

50 376
1992
216

62212

50376
1992
216

Université des Sciences et Techniques de Lille - Flandres - Artois

THESE
présentée par

N° d'ordre 971

François PALLUAULT

pour l'obtention du

Doctorat des Sciences de la Vie et de la Santé
de l'Université de Lille - Flandres - Artois

Etude Ultrastructurale et Cytochimique de
Pneumocystis carinii Delanoë et Delanoë, 1912.
Organisation Cellulaire et Implications dans la Synthèse Pariétale.



Soutenue le 29 Septembre 1992 devant le jury composé de :

MM. *Professeur Daniel CAMUS*
Docteur Eduardo DEI-CAS
Professeur André DHAINAUT

Professeur Marc MAZZUCA
Professeur Heinz MEHLHORN
Professeur Pierre De PUYTORAC

*A mes parents, Géraldine, ma famille,
et à Monsieur le Professeur M. DURCHON.*

Avant-propos :

Je remercie Monsieur le Professeur **Daniel CAMUS** pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son unité et pour avoir accepté la présidence de cette thèse.

A **Eduardo DEI-CAS** qui m'a permis de partager sa passion au sein de son groupe, je tiens à exprimer amicalement ma gratitude.

Je tiens tout particulièrement à remercier Messieurs les Professeurs **André DHAINAUT**, **Marc MAZZUCA**, **Heinz MEHLHORN** et **Pierre De PUYTORAC** de l'honneur qu'ils me font à accepter de faire partie de mon jury. Qu'ils soient assurés de mes sentiments les plus déférents.

Je remercie vivement **Christian SLOMIANNY** pour le temps qu'il a passé avec patience et au quotidien à ma formation de microscopiste, et sans qui ce travail n'aurait pu se réaliser. De même je tiens à remercier mon ami **Bruno PIETRZYK**, (actuellement ingénieur à l'école des Mines de Douai) qui, avec son enthousiasme inébranlable, a su m'initier au programme CATIA pour la réalisation de la reconstitution tridimensionnelle de *Pneumocystis carinii*. Je remercie chaleureusement **Jean-François DUBREMETZ** pour son aide, ses conseils précieux et efficaces, ainsi que pour ses encouragements constants.

Je remercie Madame **Jacqueline DEBETTE** et Monsieur le Professeur **Maurice PORCHET**, de m'avoir permis de découvrir le monde de l'enseignement à travers les travaux pratiques d'histologie à l'Institut Universitaire Technique.

Je remercie également le **Conseil Régional Nord-Pas de Calais** pour la confiance qu'il m'a accordé durant ces trois dernières années en m'accordant une bourse, me permettant de réaliser mon projet de recherche.



Etude ultrastructurale et cytochimique de *Pneumocystis carinii*
Delanoë et Delanoë, 1912.
Organisation cellulaire et implications dans la synthèse pariétale.

SOMMAIRE

Figures et tableaux	5
I. INTRODUCTION	7
A. Problématique en 1988	7
B. Historique.	10
C. Rapports hôte-parasite.	11
1. Physiopathologie	11
2. Déficits immunitaires favorisant la survenue d'une pneumocystose ..	12
D. Eléments de Biologie générale.	13
1. Description générale et cycles biologiques hypothétiques.	13
a. <i>P. carinii</i> de rat.	14
b. <i>P. carinii</i> humain.	15
2. Transmission.	16
3. Les modèles animaux.	16
4. La culture <i>in vitro</i>	17
5. Position taxonomique.	18
E. Organisation cellulaire	20
1. Les compartiments cytoplasmiques.	21
a. Le trophozoïte	21
(1). Les organites cytoplasmiques (21); (2). La membrane plasmique (22)	
b. Les prékystes	22
(1). Les organites cytoplasmiques (23); (2). La membrane plasmique (23)	
c. Les kystes et les corps intrakystiques	24
(1). Les organites cytoplasmiques (24); (2). La membrane plasmique (24)	
2. La paroi	24
a. Présentation générale.	24
b. Caractéristiques cytochimiques	26
(1). Etudes en microscopie optique. (26); (2). Etudes en microscopie électronique à transmission (MET). (29); (3). Etudes biochimiques. (30)	
3. La membrane externe	32
4. Activités enzymatiques	33
F. La fixation de <i>P. carinii</i> pour les études en MET	34

II. L'appareil de Golgi et le système lysosomal de <i>P. carinii</i> du lapereau.	37
A. Résumé.	37
B. Introduction	37
C. Matériels et méthodes	38
1. Modèle biologique	38
2. Préparation des échantillons pour études ultrastructurales en MET	38
3. Préparation des échantillons pour études cytochimiques en MET	38
a. Technique à l'iodure de zinc (IZO)	38
b. Inclusion en "London resin white" (LRW), résine hydrophile	39
c. Localisation de sites polysaccharidiques	39
(1). Réaction de Thiéry, OP-TSC-PA (39); (2). Lectines (40)	
d. Détection d'activités lysosomo-golgiennes	40
(1). Activité thiamine pyrophosphatase (TPPase) (41); (2). Activité cytidine monophosphatase (CMPase) (41); (3). Activité β -glycérophosphatase (β -GPase) (41)	
D. Résultats	41
E. Discussion	46
III. Reconstitution tridimensionnelle de <i>P. carinii</i> du lapereau. I. Le trophozoïte	50
A. Résumé.	50
B. Introduction	50
C. Matériels et méthodes	51
1. Modèle biologique	51
2. Préparation des échantillons pour la MET	51
3. Reconstitution tridimensionnelle	51
D. Résultats	52
E. Discussion	53
IV. Reconstitution tridimensionnelle de <i>P. carinii</i> du lapereau. II. Le prékyste intermédiaire	55
A. Résumé.	55
B. Introduction	55
C. Matériels et méthodes	56
D. Résultats	56
E. Discussion	57
V. Reconstitution tridimensionnelle et étude cytochimique de la mitochondrie de <i>P. carinii</i> du lapereau	59
A. Résumé.	59
B. Introduction	59
C. Matériels et méthodes	60
1. Modèle biologique	60
2. Préparation des échantillons pour la détection d'activité cytochrome <i>c</i> oxydasique.	60
D. Résultats	61
E. Discussion	63

VI. Influence de la pression osmotique sur la préservation du système endomembranaire de <i>P. carinii</i>. Inclusion en Epon	66
A. Résumé.	66
B. Introduction	66
C. Matériels et méthodes	68
1. Modèles biologiques	68
a. Lapereau	68
b. Souris	68
c. Rat	68
2. Préparation des échantillons pour études ultrastructurales en MET.	68
a. Osmolarité des fixateurs et solutions tamponnées	68
3. Contraste des échantillons par l'iodure de zinc (IZO).	69
D. Résultats	69
E. Discussion	70
VII. Influence de la pression osmotique sur la préservation du système endomembranaire de <i>Pneumocystis carinii</i> inclus en London resin white. L'appareil de Golgi et la synthèse de la paroi	73
A. Résumé.	73
B. Introduction	73
C. Matériels et méthodes	74
1. Modèles biologiques	74
2. Préparation des échantillons pour la MET.	75
a. Fixateurs et inclusion sous forte pression osmotique	75
b. Colorations	75
3. Localisation de sites polysaccharidiques.	76
4. Localisation de sites reconnus par la streptavidine.	76
5. Immunolocalisation	76
D. Résultats	77
E. Discussion	78
VIII. SYNTHÈSE et DISCUSSION.	81
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.	87
X. ARTICLES.	97
XI. RESUME / SUMMARY.	123

ABREVIATIONS & ANGLICISMES

- Ac: acétyl.
BGP/BGPase: β -glycérophosphate/ β -glycérophosphatase.
BPA: lectine extraite de *Bauhinia purpurea*.
BSA: albumine de sérum bovin.
CATIA: Conception Assistée Tridimensionnelle Inter Active, Dassault systèmes.
CMP/CMPase: cytidine monophosphate/cytidine monophosphatase.
Con A: lectine extraite de *Concanavalia ensiformis*.
CIK: corps intrakystique.
DBA: lectine extraite de *Dolichos biflorus*.
DAB: diaminobenzidine.
DHFR: dihydrofolate réductase.
DMSO: diméthylsulfoxyde.
Gal: galactosamine.
Glc: glucosamine.
GS-I: lectine extraite de *Griffonia simplicifolia*.
GS-II: " " " *Griffonia simplicifolia*.
Ig: immunoglobuline.
IZO: réactif comprenant de l'iodure de zinc et du tétr oxyde d'osmium.
kDa: kilodalton.
kV: kilovolts.
LFA: lectine extraite de *Limax flavus*.
LBA: lavage bronchoalvéolaire.
LRW: résine hydrophile London Resin White.
mOsm: milliosmoles.
MPA: lectine extraite de *Maclura pomifera*.
MET: microscopie électronique à transmission.
OP-TCH-PA: oxydation périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent.
OP-TSC-PA: oxydation périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent.
PABA: acide para-aminobenzoïque.
PBS: tampon phosphate salin.
PNA: lectine peanut agglutinin extraite de *Arachis hypogaea*.
PPC: pneumonie à *Pneumocystis carinii*.
PVP: polyvinyl pyrrolidone.
PWMc: pockweed mitogen.
RE: réticulum endoplasmique.
REG: réticulum endoplasmique granulaire.
REL: réticulum endoplasmique lisse.
SBA: lectine soybean agglutinin extraite de *Glycine max*.
SCID: severe combined immunodeficiency: déficience congénitale en lymphocytes B et T.
SE: saccule endoplasmique.
SIDA: syndrome d'immunodéficienc e acquise.
STA: lectine extraite de *Solanum tuberosum*.
TOL: Tomato lectin.
TPP/TPPase: Thiamine pyrophosphate/Thiamine pyrophosphatase.
TS: thymidylate synthétase.
UEA-I: lectine extraite de *Ulex europaeus*.
VAA: lectine extraite de *Viscum album*.
VIH: virus de l'immunodéficienc e humaine.
WGA: lectine wheat germ extraite de *Triticum vulgare*.
3-D: tridimensionnelle.

Figures et tableaux :

Figure I.1: Cycle de <i>P. carinii</i> de rat (Yoshida, 1989)	15
Figure I.2: Cycle de <i>P. carinii</i> chez l'homme (Campbell, 1972)	16
Figure I.3: Dessin de la structure fine de <i>P. carinii</i> de rat (Yoshida, 1989)	20
Figure II.1: Ultrastructure de <i>P. carinii</i> du lapin.	41
Figure II.2: Ultrastructure de <i>P. carinii</i> traité au réactif IZO.	43
Figure II.3: Mise en évidence de polysaccharides par l'OP-TSC-SP.	44
Figure II.4: Détection de polysaccharides reconnus par la Con A.	45
Figure II.5: Localisation d'activités phosphatasiques	46
Figure III.1: Technique de reconstruction 3-D	51
Figure III.2: Coupes sériées d'un petit trophozoïte de <i>P. carinii</i> du lapin	52
Figure III.3: Reconstruction 3-D d'un petit trophozoïte (4 vues)	53
Figure III.4: Reconstruction 3-D d'un petit trophozoïte	54
Figure IV.1: Coupes sériées d'un prékyste intermédiaire binucléé de <i>P. carinii</i> du lapin	56
Figure IV.2: Reconstruction 3-D d'un prékyste intermédiaire binucléé	57
Figure IV.3: Reconstruction 3-D du SE2 et des vésicules golgiennes	58
Figure V.1: Reconstruction 3-D de la mitochondrie de <i>P. carinii</i> du lapin	61
Figure V.2: Activité cytochrome oxydase dans les alvéoles pulmonaires parasitées	62
Figure V: Chaîne de transfert des électrons/sites de réaction de la cytochrome oxydase	62
Figure V.3: Activité cytochrome oxydase de <i>P. carinii</i> du lapin	63
Figure V.4: Echantillons contrôles	64
Figure VI.1: Influence de l'osmolarité sur la préservation ultrastructurale	69
Figure VI.2.A: Ultrastructure de <i>P. carinii</i> fixé et lavés sous une tonicité de 870 mOsm	69
Figure VI.2 B et C: (suite)	70
Figure VI.2.D et E: (suite)	71
Figure VI.3: <i>P. carinii</i> fixé et lavé sous une tonicité de 870 mOsm et postfixé à l'IZO	72
Figure VII.1: Marquage de <i>P. carinii</i> de souris SCID par la streptavidine-Au10	77
Figure VII.2: Marquage de l'appareil de Golgi de <i>P. carinii</i> de souris SCID par la Con A-Au20 ..	78
Figure VII.2: Marquage de <i>P. carinii</i> de souris SCID par la SBA-Au10 et L'UEA I-Au10	79
Figure VII.3: Immunolocalisation sur <i>P. carinii</i> de souris SCID	80
Figure VIII.1: Cycle de <i>P. carinii</i> du lapin.	81
Figure VIII.2: Organisation du système endomembranaire d'une cellule eucaryote	82
Figure VIII.3: Evolution du système endomembranaire et de la paroi de <i>P. carinii</i>	84
Figure VIII.4: <i>P. carinii</i> et le système avidine-biotine	85
Tableau I.1: Polysaccharides, lectines et paroi parasitaire	27
Tableau I.2: Antigènes de <i>P. carinii</i> et sérums polyclonaux	31
Tableau I.3: Antigènes de <i>P. carinii</i> et anticorps monoclonaux	32

L'ensemble des travaux exposés dans ce manuscrit a donné lieu aux publications suivantes:

Palluault F., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B., Camus D. 1990. Golgi complex and lysosomes in rabbit derived *Pneumocystis carinii*. *Biol. Cell* **70**: 73-82.

Dei-Cas E., Soulez B., **Palluault F.**, Charet P., Camus D. 1990. *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. *Médecine/Sciences* **6**: 517-525.

Palluault F., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Camus D. 1991a. 3-D reconstruction in Parasitology. *Parasitol. Today* **7(8)**: 125-217.

Palluault F., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B., Camus D. 1991b. Three-dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii*. I. Trophozoite. *J. Protozool.* **38(4)**: 402-407.

Palluault F., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B., Camus D. 1991c. Three-dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii*. II. Intermediate precyst. *J. Protozool.* **38(4)**: 407-411.

Soulez B., Dei-Cas E., **Palluault F.**, Camus D. 1991a. Morphological evaluation of *Pneumocystis carinii* after extraction from infected lung. *J. Parasitol.* **77(3)**: 449-453.

Soulez B., **Palluault F.**, Cesbron J, Dei-Cas E., Capron A., Camus D. 1991b. Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice. *J. Protozool.* **38(6)**: 123S-125S.

Soulez B., **Palluault F.**, Dei-Cas E., Aliouat E., Camus D. 1991c. Production of monoclonal antibody using lymphocytes from *Pneumocystis* infected mice. *J. Protozool.* **36(8)**: 189S-190S.

Dei-Cas E., Jackson H., **Palluault F.**, Aliouat E., Hancock V., Soulez B., Camus D. 1991. Ultrastructural observations on the attachment of *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *J. Protozool.* **38(6)**: 205S-207S.

Dei-Cas E., Caillez J., **Palluault F.**, Aliouat E., Mazars E., Soulez B., Suppin J., Camus D. 1992. Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent? *Eur. J. Clin. Epidemiol.* **Sous presse**.

Palluault F., Slomianny C., Soulez B., Dei-Cas E., Camus D. 1992a. High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embedding. *Parasitol. Research.* **Sous presse**.

Palluault F., Soulez B., Slomianny C., Dei-Cas E., Cesbron J.-Y., Camus D. 1992b. High osmotic pressure for *Pneumocystis carinii* LR White embedding enables fine ultrastructural and immunocytochemical studies. I. Golgi complex and cell wall synthesis. *Parasitol. research.* **Sous presse**.

Palluault F., Slomianny C., Pietrzyk B., Soulez B., Dei-Cas E., Camus D. 1992c. Three-dimensional and cytochemical study of the mitochondrion of rabbit-derived *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **Soumis**.

I. INTRODUCTION

A. Problématique en 1988.

Les années 80, avec la pandémie de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), ont ramené *Pneumocystis carinii* Delanoë et Delanoë, 1912, au premier rang des pathogènes opportunistes. En effet, ce parasite déclenche une pneumopathie grave qui est l'une des causes majeures de mortalité chez les patients sidéens (Walzer, 1989).

P. carinii a donc suscité un regain d'intérêt qui s'est traduit par de nombreux travaux fondamentaux grâce aux modèles animaux. Ces modèles, essentiellement des rats immunodéprimés artificiellement, ont permis d'entreprendre de nombreuses études morphologiques de ce parasite *in vivo*, visant à définir les diverses formes parasitaires, leur organisation cellulaire et le cycle biologique. L'extraction des parasites à partir des poumons a été entreprise pour compléter ces études morphologiques, pour réaliser des études biochimiques et cytochimiques et les essais de mise en culture en milieu axénique ou non.

Il ressort de ces études fondamentales de nombreux problèmes. En effet, aucun système d'extraction du parasite de son environnement pulmonaire ne permet d'obtenir des extraits purs, et aucun argument ne permet d'affirmer que ces extraits sont viables. La mise en culture du parasite reste donc difficile, et à ce jour, aucun système ne permet de maintenir plus de huit jours ce parasite *in vitro*. Les études optiques révèlent des formes parasitaires à paroi fine et à paroi épaisse, peu sensibles aux réactifs mettant en évidence la présence de polysaccharides. La quasi totalité des approches ultrastructurales réalisées sur des échantillons *in vivo* et *in vitro*, nécessaires à une analyse fine du système endomembranaire de ce parasite de très petite taille (de l'ordre du micromètre pour ses formes les plus petites), révèle une énorme difficulté technique pour préserver les structures fines cytosoliques, se traduisant par une extraction partielle et le plus souvent totale du contenu cytoplasmique. Bien que de nombreuses techniques de préservation et d'inclusion des structures parasitaires en résine hydrophobe aient été testées pour des études

ultrastructurales, aucune à ce jour ne s'est révélée satisfaisante. De même, aucune technique de fixation et d'inclusion de *P. carinii* en résine hydrophile n'a été développée pour maintenir les structures membranaires et cytosoliques. L'emploi à l'échelle ultrastructurale des diverses sondes existantes (anticorps spécifiques ou lectines), nécessaires à la définition non seulement des composés et activités parasitaires impliqués dans le métabolisme parasitaire de base, mais aussi à celle des rapports hôtes-parasite, en particulier dans la phase d'attachement spécifique des trophozoïtes aux pneumocytes de type I, est hasardeux et les résultats sont difficiles à interpréter. Ces difficultés techniques sont vraisemblablement à l'origine du manque de données sur la biologie cellulaire de ce parasite, biologie qui reste peu connue et souvent sujet à controverses.

L'obtention des parasites se fait principalement à partir de poumons d'animaux parasités. Les modèles animaux (essentiellement le rat) ne développent une pneumonie à *Pneumocystis carinii* (PPC) que sous l'influence d'une immunodépression artificielle induite par administration de corticoïdes, limitant l'analyse des processus immunologiques sous-jacents au développement de la PPC.

Les difficultés, d'une part à obtenir des données morphologiques, cytochimiques, biochimiques, génétiques et taxonomiques, et d'autre part l'impossibilité d'extraire des parasites viables et à les maintenir en culture avec les techniques usuelles, ont fait apparaître *P. carinii* comme un défi pour les biologistes.

Dans ce contexte, nous avons entrepris une étude morphologique sur *Pneumocystis carinii* de lapereau, modèle développant une pneumocystose spontanée au sevrage sans administration de corticoïdes (Soulez et coll., 1989). La description ultrastructurale de ce parasite *in vivo* et *in vitro* n'a pas été rapportée. Les faibles dimensions du parasite, en particulier celles des trophozoïtes, et les limites de résolution du microscope optique, nous ont amené à n'envisager que l'approche ultrastructurale en microscopie électronique à transmission (MET) pour étudier l'organisation cytoplasmique parasitaire. Nous nous sommes donc attachés à:

- rechercher les meilleures conditions de préservation du parasite pour une

-
- étude morphologique ultrastructurale fine des différents stades parasites;
- rechercher la présence de polysaccharides pariétaux par des études cytochimiques (réactif de Thiéry, lectines);
 - rechercher un appareil de Golgi et détecter des activités lysosomales et golgiennes, qui n'ont jamais pu être mis en évidence dans les études antérieures;
 - redéfinir de façon fine le système endomembranaire de *P. carinii* au moyen de coupes sériées du parasite et d'une reconstruction tridimensionnelle assistée par ordinateur;
 - établir un cycle biologique pour *P. carinii* du lapin, et à le comparer avec ceux proposés pour les parasites provenant d'autres modèles;
 - proposer une évolution du système endomembranaire dans les différents stades;
 - apporter des précisions sur les données controversées concernant la mitochondrie;
 - mettre au point une technique d'inclusion en résine hydrophobe (Epon 812) et hydrophile (London resin white) pour *P. carinii* de lapin, de souris et de rat, permettant:
 - de compléter l'analyse fine du système endomembranaire parasite;
 - d'établir les relations entre l'appareil de Golgi et le développement de la paroi;
 - l'utilisation fine des sondes anticorps.

