochondrial metalloenzymes that
77 detoxify the $O_2^{\bullet -}$ free radicals generated by mitochondrial respiration. Most of the fungal
78 MnSODs play an essential role in homeostasis and cell survival by protecting cells against
79 oxidative stress (Longo et al., 1999, Hwang et al., 2003, Lambou et al., 2010) and for some of
80 them, in virulence (Giles et al., 2005, Xie et al., 2012).

81 The *Pneumocystis* organisms inhabit the alveolar microenvironment where the phagocytes
82 of the innate immune system protect the airways by releasing ROS (Hasenberg et al., 2013).
83 *Pneumocystis* ROS-detoxifying pathways probably have an important role in the fungal
84 development inside the lung. Moreover, as *Pneumocystis* organisms have an aerobic
85 metabolism, these pathways may also control endogenous sources of ROS that could be
86 produced intracellularly.

87

88 Previously, our group cloned, identified and characterized the *Pcsod2* gene (originally named
89 *P. carinii sod* gene) (Denis et al., 1998). The deduced amino acid sequence was compared to
90 those of related organisms and a putative MnSOD activity was inferred (Denis et al., 1998,
91 1996).

92 Since it is not possible to continuously culture *Pneumocystis* organisms or directly
93 manipulate their genes, heterologous expression of *P. carinii* MnSOD protein in a MnSOD-
94 deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain was used in the present study to investigate the
95 protein function and its cellular localization. Previously, this expression method was
96 successfully applied to functional analysis of genes of *Pneumocystis* (Kottom and Limper,
97 2004; Moukhlis et al., 2010). The purpose of the present study was to gain an understanding
98 on PcMnSOD, the first-line enzyme of the antioxidant system of *P. carinii*.

99 **2. Materials and Methods**

100 **2.1 Ethics statement**

101 All animal experiments performed in this work were conducted following the guidelines of the
102 Pasteur Institute of Lille animal study board, which conforms to the Amsterdam Protocol on animal
103 protection and welfare, and Directive 86/609/EEC on the Protection of Animals Used for
104 Experimental and Other Scientific Purposes, updated in the Council of Europe's Appendix A
105 (<http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/PDF/123-Arev.pdf>) and in the strict accordance with
106 the French law (nu 87-848 dated 19-10-1987) and the European Community's 1976 Amendment of
107 Cruelty to Animals Act. The protocol was approved by the Ethics Committee for Experiments on
108 Animals of the Nord-Pas-de-Calais region (approval number ECEA 022011) and was carried out by
109 qualified personnel. All efforts were made to minimize animals suffering. Rat's euthanasia was made
110 after isoflurane inhalation and performed by lethal dose of pentobarbital injection.

111

112 **2.2 Source of *Pneumocystis carinii* organisms**

113 *Pneumocystis carinii* organisms were extracted from lungs of dexamethasone-treated athymic Lou
114 nu/nu rats as described elsewhere (Martinez et al., 2013) and were used for extracting total-RNA and
115 synthesizing cDNA in order to amplify the *Pcsod2* coding sequence encoding the *P. carinii*
116 manganese-cofactored superoxide dismutase (PcMnSOD).

117

118 **2.3 Yeast strains**

119 The *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1.

120 The BY4742 haploid *S. cerevisiae* strain was purchased from the European *S. cerevisiae* Archive for
121 Functional Analysis (EUROSCARF, Frankfurt, Germany) and was used as a source of genomic DNA for
122 amplification by PCR of the *Scsod2* gene encoding the *S. cerevisiae* MnSOD (ScMnSOD), which will
123 serve as positive control.

124 The *S. cerevisiae* EG110 $\Delta sod2$ strain, which has insertional defects in the gene coding for the
125 MnSOD, and its wild type counterpart EG103 were used in the heterologous complementation
126 studies. Both strains were kindly provided by Dr. Edith B. Gralla (University of California, Los Angeles,
127 USA)(Liu et al., 1992).

128

129 **2.4 Media and growth conditions**

130 Luria-Bertani medium (LB) contained 0.5% Yeast Extract, 1% Tryptone, 1% NaCl and was
131 supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin. LB was used to select and amplify recombinant plasmids in
132 *Escherichia coli*.

133 Yeast strains were grown at 30°C in YPD liquid medium (1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% dextrose)
134 or synthetic complete (SC) liquid medium, and 2% (w/v) agar was added for solid medium. SC
135 medium contained yeast nitrogen base, supplemented with 2% carbon source and 10 mg/L uracil
136 when needed. Dextrose (2%) was used as carbon source for routine culture, and gene expression was
137 induced by switching to galactose (2%).

138

139 **2.5 Plasmid construction and yeast transformation**

140 The cell wall of *P. carinii* organisms was disrupted by mechanical agitation in a bead mill (MM301,
141 Retsch France, Eragny-sur-Oise, France) at a frequency of 30 Hz during 30 s. *P. carinii* total RNA was
142 extracted using Rneasy® Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and then reverse-transcribed
143 using Smarter® Pico PCR cDNA synthesis kit (Clontech, Mountain View, CA, USA). Genomic DNA was
144 extracted from BY4742 yeast strain according to the lithium acetate method (Lööke et al., 2011).
145 Primers were designed based on available sequence data (Denis et al., 1998; Johnston et al., 1994)
146 using FastPCR 6.2 software and were synthesized and ordered from Eurogentec (Seraing, Belgium).
147 The *Pcsod2* coding region was amplified from cDNA by PCR, using primers SODPc-43F and SODPc-44R
148 as sense and antisense primers, respectively (Table 1). As introns are absent from the *Scsod2* gene,
149 amplification was performed from gDNA of the yeast strain BY4742 using primers SODSc-45F and
150 SODSc-46R (Table 1). PCR reaction mixtures were identical for both primer pairs: 1X PCR buffer, a
151 final MgCl₂ concentration of 2 mM, 0.4 μM of each primer, 250 μM of each dNTP, 2.5 U HotStarTaq
152 Plus DNA Polymerase (HotStarTaq Plus DNA Polymerase, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Two
153 microliters of the yeast or *P. carinii* DNA matrix were added to aliquots of the reaction mixture to
154 give a final volume of 50 μL. PCR reaction conditions were as follow: initial step of DNA denaturation
155 and Taq DNA polymerase activation were performed at 94°C for 5 min., followed by 40 cycles of at
156 94°C for 15 s., 53°C (for *Pcsod2* amplification) or 58°C (for *Scsod2* amplification) for 15 s., 72°C for 1
157 min., and a final extension step at 72°C for 5 min. DNA amplification was carried out using a PTC 200
158 thermocycler (MJ Research, Foster City, CA, USA). PCR products were analyzed by electrophoresis in
159 a 2% agarose gel and visualized after ethidium-bromide staining.

160 Amplified PCR products of expected size were purified using the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen
161 GmbH, Hilden, Germany) prior to cloning into the pYES2.1/V5-His-TOPO® expression vector from the
162 pYES2.1 TOPO® TA expression kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After ligation, recombinant
163 plasmids (or pYES2.1 with no insert as negative control) were transformed into One Shot® TOP10
164 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by heat shock.

165 Plasmid DNA of each construct was extracted (QIAprep® spin Miniprep kit, Qiagen GmbH, Hilden,
166 Germany) from ampicillin-selected clones and a restriction enzyme digestion was performed with
167 *AgeI* (Promega, Madison, WI, USA) to identify which plasmids possessed the ORF of the *PcSod2* or

168 *ScSod2* gene in the correct orientation. Plasmid DNA were then sequenced in order to check that
169 both *Pcsod2* and *Scsod2* sequences were identical to available sequences (absence of PCR-induced
170 errors) (Denis et al., 1998; Johnston et al., 1994), inserted in frame and in the correct direction
171 downstream of the *GAL1* promoter lying in the expression vector. Both *P. carinii* and *S. cerevisiae*
172 recombinant MnSOD were produced as fusion proteins with a C-terminal V5 epitope and
173 polyhistidine (6xHis) tags.

174 The transformations of the EG110 $\Delta sod2$ strain with pYES2.1 recombinant plasmids were performed
175 according to the lithium acetate method (Gietz and Schiestl, 2007). Briefly, the cells of *S. cerevisiae*
176 EG110 were grown overnight at 30°C in YPD liquid medium, were diluted to an OD_{595nm} of 0.4 and
177 were cultured for an additional 2-4 h. at 30°C. Cultures were harvested, washed in 40 mL of 10mM
178 Tris-HCl (pH 7.5) 1mM EDTA buffer, and suspended in 2mL of 0.1M lithium acetate-5mM Tris-HCl (pH
179 7.5)-0.5 mM EDTA buffer. After 10 min. of incubation at room temperature, 1µg of recombinant
180 plasmid DNA (carrying either *Pcsod2* or *Scsod2* genes or no insert) and 100µg DNA of salmon testes
181 (Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO, USA) were added to 100µL of the yeast suspension. Seven hundreds
182 µL of 0.1 M lithium acetate-40% polyethylene glycol 3350-10mM Tris-HCl (pH 7.5)-1mM EDTA buffer
183 were added to the suspension. The cells were then incubated at 30°C for 30 min., and heat-shocked
184 at 42°C for 7 min. before being plated out on selective medium (SC medium without uracil, SC-U).

185

186 **2.6 Expression of recombinant PcSod2 and ScSod2 proteins**

187 Expression of both tagged *S. cerevisiae* and *P. carinii* MnSOD proteins was induced in EG110-Sc and
188 EG110-Pc yeast transformants, respectively. Once *S. cerevisiae* cells have reached early logarithmic
189 phase, 2% galactose was added in the growth medium. Expression of recombinant MnSODs was thus
190 induced for 24 h. at 30°C and was confirmed by western blotting. To this purpose the transformed
191 yeasts were harvested by centrifugation (1600x *g*, 10 min., 4°C) and washed twice in ice-cold sterile
192 distilled water. The pellet was suspended in 500 µL RIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630,
193 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0.) containing protease inhibitors (protease
194 inhibitor cocktail set IV; Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, MA, USA). The yeast cells were then
195 lysed by vigorous agitation with acid-washed glass beads (0.4-0.6 mm; Sigma-Aldrich Co., St-Louis,
196 MO, USA) for 2 min. (separated by 1 min. cooling on ice) at a frequency of 30 Hz in a bead mill
197 (MM301, Retsch France, Eragny-sur-Oise, France). After centrifugation for 5 min. at 10 000 x *g*, the
198 supernatant was transferred to a clean tube. The lysed-cells and glass beads were washed with 300
199 µL of RIPA buffer, and the collected supernatant was pooled with the previous one. Total soluble
200 proteins were quantified using bicinchoninic acid protein assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit,
201 ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA), using bovine serum albumin as standard.

202

203 **2.7 SDS-PAGE and Western blotting**

204 Thirty-five µg of total protein extract of each transformed yeast strain were diluted in SDS reducing
205 buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol), and boiled at 100°C
206 for 5 min. SDS-PAGE was performed according to the protocol described by Laemmli (Laemmli, 1970)
207 in a mini-protean system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). The protein extracts were
208 separated in a 10% (w/v) polyacrylamide gel at 30 mA for 45 min., and transferred onto nitrocellulose
209 membrane. Nonspecific antigenic sites were blocked for 30 min. with 1% milk in TNT buffer (20 mM
210 Tris, 500 mM NaCl and 0.1% Tween, pH 7.5). Membranes were rinsed three times for 5 min. each
211 with TNT-0.5% milk. The recombinant V5 epitope-tagged MnSODs were detected by incubation with
212 an anti-V5 antibody (mouse monoclonal IgG, dilution 1:5000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1h. at
213 room temperature and revealed by incubation with Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-
214 mouse IgG secondary antibody (dilution 1:5000; Zymed Laboratories™, Life technologies, Carlsbad,
215 CA, USA). After addition of the ECL substrate (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate,
216 Pierce™ ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA), chemiluminescent signal was measured by
217 luminescent image analyzer (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany)
218 to detect the recombinant proteins.

219

220 **2.8 Menadione sensitivity assays**

221 Transformed yeast strains were studied for their ability to grow in liquid or solid media in the
222 presence of menadione (menadione sodium bisulfite, Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO, USA).
223 Following induction of MnSODs expression, cells were harvested and washed in sterile phosphate
224 buffer saline (PBS).

225 The menadione sensitivity assays were performed in microtiter plates. Cells were diluted to a cell
226 density of $1 \cdot 10^4$ cells/well in SC-U or SC liquid media supplemented with 2% dextrose in the presence
227 of different concentrations of menadione (0 mM, 0.5 mM and 1 mM). The growth rates were
228 calculated by measuring the optical density (OD_{595nm}) of 6 replicates per yeast transformant during 50
229 h. at 30°C with constant shaking in a spectrophotometer (EL 808 ultra microplate reader, BioTek
230 instruments, Biotek®, Winooski, VT, USA) driven by the Gen5 software. The doubling time was
231 calculated from exponential phase of growth using the following formula: $Time * (\ln 2 / (\ln(\text{final}$
232 $OD / \text{initial OD})))$.

233 The menadione sensitivity assays in solid medium were performed by preparing a working yeast
234 suspension of $2 \cdot 10^6$ cells/mL. Subsequently, the suspension was serially diluted from $2 \cdot 10^6$ to $2 \cdot 10^2$

235 yeast cells/mL. Five μ L of each diluted suspension were then spotted onto SC plates prepared with or
236 without 0.5 mM menadione. Plates were incubated for 72 h. at 30°C before read-out.

237

238 **2.9 Localization of recombinant MnSODs in yeast transformants**

239 To determine the subcellular localization of recombinant MnSODs in yeast cells, spheroplasts were
240 prepared from yeast transformants following the procedure described by Li and Cutler (Li and Cutler,
241 1991). To this purpose, the yeast transformants were grown to exponential phase (24 h., 30°C) in SC
242 medium containing 2% dextrose but lacking uracil. Then, expression of recombinant proteins was
243 induced by switching carbon source to 2% galactose (24 h., 30°C). The yeast culture was washed
244 three times in 0.1 M EDTA. Two mL of 0.1 M EDTA containing 1% of β -mercaptoethanol were added
245 per gram of pellet and cell suspension was incubated for 15 min. at room temperature. After
246 centrifugation (2 000 x *g*, 5 min.), yeast cells were suspended in 0.1 M EDTA-1M sorbitol buffer
247 supplemented with 80 UI.g⁻¹ of zymoliase 20T from *Arthrobacter luteus* (MP Biomedicals, Santa Anna,
248 CA, USA). The digestion of the yeast cell walls (30°C, 30 min.) was stopped on ice (10 min.) and thus
249 allowed the conversion from yeast cells to spheroplasts to be completed as checked by microscopy.
250 Finally, spheroplasts were gently spun down (300 x *g*, 5 min.), washed three times and suspended in
251 0.6 M KCl at a final concentration of 10⁶ yeast cells/mL. Twenty μ L of the spheroplast suspension
252 were spotted on immunofluorescence glass slides, dried and fixed with methanol. Spheroplasts were
253 then incubated for 30 min. at 37°C with an anti-yeast complex IV subunit III (also named cytochrome
254 c oxidoreductase, CoxIV) mouse monoclonal antibody (1:50 dilution; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
255 Cells were then incubated with an Alexa Fluor® 647 goat anti-mouse IgG (1:25 dilution; Molecular
256 probes®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 30 min. at room temperature. After washing, cells
257 were incubated with a FITC-labeled anti-V5 mouse antibody (1:250 dilution; Invitrogen, Carlsbad, CA,
258 USA,) added with DAPI (1:5000 dilution; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 min. at 37°C and
259 visualized using an AxioImager Z1 fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

260

261 **2.10 N-terminal sequencing**

262 Analysis of the N-terminal sequence of the PcMnSOD was first performed by using two programs
263 MitoProII (v1.101) and PSORT II (last version October 12, 1999) to predict the cleavage sites of the
264 mitochondrial targeting peptides (Habib et al., 2007; Claros and Vincens, 1996).

265 Then, the recombinant PcMnSOD was purified for N-terminal sequencing. To this purpose, once
266 separated by SDS-PAGE electrophoresis, the protein band corresponding to the recombinant *P.*
267 *carinii* MnSOD expressed in EG110 yeast strain was excised and sent to the MRC Immunochemistry

268 unit (Biochemistry dept, University of Oxford, UK) for N-terminal sequencing by Edman degradation
269 using a gas-phase protein sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

270

271 ***2.11 Statistical analysis***

272 Values of the doubling times were compared between the parental wild-type strain EG103 and the
273 yeast transformants (EG110-Pc, EG110-Sc and EG110-pYES when possible) at different menadione
274 concentrations with a Kruskal-Wallis rank sum test, performed using SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago,
275 IL, USA). Differences were considered statistically significant when p -values were lower than 0.05.

276 **3. Results**

277 **3.1 Induction of MnSODs expression in *S. cerevisiae***

278 The heterologous expression of *P. carinii* MnSOD protein in *S. cerevisiae* was performed in
279 this study to confirm the function of *Pcsod2* and notably to demonstrate whether the
280 expression of the *Pcsod2* gene could complement the MnSOD deficiency in the EG110 $\Delta sod2$
281 strain.

282 As *Pcsod2* gene sequence presented seven introns (Denis et al., 1998), total RNA was
283 isolated from *P. carinii* organisms, and the corresponding cDNA was synthesized.

284 The *Pcsod2* coding sequence was then amplified by PCR with primers SODPc-43F and SODPc-
285 44R, ligated into the pYES2.1/V5-His-TOPO[®] expression vector, and used to transform a
286 competent *E. coli* strain. Following sequencing of the inserts to check for fidelity and
287 orientation, the pYES2.1/*Pcsod2* construct was then transformed into the EG110 $\Delta sod2$ *S.*
288 *cerevisiae* strain. The presence of the pYES2.1/*Pcsod2* plasmid in the yeast strain was
289 verified by PCR. The same procedure was applied to clone *Scsod2* into the pYES2.1/V5-His-
290 TOPO[®] vector and express the ScMnSOD into EG110 $\Delta sod2$ strain to be used as a positive
291 control.

292 Expression of *Pcsod2* and *Scsod2* was under transcriptional control of the *GAL1* promoter in
293 the transformed yeasts. Expression was induced by switching carbon source to galactose
294 (2%) in the growth medium. After 24 h., SDS-PAGE and Western blot were conducted to
295 determine whether the recombinant PcMnSOD and ScMnSOD were expressed by the
296 transformed strains. As shown in figure 1, both EG110-Pc and EG110-Sc strains expressed
297 the recombinant MnSOD proteins. The immunodetection using an anti-V5 antibody revealed
298 two 23 kDa-bands corresponding to the predicted size of the epitope-tagged PcMnSOD and
299 ScMnSOD proteins, in the EG110-Pc and EG110-Sc lanes, respectively. The signal intensity is
300 stronger for the ScMnSOD than for the PcMnSOD while no signal is detected in the lanes
301 corresponding to EG110-pYES and EG103 wild type strains as expected.

302

303 **3.2 Oxidative stress resistance of the PcMnSOD- or ScMnSOD-complemented yeast strains**

304 Deletion of the yeast *sod2* gene results in a strong retarded growth of the EG110 strain on
305 medium containing redox-cycling drugs such as menadione (Demir and Koc, 2010). We
306 further investigated whether the expression of *Pcsod2* can complement the absence of the

307 MnSOD protein in EG110 strain. To this purpose, the growth rates of yeast cells expressing
308 either the *P. carinii* or the *S. cerevisiae* MnSOD (EG110-Pc and EG110-Sc, respectively) were
309 compared to those bearing an empty plasmid (EG110-pYES). The yeast strains were spotted
310 on solid SC medium with or without menadione (Figure 2). The growth of the EG110-Pc,
311 EG110-Sc (positive control) and EG103 wild type strains were comparable after 3 days of
312 incubation whereas the EG110-pYES strain (negative control) was unable to grow in the
313 presence of 0.5 mM of menadione. Thus, once the expression of *Pcsod2* is induced, the
314 PcMnSOD successfully complemented the growth defect of the EG110 $\Delta sod2$ strain in the
315 presence of menadione.

316 This phenotype was confirmed when monitoring the growth kinetics of the same yeast cell
317 suspensions in liquid cultures in the presence of different menadione concentrations (Figure
318 3). Without oxidative stress, all strains grew exponentially (Figure 3A). The doubling times
319 that were calculated during the exponential phase, were all comprised between 3.72 and
320 4.44 hours for all strains (Table 2). The addition of 0.5 mM of menadione to the medium did
321 not affect the growth curves of EG103, EG110-Sc or EG110-Pc (Figure 3B). Conversely,
322 menadione dramatically delayed the growth of the EG110 $\Delta sod2$ strain that started to grow
323 few hours only before the end of the experiment (Figure 3B). The doubling times of EG110-
324 Pc and EG110-Sc (4.16 ± 1.07 h. and 3.88 ± 0.39 h., respectively) are not significantly
325 different compared to EG103 (3.85 ± 0.14 h.) (Table 2). The EG103, EG110-Pc and EG110-Sc
326 strains continued to grow exponentially even in the presence of 1 mM menadione while this
327 oxidative stress is detrimental to the growth of EG110 $\Delta sod2$ mutant strain (Figure 3C). The
328 doubling times of the EG103 and EG110-Sc strains (3.77 ± 0.82 h. and 3.93 ± 0.22 h.,
329 respectively) were statistically comparable in the presence of 1mM menadione (Table 2).
330 The doubling time of EG110-Pc was slightly longer (4.67 ± 0.82 h.), although not statistically
331 different from those of the other two strains. In all experiments the EG103 strain entered
332 exponential phase earlier than EG110 strains.

333

334 **3.3 Cellular localization of *P. carinii* recombinant MnSOD in yeast**

335 Immunofluorescence microscopy was employed to compare the subcellular localization of
336 PcMnSOD to that of ScMnSOD, both of which are expressed in the EG110 yeast strain as
337 recombinant V5-tagged-proteins (Figure 4). An antibody directed against the yeast CoxIV
338 (cytochrome c oxidoreductase) enzyme was used to label the *S. cerevisiae* mitochondrion.

339 In both EG110-Pc and EG110-Sc strains, the anti-V5 and anti-CoxIV labelings co-localized thus
340 demonstrating the localization of both *P. carinii* and *S. cerevisiae* recombinant MnSODs in
341 the mitochondrial matrix of yeast cells. No fluorescence was detected with the anti-V5
342 antibody in the EG110-pYES cells (data not shown).

343

344 **3.4 N-terminal sequencing of the *P. carinii* recombinant MnSOD**

345 Two programs were used to predict the cleavage site of the mitochondrial targeting peptide
346 of the *Pneumocystis* MnSOD (Habib et al., 2007): MitoProII (v1.101) and PSORT II (last
347 version October 12, 1999). MitoPro II predicted a cleavage site at R-10 whereas PSORT II
348 predicted the cleavage at either R-10 or R-2 (Figure 5, panel A).

349 The N-terminal sequencing identified the first 20 amino acids of the yeast-expressed
350 PcMnSOD. Its comparison with the full-length PcMnSOD sequence (Denis et al., 1998)
351 allowed to precisely delineate the cleavage site of the *Pneumocystis* protein (Figure 5). The
352 *P. carinii* mitochondrial targeting peptide was cleaved by the *S. cerevisiae* enzymes at the R-2
353 recognition site as predicted (Gavel and von Heijne, 1990; Claros and Vincens, 1996). The
354 *P. carinii* presequence is 19 amino acids long and displayed a high content (47%) in positively-
355 charged residues, two features of mitochondrial targeting peptides (reviewed in Habib et al.,
356 2007).