B. Historique.

Pneumocystis carinii a été observé pour la première fois en 1909 par Carlos Chagas dans le poumon de cobaye infesté par *Trypanosoma sp.*. Antonio Carini, en 1910, le retrouve chez des rats infestés par *Trypanosoma lewisi*. Les deux auteurs pensaient alors que les formes kystiques qu'ils avaient découvertes correspondaient à un nouveau stade dans le cycle biologique des trypanosomes. En 1912, P. Delanoë et M. Delanoë rapportent la présence du parasite chez le rat non infesté par *Trypanosoma sp.*, et décrivent alors cet organisme comme une nouvelle entité, affirment son tropisme pulmonaire et le nomment *P. carinii*, en l'honneur d'Antonio Carini.

Sa présence dans le poumon humain a été rapportée pour la première fois en 1942, en Hollande par Van der Meer et Brug (Dei-Cas et coll., 1990a). Dans les années 40, une forme particulière de pneumonie fût décrite chez les prématurés, les enfants malnutris des orphelinats et des hospices de l'Europe centrale et de l'Est durant et après la seconde guerre mondiale (Gajdusek, 1957).

Les premières images ultrastructurales de *P. carinii* n'apparaissent qu'à partir de 1954 (Dieckmann et coll., 1954). A ce jour, plus d'une d'une centaine d'articles sur l'ultrastructure de *P. carinii* ont été rapportés, combinant les rapports de cas cliniques avec les études morphologiques, cytochimiques, immunologiques et biochimiques.

Au cours des années 60-70, *P. carinii* a été reconnu comme une cause majeure de pneumonie chez les patients immunodéprimés. Les groupes à risques étaient les enfants avec une immunodéficience congénitale et les patients de tous âges, recevant des doses importantes de corticoïdes ou d'autres agents immunosuppresseurs, pour le traitement des cancers, au cours de transplantations et de greffes d'organes.

A partir des années 80, *P. carinii* est reconnu comme l'agent responsable de la parasitose la plus fréquente rencontrée au cours du SIDA. 60 à 80 % des patients font une pneumopathie à *P. carinii* (PPC) au cours de l'évolution de leur infection: cette pneumonie est la cause principale de décès chez 25 % de ces patients (Hughes, 1987). De plus, cette parasitose occupe une place non négligeable en dehors du contexte du SIDA. En effet,

durant ces dernières années, une augmentation très importante du nombre de patients développant une PPC en dehors de toute infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été enregistrée (Dei-Cas et coll., 1990a).

C. Rapports hôte-parasite.

1. Physiopathologie.

P. carinii est fréquemment retrouvé à l'état saprophyte dans les poumons de mammifères sains, y compris chez l'homme (Walzer, 1984). Il n'a, à l'heure actuelle, pas été retrouvé dans le milieu extérieur. Son habitat préférentiel est l'alvéole pulmonaire dans laquelle les trophozoïtes s'attachent spécifiquement et très étroitement aux pneumocytes de type I. La substance active de surface (surfactant) qui recouvre l'épithélium pulmonaire et dont le rôle principal est d'atténuer les tensions de surface à l'interface eau-air (Rooney, 1985), aurait un rôle important dans la biologie du parasite (Sheehan et coll., 1986). Les pneumocytes de type I ont un rôle mineur dans la synthèse et la régénération du surfactant; ce rôle est attribué aux pneumocytes de type II (Walzer, 1984).

Même si plusieurs cas de pneumocystose ont été décrits chez des hôtes apparemment sains (Diekmann et coll., 1954; Frenkel, 1976; Pifer et coll., 1978; Stagno et coll., 1980), la pneumocystose survient le plus souvent chez des sujets profondément immunodéprimés.

Le premier contact avec *P. carinii* survient le plus souvent tôt dans la vie (Pifer et coll., 1978), et, la majorité des adultes en dehors de toute infection par *P. carinii* ont des immunoglobulines G (IgG) dirigées contre le parasite. Plusieurs études rapportent l'apparition d'anticorps anti-*P. carinii* chez les enfants, entre deux et quatre ans (Hughes, 1987), ne développant pas de PPC apparente et ne présentant aucun syndrome d'immunodépression détectable. L'apparition d'une pneumocystose, presque exclusivement liée à un état d'immunodépression, pourrait donc résulter de la réactivation du parasite présent à l'état latent dans le poumon des enfants ou de l'adulte sain.

2. Déficiences immunitaires favorisant la survenue d'une pneumocystose.

Si les pathologies conditionnant la transformation pathogène de *P. carinii* sont bien connues (SIDA, greffe, hémopathies, traitements immunomodulateurs), les rapports entre le parasite et l'hôte sain d'une part et les mécanismes responsables de la prolifération pulmonaire du parasite chez l'hôte immunologiquement affaibli d'autre part, ont été peu étudiés.

La réponse à médiation cellulaire joue un rôle primordial dans la défense de l'organisme contre *P. carinii*. En effet, un taux de lymphocytes CD4 inférieur à $250/\text{mm}^3$ dans le sang, est considéré comme un facteur de risque de PPC au cours du SIDA chez l'adulte (Masur et coll., 1989). Cependant, l'enfant infecté par le VIH ou les patients atteints par une autre maladie du système immunitaire et développant une PPC, ont souvent un taux de CD4 supérieur à $250/\text{mm}^3$ (Leibovitz et coll., 1990).

Des anticorps sériques anti-*P. carinii* sont fréquemment détectés chez les individus en absence de toute infection. Au cours de la PPC leur taux diminue le plus souvent. Les anticorps spécifiques sont retrouvés complexés à la surface du parasite (Hughes, 1987; Soulez et coll., 1989). Le transfert passif d'un anticorps monoclonal anti-*P. carinii* chez des furets infectés provoque un ralentissement dans l'évolution de l'infection (Gigliotti et Hughes, 1988). Les souris athymiques, sensibles à *P. carinii*, ne développent pas d'anticorps anti-*Pneumocystis*. La réponse humorale semble donc être un mécanisme effecteur actif contre le parasite. Ces animaux sont partiellement protégés par le transfert passif de lymphocytes T qui réactivent alors la production d'IgG (Furuta et coll., 1984).

La présence d'un infiltrat macrophagique dans les poumons infectés, les images de phagocytose de parasites observées *in vivo* et *in vitro* et la supériorité des corticoïdes sur la cyclosporine pour induire une pneumocystose chez le rat (Hughes, 1982), illustrent l'importance des mécanismes non spécifiques dans la défense de l'hôte vis-à-vis du parasite. En effet, la cyclosporine agissant principalement sur les lymphocytes CD4, n'affaiblit pas les phénomènes de phagocytose du parasite par les macrophages, alors que les corticoïdes qui inhibent de manière globale les systèmes de défense, activent la

prolifération des parasites.

Des facteurs non immunitaires, comme la composition du surfactant, pourraient aussi favoriser l'expression de la virulence du parasite. Chez le rat, les corticoïdes induisent une augmentation du taux de phospholipides dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA) (Kernbaum et coll., 1983); ce taux diminue au cours de la pneumocystose (Kernbaum et coll., 1983; Sheehan et coll., 1986). La présence intercurrente d'autres agents infectieux, tel le cytomégalovirus, a fait évoquer des interactions possibles entre *P. carinii* et ce micro-organisme, favorisant l'expression de la virulence parasitaire (Ernst et coll., 1983); toutefois, l'absence d'une intervention de facteurs immunitaires dans une infection concomitante semble peu probable.

D. Eléments de Biologie générale.

1. Description générale et cycles biologiques hypothétiques.

De nombreuses études ultrastructurales, réalisées sur des poumons humains ou d'animaux infestés par *P. carinii*, ont permis de différencier trois stades majoritairement représentés: le trophozoïte, le prékyste et le kyste.

le **trophozoïte**, encore appelé forme végétative, uninucléé, mesurant de 2 à 8 μm de diamètre, est délimité par une membrane cellulaire aux contours améboïdes, sur laquelle repose une couche pelliculaire dense aux électrons.

le **prékyste**, mesure de 3 à 5 μm de diamètre et présente une forme ovoïde.

Trois formes peuvent être observées:

- i/ le prékyste précoce, uninucléé, pouvant présenter des complexes synaptonémaux (structures des régions d'appariement des chromosomes homologues permettant leur alignement durant la prophase de première division méiotique, zygotène et pachytène) (Matsumoto et Yoshida, 1984), avec une paroi similaire à celle des trophozoïtes.
- ii/ le prékyste intermédiaire, présentant de 2 à 8 noyaux. Une couche intermédiaire peu dense aux électrons vient s'intercaler entre la membrane

cellulaire et la couche dense externe.

iii/ le prékyste tardif, présentant une paroi plus épaisse, qui délimite un cytoplasme dans lequel vont s'individualiser les 8 corps intrakystiques uninucléés (CIK), par invagination de la membrane plasmique prékystique. le kyste, mesurant 4 à 6 μm de diamètre, avec une paroi similaire à celle des prékystes intermédiaires et tardifs, contient huit CIK bien individualisés, uninucléés, qui exkystés, se développent en trophozoïtes.

Plusieurs cycles hypothétiques sont actuellement proposés à partir d'études ultrastructurales menées sur différents hôtes.

a. *P. carinii* de rat.

De nombreuses études, menées sur le rat immunodéprimé par administration de corticoïdes, ont permis de proposer un cycle hypothétique (Yoshida, 1989), résumé dans la figure I.1 ci-après. La rupture de la paroi des kystes arrivés à maturité libérerait les CIK qui se développeraient en trophozoïtes haploïdes et pourraient alors rétablir la diploïdie par copulation. Ce serait cette forme diploïde qui évoluerait vers la forme prékystique précoce où peuvent être observés les complexes synaptonémaux se formant lors de la prophase de première division méiotique. Le noyau diploïde subirait une division méiotique conduisant à la formation de huit noyaux haploïdes. La formation des huit CIK se ferait par invagination de la membrane plasmique prékystique autour de chacun des huit noyaux. Trois formes de CIK peuvent être observées: sphériques, en "forme de banane", ou améboïde.

A ce cycle sexué s'ajouterait un cycle asexué impliquant les formes trophozoïtes haploïdes et/ou diploïdes qui se multiplieraient par fission binaire et/ou par endodiogénie amenant à la formation de huit trophozoïtes bien développés.

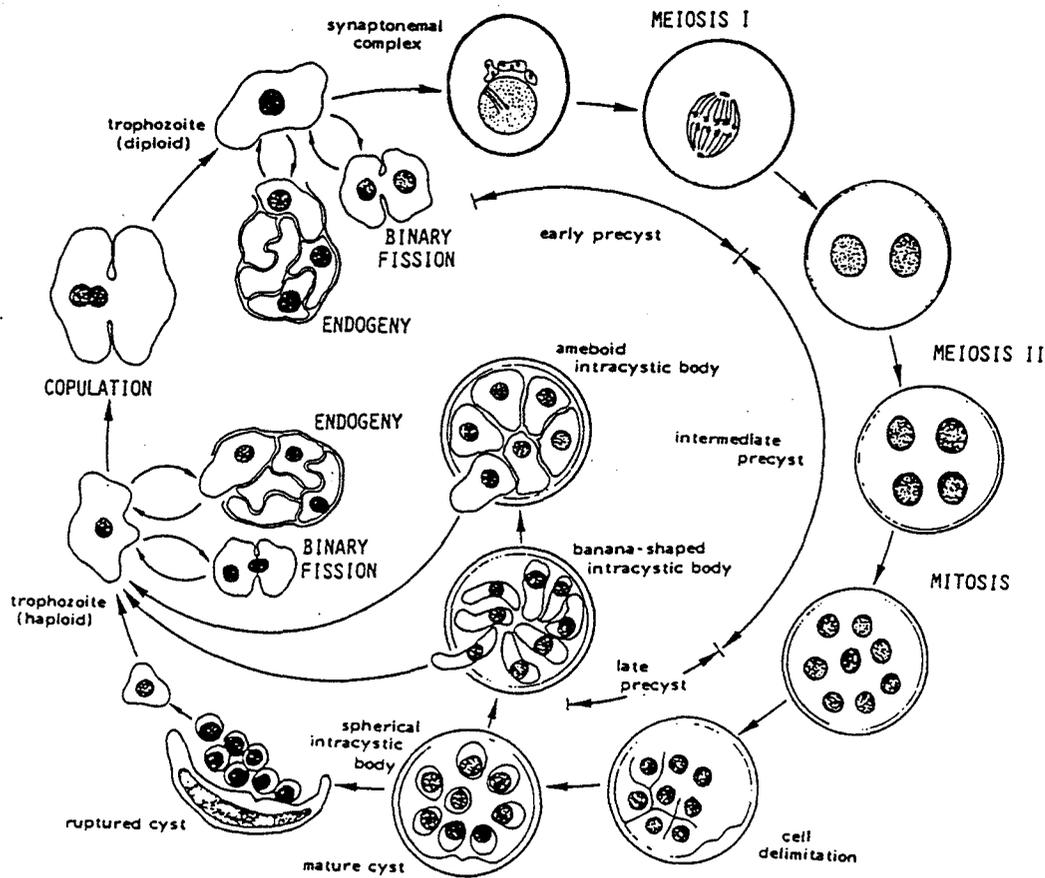


Figure I.1:

Cycle hypothétique de *Pneumocystis carinii* proposé à partir d'observations ultrastructurales faites chez le rat (Yoshida, 1989).

b. *P. carinii* humain.

Le premier cycle hypothétique de *P. carinii* chez l'homme a été proposé par W. G. Campbell (1972). Ce cycle (voir figure I.2 ci-après) rapporte la présence de kystes matures avec CIK (a), de kystes vides avec CIK récemment exkystés (b), de petits trophozoïtes (c), de trophozoïtes plus larges (d) qui pourraient se diviser par fission binaire ou copuler (e), de trophozoïtes à paroi épaisse (f), et de prékystes (g). Ce cycle n'a pas été complété depuis.

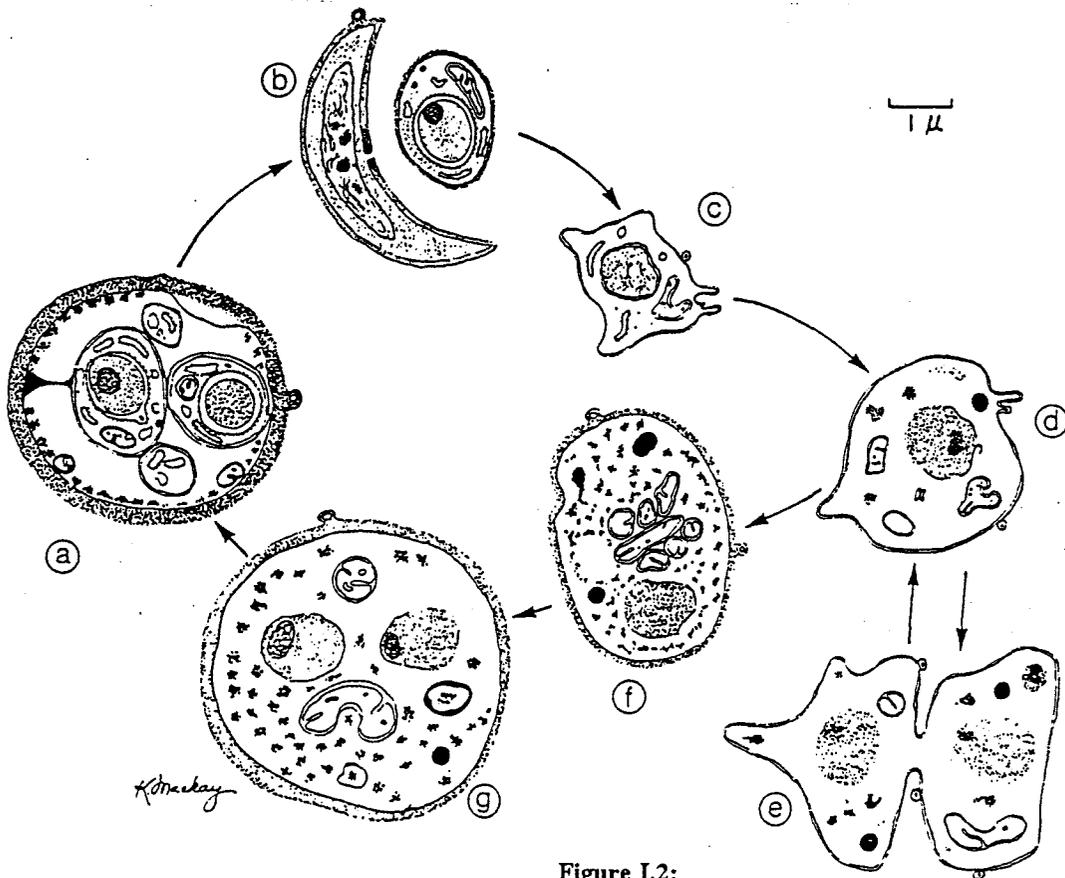


Figure I.2:

Cycle hypothétique de *Pneumocystis carinii* proposé à partir d'observations ultrastructurales faites chez l'homme (Campbell, 1972).

2. Transmission.

La voie de transmission généralement admise est la voie aérienne. Cependant, la constatation de l'infection par *P. carinii* chez des lapereaux de quelques jours dont la mère est peu parasitée (Dei-Cas et coll., 1990b) permet de suggérer que la voie transplacentaire puisse constituer une voie supplémentaire d'infection (Dei-Cas et coll., 1990a). La forme infectante demeure inconnue.

3. Les modèles animaux.

P. carinii a été retrouvé dans le poumon de nombreux mammifères (marsupiaux, rongeurs, édentés, lagomorphes, carnivores, ongulés, primates, etc) (Hughes, 1987). Cependant, seuls les rats, les souris (Hughes, 1987), les lapins (Soulez et coll., 1988, 1989), les furets (Gigliotti et Hughes, 1988), et plus récemment des petits porcs (Settnes

et coll., 1991) ont été utilisés comme hôtes expérimentaux. Le rat et la souris, soumis à une corticothérapie prolongée ou athymiques, développent une importante PPC en deux à trois mois. L'utilisation de souris présentant une déficience congénitale en lymphocytes B et T, appelées souris SCID ("Severe Combined Immunodeficiency"), a été récemment rapportée (Garner et coll., 1991; Soulez et coll., 1991). Le modèle lapereau, développé dans notre laboratoire (Soulez et coll., 1989), se caractérise par l'apparition d'une pneumocystose spontanée au moment du sevrage en absence d'immunodépression induite. La quasi totalité des lapereaux sevrés, provenant d'élevages de plusieurs régions, sont intensément parasités par *P. carinii* et développent une pneumonie d'importance variable. Dans les semaines suivant le sevrage, les animaux guérissent spontanément et la réduction progressive du taux de parasitisme est parallèle à l'apparition d'anticorps spécifiques (Dei-Cas et coll., 1990a).

4. La culture *in vitro*.

Les premières tentatives de culture *in vitro* datent de 1977 (Cushion et coll., 1977a). La plupart des auteurs rapportent le développement du parasite en co-culture avec des lignées primaires ou continues de cellules nourricières. La culture axénique a aussi été rapportée (Tegoshi, 1988, Cushion et coll., 1990). Dans ces systèmes, l'*inoculum* est constitué par des parasites séparés du tissu pulmonaire. Or, les techniques de séparation peuvent entraîner des altérations de *P. carinii*, constituant un obstacle important aux études *in vitro* (Dei-Cas et coll., 1989; Soulez et coll., 1991a). De plus, il n'existe pas de techniques permettant d'évaluer rapidement la viabilité du parasite (Graves, 1989).

Dans tous les systèmes proposés, le parasite ne serait métaboliquement actif que les premiers jours: en effet, les parasites sont capables, *in vivo*, d'incorporer de l'acide para-aminobenzoïque-³H (PABA) (Kovacs et coll., 1989). La viabilité durant les premiers jours se traduit par une augmentation de leur nombre, probablement due à la multiplication des trophozoïtes et/ou à la libération des CIK contenus dans les kystes matures présents dans l'*inoculum*. Ces systèmes se maintiennent rarement plus de 8 jours. Le seul système permettant de maintenir *P. carinii* de 8 à 40 jours est la technique de culture du parasite

in situ sur explant pulmonaire de lapin (Dei-Cas et coll., 1989). Les petits fragments pulmonaires provenant de lapereaux parasités s'enrichissent en parasites de deux à dix fois durant les premiers jours, vraisemblablement par les mécanismes de multiplications des formes végétatives et/ou de libération des CIK.

5. Position taxonomique.

Depuis 1955 jusqu'à nos jours, bon nombre d'articles de synthèse ont regroupé les données acquises avec les techniques du moment, essayant de positionner *P. carinii* Delanoë et Delanoë, 1912, dans la classification (Csillag, 1955; Vávra et Kucera, 1970; Frenkel, 1976, 1990; Edman et coll., 1988; Gradus et coll., 1988; Hughes, 1989; Walzer, 1989; Frenkel, 1990; Jackson et coll., 1991; Pixley et coll., 1991; Dei-Cas et coll., 1992). Cependant, *P. carinii* reste une énigme. L'aspect améboïde du trophozoïte, la présence de prolongements tubulaires ou *filopodia*, sa sensibilité à des drogues (pentamidine, ou l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole) efficaces contre des protozoaires parasites, permettent de le rapprocher de cet embranchement. De plus, comme *Toxoplasma gondii*, il est capable de synthétiser *de novo* des folates à partir du PABA (Kovacs et coll., 1989).

En revanche, les affinités tinctoriales et la structure de la paroi des formes kystiques évoquent celles de la paroi fongique (Matsumoto et coll., 1989). Hughes (1989) regroupe, à partir d'observations ultrastructurales faites sur *P. carinii*, les arguments morphologiques généralement considérés par plusieurs auteurs comme étant caractéristiques des micro-organismes de nature fongique: "pauvreté en organites, noyaux indistincts, des espaces vacuolaires, des mitochondries très pauvrement développées, une organisation du réticulum endoplasmique (RE) très pauvre".

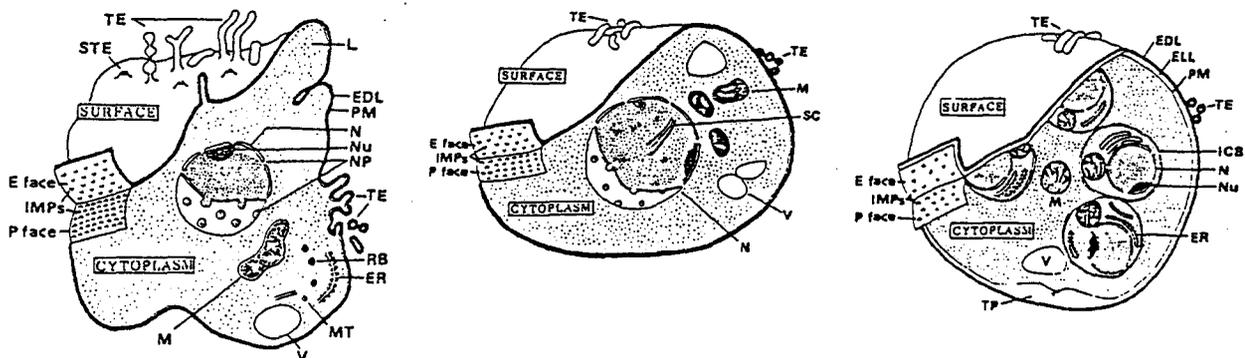
La présence de crêtes mitochondriales lamellaires observées par certains auteurs (Vávra et Kucera, 1970; Takeuchi, 1980; Ruffolo et coll., 1989), les a conduit à rapprocher *P. carinii* des *Fungi*. Ce critère reste peu fiable dans la mesure où l'observation ultrastructurale des mitochondries se base sur des préparations parasitaires incomplètement préservées. De plus, la présence de crêtes lamellaires a été rapportée chez de nombreux

protozoaires (cryptomonadines, eugléniens, zooflagellés) (De Puytorac et coll., 1987). Bien que chez les champignons pathogènes les crêtes mitochondriales soient souvent lamellaires, dans d'autres groupes fongiques elles sont tubulaires (Garrison, 1983). Par son ARN ribosomal 16S, *P. carinii* serait très proche de *Saccharomyces cerevisiae* (Edman et coll., 1988; Stringer et coll., 1989). En accord avec ces résultats, le gène codant pour la grande sous unité de l'ARN ribosomal (Sinclair et coll., 1991) ainsi que sept autres séquences continues du génome mitochondrial (Pixley et coll., 1991) présenteraient une homologie significative avec certaines séquences d'ADN fongique. De plus, tandis que chez les protozoaires étudiés jusqu'à maintenant les enzymes thymidylate synthétase (TS) et dihydrofolate réductase (DHFR) existent comme une même protéine bifonctionnelle, chez *P. carinii* ces enzymes sont deux chaînes polypeptidiques séparées et monofonctionnelles dont la synthèse est codée par deux gènes se trouvant sur des chromosomes différents (Edman et coll., 1989). Dans la mesure où ces deux activités enzymatiques sont retrouvées sur une même protéine bifonctionnelle chez tous les protozoaires étudiés à ce jour (Kungkrai et coll., 1990), cette donnée doit être prise en considération dans la discussion générale sur la taxonomie. Enfin, par la structure de son ARN ribosomal 5S, *P. carinii* serait très proche du groupe Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota, appelé provisoirement "*Protista fungi*" par Watanabe (Watanabe et coll., 1989).

En revanche, l'ADN de *P. carinii* serait pour certains auteurs plus proche en quantité de celui des protozoaires que des *Fungi* (Gradus et coll., 1988). L'absence apparente d'ergostérol dans la membrane de *P. carinii* (Yoshikawa et coll., 1987a) pourrait expliquer sa résistance à l'amphotéricine B, un antifongique majeur, et constitue un argument contre sa nature fongique. De plus, *P. carinii* ne se développe pas *in vitro* dans des milieux de cultures pour champignon. D'autre part, la synthèse protéique pour les cellules eucaryotes nécessite deux protéines solubles ou facteurs d'élongation (FE-1 et FE-2) impliquées dans l'élongation des chaînes protéiques. La synthèse protéique chez de nombreux genres de *Fungi* nécessite trois FE (FE-1, FE-2, FE-3), et il n'a pas été possible de détecter le FE-3 chez *P. carinii* (Jackson et coll., 1991).

E. Organisation cellulaire.

Lors du premier congrès international sur *P. carinii* (Bristol, 1989), Y. Yoshida présentait une analyse de l'organisation cellulaire, stade par stade, de *P. carinii* de rat, partant des données ultrastructurales acquises au cours de ces dernières décennies (Yoshida, 1989, voir figure I.3).



Dessin schématique résumant la structure fine du trophozoïte: contours polymorphiques, de 2 à 10 μm de diamètre; EDL: couche externe dense aux électrons; PM: membrane plasmique; L: lobopodes (ou pseudopodes); TE: extensions tubulaires de formes variées, (filiformes, ramifiées, en chapelet); N: noyaux; Nu: nucléole et enveloppe nucléaire avec pores nucléaires (PN); M: mitochondrie avec des crêtes vésiculaires; ER: réticulum endoplasmique, ribosomes et corps ronds (RB); MT: microtubules; V: vésicules. Pas de Golgi, ni cil, ni flagelle, ni cytostome ou complexe apical. P face, E face: demi-membranes protoplasmique et exoplasmique avec particules intramembranaires (IMP); STE: extension tubulaire tronquée.

Dessin schématique résumant la structure fine du prékyste précoce: contour externe oval de 4 à 6 μm de diamètre; paroi similaire à celle du trophozoïte. Au fur et à mesure que cette forme se développe, une couche peu dense aux électrons apparaît entre la membrane plasmique et l'EDL. Le noyau devient plus large et le complexe synaptonémal (SC) apparaît à la prophase. Les mitochondries s'agrègent à côté du noyau. Les extensions tubulaires sont plus rares.

Dessin schématique résumant la structure fine du kyste: contour sphérique de 4 à 6 μm de diamètre. Paroi épaisse formée de l'EDL, d'une couche intermédiaire peu dense (ELL) reposant sur la membrane plasmique (PM), le tout atteignant 100 à 160 nm d'épaisseur. Cette paroi présente une portion plus épaisse (TP) qui s'invagine. Les IMP semblent moins nombreuses sur la face E, et moins nombreuses dans l'ensemble que pour les autres stades. Les TE adhèrent à la paroi. Les corps intrakystiques (ICB) sont habituellement entourés par une double membrane plasmique, n'ont qu'un noyau avec nucléole, et probablement qu'une mitochondrie sphérique. Le réticulum endoplasmique et les ribosomes sont abondants.

Figure I.3:

Dessins schématiques de la structure fine de *P. carinii* de rat (traduit de Yoshida, 1989).

1. Les compartiments cytoplasmiques.

a. Le trophozoïte.

Ce stade pléomorphe peut présenter un contour sphérique ou ovoïde pour ses formes les plus petites (1 μm), ou améboïde avec de nombreux prolongements tubulaires, encore appelées *filopodia*, pour les formes pouvant atteindre 10 μm de longueur.

(1). Les organites cytoplasmiques.

Les études ultrastructurales révèlent un contenu en organites très pauvre (Hughes, 1989):

* Mitochondries:

Certaines études rapportent la présence d'une ou deux (Frenkel, 1976), ou plusieurs (Barton et Campbell, 1969; Vossen et coll., 1978; Yoneda et coll., 1982) mitochondries, ou bien encore, quelques mitochondries présentant des crêtes lamellaires très pauvrement développées (Vávra et Kucera, 1970; Takeuchi, 1980; Ruffolo et coll., 1989). Toutefois, l'observation ultrastructurale en cryofracture révèle des mitochondries plus grandes que celles observées sur coupes ultrafines, la plupart présentant des structures ramifiées (Yoshikawa et coll., 1987d).

* Réticulum endoplasmique:

Le RE est présent, mais peu développé (Vávra et Kucera, 1970, Yoneda et coll., 1982) sous forme de quelques lamelles autour du noyau (Vossen et coll., 1978). Des ribosomes peuvent être observés sur ce réticulum, ainsi que libres dans le cytoplasme.

* Appareil de Golgi:

Aucun appareil de Golgi n'a été identifié (Yoshida, 1989), à l'exception de petites vésicules regroupées en amas, appelées "Golgi-like vesicles", de composition et de fonction inconnues (Dei-Cas et coll., 1989).

* Autres composants:

La présence de corps osmiophiles de 100 nm de diamètre de composition chimique et de rôle inconnus (Vávra et Kucera, 1970; Yoshikawa et coll., 1987d; Yoshida, 1989), d'espaces vacuolaires limités par des fragments de fines membranes

(Vávra et Kucera, 1970, Yoneda et coll., 1982) et de tailles variées (Yoshikawa et coll., 1978d), de microtubules (Vossen et coll., 1976, Matsumoto et Yoshida, 1986; Itatani et Marshall, 1988), a été rapportée. Ni flagelle, ni cil, ni cytotome ou complexe apical ne sont observés (Yoshida, 1989).

(2). La membrane plasmique.

Les études de cryofracture ont apporté une multitude de renseignements sur le système membranaire parasitaire (Yoneda et coll., 1982; Yoshikawa et Yoshida, 1986, Yoshikawa et coll., 1987a,d,e). De nombreuses particules protéiques intramembranaires sont retrouvées en quantité plus importante dans la demi-membrane protoplasmique (face P: $1512 \pm 125/\mu\text{m}^2$), que dans la membrane exoplasmique (Face E: $417 \pm 44/\mu\text{m}^2$) (Yoshikawa et Yoshida, 1986). Cette membrane serait aussi constituée de stérols qui, couplés artificiellement à la filipine (antibiotique à forte affinité pour certains stérols membranaires, 3- β -hydroxystérols), formeraient un complexe filipine-stérols de densité $485 \pm 42/\mu\text{m}^2$ pour la face P, et $341 \pm 27/\mu\text{m}^2$ pour la face E (Yoshikawa et coll., 1987a). Cet auteur conclut à la présence de cholestérol qui, facilitant la fluidité membranaire et le transport sécrétoire des granules, participerait au maintien de l'aspect améboïde de ce stade.

b. Les prékystes.

Le prékyste, par sa structure et son développement, est défini comme étant la forme intermédiaire entre le trophozoïte et le kyste (Yoshida, 1989). Par commodité, ce stade se subdivise en prékyste précoce, intermédiaire et tardif, qui seront analysés simultanément dans ce paragraphe.

La principale caractéristique de ce stade réside dans son aspect ovale d'une taille allant de 3,5 à 5 μm de longueur, et 3 à 4,5 μm de largeur (Yoshida, 1989). Des complexes synaptonémaux y ont été observés au stade précoce uninucléé (Matsumoto et Yoshida, 1984). Au stade intermédiaire, deux à huit noyaux peuvent être observés. Une couche intermédiaire peu dense aux électrons vient s'intercaler entre la membrane

plasmique et la couche externe dense aux électrons. Huit CIK s'individualisent dans le cytoplasme de la forme tardive.

(1). Les organites cytoplasmiques.

*** Mitochondries:**

Une des caractéristiques des mitochondries à ce stade, outre le fait qu'elles soient peu développées (Yoshida, 1989), serait leur agrégation en amas autour du noyau (Vávra et Kucera, 1970; Takeuchi, 1980; Matsumoto et Yoshida, 1984, 1986; Yoshikawa et Yoshida, 1987e).

*** Réticulum endoplasmique:**

Il est rarement observé (Yoshida, 1989).

*** Appareil de Golgi:**

Aucun appareil de Golgi n'a été décrit (Yoshida, 1989).

*** Autres composants:**

Il est possible d'observer des corps ronds, des vacuoles de tailles variées, en quantité décroissante pour les plus petites d'entre elles au fur et à mesure que l'on va vers la forme prékystique tardive (Yoshikawa et Yoshida, 1987e), et des microtubules (Vossen et coll., 1976, Matsumoto et Yoshida, 1986).

(2). La membrane plasmique.

Les études de cryofracture ont permis de montrer une diminution, par rapport au stade précédent, de la quantité de particules protéiques membranaires (face P: $1037 \pm 56 / \mu\text{m}^2$, face E: $262 \pm 22 / \mu\text{m}^2$) (Yoshikawa et Yoshida, 1986). Une diminution du nombre de particules intra-membranaires contenant probablement du cholestérol est aussi observée à ce stade: $249 \pm 50 / \text{mm}^2$ pour la face P et $132 \pm 48 / \text{mm}^2$ pour la face E (Yoshikawa et coll., 1987a). Cet auteur suggère que, protégée par l'épaisseur de la paroi, cette membrane pourrait avoir une plus grande fluidité que celle du trophozoïte. Fait notable observé chez *P. carini* de rat au stade prékyste tardif, la membrane s'invagine finement dans le cytoplasme, enveloppe et individualise chaque CIK (Vávra et Kucera, 1970; Vossen et coll., 1978; Matsumoto et Yoshida, 1984).

c. Les kystes et les corps intrakystiques.

Les kystes présentent une taille variant de 4 à 6 μm de diamètre. La principale caractéristique de ce stade est la présence de huit CIK bien individualisés contenant pour chacun d'eux un noyau, une mitochondrie et un réticulum endoplasmique abondant et riche en ribosomes (Vávra et Kucera, 1970; Yoshida, 1989). Ces CIK peuvent être observés sous trois formes différentes: CIK ronds, "en banane" et très denses, ou développés et similaires aux trophozoïtes.

(1). Les organites cytoplasmiques.

Aucun organite n'est identifiable dans le cytoplasme résiduel du kyste, à l'exception de quelques mitochondries.

(2). La membrane plasmique.

Les études de cryofracture ont permis de montrer, par rapport aux deux stades précédents, une diminution du nombre de particules membranaires protéiques (face P: $875 \pm 59 / \mu\text{m}^2$, face E: $150 \pm 20 / \mu\text{m}^2$) (Yoshikawa et Yoshida, 1986). Paradoxalement, le nombre de particules protéiques intra-membranaires chez les CIK est supérieur à celui de la membrane plasmique mère, suggérant une synthèse active des CIK (Yoshikawa et Yoshida, 1987c). Une diminution du nombre de particules intramembranaires contenant du cholestérol est aussi rapportée chez ce stade: $138 \pm 24 / \text{mm}^2$ pour la face P et $59 \pm 20 / \text{mm}^2$ pour la face E (Yoshikawa et coll., 1987a).

2. La paroi.

a. Présentation générale.

Cette paroi suscite un intérêt particulier tant par son évolution morphologique que par sa composition biochimique avec le(s) rôle(s) potentiel(s) sous-jacent(s) dans: i/ les phénomènes d'attachement spécifique des trophozoïtes à la cellule hôte (pneumocyte de type I), ii/ le métabolisme parasitaire et les rapports hôte-parasite, et iii/ l'exkystement des CIK.

La paroi du trophozoïte, encore appelée pellicule, reposant sur la membrane plasmique, se présente en MET, sous forme d'une fine couche de 20 à 30 nm d'épaisseur dense aux électrons (Yoshida, 1989). Elle se prolonge, à ce stade par de nombreuses extensions ou prolongements tubulaires de formes variées, allant de tubulaire plus ou moins tronquée à ramifiée, en passant par des formes en chapelet (Yoshikawa et coll., 1987d; Yoshida, 1989). Le rôle suspecté de ces prolongements tubulaires, caractéristiques de ce stade et souvent observés en contact intime avec la face luminale du pneumocyte de type I, serait de faciliter l'attachement et d'augmenter la surface parasitaire pour la capture de nutriments. Des *lobopodia* sont aussi observés sans toutefois qu'aucun argument laissant présager une activité phagocytaire n'ait été rapporté (Yoshida, 1989).

La paroi du stade prékystique se caractérise par un arrondissement de son contour, et une forte diminution du nombre des prolongements tubulaires. La paroi du prékyste précoce, similaire à celle du trophozoïte, se développe au stade prékyste intermédiaire par adjonction d'une couche supplémentaire peu dense aux électrons, située entre la membrane plasmique et la couche externe dense. Son épaisseur passe alors de 40 à 120 nm pour le stade prékystique tardif (Yoshida, 1989).

La paroi sphérique des kystes matures et des kystes vides atteint une épaisseur de 100 à 160 nm. Elle présente une portion plus épaisse de la couche intermédiaire peu dense, portion qui s'étale sur 1 à 2 μm , et se développe localement par invagination dans le cytoplasme kystique sur 200 à 300 nm d'épaisseur, formant en coupe "une structure en forme de parenthèse". Sa fonction reste peu claire, bien que présentant en son centre une zone d'apparence craquelée, suggérant une relation avec le phénomène d'exkystement des CIK (Yoshida, 1989).

b. Caractéristiques cytochimiques.

Le contenu de cette paroi a fait l'objet de quelques travaux essentiellement réalisés sur *P. carinii* de rat. La plupart des données acquises reposent sur des observations faites en microscopie optique, quelques unes en microscopie électronique à transmission, d'autres plus récemment acquises en biochimie.

nota: Pour les études immunocytochimiques, bon nombre de sondes sont couplées à la biotine et révélées par la streptavidine (protéine tétramérique de *Streptomyces avidinii*), elle même couplée à des particules d'or colloïdal ou à la peroxydase (cette dernière étant révélée par la diaminobenzidine, DAB). Dans un article récent (Alon et coll. 1990), il a été démontré que la streptavidine possède une séquence accessible RYD (Arginine-Tyrosine-Acide aspartique) qui mime la séquence RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) de la fibronectine. Par ailleurs, il a été établi récemment que *P. carinii* possède des récepteurs pour la fibronectine (Pottratz et Martin, 1990). La biotine ayant une constante de dissociation de $10^{-15}M$, traduisant une affinité exceptionnelle pour la streptavidine (Weber et coll., 1989), les résultats issus de l'emploi d'outils biotinylés et révélés par la streptavidine doivent être relativisés dans la mesure où ils pourraient non pas traduire la spécificité de la sonde mais l'affinité de la streptavidine pour la biotine endogène parasitaire et pour les récepteurs parasitaires à fibronectines. Il sera rappelé ci-après dans les divers paragraphes de présentation des résultats bibliographiques, si ces derniers ont été obtenus par l'utilisation de ces outils.

(1). Etudes en microscopie optique.