357

358

359 **4. Discussion**

360 In the alveolar microenvironment, fungal organisms are confronted to the phagocytic
361 alveolar macrophages and neutrophils that are believed to be the first line of defense
362 against these infections (Hasenberg et al., 2013). The aeriually-transmitted *Pneumocystis*
363 organisms are no exceptions as several studies have demonstrated that they are internalized
364 by alveolar macrophages (AM). This process involves the AM mannose or Dectin-1 β -glucan
365 receptors (Ezekowitz et al., 1991; O’Riordan et al., 1995; Steele et al., 2003). *In vitro*,
366 *Pneumocystis* organisms are able to induce the production of superoxide anion or hydrogen
367 peroxide in human or rodent monocytes and macrophages (Hidalgo et al., 1992; Koziel et al.,
368 2000; Laursen et al., 1994) and in human neutrophils (Jensen et al., 1998; Laursen et al.,
369 1993). Authors have then proposed that induction of respiratory burst may be one of the
370 ways that macrophages kill *Pneumocystis* organisms (Koziel et al., 2000; Hidalgo et al., 1992;
371 Pesanti, 1984). Moreover, Dectin-1-deficient mice have been shown to be more susceptible
372 to *Pneumocystis* infection and Dectin-1-knockout macrophages were defective in the
373 production of ROS once incubated with *Pneumocystis* organisms (Saijo et al., 2007). Thus,
374 dectin-1-induced signaling is essential for *Pneumocystis*-induced ROS production and
375 protection against *Pneumocystis* organisms.

376
377 Next to oxidative burst, ROS are also generated endogenously as by-products of the aerobic
378 metabolism (Haliwell and Gutteridge, 2006). To protect themselves against oxygen radicals,
379 most eukaryotes have developed antioxidant enzymatic systems and SOD are considered as
380 the first-line detoxifying enzymes for $O_2^{\bullet-}$ (Figure 6). In *Pneumocystis* organisms, a low (2
381 $U \cdot mg^{-1}$ protein) but significant SOD activity was measured (Pesanti, 1984). Inhibition
382 experiments by cyanid (CN^-) or hydrogen peroxide (H_2O_2) revealed that most of the activity
383 was due to a MnSOD (Denis et al., 1996). Later, a *P. carinii sod2* gene was amplified and its
384 deduced amino acid sequence displayed the highest similarity (70.3%) with the *S. cerevisiae*
385 MnSOD sequence (Denis et al., 1998). To pursue its characterization, the *Pcsod2* gene was
386 expressed in a $\Delta sod2$ *S. cerevisiae* background and was shown to protect the complemented
387 strain against superoxide anion generated by menadione (this study). After induction, both
388 EG110-Pc and EG110-Sc strains were expressing the corresponding MnSOD but the
389 PcMnSOD protein level was lower than this of ScMnSOD (Figure 1). This difference in
390 expression level can be due to the different codon usage bias in both organisms as codons of

391 *Pcsod2* were not optimized to be expressed in the yeast context (Lanza et al., 2014). The
392 quantity of PcMnSOD expressed by *S. cerevisiae* was sufficient to complement for the
393 MnSOD deficiency since yeasts that were expressing either *P. carinii* or *S. cerevisiae* MnSOD
394 grew exponentially under oxidative stress while yeasts transformed with the vector alone
395 did not (Figure 3). The doubling times of complemented strains were not different from that
396 of wild-type strain. However, EG110 strains reached the exponential phase and grew more
397 slowly than the wild type strain. The difference in growth curves observed here could be due
398 to the different medium used for the wild type and the complemented strains. The EG110
399 transformants growing on SC-U medium have to produce uracil from the plasmidic *URA3*
400 gene whereas the wild type EG103 strain directly uses uracil that is available in the SC
401 medium.

402 These findings along with previous studies (Denis et al., 1998, 1996) indicate that the *Pcsod2*
403 gene encoded an active MnSOD that efficiently complements the yeast deficient strain and
404 allows its growth in the presence of oxidative stress.

405 In yeast cells, the recombinant PcMnSOD colocalized with *S. cerevisiae* cytochrome oxidase,
406 CoxIV, thus confirming the expected mitochondrial localization of the *Pneumocystis* MnSOD.
407 Moreover, N-terminal sequencing of the PcMnSOD indicated that *S. cerevisiae* was able to
408 cleave the mitochondrial signal peptide of PcMnSOD at one of the expected cleavage sites
409 (R-2), thus releasing a functional protein within the yeast mitochondrial matrix. Although
410 *Pneumocystis* organisms are closer to the fission yeast than to the baker yeast (Liu et al.,
411 2009; Ma et al., 2013), *S. cerevisiae* appears as a practical system to study *Pneumocystis*
412 gene function since many deficient strains are available.

413 Other fungal species such as *Cryptococcus neoformans* (Narasipura et al., 2005),
414 *Schizosaccharomyces pombe* (Jeong et al., 2001), *Candida albicans* (Rhie et al., 1999),
415 *Aspergillus fumigatus* (Lambou et al., 2010) harbor a MnSOD in the mitochondrial matrix as
416 testified by the presence of N-terminal mitochondrial targeting peptides and in some
417 instances by the detection of MnSOD activity in mitochondrial fractions. Cytosolic MnSODs
418 were also described in many fungal species such as in *Beauveria bassiana* (Xie et al., 2010),
419 *A. fumigatus* (Lambou et al., 2010) or *C. albicans* (Lamarre et al., 2001). As $O_2^{\bullet -}$ does not
420 diffuse easily across subcellular compartments, it has to be scavenged *in situ*. In this way, it is
421 reasonable to argue that the main function of the *Pneumocystis* mitochondrial MnSOD is to
422 protect against oxidative radicals that are intracellularly produced during aerobic

423 metabolism of the fungus. At this point of our knowledge, the existence of a cytosolic and/or
424 extracellular SOD(s) in *P. carinii* cannot be excluded.

425 This intracellular detoxification of ROS appears essential for fungi as deletion mutants for
426 mitochondrial MnSOD have displayed less virulence in the animal models. This has been
427 exemplified in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Xie et al., 2012) and in
428 *Cryptococcus neoformans*, (Giles et al., 2005; Narasipura et al., 2005).

429 Strikingly, the virulence of both the *Aspergillus fumigatus* triple SOD mutant and the *Candida*
430 *albicans* mitochondrial MnSOD mutant were not affected in immunocompromised mice
431 (Lambou et al., 2010, Hwang et al., 2003). From these virulence studies focusing on other
432 fungal pathogens, the exact function of the mitochondrial *P. carinii* MnSOD in pathogenesis
433 is difficult to predict. Most probably, its main role is to detoxify $O_2^{\bullet-}$ generated as a
434 consequence of the fungus own oxidative respiration but studying its potential role in
435 virulence requires gene deletion or silencing, two approaches currently out of reach for this
436 non-cultivable fungus.

437 However, some studies on *Pneumocystis* genetic diversity have reported significant
438 association between some single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and clinical parameters
439 in patient with PcP. Notably, SNPs at position 110 and 215 in the *sod* locus were described
440 and associated with favorable outcome of PcP (*SOD215C*) (Esteves et al., 2010) or a lower
441 parasite burden (*SOD215C/SOD110T*) (Esteves et al., 2011, 2012). The mitochondrial MnSOD
442 is probably not the unique component of the *Pneumocystis* anti-oxidant system (Figure 6). In
443 that respect, few genes have already been identified such as a sequence encoding a putative
444 catalase protein in the *Pneumocystis* transcriptome (Cushion et al., 2007). Another *P. carinii*
445 gene, *Trr1* that encodes a thioredoxin reductase can participate in the protection of the
446 fungus from oxidative stress (Kutty et al., 2003). Lastly, the role of a *Pneumocystis* MAP
447 kinase, *Mkp1*, in the maintenance of the cell wall integrity in response to ROS has been
448 reported (Fox and Smulian, 1999).

449 In conclusion, the functional characterization of PcMnSOD improves our knowledge in the
450 antioxidant system of *Pneumocystis*. Further investigation into the function and interplay
451 between the mitochondrial PcMnSOD and the other components of the antioxidant system
452 should provide new insights in the regulation of ROS homeostasis in *Pneumocystis*
453 organisms.

454 **Figure legends**

455 **Figure 1. Immunodetection of *P. carinii* and *S. cerevisiae* recombinant MnSODs expressed**
456 **in the EG110 $\Delta sod2$ yeast strain.**

457 The expression of recombinant V5-tagged-MnSODs was induced by switching carbon source
458 to galactose. Thirty-five μg of total protein extracted from wild type EG103 (lane 1),
459 pYES2.1/*Pcsod2*- and pYES2.1/*Scsod2*-transformed EG110 (EG110-Pc and EG110-Sc, lanes 2
460 and 3, respectively) and pYES2.1- transformed EG110 (EG110-pYES, lane 4) strains were
461 loaded on a SDS-PAGE gel and blotted onto nitrocellulose membrane. The blot was probed
462 with an anti-V5 monoclonal antibody. Displayed results are representative of three
463 independent experiments.

464

465 **Figure 2. Spotting assays to test the growth of wild type or transformed *S. cerevisiae***
466 **strains in the presence of menadione**

467 Growth characteristics were tested by plating serial dilutions of the wild type strain (EG103)
468 or the yeast EG110 transformants bearing either a plasmid expressing the *P. carinii* (EG110-
469 Pc), *S. cerevisiae* (EG110-Sc) MnSOD or the vector alone (EG110-pYES). Before plating,
470 expressions of *P. carinii* or *S. cerevisiae* MnSODs were induced for 24h in synthetic complete
471 minus uracil (SC-U) medium supplemented with 2% galactose. Five μl of each suspension
472 were spotted on SC agar plates containing either no (panel A) or 0.5 mM menadione (panel
473 B). The number of spotted cells corresponds to 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 and 1 cell per spot from left
474 to right as indicated. The ability of transformants to grow at 30°C was assessed by 3 replica-
475 plating. Representative photographs show yeast growth following 3 days of incubation. SCD:
476 synthetic complete medium with 2% dextrose.

477

478 **Figure 3. Impact of menadione on growth kinetics of wild type or transformed *S. cerevisiae***
479 **strains.**

480 Growth kinetics of the wild type strain EG103 (●) and EG110 $\Delta sod2$, transformed with either
481 pYES2.1/*Pcsod2* (▲), or pYES2.1/*Scsod2* (■) plasmid or either non recombinant plasmid
482 pYes2.1 as negative control (○) were monitored after expression of recombinant MnSOD
483 transformed cells were grown in SC-U liquid medium supplemented with 2% dextrose at
484 30°C for 50 h and EG103 was grown in SC medium with 2% dextrose (Figure 3A). The
485 resistance of each strain to oxidative stress was measured at 0.5 mM (Figure 3B) and 1 mM

486 (Figure 3C) of menadione. Data points are the OD₅₉₅ values of the cultures at the times
487 indicated and results represent the the means of six replicates. There were no significant
488 differences in doubling times among wild-type EG103 and EG110-Pc or EG110-SC strain in
489 both three experiments.

490

491 **Figure 4. Cellular localization of *P. carinii* and *S. cerevisiae* recombinant MnSODs in EG110**
492 **yeast cells.**

493 *P. carinii* and *S. cerevisiae* V5-tagged recombinant MnSODs were expressed in EG110 yeast
494 cells and their subcellular localizations were determined by staining with an anti-V5
495 antibody. The yeast cells were also stained with an anti-complex IV cytochrome c
496 oxidoreductase (CoxIV) and DAPI to label mitochondria and nuclei, respectively. The merged
497 of the 3 staining (V5-tagged MnSOD, CoxIV, DAPI) and differential interference contrast (DIC)
498 images are also presented. Bar = 5 µm.

499

500

501 **Figure 5. N-terminal amino acid sequence of *P. carinii* MnSOD expressed in yeast.**

502 The recombinant *P. carinii* MnSOD was expressed in EG110 yeast cells, separated by SDS-
503 PAGE electrophoresis and sent for N-terminal sequencing by Edman degradation
504 (Biochemistry dept, University of Oxford, UK). (A) Sequence of the 220 amino-acid residues
505 deduced from *Pneumocystis carinii sod2* gene (Denis et al., 1998) and the cleavage sites (R-2
506 and R-10, arrows) of the mitochondrial targeting peptide predicted by the software
507 programs MitoProII (v1.101) and PSORT II (last version October 12, 1999). (B) N-terminal
508 amino acid sequence of the PcMnSOD expressed in yeast. The cleavage site occurs at the
509 expected R-2 position (Gavel and von Heijne, 1990) thus delimiting the mitochondrial
510 targeting peptide (in bold).