Mise en évidence de polysaccharides. C'est en 1986 que sont rapportés les premiers résultats de mise en évidence de polysaccharides sur la paroi parasitaire (Shiota, 1986, 1987) par imprégnation au colorant de Grocott (méthénamine-nitrate d'argent de Gomori modifiée, Grocott, 1955), connu pour son affinité pour le glycogène

et les mucines (Gomori, 1946). De nombreuses lectines couplées à la fluorescéine, et à affinité spécifique envers divers polysaccharides, ont été testées sur des extraits parasitaires, permettant de mieux entrevoir la diversité des polysaccharides sur la paroi parasitaire (Yoshikawa et coll., 1987b; Cushion et coll., 1988). Le tableau I.1 résume la réactivité de *P. carinii* vis-à-vis de diverses lectines (Yoshikawa et coll., 1987b).

	Concentration en lectine ($\mu\text{g/ml}$)						Origine	Affinité
	0	25	50	125	250	500		
PNA	-	-	-	-	-	-	<i>Arachis hypogaea</i>	NAC α -D Gal
BPA	-	-	-	-	-	\pm	<i>Bauhinia purpurea</i>	NAC β -D Gal
Con A	-	\pm	+	2+	3+	3+	<i>Concanavalia ensiformis</i>	CH ₃ α -D Man
DBA	-	-	-	-	-	\pm	<i>Dolichos biflorus</i>	NAC α (1-3)Gal
SBA	-	-	-	-	-	\pm	<i>Glycine max</i>	NAC α -D Gal
GS-I	-	-	-	-	-	\pm	<i>Griffonia simplicifolia</i>	α -D Gal
GS-II	-	-	-	-	\pm	+	<i>Griffonia simplicifolia</i>	α - et β - NAc Glc
MPA	-	\pm	+	2+	3+	3+	<i>Maclura pomifera</i>	N Ac Gal
WGA	-	-	-	-	-	\pm	<i>Triticum vulgare</i>	β -N Ac Glc
UEA-I	-	-	-	-	-	-	<i>Ulex europaeus</i>	α -L fucose

Fluorescence: 3+ = très forte, 2+ = forte, + = modérée, \pm = faible, - = aucune. Ac: Acetyl; Glc: glucosamine; Gal: Galactosamine.

Tableau I.1 :

Intensité de la fluorescence de diverses lectines sur *P. carinii* (traduit de Yoshikawa et coll., 1987b).

Dans des conditions expérimentales similaires, M. Cushion et coll. (1988) ont complété ce tableau par des résultats obtenus avec d'autres lectines. Certaines d'entre elles apparaissent très faiblement réactives, voire non-réactives: la STA (extraite de *Solanum tuberosum*) à affinité pour les β -D N Ac Glc; la VAA (extraite de *Viscum album*) à affinité pour les β -Gal; LFA (extraite de *Limax flavus*) à affinité pour les acides 5 α neuraminiques. D'autres résultats obtenus par ces auteurs apparaissent contradictoires avec ceux présentés par Yoshikawa. En effet, ces auteurs notent une forte réactivité pour la SBA et la WGA, alors que la MPA n'apparaît dans leurs résultats que partiellement réactive. Pesanti et Shanley (1988), en réitérant cette expérience, mais en utilisant cette fois-ci le système

lectines biotinylées/streptavidine conjuguée à la peroxydase/DAB, ont noté que la Con A réagit fortement sur la paroi et que la WGA ne réagit pas. Ils notaient aussi, fait important, qu'il était aussi possible de marquer le parasite en utilisant, dans leurs témoins, de la Con A non biotinylée et de la peroxydase non conjuguée à la streptavidine, laissant présager une réactivité du DAB sur la paroi de *P. carinii* (Pesanti et Shanley, 1988).

Mise en évidence de chitine. La présence de chitine a été rapportée sur la paroi de tous les stades de *P. carinii* de rat. Elle a été mise en évidence par un sérum polyclonal de lapin immunisé contre des chitotrioses, chitotétraoses et chitopentoses (enchainement respectif de 3, 4, et 5 N-Acétyl-D-Glucosamines), reconnu par un conjugué biotinylé (sérum de porc anti-Ig de lapin), lui même reconnu par la streptavidine-peroxydase/DAB, (Walker et coll., 1990). Récemment, utilisant le même protocole, la même équipe rapportait des résultats similaires sur *P. carinii* de souris SCID et *P. carinii* humain (Garner et coll., 1991). Ils confortaient leurs résultats par l'observation d'une forte fluorescence de la paroi parasitaire en présence d'une lectine à forte affinité pour les enchainements de NAc-D-Glc (TOL, "Tomato lectin").

Mise en évidence de protéines. Récemment, des études menées sur *P. carinii* extrait de poumons de patients sidéens, ont révélé la présence de protéines pariétales, sensibles à diverses protéases, et à forte affinité pour certains polysaccharides, et ce, pour tous les stades parasitaires. *P. carinii* posséderait des "lectines endogènes" à forte affinité pour les β -D-Gal et les D-Man et à affinité modérée pour les L-Fuc et les NAc-Gal et NAc-D-Glc (Vierbuchen et coll., 1990). Dans ce travail, les lectines endogènes ont été révélées par des polysaccharides préalablement biotinylés, eux-mêmes révélés par de la streptavidine couplées à la peroxydase intensifiée par le DAB.

Une protéine parasitaire, caractérisée sur gel électrophorétique par une masse moléculaire apparente de 90-95 kDa, a été reconnue en immunofluorescence par un anticorps monoclonal de souris (IgM 5E12, voir tableau I.3) anti-*P. carinii* de rat. Cette

protéine a été retrouvée sur *P. carinii* de lapin, de furet et humain (Gigliotti et coll., 1986).

(2). Etudes en microscopie électronique à transmission (MET).

Paradoxalement, bien qu'en présence d'un parasite de très petite taille, rares sont les études cytochimiques en MET sur *P. carinii*. Les difficultés à maintenir intactes les structures parasitaires lors des inclusions en résines hydrophobes et hydrophiles pourraient expliquer cette rareté.

Mise en évidence de polysaccharides. Les premiers travaux publiés sont relativement récents et montrent une affinité de la couche intermédiaire peu dense aux électrons des parois prékystiques et kystiques pour le colorant de Gomori au méthénamine-nitrate d'argent (Yoshikawa et Yoshida, 1987c). Dans un article récent (Yoshikawa et coll., 1988), il a été montré que les deux couches pariétales parasitaires possèdent des polysaccharides sensibles à une oxydation périodique révélée par la méthénamine-argent; après oxydation périodique, la couche externe est la seule à être imprégnée par le thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (réactif de Thiéry). Dans cette étude, les lectines Con A et MPA reconnaissent respectivement des sites polysaccharidiques sur les deux couches pariétales et sur la couche externe dense aux électrons. Notons que dans ces travaux de localisation de sites polysaccharidiques par des lectines, le système utilisé est le système lectine biotinylée/streptavidine couplée à des particules d'or. Ces résultats ont été confirmés pour la Con A (Pesanti et Shanley, 1988).

Mise en évidence de chitine. La localisation ultrastructurale de chitine à la surface parasitaire n'est que récente. Dix grains d'or (couplés à la lectine TO) peuvent être observés par parasite (Garner et coll., 1991).

Mise en évidence de protéines. Une seule étude d'immunolocalisation ultrastructurale sur coupe (ou en "postembedding") d'épitopes parasitaires utilisant des anticorps monoclonaux produits contre des antigènes de *P. carinii* de rat, a été rapportée à ce jour (Yoshikawa et coll., 1991). Certains réagissent sur les deux couches pariétales externes, alors que d'autres ne réagissent qu'avec la couche externe dense aux électrons (voir ci-après: iii. Etudes biochimiques, § protéines). Ces épitopes sont, d'après l'analyse de ces auteurs, de nature protéique et/ou glycoprotéique.

La présence d'IgG de l'hôte a été rapportée sur la paroi de *P. carinii* humain par immunolocalisation (Blumenfeld et coll., 1990). Ces auteurs ne précisent pas si ces IgG sont fixées à la paroi parasitaire par leur fragment Fc, ou si elles reconnaissent un épitope.

(3). Etudes biochimiques.

Mise en évidence de polysaccharides.

Le décapage de la paroi kystique par de la zymolyase (contenant une β -1-3 glucanase) et l'analyse de ce lysat par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse a montré que le glucose était le constituant majeur de la paroi kystique. A un plus faible taux, et dans des proportions égales, il y aurait du mannose et du galactose. Enfin, il y aurait un peu de NAc-glc et quelques traces de ribose et d'acide sialique (DeStephano et coll., 1990b).

Le nombre de sites polysaccharidiques reconnus par la Con A serait pour *P. carinii* de rat de $18,5 \times 10^6$ par parasite (Limper et coll., 1991).

Enfin, dans un article de synthèse, Walzer (1991) présente des résultats non-publiés sur les polysaccharides où ces derniers ne représenteraient que 8% du contenu de la paroi kystique (Kaneshiro, observations non-publiées).

Mise en évidence de protéines. Les composés antigéniques pariétaux majeurs de *P. carinii*, détectés sur western blot par des anticorps monoclonaux et polyclonaux ont une masse moléculaire apparente comprise entre 105 et 120 kDa. Ces

composés antigéniques sont, pour la majorité d'entre eux, sensibles aux protéases et apparaissent riches en mannose (Tanabe et coll., 1989; Radding et coll., 1989). D'autres protéines de 90–97, 55, 35 et 28 kDa sont reconnues par ces sondes, mais de façon moins intense. Certaines de ces protéines apparaissent, après électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et révélation par des lectines couplées à la peroxydase, sous forme de "smear" (matériel protéique ou glycoprotéique ayant l'aspect d'une trainée diffuse en électrophorèse). Ces smears s'étalent entre 80–150 et 55–70 kDa pour une révélation par la ConA, et sur 100–125 et 50–70 kDa pour une révélation par la WGA, et enfin sur 95–115 kDa pour une révélation par le pokeweed mitogène (PWMc) à affinité pour les β -1, 4 N-Ac Glc (Pesanti et Shanley, 1988).

Les IgG humaines reconnaissent sur *P. carinii* humain une protéine de 52 kDa, et des protéines de 65–70, 60, 50, 35 kDa sur *P. carinii* de rat (Blumenfeld et coll., 1990).

Le tableau I.2, ci-dessous, résume les antigènes potentiels de *P. carinii* détectés par des sérums polyclonaux sur western blot.

Référence	Source de <i>P. carinii</i>	Masse moléculaire estimée (kDa)	
		Bandes à réactivité majeure	Bandes à réactivité mineure
Graves et coll. 1986a	Humaine	57	125, 100–110, 64
	Murine (rat)	110–116, 55–60	170, 125, 70, 90, 45, 30, 32
Walzer et coll. 1987a, et b	Humaine	66, 40	116, 66–92, 35
	Murine (rat)	116, 50, 45	66–92, 35, 30
Kovacs et coll. 1988	Humaine	35–45, 24, 22	100, 75, 64
	Murine (rat)	100–110, 49–64, 45	88, 43, 36

Tableau I.2 :

Antigènes de *P. carinii* détectés par des sérums polyclonaux sur western blot (extrait et traduit de Graves et coll., 1989).

Le tableau I.3, ci-après, résume les antigènes de *P. carinii* détectés par des anticorps monoclonaux sur western blots.

Référence	Monoclonal	Source	Masse moléculaire estimée (kDa)
		de <i>P. carinii</i>	Bandes à réactivité majeure
Graves et coll., 1986a	T-84.h.6	Rat	110-116
	S-174.2	Rat	55-60, 116
	S-51.1	Rat	30-40
Gigliotti et coll., 1986	5E8	Rat	90-95
	5E12	Rat	90-95
Lee et coll., 1986	R13/3G4-6	Rat	35, 65
Kovacs et coll., 1986	2G2	Homme	22, 24, 65, 67
	6G8	Homme	95
Gill et coll., 1987	7D7	Rat	50, 85
Linder et coll., 1987	2E3	Homme	82
	3F6	Homme	82

Tableau I.3:

Antigènes de *P. carinii* détectés par des anticorps monoclonaux sur western blot (extrait et traduit de Graves et coll., 1989).

La présence d'un récepteur pour la fibronectine a été rapportée chez *P. carinii*. Le nombre de ces récepteurs serait de $6,4 \times 10^5$ par organisme. La fibronectine serait importante pour l'attachement du parasite aux pneumocytes de type I (Pottratz et Martin, 1990).

Mise en évidence de lipides. Travaillant sur des extraits parasitaires partiellement purifiés, Pesanti (1987) a rapporté la présence de phosphatidylglycérol, de cardiolipine, de phosphatidyléthanolamine, de sphingomyéline, de phosphatidylsérine et de phosphatidylinositol, ce qui indique que le parasite ne semble pas capable de synthétiser *de novo* du dipalmitoyl phosphatidylcholine (Pesanti, 1987). *P. carinii*, ne pouvant pas désaturer le palmitate, ne présentant pas d'activité de synthèse *de novo* de lipides et ne présentant pas d'activité biosynthétique à désaturer ou à allonger les acides gras, il a été postulé qu'il pourrait incorporer les acides gras du surfactant pulmonaire (Kaneshiro et coll., 1989). Enfin, dans un article récent, à partir de résultats non encore publiés, Walzer indique que la paroi parasitaire kystique serait composée de 50% de lipides (Walzer, 1991).

3. La membrane externe.

En 1970, Vávra et Kucera rapportaient sur la paroi des CIK la présence

d'une deuxième membrane à double feuillet lipidique, d'aspect similaire à la membrane plasmique, entourant la fine couche pariétale dense aux électrons. Cette membrane n'a été retrouvée récemment que dans la couche externe dense aux électrons de la paroi kystique, affleurant la couche intermédiaire peu dense (DeStephano et coll., 1990a). Elle serait générée au stade prékyste tardif lors de l'invagination de la membrane cellulaire prékystique. Cette membrane, de rôle inconnu et non retrouvée pour les autres stades parasitaires, pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes d'osmorégulation ainsi que dans l'utilisation d'éléments nutritifs; elle pourrait aussi participer aux interactions parasite-cellule hôte et être une cible potentielle pour des agents antimicrobiens (DeStephano et coll., 1990a).

4. Activités enzymatiques.

Des activités p-nitrophénylphosphatasiques et 5'-triphosphatasiques ont été observées à l'échelle ultrastructurale dans les noyaux de *P. carinii* (Barton et Campbell., 1969). La présence d'enzymes oxydoréductases telles la lactate déshydrogénase, la succinate déshydrogénase, la glutamate deshydrogénase a été rapportée (Mazer et coll., 1987). *P. carinii* posséderait des antioxydants tels la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, l'activité des deux dernières ayant été détectée à très faible taux (Pesanti, 1984). *In vitro*, il serait capable de métaboliser du glucose en CO₂ et de synthétiser des protéines (Pesanti et Cox, 1981). Il serait aussi capable de synthétiser *de novo* des folates à partir du PABA (Kovacs et coll., 1989). La destruction de *P. carinii* par les échinocandines et les papulocandines, antifongiques lipopeptidiques inhibiteurs de la synthèse des β-1,3 glucanes, laisse présager la présence d'enzymes effectrices qu'il reste à déterminer (Schmatz et coll., 1990). Enfin, *P. carinii* catalyserait l'uridine diphospho-glucose pour former un polymère insoluble qui serait un α-1, 4 glucane avec peu ou pas de ramifications; cette activité enzymatique serait inhibée par l'α-amyloglucohydrolase (Williams et coll., 1991).

F. La fixation de *P. carinii* pour les études en MET.

De nombreuses études ultrastructurales ont été menées sur *P. carinii* (Diekmann et coll., 1954; Wessel et Ricken, 1958; Seifert, 1960; Bommer, 1961, 1962, 1964; Kucera, 1963; Huneycutt et coll., 1964; Barton et Campbell, 1967, 1969; Huang et Marshall, 1970; Brzosko et Wojewodska, 1969; Vávra et Kucera, 1970; Ham et coll., 1971; Campbell, 1972; Frenkel, 1976; Vossen et coll., 1976, 1977, 1978; Takeuchi, 1980; Yoneda et Walzer, 1980, 1981; Haleston et coll., 1981; Matsumoto et Yoshida, 1984, 1986; Yoshida et coll., 1984; Filiale et coll., 1985; Henshaw et coll., 1985; Gigliotti et coll., 1986; Haque et coll., 1987; Yoshikawa et coll., 1987b et c, 1988, 1991; Itatani et Marshall, 1988; Watts, 1988; Matsumoto et coll., 1989; Dei-Cas et coll., 1989, 1990; Goheen et coll., 1989; Ruffolo et coll., 1989; Blumenfeld et coll., 1990; DeStephano et coll., 1990a; Millard et coll., 1990; Garner et coll., 1991; Nielsen et Settnes, 1991; Soulez et coll., 1991a et b).

La préparation des échantillons pour une inclusion en résine se réalise successivement par une étape de fixation, lavage, postfixation, déshydratation en alcools de degrés croissants, et inclusion progressive en résine. De nombreuses méthodes ont été testées pour essayer de préserver et maintenir l'intégrité cellulaire des différents stades parasitaires, en faisant varier certains paramètres durant les étapes de préparation des échantillons.

Certains auteurs se sont attachés à varier:

La technique de fixation: fixation du poumon par perfusion ou immersion du poumon parasité (Barton et Campbell., 1969; Vávra et Kucera, 1970; Vossen et coll., 1978; Yoshida et coll., 1984; Matsumoto et Yoshida, 1984; Henshaw et coll., 1985; Millard et coll., 1990; Nielsen et Settnes, 1991).

Le fixateur: glutaraldéhyde-acroléine en tampon phosphate (Vávra et Kucera, 1970; Ruffolo et coll., 1989); acide picrique (Vávra et Kucera, 1970); mélange acroléine-acide tannique ou, glutaraldéhyde-acroléine-acide tannique (Ruffolo et coll., 1989);

solution de permanganate en solution tamponnée ou non (Vávra et Kucera, 1970; Takeuchi, 1980); mélange acide tannique-glutaraldéhyde en tampon véronal ou en tampon cacodylate (Yoshida et coll., 1984; Matsumoto et Yoshida, 1984; Itatani et Marshall, 1988; Ruffolo et coll., 1989).

La postfixation: mélange tétroxyde d'osmium-ferrocyanure ou tétroxyde d'osmium-acide tannique (Goheen et coll., 1989).

La déshydratation: en ajoutant de l'acétate d'uranyle ou de l'acide phosphotungstique durant les premières étapes de la déshydratation (Itatani et Marshall, 1988).

L'osmolarité des différentes solutions: certains auteurs se sont attachés à respecter une osmolarité de 380 milliosmoles (mOsm) pour les étapes de fixation et de lavage (Vávra et Kucera, 1970; Vossen et coll., 1978).

La plupart de ces techniques apportent des résultats acceptables (Ruffolo et coll., 1989), mais ne préservent pas le parasite des lyses osmotiques et des extractions cytoplasmiques particulièrement dramatiques pour le stade trophozoïte, expliquant peut être la pauvreté en organites constatée par certains auteurs (Hughes, 1989; Yoshida, 1989).

Pour les inclusions en résines hydrophiles (résine de choix pour maintenir une bonne réactivité vis-à-vis des lectines et des anticorps), la fixation devant être "douce", la postfixation exclue et la déshydratation partielle, les conséquences ultrastructurales sont dramatiques: il ne reste du parasite que la paroi, le noyau, et quelques reliquats du système endomembranaire difficilement identifiables.

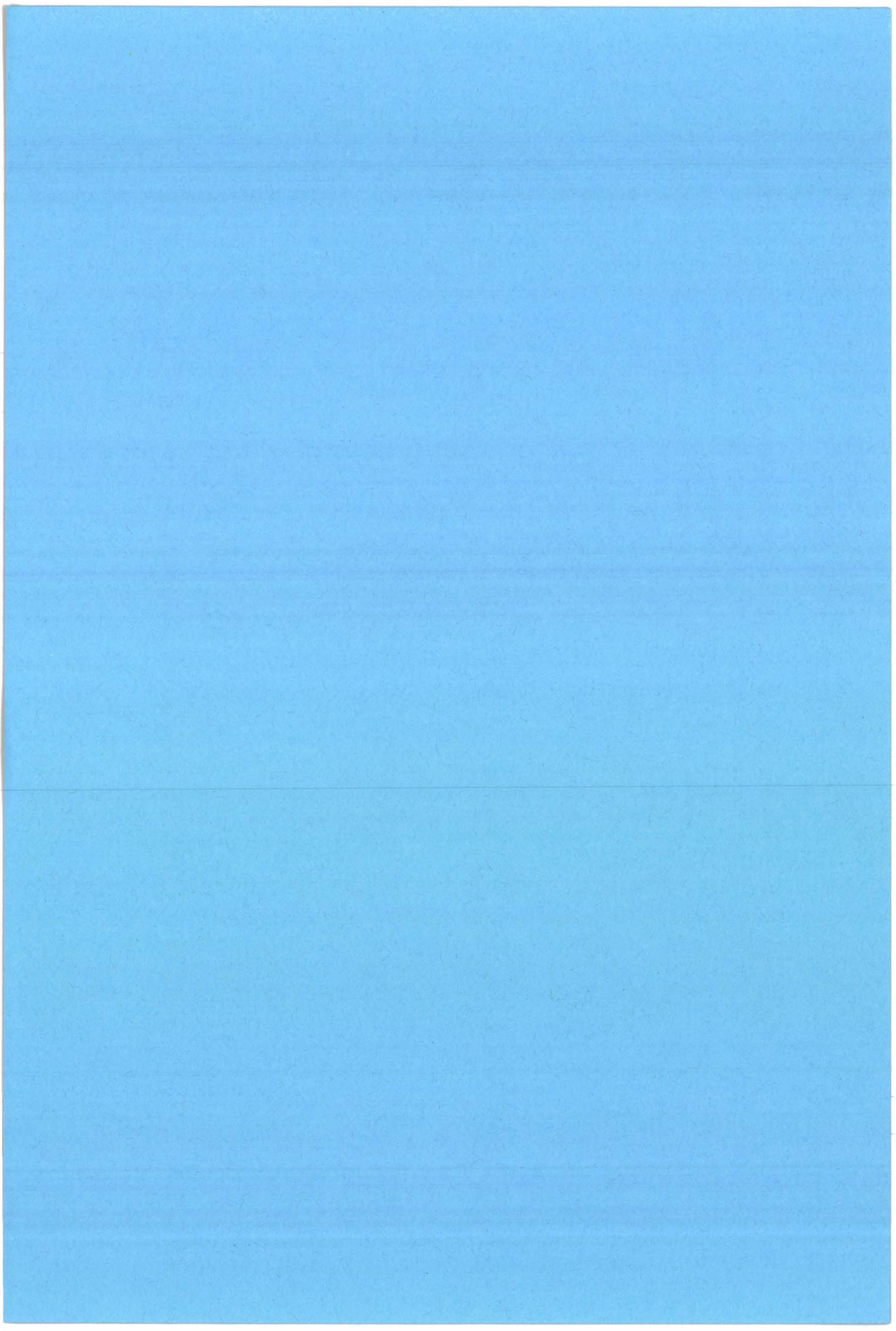
Dans ces diverses conditions expérimentales, une estimation de l'implication des divers organites cellulaires dans la synthèse pariétale reste hasardeuse, voire illusoire.

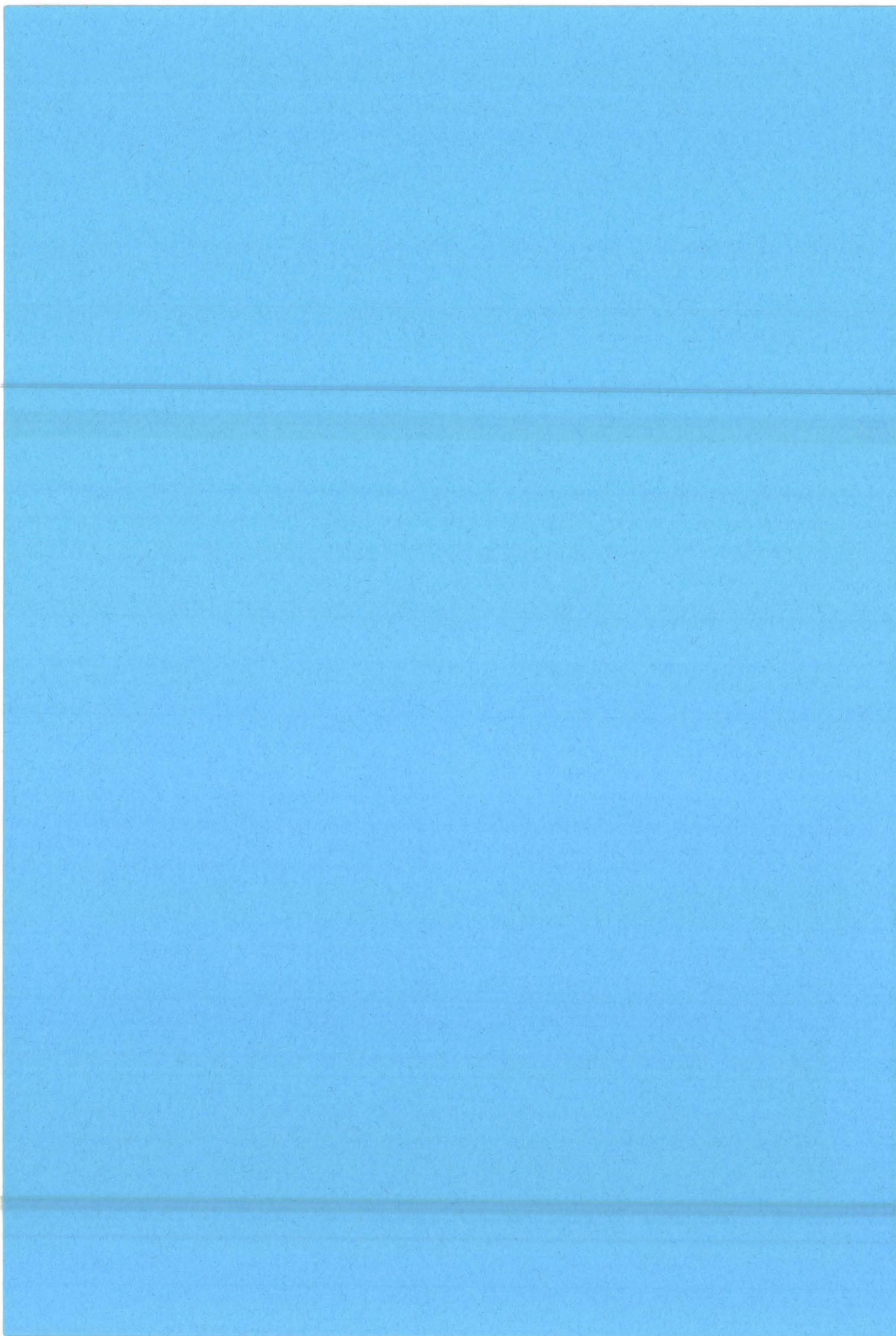
Rappel :

Dans ce contexte, nous avons entrepris une étude morphologique sur *Pneumocystis carinii* de lapereau, modèle développant une pneumocystose spontanée au sevrage sans administration de corticoïdes (Soulez et coll., 1989). *P. carinii* n'a pas été décrit *in vivo* chez le lapin au niveau ultrastructural. Les faibles dimensions du parasite, en particulier celles des trophozoïtes, nous ont amené à n'envisager que l'approche ultrastructurale en microscopie électronique à transmission (MET). Nous nous sommes donc attachés à :

- rechercher les meilleures conditions de préservation du parasite pour une étude morphologique ultrastructurale fine des différents stades parasitaires;
- rechercher la présence de polysaccharides pariétaux par des études cytochimiques (réactif de Thiéry, lectines);
- rechercher un appareil de Golgi et détecter des activités lysosomales et golgiennes, qui n'ont jamais pu être mis en évidence dans les études antérieures;
- redéfinir de façon fine le système endomembranaire de *P. carinii* au moyen de coupes sériées du parasite et d'une reconstruction tridimensionnelle assistée par ordinateur;
- proposer un cycle biologique pour *P. carinii* du lapin ainsi qu'une évolution du système endomembranaire dans les différents stades;
- apporter des précisions sur les données controversées concernant la mitochondrie;
- mettre au point une technique d'inclusion en résine hydrophobe (Epon 812) et hydrophile (London resin white) pour *P. carinii* de lapin, de souris et de rat, permettant:
 - de compléter l'analyse fine du système endomembranaire parasitaire;
 - de mettre en relation le Golgi et la synthèse de la paroi;
 - l'utilisation fine des sondes anticorps.

Les résultats obtenus sont présentés dans les chapitres suivants.





II. L'appareil de Golgi et le système lysosomal de *P. carinii* du lapereau.

A. Résumé.

La morphologie de *Pneumocystis carinii* à l'échelle ultrastructurale est décrite en détail *in vivo* dans le poumon du modèle lapereau, modèle non immunodéprimé artificiellement. L'appareil de Golgi ainsi que des lysosomes primaires de *P. carinii* y sont décrits pour la première fois. Des activités thiamine pyrophosphatasiques et β -glycérophosphatasiques sont retrouvées dans le parasite, alors que l'activité cytidine monophosphatasique est absente. L'activité thiamine pyrophosphatasique est faiblement retrouvée dans les vésicules golgiennes. Une structure sacculaire endomembranaire, retrouvée depuis le stade CIK jusqu'aux formes prékystiques, semble similaire aux lysosomes secondaires rencontrés dans les cellules eucaryotes classiques. Un second type de structure sacculaire endomembranaire, uniquement observé dans les trophozoïtes de grande taille et les formes prékystiques, est décrit. La présence de polysaccharides dans la paroi parasitaire est démontrée par imprégnation au réactif de Thiéry et marquage par la lectine Concanavaline A. L'augmentation du nombre de vésicules golgiennes précède le développement de la paroi fine en paroi épaisse.

B. Introduction.

La présence de polysaccharides a été rapportée chez *P. carinii* obtenus à partir de poumons de rats développant une parasitose par adjonction de corticoïdes (Yoshikawa et coll., 1987b,c, 1988; Pesanti et Shanley, 1988; Matsumoto et coll., 1989). Après oxydation périodique, les deux couches pariétales parasitaires apparaissent réactives à la méthénamine d'argent; seule la couche externe dense aux électrons est sensible au thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (OP-TCH-PA), (Yoshikawa et coll., 1988). La Con A reconnaît des sites polysaccharidiques sur les deux couches pariétales, alors que seule la couche intermédiaire peu dense présente des sites reconnus par la MPA (Yoshikawa et coll., 1988). La dégradation de la paroi kystique par la zymolyase suggère la présence de β -1,3-glucanes (Matsumoto et coll., 1989). Cependant, bien que de nombreuses études morphologiques ultrastructurales aient été réalisées, aucun appareil de Golgi, généralement

impliqué dans les phénomènes de glycosylation et de synthèse pariétale, n'a été décrit chez *P. carinii*.

C. Matériels et méthodes.

1. Modèle biologique.

P. carinii est obtenu à partir de poumon de lapins hybrides californiens-néo-zélandais achetés au sevrage chez différents éleveurs. Il a été montré que 80 à 100% des lapereaux au sevrage sont spontanément et fortement parasités par *P. carinii* (Soulez et coll., 1989).

2. Préparation des échantillons pour études ultrastructurales en MET.

De petits morceaux de poumons (1 mm³) de lapins parasités sont fixés 2 h à 4°C par immersion dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans du cacodylate (0,1M, pH 7,3). Après un lavage soigneux en solution tampon, les échantillons sont postfixés 1 h à température du laboratoire dans le même tampon contenant 1% de tétr oxyde d'osmium (OsO₄). Une déshydratation en éthanol à 70% (10 min), 95% (30 min), absolu (1 h), est suivie d'un bain en oxyde de propylène (1 h). L'imprégnation des tissus pulmonaires par la résine hydrophobe (Epon 812) se fait par un passage dans un mélange oxyde de propylène-Epon (volume à volume) de 12 h à température du laboratoire, suivi de deux incubations en résine pure à 37°C, la polymérisation se faisant dans un nouveau bain de résine pendant 3 jours à 70°C. Les coupes ultrafines sont réalisées avec un ultramicrotome Reichert-Jung. Une double coloration est ensuite réalisée avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb.

3. Préparation des échantillons pour études cytochimiques en MET.

a. Technique à l'iodure de zinc (IZO).

La méthode utilisée est celle décrite par Benchimol et De Souza (1985). Brièvement, après une fixation similaire à celle décrite au paragraphe précédent, les échantillons pulmonaires sont lavés soigneusement dans la même solution tamponnée contenant 8,5% de saccharose. Une deuxième série de lavages (4x10 min) est opérée dans la solution tamponnée A contenant :

- Tris (0,01M, pH 4,5),
- NaCl (1,13M),
- CaCl₂ (0,01M),
- MgCl₂(6H₂O) (0,03M).

La préparation extemporanée du réactif iodure de zinc-tétr oxyde d'osmium (IZO) se fait

comme suit:

- Zinc (poudre): 3g dans 10 ml H₂O. A dissoudre sans chauffer.
- Iodure resublimé: 1g dans 10 ml H₂O. A dissoudre à l'obscurité, sans chauffer.
- . Mélange des deux solutions sous agitation, 15 min.
- . Filtration en obscurité.
- . Mélange du filtrat avec la solution A (vol./vol.), à l'obscurité.
- . Mélange de cette solution à OsO₄ 4% (4 vol./ 1vol.).

Les échantillons pulmonaires sont immergés dans cette solution pendant 20 h, à l'obscurité, sous agitation légère. Deux lavages de 10 min sont ensuite réalisés en solution tamponnée A, suivis d'une deshydratation et inclusion comme décrites dans le paragraphe précédent. Le contrôle s'effectue par un passage des échantillons pulmonaires dans une solution tamponnée de phosphate (0,1M, pH 6,8), contenant du dithiothreitol (DTT) (1 mM), entre les lavages en solution A et l'incubation dans la solution d'IZO. L'observation des coupes ultrafines se fait sans double coloration.

b. Inclusion en "London resin white" (LRW), résine hydrophile.

Cette résine est préconisée pour l'utilisation de sondes telles les lectines ou les anticorps.

Les échantillons pulmonaires sont fixés 30 min sur glace dans une solution de paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0,1% dans du cacodylate (0,1M, pH 6,8), puis lavés 30 min sur glace en solution tamponnée. La deshydratation se fait comme suit:

- Ethanol 30%, 10 min à 4°C.
- Ethanol 50%, 10 min à -20°C.
- Ethanol 70%, 10 min à -20°C.

Puis,

- mélange LRW/Ethanol 95% (2 vol./1vol.), 1 h à -20°C.
- LRW pure, 3x 1 h à -20°C.
- LRW, toute la nuit à 4°C.
- LRW, cinq jours à 37°C, temps nécessaire à la polymérisation.

c. Localisation de sites polysaccharidiques.

(1). Réaction de Thiéry, OP-TSC-PA.

L'imprégnation au réactif de Thiéry se fait sur coupe de poumon parasité inclus en Epon. La fixation ne diffère que par la teneur en glutaraldéhyde (1%). Les coupes sont récoltées sur des grilles de nickel préalablement membranées au parlodion. Les échantillons sont déposés sur une goutte d'acide périodique à 1% (oxydation périodique, OP) pendant 30 à 60 min à température du laboratoire. Les coupes sont ensuite lavées, puis déposées sur une solution de thiosemicarbazide (TSC) à 1% dans de l'acide acétique à 10% pendant 1 à 75 h, puis rapidement lavées sur de l'acide acétique à 10%, et enfin, soigneusement lavées sur de l'eau distillée pendant

1 h en chambre humide. Les coupes sont ensuite déposées sur une solution de protéinate d'argent (PA) à 1% pendant 30 min à température du laboratoire, et en chambre noire. Après un lavage soigneux, les préparations sont directement observées. Les échantillons de contrôle n'ont pas subi d'oxydation périodique.

(2). Lectines.

Deux lectines ont été testées: la Con A et la MPA.

Les coupes ultrafines de poumon parasité inclus en LRW sont collectées sur grilles de nickel membranées au parlodion. Elles sont ensuite déposées 5 min à température ambiante soit sur une solution tamponnée Tris (0,1M, pH 7) contenant 1 mM de CaCl_2 et 1 mM de MgCl_2 pour la Con A, soit dans une solution tamponnée au phosphate salin (0,02M, pH 7,45) pour la MPA, les deux solutions étant supplémentées avec 5% d'albumine de sérum bovin (BSA).

Pour le marquage direct: les coupes sont ensuite directement déposées 30 min sur une solution tamponnée contenant de la Con A (120–240 $\mu\text{g/ml}$) couplée à des particules d'or de 20 nm de diamètre (Con A– Au_{20} , Sigma, France). Les grilles sont ensuite lavées dans le même tampon complété de 0,1% de BSA, puis dans de l'eau distillée. Certaines grilles ont préalablement subi un décapage de 10 min en solution saturée de métapériodate, puis de 30 min dans une solution d' HCl 10^{-1}N .

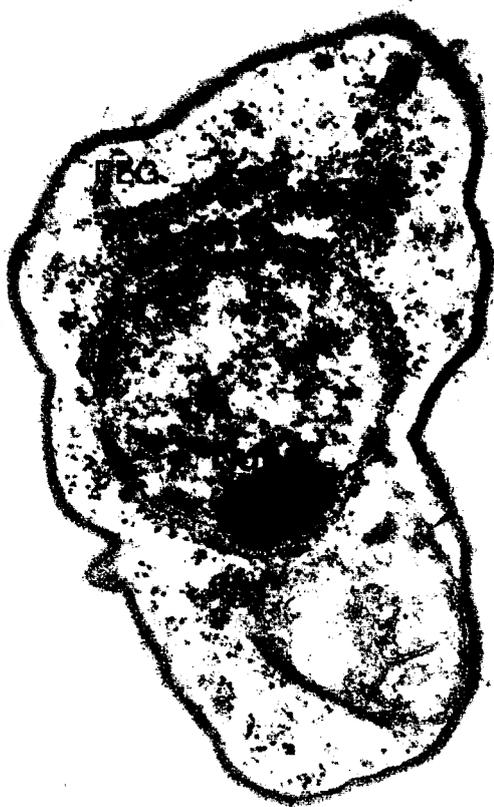
Trois types de contrôles ont été réalisés:

- Dépôt des grilles sur une solution de Con A– Au_{20} / α -D-mannopyranose (0,2M).
- saturation des grilles avec de la Con A non marquée avant incubation avec Con A– Au_{20} .
- Dépôt des grilles sur une solution d'or colloïdal.

Pour le marquage indirect: les coupes sont préincubées sur la solution à 10 $\mu\text{g/ml}$ de lectine biotinylée (Con A, MPA), puis lavées soigneusement dans les tampons respectifs et déposées sur une solution de streptavidine– Au_{10} (Janssen, Belgique).

Les mêmes contrôles que ceux décrits ci-dessus ont été réalisés, le sucre inhibiteur pour la MPA étant de l' α -D-mélobiose (0,2M). Un témoin supplémentaire consistant en une incubation directe des grilles sur une solution de streptavidine– Au_{10} a été apporté.

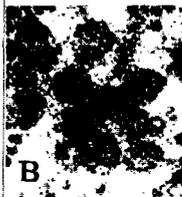
Après lavages soigneux, les grilles sont ensuite colorées à l'acétate d'uranyle aqueux à 4%.



A



B



C



D



d. Détection d'activités lysosomo-golgiennes.**(1). Activité thiamine pyrophosphatase (TPPase) et****(2). Activité cytidine monophosphatase (CMPase).**

Les activités thiamine pyrophosphatase et cytidine 5' monophosphatase ont été recherchées selon la technique décrite par Novikoff et Novikoff (1977).

(3). Activité β -glycérophosphatase (β -GPase).

Pour la détection d'activité β -glycérophosphatasiques (β -GPase), les échantillons pulmonaires parasités sont fixés 1 h à 4°C dans du glutaraldéhyde 2,5% dans du cacodylate (0,1M, pH 7,4) contenant 0,025% de CaCl₂. Ils sont ensuite lavés une première fois dans une solution de cacodylate, puis une seconde fois dans une solution tamponnée contenant 1,5% de diméthylsulfoxyde (DMSO) et 0,33 M de saccharose, et enfin une troisième fois dans une solution d'acétate de sodium (0,1M, pH 4,5) contenant 7,5% de saccharose. Les échantillons sont ensuite incubés 1 h à 37°C dans le substrat suivant:

- 1 ml d'une solution β -glycérophosphate de sodium à 3%.
- 10 ml d'une solution tamponnée d'acétate de sodium (0,1M, pH 4,5) contenant:
 - . 7,5% de saccharose.
 - . 25 mg de PbNO₃.

Les contrôles sont réalisés en l'absence des substrats.

Après un lavage soigneux, les échantillons sont post-fixés 30 min à 4°C avec une solution à 1% d'OsO₄, puis inclus en Epon comme décrit dans le Chapitre 2C2.