511

512 **Figure 6: Schematic representation of the pathways producing reactive oxygen species**
513 **(ROS) and key cellular antioxidant enzymatic systems controlling ROS production into a**
514 ***Pneumocystis* organism.**

515 This schematic illustration was based on our knowledge of antioxidant systems described for
516 most of eukaryotic cells and has been hypothesized for *Pneumocystis* organisms. During
517 aerobic metabolism, some of the dioxygen (O₂) used by the mitochondrial respiratory chain

518 is not completely reduced to H₂O. This leads to ROS formation (e.g. superoxide anion O₂^{•-};
519 hydrogen peroxide H₂O₂ and hydroxyl radical OH[•]). Aerobic organisms defend themselves
520 against ROS through enzymatic and non-enzymatic detoxification mechanism. Only enzymes
521 involved in this process are shown here. Both manganese and copper/zinc superoxide
522 dismutases (SODs) catalyze the disproportionation of superoxide to hydrogen peroxide
523 (H₂O₂) and dioxygen. This reaction occurs either in the mitochondrial matrix (MnSODs) or in
524 the cytosol (Cu/ZnSODs). In the presence of certain transition metal (e.g. iron or copper),
525 H₂O₂ could form hydroxyl radical OH[•] *via* the Fenton reaction or the Haber-Weiss
526 mechanism. In addition, H₂O₂ can also be converted to O₂ and H₂O by the catalase (CAT) or
527 glutathione peroxidase (GPX) enzymes depending on its intracellular level. During the latter
528 process, reduced glutathione (GSH) is oxidized to glutathione disulfide (GSSG) which is then
529 reduced back to GSH by glutathione reductase (GR) using NADPH as a cofactor. The
530 thioredoxin system (TRX) is one of the intracellular mechanisms for regulating the redox
531 balance by maintaining the reducing status of various molecules *via* thioredoxin, using
532 NADPH as co-factor. Concerning *Pneumocystis*, little is known about the antioxidant systems.
533 Only few components have been characterized (filled ovals), and the corresponding studies
534 are notified. The other components (open ovals) are still to be explored to confirm their
535 occurrence and their role in *Pneumocystis* organisms.

536

537 CAT, catalase; Cu/ZnSOD, copper/zinc-cofactored superoxide dismutase; GPX, glutathione
538 peroxidase; GR: glutathione reductase, GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized
539 glutathione; MnSOD, manganese-cofactored superoxide dismutase; NOX, NADPH oxidase;
540 TRX, thioredoxin system (composed of thioredoxin peroxidase and thioredoxin reductase)

541

542 **Acknowledgments:**

543 We are grateful to Dr. Edith B. Gralla (University of California, Los Angeles, USA) for kindly providing
544 EG103 and EG110 *Saccharomyces cerevisiae* strains. We kindly thank Ludovic Huot, Christophe
545 Audebert for their constructive advices and Aurélie Lalau for her helpful technical assistance.

546 This work was partly supported by ANR-ERA-NET '*Pneumocystis*' PathoGenoMics (ANR-06-319
547 PATHO-009-01). We also thank Lille-Nord-de-France University, the Pasteur Institute of Lille, and the
548 microscopy platform of the Lille-Nord-de-France BioImaging Center (BiCeL, IFR142) for their support.

549 Sara Khalife, Ph-D student, has a financial support from the AZM Center for Biotechnology Research,
550 Lebanese University, Tripoli, Lebanon.

551 The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or
552 preparation of the manuscript.

553

554 **Competing interests:**

555 The authors have declared that no competing interests exist.

556 **References:**

- 557 Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (ART-CC), Mocroft, A., Sterne, J.A.C., Egger, M., May, M., Grabar,
558 S., Furrer, H., Sabin, C., Fatkenheuer, G., Justice, A., Reiss, P., d' Arminio Monforte, A., Gill, J., Hogg, R., Bonnet,
559 F., Kitahata, M., Staszewski, S., Casabona, J., Harris, R., Saag, M., 2009. Variable impact on mortality of AIDS-
560 defining events diagnosed during combination antiretroviral therapy: not all AIDS-defining conditions are
561 created equal. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1138–1151
- 562
- 563 Calderón, E.J., Rivero, L., Respaldiza, N., Morilla, R., Montes-Cano, M.A., Friaza, V., Muñoz-Lobato, F., Varela,
564 J.M., Medrano, F.J., Horra, C. de la, 2007. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive
565 pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin. Infect. Dis.* 45, e17–19.
- 566
- 567 Catherinot, E., Lanternier, F., Bournoux, M.-E., Lecuit, M., Couderc, L.-J., Lortholary, O., 2010. *Pneumocystis*
568 *jirovecii* Pneumonia. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 24, 107–138.
- 569
- 570 Claros, M.G., Vincens, P., 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their
571 targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241, 779–786.
- 572
- 573 Cushion, M.T., Smulian, A.G., Slaven, B.E., Sesterhenn, T., Arnold, J., Staben, C., Porollo, A., Adamczak, R.,
574 Meller, J., 2007. Transcriptome of *Pneumocystis carinii* during fulminate infection: carbohydrate metabolism
575 and the concept of a compatible parasite. *PLoS ONE* 2, e423.
- 576
- 577 Demir, A.B., Koc, A., 2010. Assessment of chronological lifespan dependent molecular damages in yeast lacking
578 mitochondrial antioxidant genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 106–110.
- 579
- 580 Denis, C.M., Odberg-Ferragut, C., Guyot, K., Dei-Cas, E., Camus, D., Dive, D., 1996. Manganese-cofactored
581 superoxide dismutase activity in rat-derived *Pneumocystis carinii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 265.
- 582
- 583 Denis, C.M., Guyot, K., Wakefield, A.E., Dive, D., Dei-Cas, E., Camus, D., Odberg-Ferragut, C., 1998. Molecular
584 cloning and characterization of a superoxide dismutase (sod) gene in *Pneumocystis carinii*. *J. Eukaryot.*
585 *Microbiol.* 45, 475–483.
- 586
- 587 Esteves, F., Gaspar, J., Marques, T., Leite, R., Antunes, F., Mansinho, K., Matos, O., 2010. Identification of
588 relevant single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: relationship with clinical data. *Clin.*
589 *Microbiol. Infect.* 16, 878–884.
- 590
- 591 Esteves, F., Gaspar, J., De Sousa, B., Antunes, F., Mansinho, K., Matos, O., 2011. Clinical relevance of multiple
592 single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: development of a multiplex PCR-single-
593 base-extension methodology. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1810–1815.
- 594
- 595 Esteves, F., Gaspar, J., de Sousa, B., Antunes, F., Mansinho, K., Matos, O., 2012. *Pneumocystis jirovecii*
596 multilocus genotyping in pooled DNA samples: a new approach for clinical and epidemiological studies. *Clin.*
597 *Microbiol. Infect.* 18, E177–184.
- 598
- 599 Ezekowitz, R.A., Williams, D.J., Koziel, H., Armstrong, M.Y., Warner, A., Richards, F.F., Rose, R.M., 1991. Uptake
600 of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351, 155–158.
- 601
- 602 Fox, D., Smulian, A.G., 1999. Mitogen-activated protein kinase Mkp1 of *Pneumocystis carinii* complements the
603 slt2Delta defect in the cell integrity pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 34, 451–462.
- 604
- 605 Fréal, E., Noël, C., Viscogliosi, E., Camus, D., Dei-Cas, E., Delhaes, L., 2005. Manganese superoxide dismutase
606 in pathogenic fungi: an issue with pathophysiological and phylogenetic involvements. *FEMS Immunol. Med.*
607 *Microbiol.* 45, 411–422.
- 608
- 609 Gavel, Y., von Heijne, G., 1990. Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng.* 4, 33–37.
- 610

611 Gietz, R.D., Schiestl, R.H., 2007. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier
612 DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2, 38–41.
613
614 Giles, S.S., Batinic-Haberle, I., Perfect, J.R., Cox, G.M., 2005. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial
615 superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. *Eukaryotic*
616 *Cell* 4, 46–54.
617
618 Habib, S.J., Neupert, W., Rapaport, D., 2007. Analysis and Prediction of Mitochondrial Targeting Signals, in:
619 *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 761–781.
620
621 Haliwell, B., Gutteridge, J., 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press., Oxford, UK.
622
623 Hasenberg, M., Stegemann-Koniszewski, S., Gunzer, M., 2013. Cellular immune reactions in the lung. *Immunol.*
624 *Rev.* 251, 189–214.
625
626 Hidalgo, H.A., Helmke, R.J., German, V.F., Mangos, J.A., 1992. *Pneumocystis carinii* induces an oxidative burst in
627 alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 60, 1–7.
628
629 Huang, L., Cattamanchi, A., Davis, J.L., Boon, S. d., Kovacs, J., Meshnick, S., Miller, R.F., Walzer, P.D., Worodria,
630 W., Masur, H., on behalf of the International HIV-associated Opportunistic Pneumonias (IHOP) Study and the
631 Lung HIV Study, 2011. HIV-Associated Pneumocystis Pneumonia. *Proceedings of the American Thoracic Society*
632 8, 294–300.
633
634 Hwang, C.S., Baek, Y.U., Yim, H.S., Kang, S.O., 2003. Protective roles of mitochondrial manganese-containing
635 superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* 20, 929–941.
636
637 Jensen, T., Aliouat, E.M., Lundgren, B., Settnes, O.P., Karlsson, A., Dahlgren, C., Dei-Cas, E., Obel, N., 1998.
638 Cultured rat and purified human *Pneumocystis carinii* stimulate intra- but not extracellular free radical
639 production in human neutrophils. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 544–547.
640
641 Jeong, J.H., Kwon, E.S., Roe, J.H., 2001. Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase
642 and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
643 283, 908–914.
644
645 Johnston, M., Andrews, S., Brinkman, R., Cooper, J., Ding, H., Dover, J., Du, Z., Favello, A., Fulton, L., Gattung, S.,
646 1994. Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII. *Science* 265, 2077–2082.
647
648 Kling, H.M., Shipley, T.W., Guyach, S., Tarantelli, R., Morris, A., Norris, K.A., 2014. Trimethoprim-
649 sulfamethoxazole treatment does not reverse obstructive pulmonary changes in *pneumocystis*-colonized
650 nonhuman primates with SHIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 65(4), 381–389.
651
652 Kottom, T.J., Limper, A.H., 2004. *Pneumocystis carinii* cell wall biosynthesis kinase gene CBK1 is an
653 environmentally responsive gene that complements cell wall defects of cbk-deficient yeast. *Infect. Immun.* 72,
654 4628–4636.
655
656 Koziel, H., Li, X., Armstrong, M.Y., Richards, F.F., Rose, R.M., 2000. Alveolar macrophages from human
657 immunodeficiency virus-infected persons demonstrate impaired oxidative burst response to *Pneumocystis*
658 *carinii in vitro*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 452–459.
659
660 Kutty, G., Huang, S.N., Kovacs, J.A., 2003. Characterization of thioredoxin reductase genes (*trr1*) from
661 *Pneumocystis carinii* and *Pneumocystis jiroveci*. *Gene* 310, 175–183.
662
663 Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
664 *Nature* 227, 680–685.
665

666 Lamarre, C., LeMay, J.D., Deslauriers, N., Bourbonnais, Y., 2001. *Candida albicans* expresses an unusual
667 cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the
668 stationary phase. *J. Biol. Chem.* 276, 43784–43791.
669

670 Lambou, K., Lamarre, C., Beau, R., Dufour, N., Latge, J.-P., 2010. Functional analysis of the superoxide dismutase
671 family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* 75, 910–923.
672

673 Lanza AM, Curran KA, Rey LG, Alper HS. A condition-specific codon optimization approach for improved
674 heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol.* 2014 Mar 17;8:33.
675

676 Laursen, A.L., Obel, N., Rungby, J., Andersen, P.L., 1993. Phagocytosis and stimulation of the respiratory burst in
677 neutrophils by *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* 168, 1466–1471.
678

679 Laursen, A.L., Møller, B., Rungby, J., Petersen, C.M., Andersen, P.L., 1994. *Pneumocystis carinii*-induced
680 activation of the respiratory burst in human monocytes and macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 98, 196–202.
681

682 Li, R.K., Cutler, J.E., 1991. A cell surface/plasma membrane antigen of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 137,
683 455–464.
684

685 Limper, A.H., Weiss, L.M., 2011. Guidelines for the naming of genes, gene products, and mutants in the
686 opportunistic protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 58, 537–538.
687