D. Résultats.

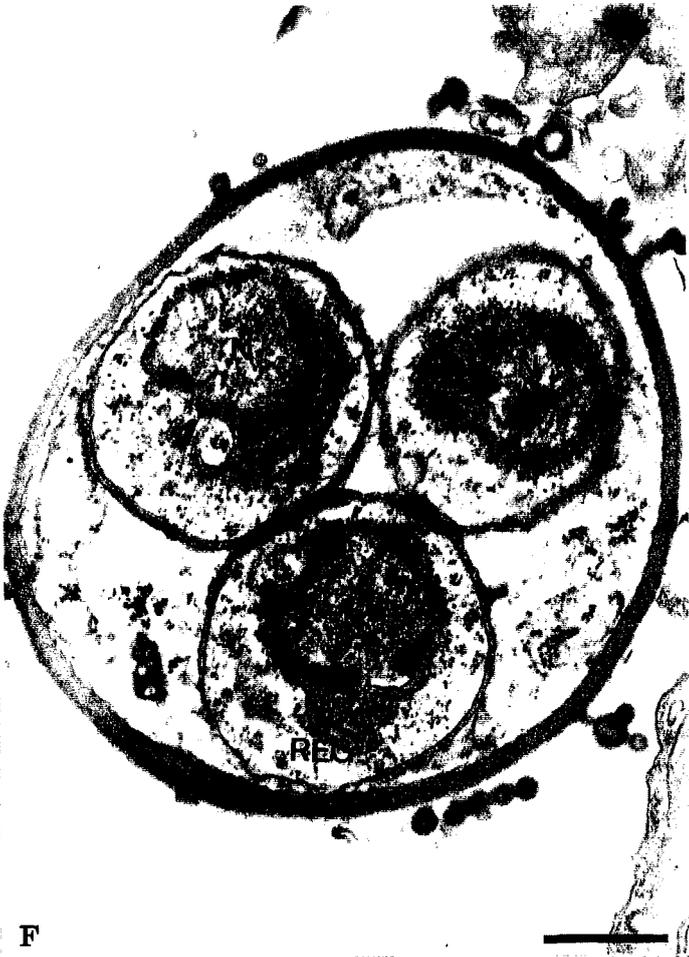
P. carinii du lapereau: Figure II.1.

Les trophozoïtes de petite taille aux contours améboïdes, présentent une paroi de 20-25 nm d'épaisseur reposant sur une membrane plasmique de 6-7 nm d'épaisseur. De petits prolongements tubulaires de 100 nm de diamètre interne sont observés. La citerne périnucléaire communique avec la citerne du réticulum endoplasmique granulaire (REG)

← **Figure II.1.** Ultrastructure de *P. carinii* du lapin. A. Trophozoïte de petite taille présentant une mitochondrie (Mi) qui bourgeonne (►). Nucléole (Nu), réticulum endoplasmique lisse (REL) et granulaire (REG), vésicules golgiennes (→). B. Trophozoïte de grande taille, sections de mitochondries (Mi), noyau (N); le premier type de saccule endoplasmique (SE₁) est spiralé et est en continuité avec le saccule de type 2 (SE₂); les vésicules golgiennes (→) sont observées à proximité du SE₁. L'encart présente des vésicules golgiennes d'un autre trophozoïte. C. Prékyste précoce. Le SE₂ internalise des vésicules golgiennes(→); un grand nombre de ces vésicules est observé dans le cytoplasme (cercle); de nombreuses sections de mitochondries (Mi) sont observées à proximité du SE₂. D. Prékyste intermédiaire avec 3 noyaux (N) sur le plan de coupe; le SE₂ est séparé de la citerne périnucléaire; (Mi), mitochondrie apposée au noyau. Trait = 0,5µm.

Figure II.1 (suite).

Ultrastructure de *P. carinii* du lapin.



et du réticulum endoplasmique lisse (REL) (Fig 1A). Au fur et à mesure que le parasite se développe, deux types de structures sacculaires de nature endoplasmique peuvent être observés. Le premier type consiste en un à plusieurs saccules endoplasmiques (SE₁) aux contours spiralés, de petite taille (1–1,5 µm), internalisant une portion de cytoplasme avec ou sans particules de glycogène, ou bien encore des mitochondries (Fig. 1B). Le second type de saccule endoplasmique (SE₂), seulement retrouvé dans les trophozoïtes de grande taille, se présente sous forme d'une grande structure sacculaire membranaire plate (1–1,5 µm de largeur) pouvant atteindre 6 µm de longueur (Fig. 1B). De petites vésicules golgiennes sont aussi observées à proximité des SE (Fig. 1B).

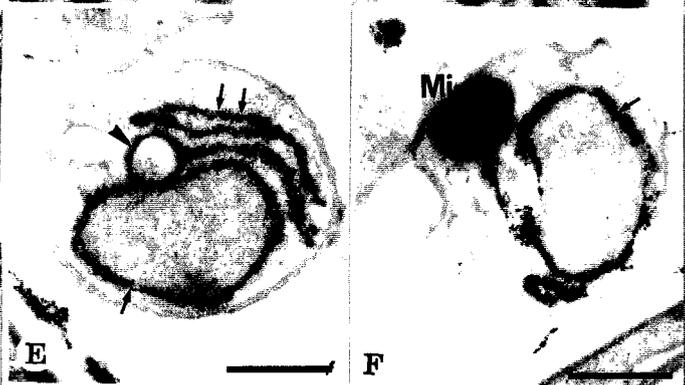
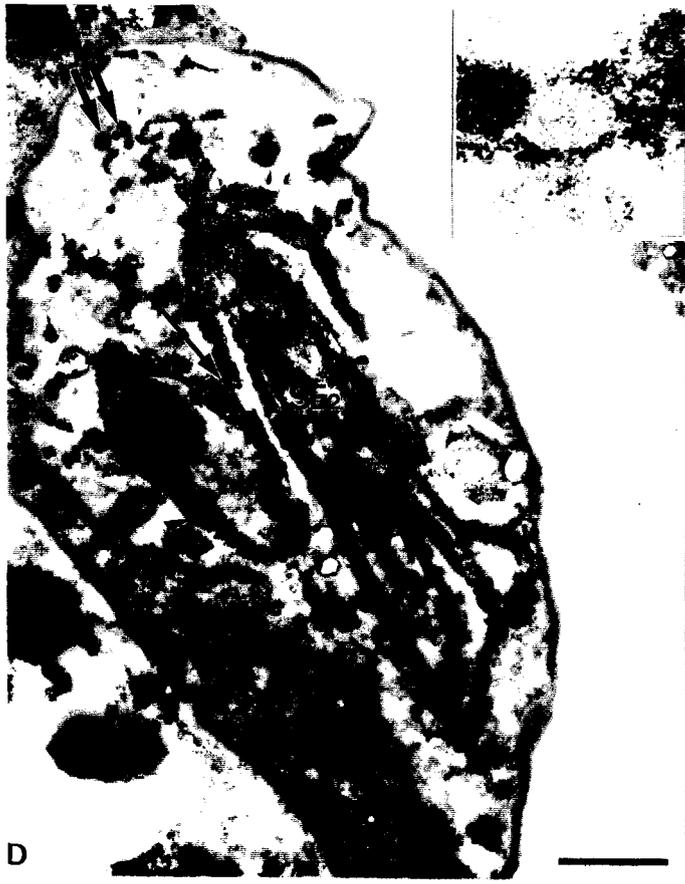
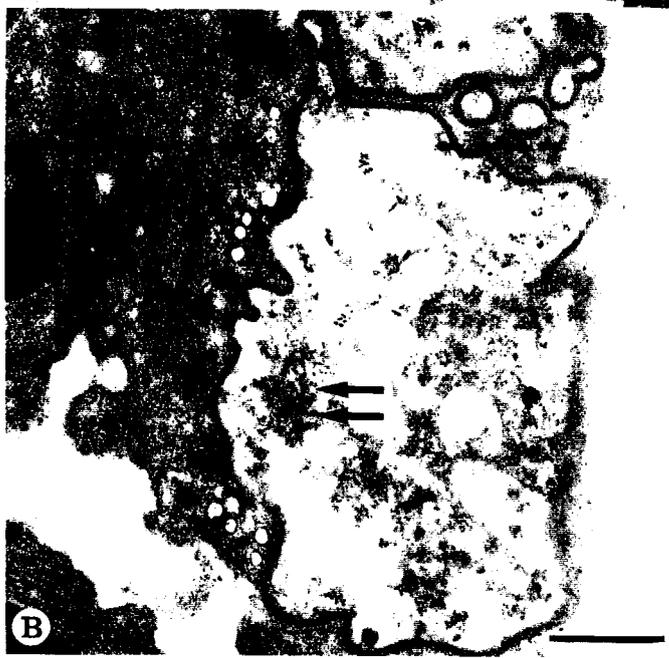
Toutes les formes prékystiques sont ovoïdes. Le prékyste précoce présente de nombreux prolongements tubulaires, moins nombreux toutefois que chez le trophozoïte. La paroi de ce stade reste similaire dans son aspect tinctorial à celle du trophozoïte, mais est un peu plus épaisse (25–30 nm). Les sections de mitochondries sont nombreuses. Les vésicules golgiennes sont fréquemment observées. Leur nombre s'accroît au fur et à mesure que le prékyste précoce évolue vers sa forme intermédiaire. Les lysosomes primaires ou vésicules golgiennes ainsi que des particules de glycogène sont fréquemment retrouvées dans l'espace cytoplasmique internalisé dans les SE₂ (Fig. 1C).

La paroi du prékyste intermédiaire (Fig. 1D) se caractérise par le développement d'une couche intermédiaire peu dense aux électrons entre la membrane plasmique et la couche externe dense. Cette couche peu dense atteint une épaisseur d'environ 20 nm. Les divisions nucléaires semblent asynchrones dans la mesure où trois à cinq noyaux peuvent être observés dans un parasite observé à partir de coupes sériées. La présence d'un organite associé au noyau est retrouvé à la périphérie de chaque noyau (donnée non présentée). L'enveloppe nucléaire semble partiellement préservée durant la division nucléaire. De nombreuses sections de mitochondries sont observées. Les deux types de SE sont encore présents.

← **Figure II.1 (suite).** E. Prékyste tardif avec individualisation progressive des CIK par invagination de la membrane plasmique (→), N, noyau; Nu, nucléole. F. Kyste mature présentant 3 corps intrakystiques ovoïdes contenant un noyau (N) et du REG. G. Kyste mature avec des CIK denses en forme de "banane". H. Kyste mature présentant des CIK développés similaires aux petits trophozoïtes. Trait = 0,5µm.

Figure II.2.

P. carinii traité par le réactif iodure de zinc-téroxide d'osmium.



Le stade prékyste tardif (Fig. 1E) se caractérise par la formation de CIK. La couche externe dense aux électrons de la paroi atteint 40 nm d'épaisseur, alors que la couche peu dense atteint 24–28 nm. Les sections de mitochondries sont proches des noyaux.

Le kyste mature (Fig. 1F, G et H) présente une paroi plus épaisse consistant en une couche externe dense de 50 nm d'épaisseur et une couche sous-jacente peu dense de 40–45 nm. Les organites cytoplasmiques et les mitochondries sont altérés. Huit CIK, pouvant se présenter sous trois morphologies différentes, sont dénombrés dans les kystes matures observés de façon sériée. La première se présente sous forme de CIK ronds (Fig. 1F), d'environ 1 µm de diamètre, présentant un noyau, un REG et une mitochondrie. La seconde est une forme plus dense de CIK, en "forme de bananes", dans lesquels il est possible de distinguer le noyau et le REG (Fig. 1G). La troisième se présente sous forme de CIK plus développés, similaires aux petits trophozoïtes, mais sans prolongement tubulaire (Fig. 1H).

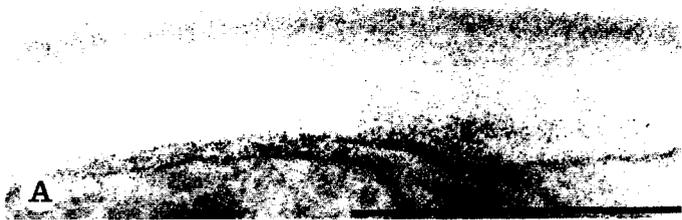
Imprégnation à l'IZO: Figure II.2.

L'imprégnation à l'IZO après traitement au DTT augmente considérablement le contraste des structures endomembranaires et de la mitochondrie. Ce marquage se retrouve sur l'enveloppe nucléaire des trophozoïtes (Fig. 2A, C et D). Les pores nucléaires de 55 à 80 nm de diamètre sont alors facilement observables sur des coupes épaisses (100–150 nm) (Fig. 2D). Le réticulum endoplasmique des formes trophozoïtes est en communication avec la citerne périnucléaire (Fig. 2A), et présente de nombreux prolongements cytoplasmiques aplatis ou spiralés. Les vésicules golgiennes sont facilement détectées grâce au réactif IZO (Fig. 2B). Les deux types de SE sont fortement imprégnés, et leur continuité avec la

← **Figure II.2.** *P. carinii* traité par le réactif iodure de zinc-téroxide d'osmium. A. Trophozoïte avec un réticulum endoplasmique bien développé (→), une mitochondrie bien développée (Mi), un noyau (N); cellule hôte (CH). B. Trophozoïte avec des vésicules golgiennes (⇌); cellule hôte (CH). C. Trophozoïte présentant des saccules endoplasmiques de type 1 (→) internalisant du cytoplasme et une mitochondrie (Mi); les vésicules golgiennes (⇌) sont observées à proximité du SE₁; nucléole (Nu); cellule hôte (CH). D. Trophozoïte de grande taille. Le SE₂ est en communication avec la citerne périnucléaire (→). Les pores nucléaires sont identifiables (▶, et encart); les vésicules golgiennes (⇌) sont proches du SE₂, (encart x 86 000). E et F. Corps intrakystiques présentant une enveloppe nucléaire bien marquée (→), du réticulum endoplasmique (⇌) et un petit SE₁ (▶); mitochondrie (Mi). G. Corps intrakystique présentant un SE₁, et des vésicules golgiennes (⇌) bourgeonnant à partir de ces structures sacculaires. Trait = 0,5 µm.

Figure II.3.

Mise en évidence de polysaccharides chez *P. carinii* par l'OP-TSC-PA.



citerne périnucléaire est alors clairement mise en évidence (Fig. 2C et D). Le SE₁ peut contenir des mitochondries en cours d'internalisation (Fig. 2C), ou plus fréquemment du cytoplasme (Fig. 2C, E, F). Les vésicules golgiennes sont observées à proximité des SE₁ (Fig. 2C). La continuité du SE₂ (correspondant ici au SE₂ montré dans la Fig. 1B et C) avec la citerne périnucléaire est ici clairement observée (Fig. 2D). Dans cette figure, les vésicules golgiennes se trouvent près de la portion apicale du SE₂.

Le réactif IZO est aussi associé avec l'enveloppe nucléaire, le REG et la mitochondrie des CIK (Fig. 2E et F). De plus, dans ces CIK, les structures sacculaires et les vésicules golgiennes qui semblent se développer par bourgeonnement à partir des SE, sont imprégnées par l'IZO (Fig. 2G).

Aucune différence majeure n'a été observée lorsque les échantillons n'ont pas été soumis à l'action du DTT, à l'exception peu être d'un marquage moindre pour les vésicules golgiennes.

Mise en évidence de polysaccharides pariétaux:

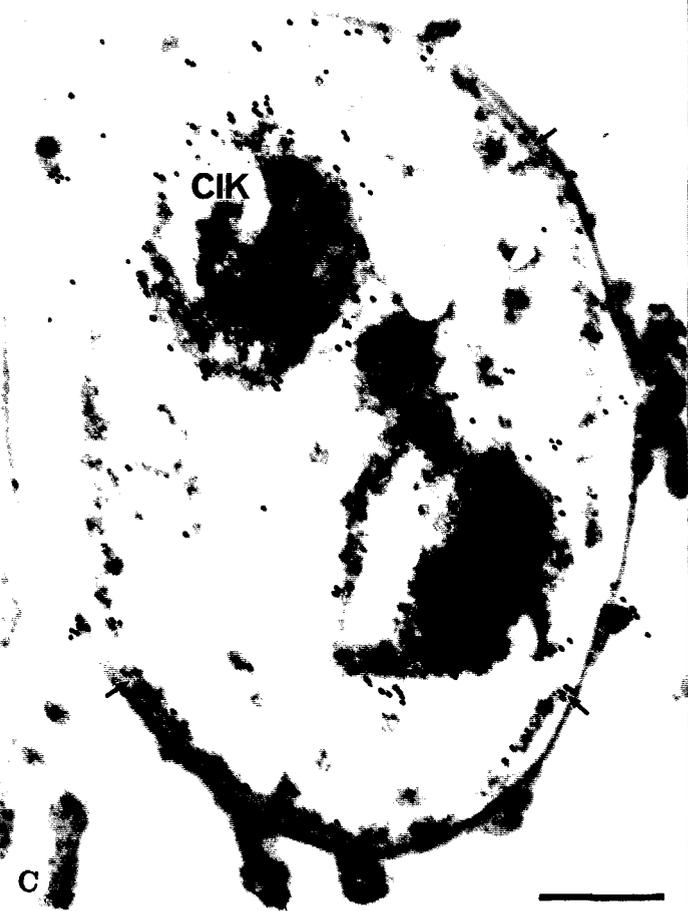
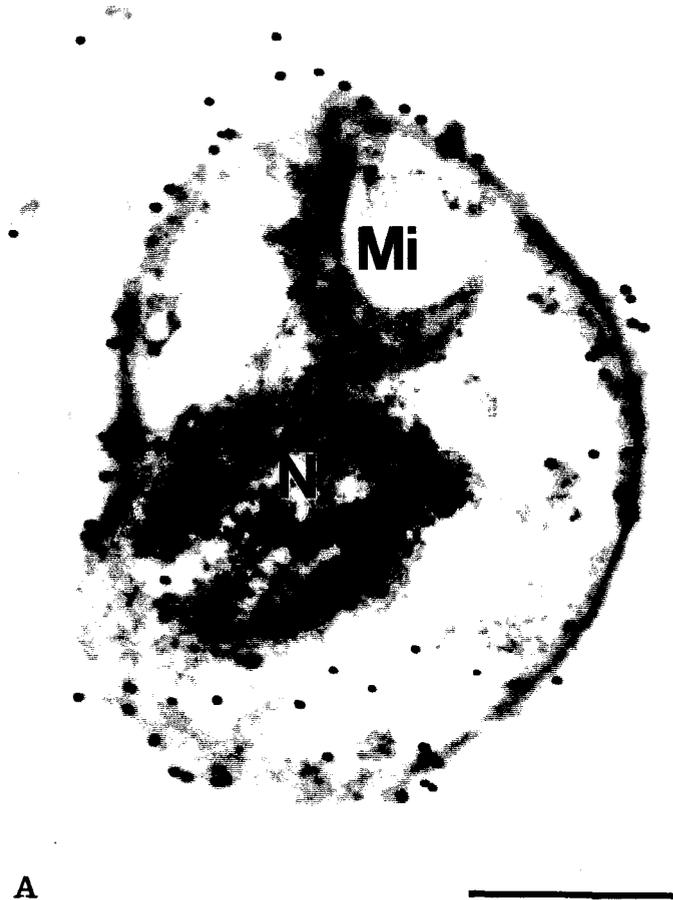
Réaction à l'OP-TSC-PA: Figure II.3.

La couche intermédiaire peu dense aux électrons de la paroi prékystique et kystique est marquée faiblement et de façon hétérogène (Fig. 3B et D). Pour tous les stades, les granules de glycogène observés dans les espaces cytoplasmiques des SE sont fortement marqués. Ce marquage est observé pour une oxydation périodique de 30 min et une

← **Figure II.3.** Mise en évidence de polysaccharides chez *P. carinii* par l'OP-TSC-PA. **A.** Contrôle. Lorsque l'oxydation périodique est omise, aucune réaction positive au TSC-PA n'est observée sur la paroi (kyste mature). **B.** Vue à fort grossissement du même kyste mature présenté en A, mais ayant subi une oxydation périodique avant d'être exposé au TSC-PA. La couche dense aux électrons n'est pas sensible à l'OP-TSC-PA, alors que la couche sous-jacente peu dense l'est faiblement. **C.** Faible agrandissement du kyste mature présenté en A (contrôle). La couche pariétale peu dense (►) de la paroi kystique, ainsi que les particules de glycogène (★) ne sont pas colorées. **D.** Faible agrandissement du kyste mature présenté en B. La couche intermédiaire peu dense (►) présente une coloration hétérogène à l'OP-TSC-SP. Les particules de glycogène (★) sont fortement marquées. **E.** Vue à faible grossissement de la paroi d'un trophozoïte sur un échantillon de contrôle (sans oxydation périodique). La membrane plasmique est imprégnée par le TSC-PA (►), alors que la paroi ne l'est pas. **F.** Trophozoïte coloré par l'OP-TSC-PA. La paroi n'est pas colorée alors que les particules de glycogène le sont fortement (★). Trait = 0,5 µm.