688 Liu, X.F., Elashvili, I., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Lapinskas, P., Culotta, V.C., 1992. Yeast lacking superoxide
689 dismutase. Isolation of genetic suppressors. *J. Biol. Chem.* 267, 18298–18302.
690

691 Liu, Y., Leigh, J.W., Brinkmann, H., Cushion, M.T., Rodriguez-Ezpeleta, N., Philippe, H., Lang, B.F., 2009.
692 Phylogenomic analyses support the monophyly of Taphrinomycotina, including *Schizosaccharomyces* fission
693 yeasts. *Mol. Biol. Evol.* 26, 27–34.
694

695 Longo, V.D., Liou, L.L., Valentine, J.S., Gralla, E.B., 1999. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in
696 stationary phase. *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 131–142.
697

698 Lööke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A., 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based
699 applications. *BioTechniques* 50, 325–328.
700

701 Ma L, Huang DW, Cuomo CA, Sykes S, Fantoni G, Das B, Sherman BT, Yang J, Huber C, Xia Y, Davey E, Kutty G,
702 Bishop L, Sassi M, Lempicki RA, Kovacs JA. Sequencing and characterization of the complete mitochondrial
703 genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent
704 *Pneumocystis*. *FASEB J.* 2013 May;27(5):1962-72.
705

706 Martinez, A., Halliez, M.C.M., Aliouat, E.M., Chabé, M., Standaert-Vitse, A., Fréalle, E., Gantois, N., Pottier, M.,
707 Pinon, A., Dei-Cas, E., Aliouat-Denis, C.-M., 2013. Growth and airborne transmission of cell-sorted life cycle
708 stages of *Pneumocystis carinii*. *PLoS ONE* 8, e79958.
709

710 Morris, A., Lundgren, J.D., Masur, H., Walzer, P.D., Hanson, D.L., Frederick, T., Huang, L., Beard, C.B., Kaplan,
711 J.E., 2004a. Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerging Infect. Dis.* 10, 1713–1720.
712

713 Morris, A., Sciarba, F.C., Lebedeva, I.P., Githaiga, A., Elliott, W.M., Hogg, J.C., Huang, L., Norris, K.A., 2004b.
714 Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am. J. Respir.*
715 *Crit. Care Med.* 170, 408–413.
716

717 Morris, A., Norris, K.A., 2012. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.*
718 25, 297–317.
719

720 Moukhlis, R., Boyer, J., Lacube, P., Bolognini, J., Roux, P., Hennequin, C., 2010. Linking *Pneumocystis jiroveci*
721 sulfamethoxazole resistance to the alleles of the DHPS gene using functional complementation in
722 *Saccharomyces cerevisiae*. Clin. Microbiol. Infect. 16, 501–507.
723
724 Narasipura, S.D., Chaturvedi, V., Chaturvedi, S., 2005. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety
725 *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. Mol.
726 Microbiol. 55, 1782–1800.
727
728 Nathan, C., Cunningham-Bussel, A., 2013. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen
729 species. Nature Reviews Immunology 13, 349–361.
730
731 O'Riordan, D.M., Standing, J.E., Limper, A.H., 1995. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage
732 mannose receptors. Infect. Immun. 63, 779–784.
733
734 Pesanti, E.L., 1984. *Pneumocystis carinii*: oxygen uptake, antioxidant enzymes, and susceptibility to oxygen-
735 mediated damage. Infect. Immun. 44, 7–11.
736
737 Rhie, G.E., Hwang, C.S., Brady, M.J., Kim, S.T., Kim, Y.R., Huh, W.K., Baek, Y.U., Lee, B.H., Lee, J.S., Kang, S.O.,
738 1999. Manganese-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. Biochim. Biophys. Acta
739 1426, 409–419.
740
741 Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., Kinjo, T.,
742 Nakamura, K., Kawakami, K., Iwakura, Y., 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis*
743 *carinii* but not against *Candida albicans*. Nat. Immunol. 8, 39–46.
744
745 Shipley, T.W., Kling, H.M., Morris, A., Patil, S., Kristoff, J., Guyach, S.E., Murphy, J.E., Shao, X., Sciarba, F.C.,
746 Rogers, R.M., Richards, T., Thompson, P., Montelaro, R.C., Coxson, H.O., Hogg, J.C., Norris, K.A., 2010.
747 Persistent *Pneumocystis* colonization leads to the development of chronic obstructive pulmonary disease in a
748 nonhuman primate model of AIDS. J. Infect. Dis. 202, 302–312.
749
750 Steele, C., Marrero, L., Swain, S., Harmsen, A.G., Zheng, M., Brown, G.D., Gordon, S., Shellito, J.E., Kolls, J.K.,
751 2003. Alveolar Macrophage-mediated Killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* Involves Molecular Recognition
752 by the Dectin-1 -Glucan Receptor. Journal of Experimental Medicine 198, 1677–1688.
753
754 To, K.K.W., Hung, I.F.N., Xu, T., Poon, R.W.S., Ip, W.C.T., Li, P.T.W., Li, C.P.Y., Lau, S.K.P., Yam, W.-C., Chan, K.-H.,
755 Yuen, K.-Y., 2013. Clinical significance of *Pneumocystis jiroveci* in patients with active tuberculosis. Diagn.
756 Microbiol. Infect. Dis. 75, 260–265.
757
758 Venditti, P., Di Stefano, L., Di Meo, S., 2013. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species.
759 Mitochondrion 13, 71–82.
760
761 Xie, X.-Q., Wang, J., Huang, B.F., Ying, S.H., Feng, M.G., 2010. A new manganese superoxide dismutase
762 identified from *Beauveria bassiana* enhances virulence and stress tolerance when overexpressed in the fungal
763 pathogen. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 1543–1553.
764
765 Xie, X.Q., Li, F., Ying, S.H., Feng, M.G., 2012. Additive contributions of two manganese-cored superoxide
766 dismutases (MnSODs) to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. PLoS ONE 7, e30298.
767
768

Table 1: List of *S. cerevisiae* strains, plasmids and primers used

Strains, plasmids or primers	Genotype, description or sequence
EG103 (wild type)	<i>MATα leu2 his3 trp1 ura3</i>
EG110 (Δ <i>sod2</i>)	<i>MATα leu2 his3 trp1 ura3 sod2Δ::TRP1</i>
BY4742 (wild type)	<i>MATα his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>
pYES.1/ <i>Pcsod2</i>	pYES2.1/V5-His-TOPO [®] vector with <i>Pneumocystis carinii sod2</i> cDNA
pYES2.1/ <i>Scsod2</i>	pYES2.1/V5-His-TOPO [®] vector with <i>Saccharomyces cerevisiae sod2</i> cDNA
pYES2.1	pYES2.1/V5-His-TOPO [®] vector alone
EG110-Pc	EG110 strain transformed with the pYES2.1/ <i>Pcsod2</i>
EG110-Sc	EG110 strain transformed with the pYES2.1/ <i>Scsod2</i>
EG110-pYES	EG110 strain transformed with the pYES2.1
SODPc-43F	5'- AAAATGTTAAAGTCATTTAGAGATTTGGTT-3'
SODPc-44R	5'-TTGCTCAAATCGTTGATTCATAAC-3'
SODSc-45F	5'-AAA ATGTTTCGCGAAAACAGCAGCT-3'
SODSc-46R	5'-GATCTTGCCAGCATCGAATCTTCT-3'
Genes and gene products were named according the guidelines for opportunistic protists (Limper and Weiss, 2011). F: Forward primer; R: Reverse primer	

Table 2. Doubling times of wild type and transformed yeast strains submitted to oxidative stress

Strains	Doubling time (hours)		
	Without Menadione	Menadione 0.5mM	Menadione 1mM
EG103	3.72 ± 0.54	3.85 ± 0.14	3.77 ± 0.33
EG110-pYES	3.78 ± 0.09	Late growth	No growth
EG110-Pc	4.44 ± 1.17	4.16 ± 1.07	4.67 ± 0.82
EG110-Sc	4.09 ± 0.62	3.88 ± 0.39	3.93 ± 0.22

* Doubling times were determined during logarithmic growth in presence/absence of menadione (Figure 3) as follows: $\text{time} * (\ln 2 / (\ln(\text{final OD}/\text{initial OD})))$; the averages of 6 separate doubling times \pm standard deviations are presented. The doubling times of EG103, EG110-Pc and EG110-Sc were not significantly different from each other for each menadione concentration ($p > 0.05$; Kruskal-Wallis tests)

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

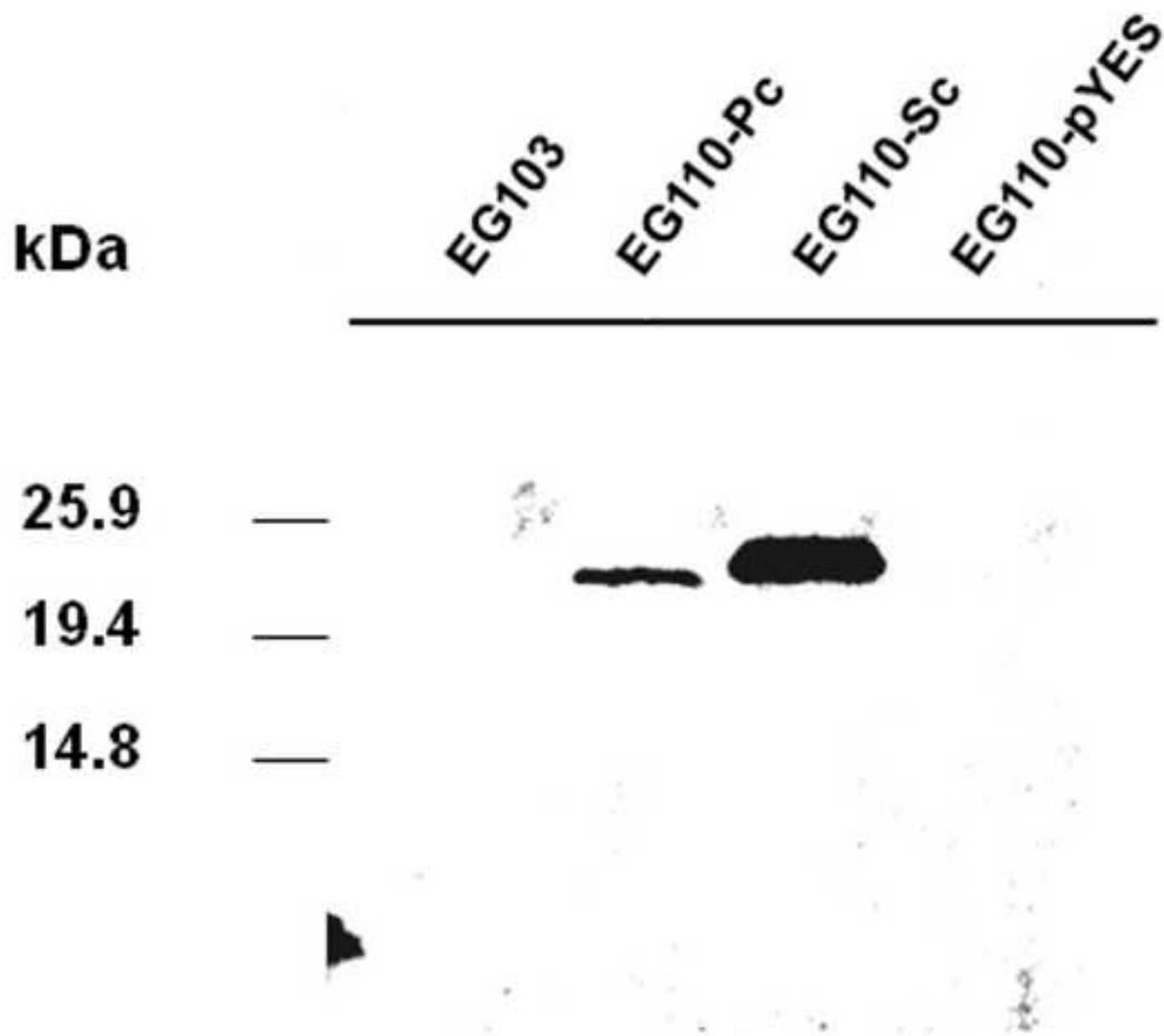


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

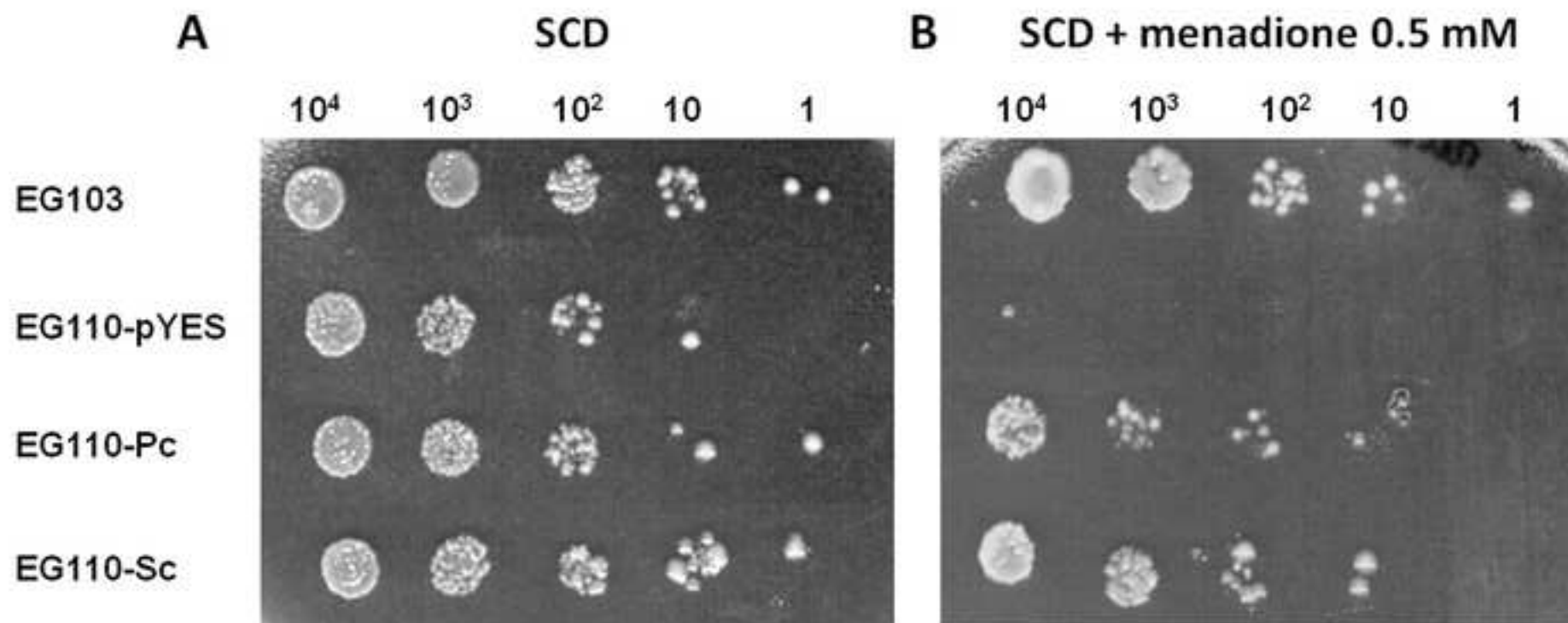


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

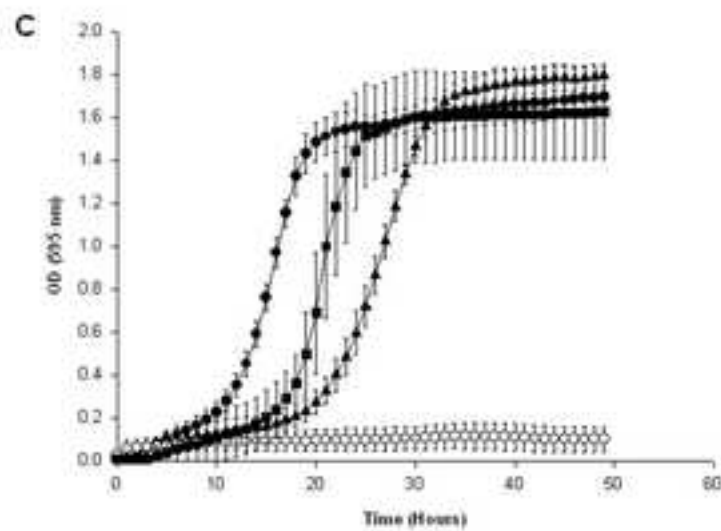
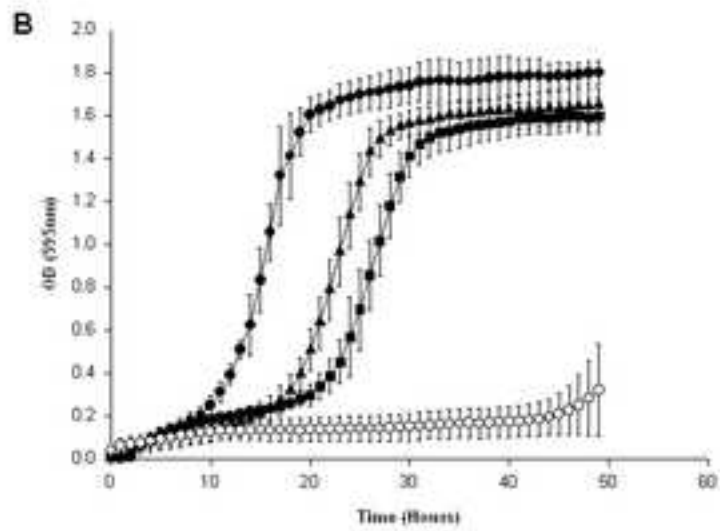
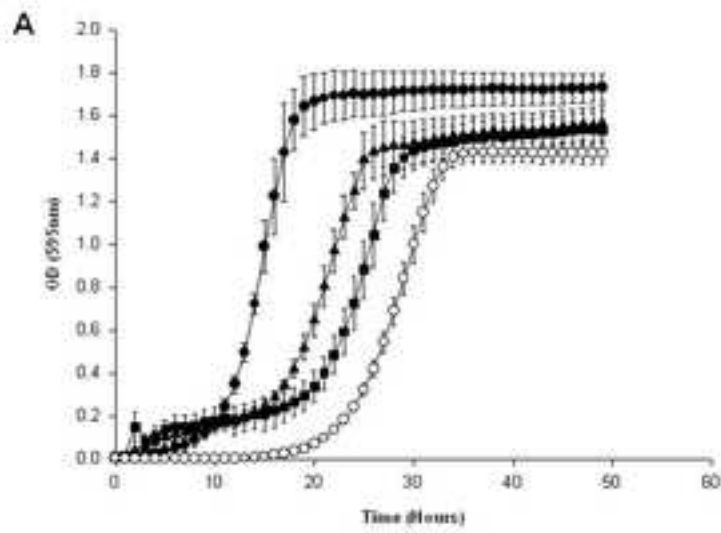


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

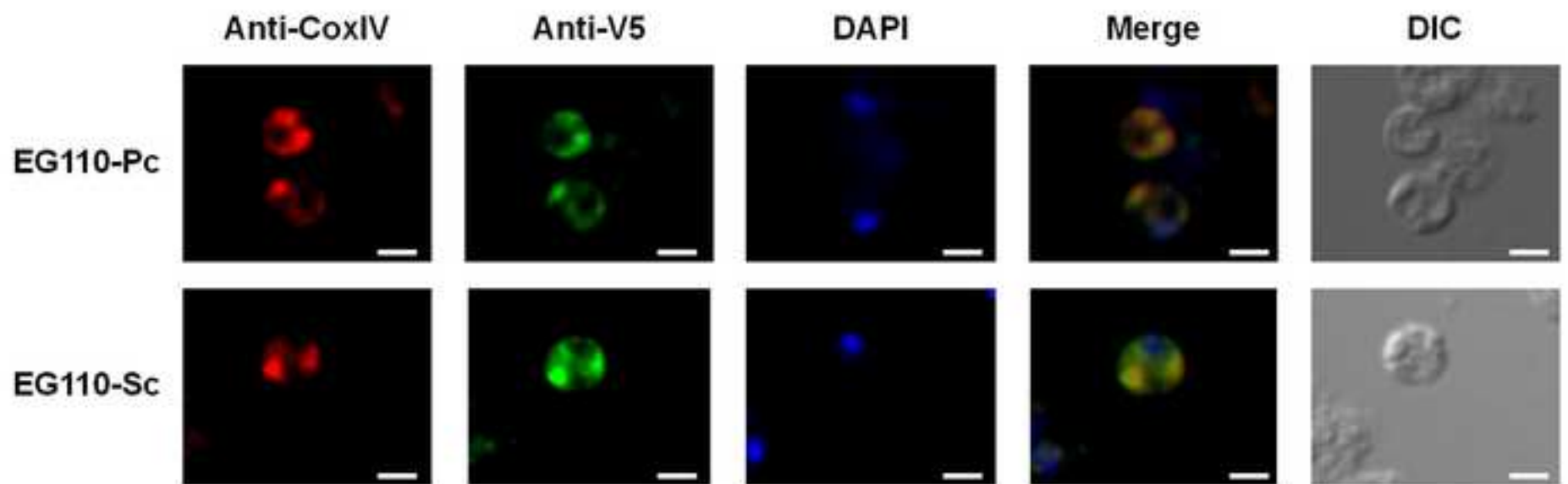


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

A

R-2 R-10

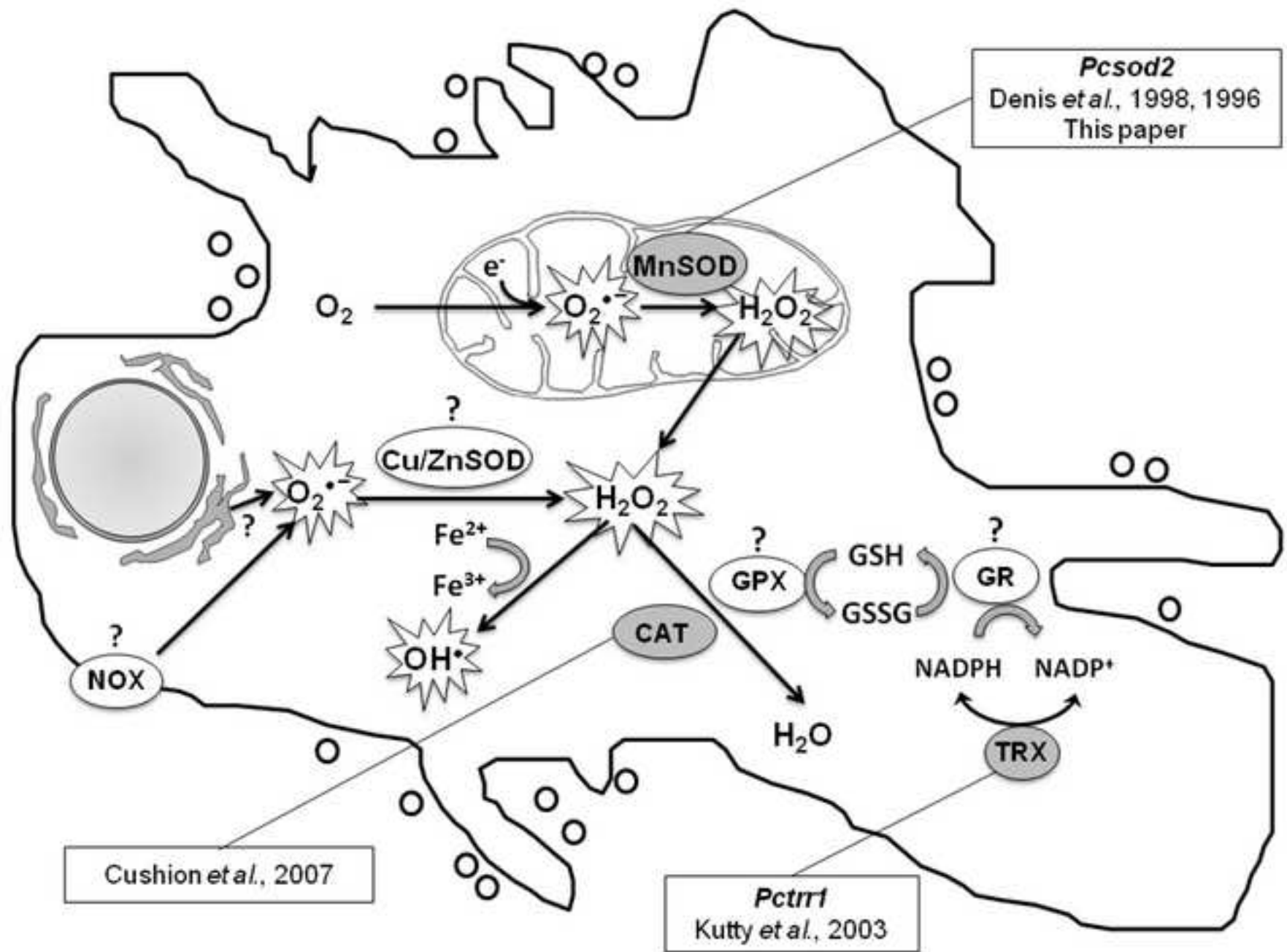
↓ ↓

MLKSF~~R~~DLVF~~K~~KTIKNS~~R~~FFSHSKHVLPSLPYDYQALEPY 40
LSADLIELHYNQHHRAYVTNLNKTIEKYYEGNESSLDSFI 80
NRLNLLTSIKFFAGGHI~~N~~HSLYWENLLPNKQGGGEIINGP 120
LVEAIKKEWKSVD~~E~~FI~~R~~IFNMQLAGIQGSGWAWLVKSPFS 160
QRLSIQITMNQDVVTQGKVI~~L~~GIDAW~~E~~HSYYVQYLNNKTK 200
YFENIWNVINWKVMNQRFEQ 220