Figure II.4.

Détection de polysaccharides reconnus par la Con A-Au₂₀ sur *P. carinii* inclus en LRW.



incubation en TSC-PA d'une heure. Un traitement prolongé n'apporte pas de modification du marquage. Aucun marquage clair n'est observé chez les trophozoïtes après traitement à l' OP-TSC-PA, à l'exception des granules de glycogène (Fig. 3F).

Un marquage non spécifique est observé sur la membrane plasmique des trophozoïtes n'ayant pas subi d'oxydation périodique (Fig. 3E). La couche intermédiaire peu dense de la paroi prékystique et kystique et les granules de glycogène ne sont pas marqués dans les échantillons contrôles (Fig. 3A et C).

Marquage sur coupes avec lectines: Figure II.4.

Les structures parasitaires de surfaces sont fortement marquées par la Con A-Au₂₀. La paroi des petits et des grands trophozoïtes (Fig. 4A et B), des formes prékystiques et kystiques (Fig. 4C), ainsi que la surface de CIK sont fortement marquées. Le marquage est observé sur les deux couches pariétales kystiques ainsi que sur la face interne de la membrane plasmique (Fig. 4C). Les prolongements tubulaires des trophozoïtes vides sont fortement marqués (Fig. 4B).

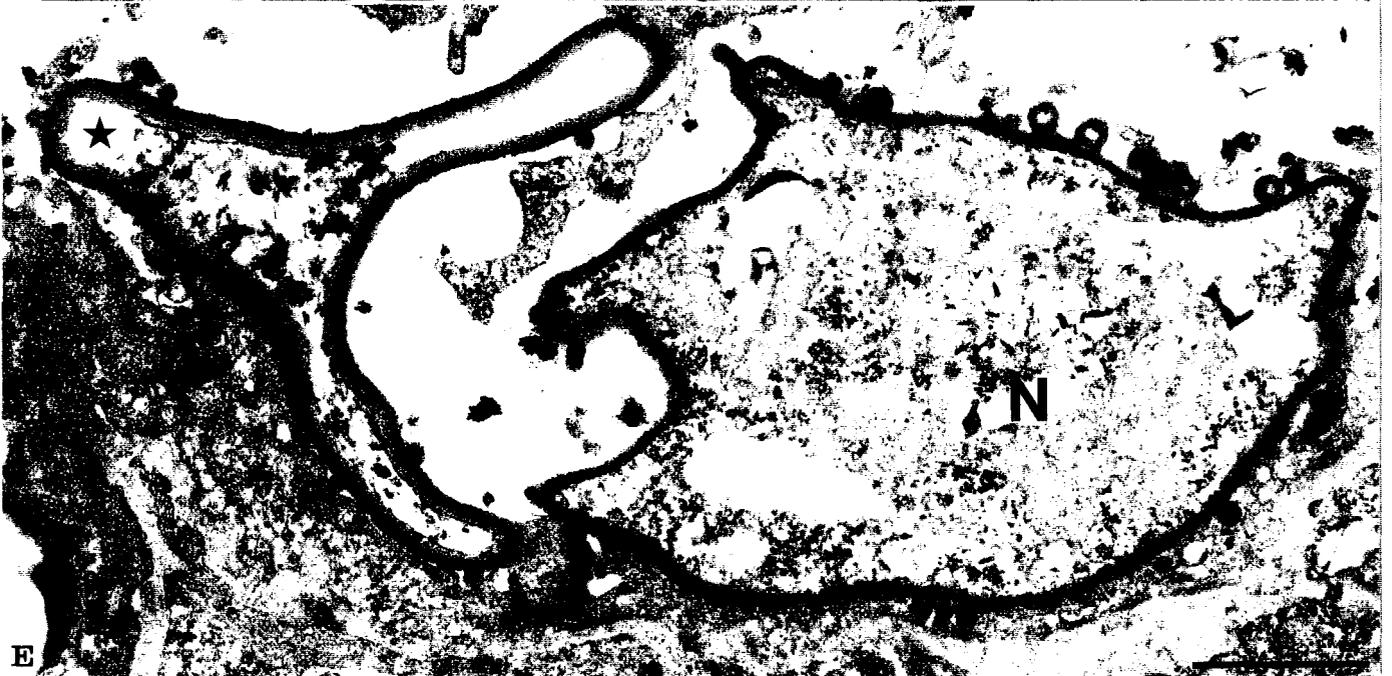
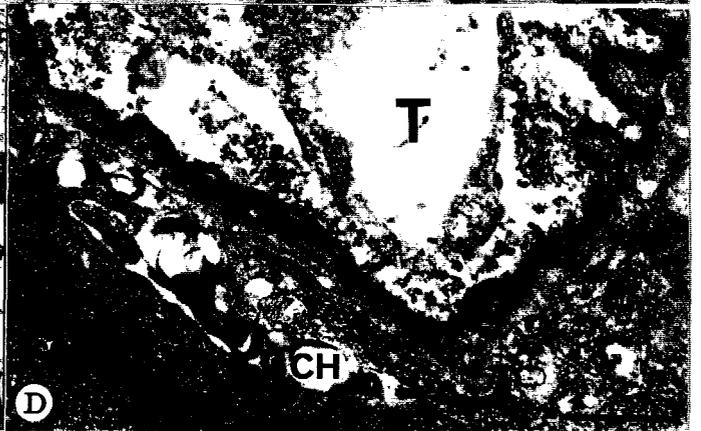
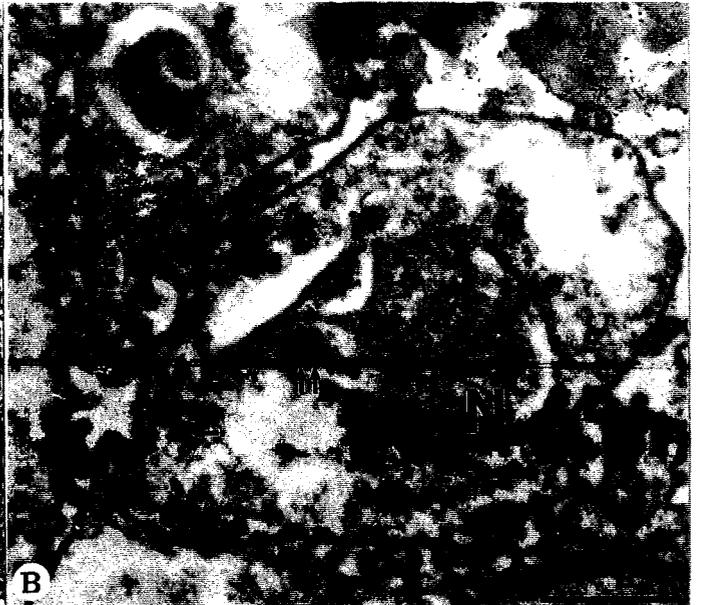
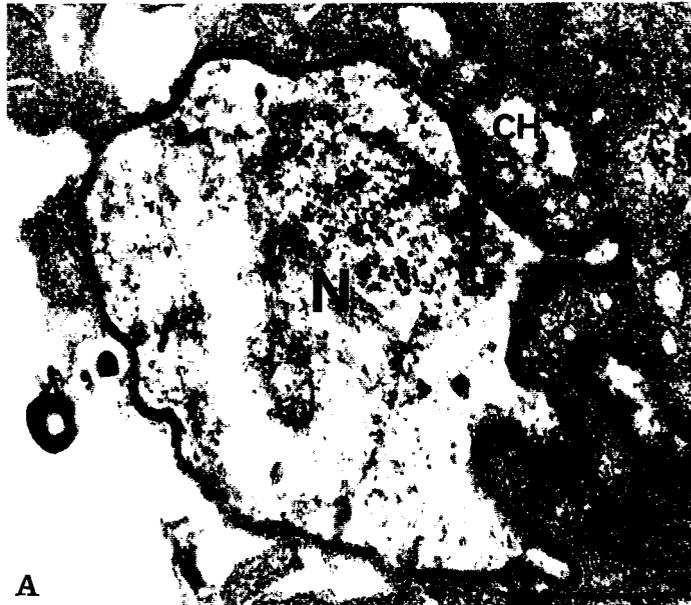
Les contrôles ne présentent pas de marquages spécifiques (Fig. 4D, E et F).

Les marquages obtenus avec le système avidine/biotine ne sont pas présentables dans la mesure où un marquage est observé dans un des contrôles, marquage obtenu sur la paroi et dans le cytoplasme pour une incubation des échantillons sur de la streptavidine couplée à des particules d'or. Ce marquage disparaît lorsque les échantillons sont préincubés sur de la streptavidine non marquée (données non présentées, voir Chap. VII).

← **Figure II.4.** Détection de polysaccharides reconnus par la Con A-Au₂₀ sur *P. carinii* inclus en LRW. **A.** Petit trophozoïte présentant de nombreuses particules d'or sur sa paroi. Noyau (N), mitochondrie (Mi). **B.** Trophozoïte vide de plus grande taille présentant de nombreuses particules d'or sur sa paroi; les prolongement tubulaires sont marqués. **C.** Kyste mature présentant des particules d'or sur les deux couches pariétales (→); la surface des corps intrakystiques (CIK) est plus intensément marquée. **D, E, F.** Echantillons contrôles. **D.** kyste mature incubé avec des particules d'or de 20 nm; aucun marquage spécifique n'est détecté. **E.** trophozoïte (T) incubé avec de la Con A-Au₂₀ et son sucre inhibiteur (α -D-mannopyranoside); aucun marquage spécifique n'est observé. **F.** kyste dégénéré (KD) préincubé avec de la Con A non marquée, puis avec de la Con A-Au₂₀. Aucune particule d'or n'est observée. Trait = 0,5 μ m.

Figure II.5.

Localisation ultrastructurale d'activités phosphatasiques chez *P. carinii*.



Activités phosphatasiques: Figure II.5.

Afin de caractériser l'appareil de Golgi et les lysosomes, des activités phosphatasiques ont été recherchées. Trois substrats ont été utilisés (CMP, TPP et β GP). Aucune activité CMPase n'est détectée. Pour les trophozoïtes, une activité TPPase est retrouvée dans le noyau (Fig. 5A), dans des vésicules cytoplasmiques et dans les zones cytoplasmiques internalisées dans le SE_1 (Fig. 5B). Un léger marquage non spécifique est observé sur la paroi des trophozoïtes. Aucun marquage n'est observé dans les formes prékystiques.

Une activité β -GPase est observée dans le noyau des trophozoïtes et des prékystes précoces (Fig. 5C, D et E). La paroi des trophozoïtes est occasionnellement marquée, ainsi que la zone d'attachement entre le parasite et le pneumocyte de type I (Fig. 5E).

Les contrôles ne présentent pas de marquages spécifiques.

E. Discussion.

Nos recherches se sont portées sur *P. carinii* provenant de lapins non immunodéprimés afin de s'extraire de l'influence potentielle des corticoïdes. Dans ce modèle, tous les stades parasitaires ont été retrouvés, à l'exception des formes trophozoïtes à multiplication par endogénie fréquemment retrouvées chez le modèle rat (Vossen et coll., 1978), qui n'ont jamais pu être détectées au cours de nos nombreuses observations. Noyau, REG et mitochondries sont présents à tous les stades et sont similaires à ceux retrouvés chez *P. carinii* de rat (Barton et Campbell, 1969; Ham et coll., 1971; Hughes, 1989; Itatani et Marshall, 1988; Matsumoto et coll., 1984, 1989; Takeuchi, 1980; Vávra et Kucera, 1970; Vossen et coll., 1978), ou *P. carinii* d'humain (Haque et coll., 1987), ou de souris (Soulez et coll., non publié). Par contre le nombre de prolongements tubulaires est moins important

← **Figure II.5.** Localisation ultrastructurale d'activités phosphatasiques chez *P. carinii*. **A.** Petit trophozoïte. Une activité TPPase est détectée dans le noyau (N); cellule hôte (CH). **B.** Trophozoïte de plus grande taille. L'activité TPPase est détectée dans le noyau (N), dans les vésicules golgiennes (\rightarrow), et dans le SE_1 (\Rightarrow). Un marquage non spécifique est observé sur la paroi. **C.** Trophozoïte présentant une activité β -GPase dans son noyau (N) et dans la périphérie nucléaire cytoplasmique. **D.** Trophozoïte présentant une activité β GPase pariétale au niveau de la zone de contact avec la cellule hôte (CH). **E.** L'activité β -GPase est aussi observée dans le noyau (N) des prékystes, et dans le cytoplasme des kystes dégénérés (\star). Trait = 0,5 μ m.

pour *P. carinii* de lapin que celui trouvé chez *P. carinii* de souris (Dei-Cas et coll., non-publié).

Les deux types de saccules endoplasmiques mis en évidence sont particulièrement détectables sous coloration à l'IZO. Le premier type de saccule (SE₁) semble, par l'internalisation de mitochondries ou de cytoplasme, être doté d'activités autophagiques, et pourrait donc à ce titre prendre le rôle de lysosomes secondaires. L'activité TPPase, reconnue comme marqueur de l'appareil de Golgi (Rambourg et coll., 1990), est retrouvée dans le cytoplasme phagocyté du SE₁, indiquant la présence d'une activité golgienne.

Le second type de saccule (SE₂), beaucoup plus développé que le SE₁, n'est retrouvé que dans les trophozoïtes de grande taille, ainsi que dans les prékystes multinucléés. La présence de cette structure semble être un événement préliminaire à une division nucléaire soit mitotique, précédant la fission binaire chez les trophozoïtes de grande taille, soit méiotique pour les prékystes. Ce SE₂ pourrait donc jouer un rôle dans le processus de division; ceci n'est qu'une hypothèse qu'il reste à conforter par d'autres arguments. Néanmoins, elle est partiellement étayée par des observations faites sur des coupes sériées d'un prékyste précoce binucléé (voir Chap. IV), indiquant que le SE₂ n'est plus en contact avec la citerne périnucléaire après que la première division nucléaire se soit achevée.

Lors d'une étude préliminaire sur *P. carinii* du lapin *in vitro*, la présence de petites vésicules regroupées en amas, de nature et de rôle inconnus, avaient été décrites comme des "Golgi-like vesicles" (Dei-Cas et coll., 1989). Ces petites vésicules sont retrouvées *in vivo*, et sont particulièrement bien contrastées par le réactif IZO qui permet alors de les localiser dans tous les stades parasitaires. Nos observations suggèrent fortement que ces vésicules se développent par bourgeonnement à partir des SE.

La présence de polysaccharides dans la paroi de *P. carinii* provenant de rats a été rapportée (Matsumoto et coll., 1989; Yoshikawa et coll., 1987b et c, 1988), mais aucun appareil de Golgi n'a été observé (Yoshida, 1989). Utilisant l'IZO et les coupes sériées, nous avons pu observer des structures d'un appareil de Golgi rudimentaire. Nos résultats

sur la composition en polysaccharides de la paroi de *P. carinii* sont en accord en ce qui concerne la Con A, avec ceux obtenus sur *P. carinii* de rats (Yoshikawa et coll., 1988). Par contre, alors que, dans nos conditions expérimentales, seule la couche intermédiaire peu dense est sensible à l'OP-TSC-PA, il semblerait qu'elle ne le soit plus face à l'OP-TCH-PA qui n'imprègne que la couche externe dense (Yoshikawa et coll., 1988).

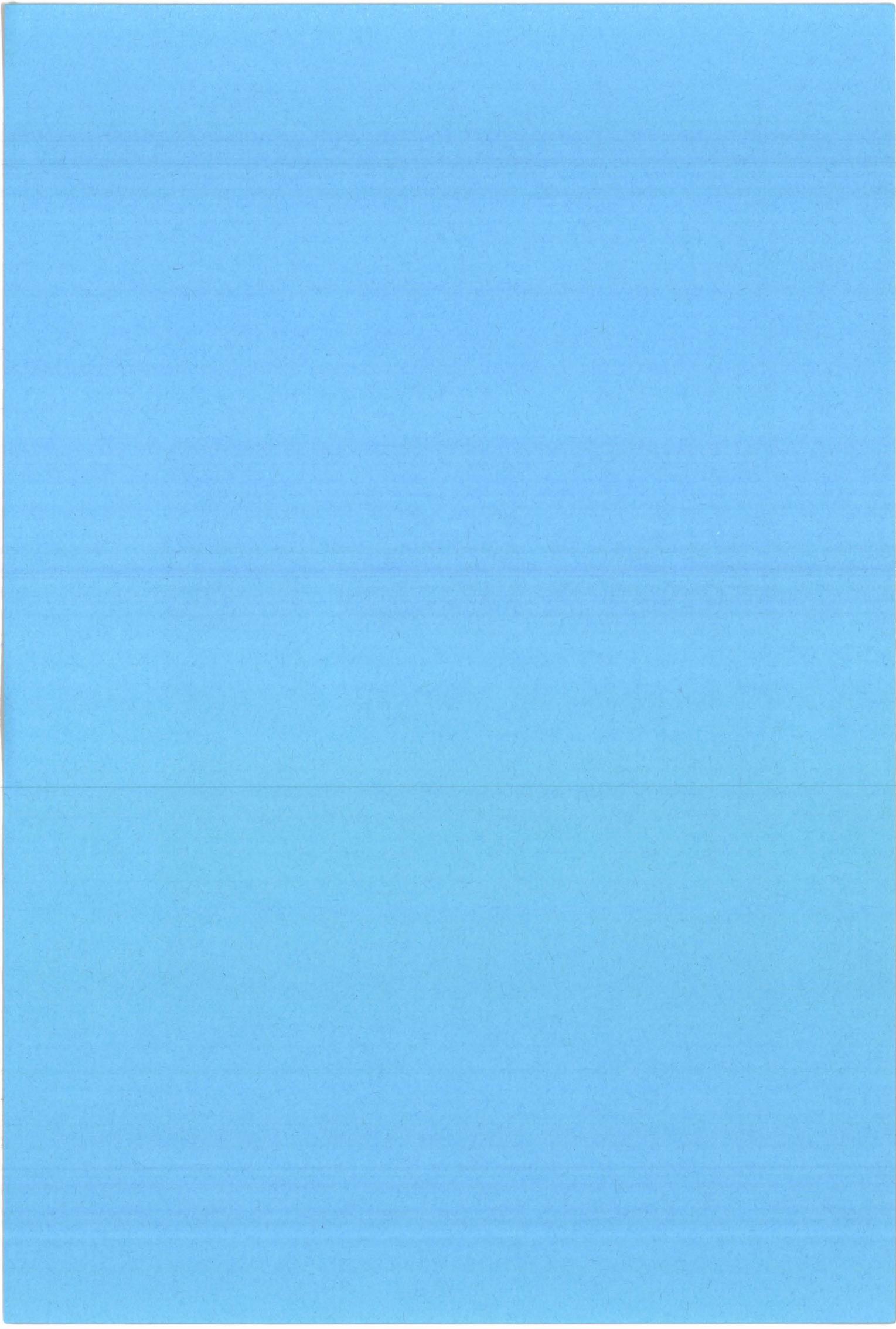
Un faible taux de polysaccharides est retrouvé sur la paroi parasitaire, ce qui serait en accord avec la présence de l'appareil de Golgi rudimentaire décrit dans nos travaux. Récemment, des résultats sur l'action de la zymolyase (contenant, entre autres, une β -1,3 glucane laminaripentaohydrolase) sur des extraits parasitaires, ont permis de suggérer la présence de β -1,3 glucanes dans la paroi kystique (Matsumoto et coll., 1989). En accord avec ces résultats, l'action des échinocandines et des papulocandines, deux inhibiteurs de la synthèse des β -1,3 glucanes, efficaces contre *Candida albicans* et contre *P. carinii* *in vivo*, conforte cette présence (Schmatz et coll., 1990). Cependant, ces deux groupes de molécules n'ont qu'une action inhibitrice limitée sur la synthèse des β -1,3 glucanes de *P. carinii*, et leur mode d'action contre ce parasite pourrait être différent de celui défini sur *C. albicans* (Schmatz et coll., 1990). D'autre part, les β -1,3 glucanes ne sont pas sensibles à l'oxydation périodique (Novikoff et Novikoff, 1977). Bien que *P. carinii* se colore au réactif de Schiff après oxydation périodique (Yoshikawa et coll., 1988), son affinité est beaucoup moins intense que celle des *Fungi* (observations non publiées). La présence de polymères polysaccharidiques hautement ramifiés pourrait expliquer ces faibles détections.