B

FSHSHK~~H~~VLP~~S~~LPYDYQALEPY

Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)



Occurrence of *Pneumocystis jirovecii* colonization and predominance of *mtLSU* genotype 2 in patients with respiratory diseases in North Lebanon

Khalife S^{1,2}, Aliouat EM¹, Aliouat-Denis CM¹, Gantois N¹, Devos P³, Mallat H², Dei-Cas E^{1,4}, Dabboussi F², Hamze M², Fréalle E^{1,4}.

1. Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens (BDPEE), Pasteur Institute of Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Univ. Lille Nord de France, Lille, France
2. Health and Environment Microbiology Laboratory, AZM Center for Research in Biotechnology and its Application, Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Tripoli, Lebanon
3. Department of Research, Lille University Hospital, EA 2694, Lille, France
4. Parasitology-Mycology Laboratory of Lille University Hospital Center & Faculty of Medicine of Lille, Univ. Lille Nord de France, Lille, France

Running title: *Pneumocystis jirovecii* colonization in North Lebanon

Corresponding author: Dr Emilie Fréalle, Pasteur Institute of Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Inserm U1019, CNRS UMR 8204, University Lille-Nord de France, Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens, 1 rue du Pr Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France; Tel: +33 3 20 87 71 56, Fax: +33 3 20 87 78 88; email: emilie.frealle@pasteur-lille.fr

Abstract

Pneumocystis colonization may play a role in transmission and local inflammatory response. It was explored in patients with respiratory diseases in North Lebanon. Prevalence reached 5.2% (95% CI : [2.13 - 10.47]) in the whole population but it was higher in COPD patients (17.3%). COPD was the only factor associated with a significant increased risk of colonization. *mtLSU* genotyping revealed predominance of genotype 2, identified in 5 patients (71.4%), including 1 patient who had coinfection with genotype 3.

Keywords: *Pneumocystis* colonization, Lebanon, respiratory diseases, COPD, *mtLSU* genotype

Pneumocystis colonization (PC) occur in both immunocompetent and immunocompromised individuals, reaching 0-20% in the general population [1,2], 20-69% in HIV-infected [3] or 16-55% in chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) patients [1,3,4]. Colonized individuals may be at risk of developing PcP or serve as a reservoir for transmission [3]. Moreover, *Pneumocystis* may stimulate the host inflammatory response, lead to lung damage and play a role in the progression of lung diseases such as COPD [3].

In this study, which was approved by institutional review boards of the Lebanese university and of the different hospitals, PC was prospectively explored in 134 patients with respiratory diseases (33 rhinopharyngitis, 27 bronchitis, 23 COPD, 17 flu, 14 asthma, 8 respiratory infections, 4 pneumonia, 4 respiratory distress syndromes, 2 lung cancers, 1 fibrosis, 1 acute pulmonary oedema). Patients were enrolled from July 2012 to October 2013 in 4 hospitals of Tripoli (Tripoli governmental, Nini, al Mazloum, and el Monla hospitals) (n=108) and in local medical care centers (n=26). Collected samples included 56 oropharyngeal washes (OPW), 37 sputa, 15 tracheal aspirations, 14 bronchoalveolar lavages (BAL) and 12 nasal swabs. DNA extraction was performed using the Nucleospin tissue Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). *Pneumocystis* DNA was detected using a *mtLSU* nested-PCR assay [5]. Positive samples were sequenced and further processed to determine fungal load using a quantitative *mtLSU* PCR assay [6]. *P. jirovecii mtLSU* sequences were deposited in Genbank under accession nos. KM023735 to KM023742.

Nested-PCR assay was positive in 7 specimens from patients with COPD (n=4), rhinopharyngitis (n=1), bronchitis (n=1), and flu (n=1) (Table 1). Prevalence of PC reached 5.2% (95% CI : [2.13 - 10.47]), being in the same range as in Iran (7.3%), a neighboring country [7]. *mtLSU* qPCR confirmed *Pneumocystis* DNA detection for 6 out of 7 samples, with a 7.97 to 3.51.10⁴

copies/ μ L fungal burden (Table 1). The prevalence was similar in patients with rhinopharyngitis (3.0%), bronchitis (3.7%), and flu (5.9%), but it was higher in COPD patients (17.3%, Table 1), confirming previous data in this population [1,3,4] and potential occurrence of *Pneumocystis* in patients with flu [8]. *Pneumocystis* was not detected in patients with asthma, supporting a lower risk for colonization in these patients, despite previous reports of PcP association with asthma [9]. Surprisingly, no lung cancer patient was colonized, but only 2 patients were included. This low number of cancer patients, the absence of cystic fibrosis or interstitial lung diseases patients and the high number of patients with rhinopharyngitis, asthma or flu, could explain our lower overall prevalence when compared to previous studies in Spain (27.1% in lung cancer, cystic fibrosis, interstitial lung disease and COPD patients) [10], or in the UK (18% in patients with mainly lung cancer or pneumonia) [11]. As the prevalence of PcP in HIV-infected patients in Lebanon is low (10.9%) [12], the lower prevalence of PC in Lebanon and Iran could further be explained by a lower overall burden of *Pneumocystis* that could result from the influence of climatic factors [13]. Regarding the lower incidence of PcP among HIV Africans residing in the Netherlands when compared to Western patients [14], the role of genetic susceptibility would also be interesting to explore in Lebanese patients.

When potential risk factors and sample types were analyzed (Table 2), the frequencies were similar or lower in colonized patients for all the examined criteria, except sex-ratio and COPD. Since the low number of colonized patients induced a high risk of falsely supported null hypothesis, statistical analyses were only performed for these criteria. Fisher-Exact test revealed a significantly higher prevalence of PC in patients with COPD ($p=0.019$). But the higher proportion of males in the *Pneumocystis*-positive group was not statistically significant ($p=0.238$). However, this result could be due to a lack of statistical power and has thus to be

interpreted carefully. Nevertheless, *Pneumocystis* association with COPD confirmed a previous multivariate analysis which identified COPD as the only important predictor factor of colonization [15], contrarily to another study [11], but this last study included only subjects with very mild airway obstruction. Our study also confirmed that immunosuppressive treatment and cancer are not risk factors for PC [11]. Surprisingly, despite previous reports of association between corticotherapy and PC [2,11], this criteria did not appear as a risk factor in our study. This result, which supports data from Morris *et al.* [15], could be related to the low number of Lebanese patients undergoing corticotherapy in our study. Another specific feature of our population was the high frequency of smokers or passive smokers in both colonized and non-colonized individuals (100% and 81.5%, respectively), which supported previous data reporting smoking is not a risk factor for PC [15]. Lastly, the similar frequency of positivity of BAL, sputa, OPW and nasal swabs (Table 2) confirmed the usefulness of non-invasive samples for *Pneumocystis* detection [16].

mtLSU genotyping revealed predominance of genotype 2 (71.4%). One patient had coinfection with genotype 3. Genotype 1 was found in 2 patients (Table 1). Genotype 2 was also found to be predominant in Italy (39%) [17] and in Cuba (48%) [18]. But our results contrasted with Spanish and Brazilian studies, which reported a predominance of genotype 1 in patients with pulmonary diseases (45%) [10] and cystic fibrosis patients (41.6%) [19], respectively. Seasonal variation in the occurrence of *Pneumocystis* genotypes, which have been previously reported in the UK [20], were suggested by identification of most genotype 2 isolates during the dry season (June-September) whereas both patients with genotype 1 isolates had been sampled during the wet season (March-October) (Table 1).

To our knowledge, this is the first investigation of *Pneumocystis* carriage in Lebanon. These first data in North Lebanon confirm the circulation of *P. jirovecii* among patients with respiratory diseases and the potential for transmission to immunocompromised patients.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Pasteur Institute of Lille, University of Lille 2, “Centre National de la Recherche Scientifique” (CNRS), and “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (Inserm). SK was supported by PhD fellowship from the Azm & Saade Association from Lebanon.

Transparency declaration

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Nevez G, Magois E, Duwat H *et al.* Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. *Clin Infect Dis* 2006; 42: e99–101.
2. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M *et al.* *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 245–250.
3. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *pneumocystis* colonization. *J Infect Dis* 2008; 197: 10–17.
4. Calderón EJ, Rivero L, Respaldiza N *et al.* Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jiroveci*. *Clin Infect Dis* 2007; 45: e17–19.
5. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S *et al.* Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 43: 69–76.
6. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C *et al.* Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1531–1537.
7. Khodadadi H, Mirhendi H, Mohebbi M *et al.* *Pneumocystis jirovecii* Colonization in Non-HIV-Infected Patients Based on Nested-PCR Detection in Bronchoalveolar Lavage Samples. *Iran J Public Health* 2013; 42: 298–305.
8. Pulcini C, Houssein L, Mondain V, Baudin G, Roger P-M. Possible pandemic H1N1 influenza complicated by *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in an HIV-infected patient. *J Mycol Med* 2012; 22: 88–91.

9. Sy ML, Chin TW, Nussbaum E. *Pneumocystis carinii* pneumonia associated with inhaled corticosteroids in an immunocompetent child with asthma. *J Pediatr* 1995; 127: 1000–1002.
10. Montes-Cano MA, de la Horra C, Martin-Juan J *et al.* *Pneumocystis jiroveci* genotypes in the Spanish population. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 123–128.
11. Maskell NA, Waine DJ, Lindley A *et al.* Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax* 2003; 58: 594–597.
12. Naba MR, Kanafani ZA, Awar GN, Kanj SS. Profile of opportunistic infections in HIV-infected patients at a tertiary care center in Lebanon. *J Infect Public Health* 2010; 3: 130–133.
13. Varela JM, Regordán C, Medrano FJ *et al.* Climatic factors and *Pneumocystis jiroveci* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 770–772.
14. Schoffelen AF, van Lelyveld SFL, Barth RE *et al.* Lower incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among Africans in the Netherlands host or environmental factors? *AIDS* 2013; 27: 1179–1184.
15. Morris A, Sciruba FC, Lebedeva IP *et al.* Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 408–413.
16. Vargas SL, Pizarro P, López-Vieyra M *et al.* *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory sampling. *Clin Infect Dis* 2010; 50: e19–21.

17. Dimonte S, Berrilli F, D’Orazi C *et al.* Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infect Genet Evol* 2013; 14: 68–72.
18. Monroy-Vaca EX, de Armas Y, Illnait-Zaragozí MT *et al.* Prevalence and genotype distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban infants and toddlers with whooping cough. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 45–51.
19. Pederiva MA, Wissmann G, Friaiza V *et al.* High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Med Mycol* 2012; 50: 556–560.
20. Miller RF, Evans HER, Copas AJ, Cassell JA. Climate and genotypes of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 445–448.

TABLE 1. Characteristics of patient with *P. jirovecii* carriage: epidemiological, biological and clinical data; qPCR & *mtLSU* genotyping results

Patient identification	Localization	Date	Age	Sex	Sample type	Underlying respiratory disease or infection	Smoking habits	Other risk factors (cancer, immune deficiency, corticotherapy immunosuppressive treatment, antibiotherapy)	Microbiological findings	<i>P. jirovecii</i> real-time PCR (copies/ μ l)	<i>mtLSU</i> Genotype
O3	Nini hospital	11/07/13	57	M	Sputum	COPD SI	Yes	No	Neg	$7.97.10^0$	Mixture (2 & 3)
X3	Nini hospital	04/06/13	78	M	Nasal swab	COPD SIII	Yes	No	Neg	$3.95.10^1$	2
3	Nini hospital	30/10/12	75	F	OPW	COPD SIII	Yes	No	NA	$4.47.10^3$	1
V1	Monla hospital	12/09/13	75	M	Sputum	COPD SIII	Yes	No	NA	$9.71.10^0$	2
P3	Mazloum hospital	25/08/13	70	M	BAL	Flu	NA	No	Neg	Neg	2
50	Local medical care center	01/03/13	53	M	OPW	Rhinopharyngitis	Yes	No	Neg	$5.37.10^2$	1
2	Tripoli Governmental hospital	16/11/12	75	M	OPW	Acute bronchitis	Passive	No	NA	$3.51.10^4$	2

NA : not available ; COPD : Chronic Obstructive Pulmonary disease ; BAL : Bronchoalveolar Lavage ; OPW : Oropharyngeal wash ; *mtLSUrRNA* : mitochondrial large subunit ribosomal RNA.

TABLE 2. Comparison of patient localization, underlying respiratory diseases, other potential risk factors, and sample type between *P. jirovecii* colonized and non-colonized patients

		<i>P. jirovecii</i> DNA detected (n=7)	<i>P. jirovecii</i> DNA not detected (n=127)
Mean age		69.0 ± 9.9	51.0 ± 20.9
Sex ratio		6	1.3
Localization	Tripoli		
	Governmental hospital	1 (14.3%)	12 (9.4%)
	Nini	3 (42.8%)	66 (52.0%)
	Monla	1 (14.3%)	11 (8.7%)
	Mazloum	1 (14.3%)	13 (10.2%)
	Local medical care	1 (14.3%)	25 (19.7%)
Population characteristics	COPD*	4 (57.1%)	19 (14.9%)
	Acute bronchitis	1 (14.3%)	26 (20.5%)
	Pulmonary fibrosis	0 (0%)	1 (0.8%)
	Flu	1 (14.3%)	16 (12.6%)
	Rhinopharyngitis	1 (14.3%)	32 (25.2%)
	Asthma	0 (0%)	14 (11.0%)
	Pneumonia	0 (0%)	4 (3.1%)
	Respiratory infection	0 (0%)	8 (6.3%)
	Acute pulmonary oedema	0 (0%)	1 (0.8%)
	Respiratory distress syndrome	0 (0%)	4 (3.1%)
Other risk factors	Lung cancer	0 (0%)	2 (1.6%)
	Cancer	0 (0%)	16 (12.6%)
	Immune deficiency	0 (0%)	1 (0.8%)
	Corticotherapy	0 (0%)	5 (3.9%)
	Immunosuppressive treatment	0 (0%)	16 (12.6%)
Type of samples	Antibiotherapy	0 (0%)	10 (7.9%)
	OPW	3 (42.8%)	53 (41.7%)
	Sputum	2 (28.6%)	35 (27.5%)
	BAL	1 (14.3%)	13 (10.8%)
	Nasal swab	1 (14.3%)	11 (8.7%)
	Tracheal aspiration	0 (0%)	15 (11.8%)

BAL=Bronchoalveolar lavage, COPD=chronic obstructive pulmonary disease, OPW=oropharyngeal wash.

* Because the number of colonized patients was low, the statistical analyses were not performed for criteria with similar or lower frequencies in colonized and non-colonized patients. Among the risk factors tested (*i.e.* sex ratio and COPD), COPD was the only one associated with a significant increased risk of *Pneumocystis* colonization (p=0.019).

CURRICULUM VITAE

Sara Khalife

Date of birth: 1st of January, 1988

Nationality: Lebanese

Personal Address

En Nakhlé

Koura- Lebanon

☎ 00961-70557389

✉ sarsoura_k88@hotmail.com

Professional Address

Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL),

Pasteur Institute of Lille,

Biology and Diversity of Emergent Eukaryote Pathogens,

Inserm U1019, CNRS UMR 8204,

University of Lille II (North of France)

1 Street of Professor Calmette, BP 245,

59019 Lille cedex. France

EDUCATION

Lebanese University (Lebanon) and University of Lille 2 (France):

2011-2014: PhD. Co-directed thesis between the Lebanese University, AZM Center, Laboratory of Microbiology, Environment and Health in Lebanon and the University of Lille 2, Team of Biology and Diversity of Emergent Eukaryote Pathogens, Pasteur Institute of Lille in France.

Thesis title: "Host-*Pneumocystis* interactions: PcMnSOD functional study and evaluation of *Pneumocystis* spp colonization by experimental and clinico-epidemiological approaches". (Research Supervisor: Pr. EM. ALIOUAT).

2010-2011: Master's degree (M2R), "Medical Microbiology", with the distinction "Good". Lebanese University, AZM Centre, Laboratory of Microbiology, Environment and Health, Tripoli, Lebanon.

M2R project title: "Determination of fecal fungal colonization by quantitative PCR, relationship with serological markers in patients with Crohn's disease".

Lebanese University, faculty of Sciences, Lebanon:

2009-2010: Master degree (M1) in general biochemistry with the distinction "very good". Lebanese University faculty of sciences, Beyrouth, Lebanon.

2006-2009: BS in biochemistry at Lebanese University, faculty of sciences, Tripoli, Lebanon.

SCIENTIFIC TRAINING

March 2012: Practical training on BD FACS Calibur™ flow cytometer.

January 2012: Experimental animal models, Pasteur Institute of Lille, France.

November 2012: Biostatistics and bioinformatics, AZM center, Tripoli, Lebanon.

August 2012: Conception, development and using an online course, francophone Numeric Campus, Tripoli, Lebanon.

April - July 2011: Research trainee at “Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille CHRU”, Lille- France. Reference: sebastien.damiens@etu.univ-lille.fr. (Dr. Sébastien Damiens).

April - July 2011: Research trainee at “Centre de Biologie Pathologie CBP”, Lille-France. Reference: bsendid@univ-lille2.fr (Dr. Boualem Sendid).

TECHNICAL SKILLS

Laboratory techniques: Animal models (rats, mice), Blood sampling, organ extraction IV and IP injections, pharmacological treatment, drug testing.

Microbial culture techniques & cell Biology Techniques: Extraction of *P. carinii* organisms from infected animal lungs.

Protein biochemistry techniques: extraction and purification of protein. MALDI imaging mass spectrometry and analysis of endogenous peptides.

Immunological techniques: western blotting, immunofluorescence assay (IFA).

Molecular biology techniques: RNA & DNA (genomic / plasmid) extraction and purification, cDNA synthesis, PCR and Real time PCR (SYBR Green, TaqMan), cloning strategies, DNA sequencing.

Microscopic investigation: bases of microscopy, classical microscopy, transmission microscopy and fluorescence microscopy.

Computing skills: MS office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook), sequence analysis softwares (BLAST, Clustal), alignment of sequences (Bioedit, Seaview), phylogenetic analyses (Mr Bayes), Statistical analysis (Logician R), Endnote and Zotero.

Language skills: Arabic (native speaker), French (fluent), English (fluent).

MANAGEMENT EXPERIENCE

Supervised several students:

June-July 2012: Hélène Jakobczyk, Master 1.

March-May 2012: Aur  lie Lalau, B.Sc.

April-May 2012: François Demay, third year in Sciences.

PUBLICATIONS

Khalife et al., 2014. Relationship between *Pneumocystis carinii* colonization and the degree of host immunosuppression in an airborne transmission experimental model. PLOS Pathogens (In preparation).

Khalife et al., 2014. Complementation of a manganese-dependant superoxide dismutase-deficient yeast strain with *Pneumocystis carinii Sod2* gene. Journal of Fungal Biology (Published).

Khalife et al., 2014. Occurrence of *Pneumocystis jirovecii* colonization and predominance of *mtLSU* genotype 2 in patients with respiratory diseases in North Lebanon. Journal of Clinical Microbiology and Infection (submitted).

Chab  , M., **Khalife, S. et al. 2014.** An optimized end-point PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Pneumocystis* Spp. Medical Mycology (published).

Standaert A., Aliouat-Denis C.M., Pottier M., Martinez A., **Khalife S.** et al. 2014. SYTO  -13, a new viability marker as a tool to obtain in vitro pharmacodynamic parameters of anti-Pneumocystis drugs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (In preparation).

MEETING PARTICIPATIONS

Khalife, S., Hamze, M., Aliouat, EM. Relationship between *Pneumocystis carinii* colonization and the degree of host immunosuppression in an airborne transmission experimental model. (oral communication). International Workshops on Opportunistic Protists, Séville, Spain. (November 2014).

Khalife, S., Hamze, M., Aliouat, EM. Complementation of a manganese-dependant superoxide dismutase-deficient yeast strain with *Pneumocystis carinii Sod2* gene. (Oral communication). International Workshops on Opportunistic Protists, Séville, Spain. (November 2014).

Khalife, S., Hamze, M., Aliouat, EM. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with respiratory diseases in North Lebanon: frequency, risk factors and genotype distribution. (Oral communication). International Workshops on Opportunistic Protists, Séville, Spain. (November 2014).

Chabe, M., **Khalife, S.,** Audebert, C. An improved single-round PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Pneumocystis* spp. (Poster). International Workshops on Opportunistic Protists, Séville, Spain. (November 2014).

Standaert, A., Aliouat-Denis, CM., Martinez, A., **Khalife, S.**, Aliouat, EM. SYTO[®]-13, a new viability marker as a tool to monitor *in vitro* pharmacodynamic parameters of anti-*Pneumocystis* drugs. (Poster). International Workshops on Opportunistic Protists, Séville, Spain. (November 2014).

Khalife, S., Hamze, M., Aliouat, EM. Complementation of a manganese-dependant superoxide dismutase-deficient yeast strain with *Pneumocystis carinii* *Sod2* gene. (Oral communication). Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Reims, France (May 2014).

Khalife, S., Hamze, M., Aliouat, EM. Etude de la colonisation par *Pneumocystis carinii* en fonction du degré d'immunodépression dans un modèle naturel de transmission aérienne du microchampignon. (Oral communication). Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Reims, France (May 2014).

Khalife, S., Hamze, M., Aliouat, EM. Compréhension du cycle biologique de *Pneumocystis* spp, de sa transmission et du risque infectieux associé au statut immunitaire de l'hôte. (Poster). 13^{ème} Journée André Verbert (JAV), Faculty of medicine of Lille, France. (September 18, 2013).

REFERENCES

Pr. El Moukhtar ALIOUAT (Ph.D. Supervisor and University professor), CIIL, Pasteur Institute of Lille, Team of Biology Diversity of Emergent Eukaryote Pathogens, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, University Lille Nord de France, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France

☎ (+33) 3 20 87 71 57

Fax: (+33) 3 20 95 90 09

✉ elmoukhtar.aliouat-3@univ-lille2.fr

Dr. Eric VISCOGLIOSI (Ph.D. Supervisor and Head of laboratory), CIIL, Institut Pasteur of Lille, Team of Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, University Lille Nord de France, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France

☎ (+33) 3 20 87 79 61

Fax : (+33) 3 20 87 78 88

✉ eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

Dr. Cécile-Marie ALIOUAT-DENIS (Ph.D.) CIIL, Pasteur Institute of Lille, Team of Biology Diversity of Emergent Eukaryote Pathogens, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, University Lille Nord de France, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France.

☎ (+33) 3 20 87 71 57

✉ cecile.aliouat@univ-lille2.fr