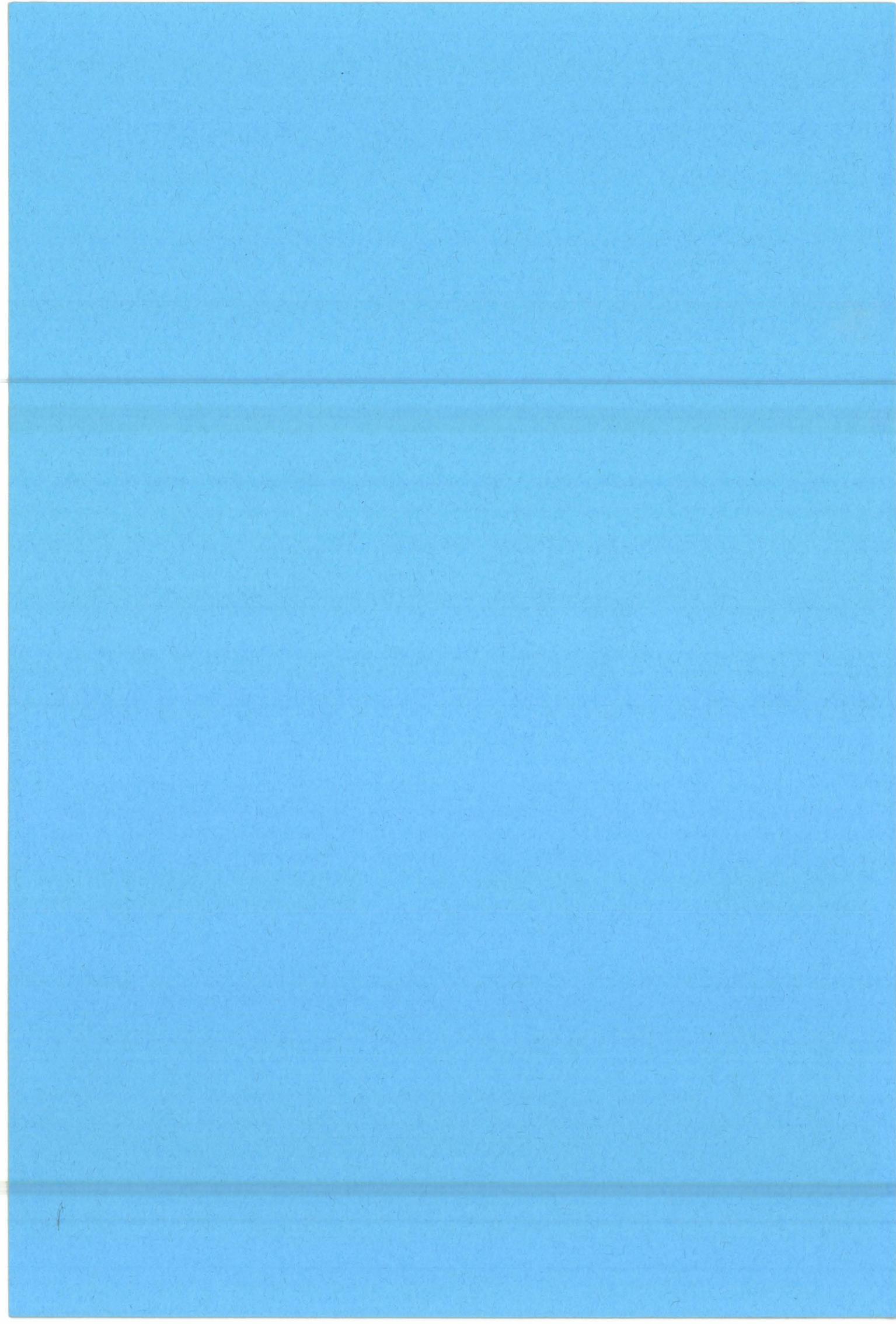
Bien que *P. carinii* partage des affinités tinctoriales, biochimiques, cytochimiques et génomiques avec des organismes fongiques (Hughes, 1989; Dei-Cas et coll., 1990), sa paroi kystique présente, par comparaison aux résultats obtenus sur celle de *C. albicans* (Poulain et coll., 1985), nettement moins de sites reconnus par la Con A et est beaucoup moins sensible à l'OP-TSC-PA. La paroi de ce champignon se présente, pour une épaisseur de 200 à 300 nm, sous forme de neuf strates successives, mises en évidence par le réactif de Thiéry (Poulain et coll., 1985). Cette paroi fongique contraste avec celle de *P. carinii* dont l'épaisseur est d'environ 100 nm, et pour laquelle seule la couche

intermédiaire peu dense est faiblement marquée par le réactif de Thiéry. De plus, bien que la réactivité de la paroi de *P. carinii* face à la Con A soit considérée par certains auteurs comme étant forte (Cushion et coll., 1988; Yoshikawa et coll., 1987b et 1988), les solutions de lectine Con A utilisées sur *C. albicans* sont moins concentrées (Tronchin et coll., 1984) que celles utilisées sur *P. carinii*. Plus précisément, la concentration de Con A-Au utilisée pour les études sur *C. albicans* est de l'ordre de 8 à 10 $\mu\text{g/ml}$ (Dr. J-C Caille, communication personnelle), alors qu'elle est de l'ordre de 100 à 240 $\mu\text{g/ml}$ pour celles faites sur *P. carinii* (Yoshikawa et coll., 1988; et résultats présentés dans ce chapitre). Le marquage sur *C. albicans* étant beaucoup plus intense, il est possible d'estimer un rapport de 100 entre la réactivité pariétale de ces deux micro-organismes.

Les contrôles positifs effectués pour le marquage indirect par des lectines biotinyllées, ont révélé que la streptavidine pouvait reconnaître des structures parasitaires pariétales et cytoplasmiques difficilement identifiables dans des préparations où la préservation ultrastructurale était alors déficitaire. Ce marquage pourrait être dû aux conditions expérimentales; mais il pourrait aussi indiquer la présence de biotine endogène chez *P. carinii* (voir Chap. VII).

Les activités β -GPase et TPPase dans les vésicules cytoplasmiques sont des arguments supplémentaires en faveur de la présence de lysosomes primaires et de vésicules golgiennes (Rambourg et Leblond, 1990) chez *P. carinii*. De plus une étude récente de reconstitution tridimensionnelle (voir Chap. III et IV) nous a révélé que les grandes formes de trophozoïtes ainsi que les prékystes pouvaient présenter plus de 200 vésicules golgiennes. La transition du stade à paroi fine vers le stade à paroi épaisse pourrait nécessiter une plus grande synthèse de composants pariétaux. Enfin, l'activité β -GPase observée sur la paroi des trophozoïtes au niveau de la zone d'attachement pourrait suggérer des interactions intenses avec la cellule cible. La présence de précipités de phosphate de plomb dans le noyau parasite, considérée par certains auteurs comme artéfactuelle (Barka et Anderson, 1962), a déjà été rapportée chez *P. carinii* en utilisant comme substrat le p-nitrophenylphosphate (Barton et Campbell, 1969).





Etude Ultrastructurale et Cytochimique de *Pneumocystis carinii*
Delanoë et Delanoë, 1912. Organisation Cellulaire et Implications dans la
Synthèse Pariétale.

ABREVIATIONS & ANGLICISMES

- Ac: acétyl.
 BGP/BGPase: β -glycérophosphate/ β -glycérophosphatase.
 BPA: lectine extraite de *Bauhinia purpurea*.
 BSA: albumine de sérum bovin.
 CATIA: Conception Assistée Tridimensionnelle Inter Active, Dassault systèmes.
 CMP/CMPase: cytidine monophosphate/cytidine monophosphatase.
 Con A: lectine extraite de *Concanavalia ensiformis*.
 CIK: corps intrakystique.
 DBA: lectine extraite de *Dolichos biflorus*.
 DAB: diaminobenzidine.
 DHFR: dihydrofolate réductase.
 DMSO: diméthylsulfoxyde.
 DTT: dithiothreitol.
 FE: facteur d'élongation.
 Gal: galactosamine.
 Glc: glucosamine.
 GS-I: lectine extraite de *Griffonia simplicifolia*.
 GS-II: " " " *Griffonia simplicifolia*.
 Ig: immunoglobuline.
 IZO: réactif comprenant de l'iodure de zinc et du tétraoxyde d'osmium.
 kDa: kilodalton.
 kV: kilovolts.
 LFA: lectine extraite de *Limax flavus*.
 LBA: lavage bronchoalvéolaire.
 LRW: résine hydrophile London Resin White.
 mOsm: milliosmoles.
 MPA: lectine extraite de *Maclura pomifera*.
 MET: microscopie électronique à transmission.
 OP-TCH-PA: oxydation périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent.
 OP-TSC-PA: oxydation périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent.
 PABA: acide para-aminobenzoïque.
 PBS: tampon phosphate salin.
 PNA: lectine peanut agglutinin extraite de *Arachis hypogaea*.
 PPC: pneumonie à *Pneumocystis carinii*.
 PVP: polyvinyl pyrrolidone.
 PWMc: pokeweed mitogen.
 RE: réticulum endoplasmique.
 REG: réticulum endoplasmique granulaire.
 REL: réticulum endoplasmique lisse.
 SBA: lectine soybean agglutinin extraite de *Glycine max*.
 SCID: severe combined immunodeficiency: déficience congénitale en lymphocytes B et T.
 SE: saccule endoplasmique.
 SIDA: syndrome d'immunodéficiences acquises.
 STA: lectine extraite de *Solanum tuberosum*.
 TOL: Tomato lectin.
 TPP/TPPase: Thiamine pyrophosphate/Thiamine pyrophosphatase.
 TS: thymidylate synthétase.
 UEA-I: lectine extraite de *Ulex europaeus*.
 VAA: lectine extraite de *Viscum album*.
 VIH: virus de l'immunodéficiences humaine.
 WGA: lectine wheat germ extraite de *Triticum vulgare*.
 3-D: tridimensionnelle.

Figures et tableaux :

Figure I.1: Cycle de <i>P. carinii</i> de rat (Yoshida, 1989)	15
Figure I.2: Cycle de <i>P. carinii</i> chez l'homme (Campbell, 1972)	16
Figure I.3: Dessin de la structure fine de <i>P. carinii</i> de rat (Yoshida, 1989)	20
Figure II.1: Ultrastructure de <i>P. carinii</i> du lapin.	41
Figure II.2: Ultrastructure de <i>P. carinii</i> traité au réactif IZO.	43
Figure II.3: Mise en évidence de polysaccharides par l'OP-TSC-SP. ...	44
Figure II.4: Détection de polysaccharides reconnus par la Con A.	45
Figure II.5: Localisation d'activités phosphatasiques	46
Figure III.1: Technique de reconstruction 3-D	51
Figure III.2: Coupes sériées dun petit trophozoïte de <i>P. carinii</i> du lapin	52
Figure III.3: Reconstruction 3-D d'un petit trophozoïte (4 vues)	53
Figure III.4: Reconstruction 3-D d'un petit trophozoïte	54

Figure IV.1: Coupes s�riees d'un prékyste intermédiaire binucl�e de <i>P. carinii</i> du lapin	56
Figure IV.2: Reconstruction 3-D d'un prékyste intermédiaire binucl�e	57
Figure IV.3: Reconstruction 3-D du SE2 et des vésicules golgiennes	58
Figure V.1: Reconstruction 3-D de la mitochondrie de <i>P. carinii</i> du lapin	61
Figure V.2: Activité cytochrome oxydase dans les alvéoles pulmonaires parasitées	62
Figure V: Chaîne de transfert des électrons/sites de réaction de la cytochrome oxydase	62
Figure V.3: Activité cytochrome oxydase de <i>P. carinii</i> du lapin	63
Figure V.4: Echantillons contrôles	64
Figure VI.1: Influence de l'osmolarité sur la préservation ultrastructurale	69
Figure VI.2.A: Ultrastructure de <i>P. carinii</i> fixé et lavés sous une tonicité de 870 mOsm	69
Figure VI.2 B et C: (suite)	70
Figure VI.2.D et E: (suite)	71
Figure VI.3: <i>P. carinii</i> fixé et lavé sous une tonicité de 870 mOsm et postfixé à l'IZO	72
Figure VII.1: Marquage de <i>P. carinii</i> de souris SCID par la streptavidine-Au10	77
Figure VII.2: Marquage de l'appareil de Golgi de <i>P. carinii</i> de souris SCID par la Con A-Au20	78
Figure VII.2: Marquage de <i>P. carinii</i> de souris SCID par la SBA-Au10 et L'UEA I-Au10	79
Figure VII.3: Immunolocalisation sur <i>P. carinii</i> de souris SCID	80
Figure VIII.1: Cycle de <i>P. carinii</i> du lapin.	81
Figure VIII.2: Organisation du système endomembranaire d'une cellule eucaryote	82
Figure VIII.3: Evolution du système endomembranaire et de la paroi de <i>P. carinii</i>	84
Figure VIII.4: <i>P. carinii</i> et le système avidine-biotine	85
Tableau I.1: Polysaccharides, lectines et paroi de <i>P. carinii</i>	27
Tableau I.2: Antigènes de <i>P. carinii</i> et sérums polyclonaux	31
Tableau I.3: Antigènes de <i>P. carinii</i> et anticorps monoclonaux	32

ERRATUM :

Chapitre	Page	�	Ligne	Lire
II	41	Cd(3)	14	IIC2.
II	44	D, pied de page	1	Lorsque
III	52	D	4	REG (Fig. 2A),
IV	58	D	10	ultrastructurale
IV	58	D	22	micro-organisme.
VI	68	C2	3	lavés
VII	76	C5	9	�t�
VIII	82	Fig. VII.2	1	endomembranaire
XI	123	3	1	Développement
XI	123	4	1	micro-organism

III. Reconstitution tridimensionnelle de *P. carinii* du lapereau. I. Le trophozoïte.

A. Résumé.

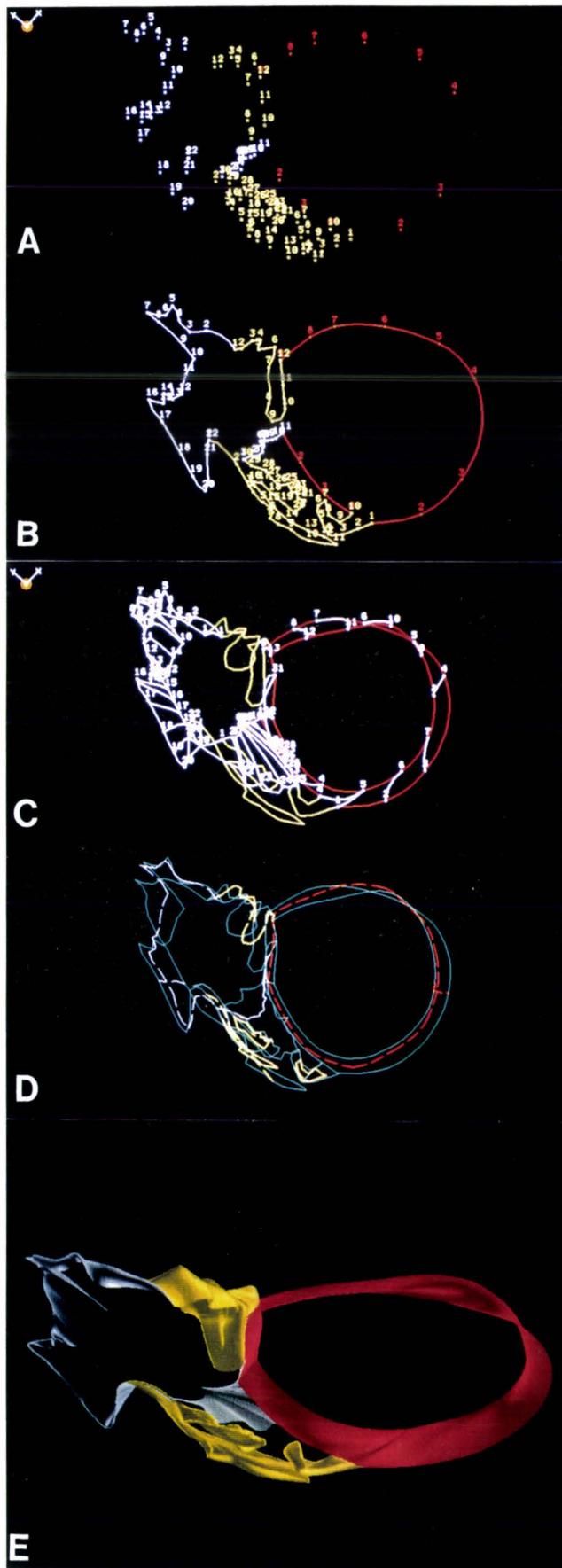
La morphologie ultrastructurale très complexe du système endomembranaire de *Pneumocystis carinii* nous a amené à en réaliser l'analyse fine par reconstitution tridimensionnelle à partir de coupes sériées et du programme informatique de dessin assisté par ordinateur CATIA (Conception Assistée Tridimensionnelle Inter Active). La reconstitution 3-D d'un trophozoïte de petite taille nous apporte une meilleure compréhension des relations entre les organites, qui nous permet alors d'émettre des hypothèses cytophysiologiques. La reconstruction 3-D des autres stades parasitaires devrait apporter des informations complémentaires sur l'évolution des organites au cours du cycle biologique, et leurs implications physiologiques.

B. Introduction.

P. carinii, organisme eucaryote, est reconnu comme étant une cause importante de pneumonie chez les hôtes immunodéprimés. Bien que de nombreuses études ultrastructurales aient été réalisées (Barton et Campbell, 1969; Dei-Cas et coll., 1989, 1990; Ham et coll., 1971; Haque et coll., 1987; Itatani et Marshall, 1988; Palluault et coll., 1990; Takeuchi, 1980; Vavra et Kucera, 1970; Vossen et coll., 1978; Yoshida, 1989), la taxonomie, le cycle biologique, et l'organisation cellulaire de ce parasite restent peu clairs. La présence de polysaccharides a été rapportée à l'échelle ultrastructurale dans la paroi parasitaire (Palluault et coll., 1990; Pesanti et Shanley, 1988; Yoshikawa et coll., 1988, 1991), et des glucanes fongiques seraient présents sur la paroi kystique (Matsumoto et coll., 1989). Récemment, une étude cytochimique nous a permis de révéler chez *P. carinii* de lapereaux, la présence d'un appareil de Golgi pour les trophozoïtes, prékystes et CIK (Palluault et coll., 1990). Des structures membranaires présentant des vésicules golgiennes bourgeonnantes, ainsi que des lysosomes ont été observées. Des vacuoles autophagiques ont été décrites chez les trophozoïtes. Des structures endomembranaires aux contours très complexes ont été décrites dans les trophozoïtes de grande taille et dans les prékystes

Figure III.1.

Reconstruction tridimensionnelle assistée par ordinateur.



intermédiaires (Palluault et coll., 1990).

Cette morphologie ultrastructurale parasitaire très complexe nous a amené à en réaliser l'analyse fine par reconstitution tridimensionnelle à partir de coupes sériées. Dans ce chapitre, nous réinterprétons la morphologie ultrastructurale du stade trophozoïte.

C. Matériels et méthodes.

1. Modèle biologique.

P. carinii est obtenu à partir de poumon de lapins hybrides californiens-néo-zélandais achetés au sevrage chez différents éleveurs. Il a été montré que 80 à 100% des lapereaux au sevrage sont spontanément et fortement parasités par *P. carinii* (Soulez et coll., 1989).

2. Préparation des échantillons pour la MET.

De petits morceaux de poumon (1 mm³) de lapins parasités sont fixés 2 h à 4°C par immersion dans une solution de glutaraldéhyde à 1,25% dans du cacodylate (0,1M, pH 7,3). Les étapes suivantes ont été effectuées de manière similaire à celle décrite dans le chapitre IIC2. Les rubans de coupes ultrafines (de 50 à 90 coupes de 100 nm d'épaisseur), réalisées avec un ultramicrotome Reichert-Jung, sont déposés sur une "grille à un trou" préalablement membrannée au Formvar. Puis, une double coloration est réalisée avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb. Les échantillons sont ensuite observés et photographiés sous 75 kV sur un microscope électronique à transmission Hitachi-H-600.

3. Reconstitution tridimensionnelle. (Figure III.1)

La reconstruction tridimensionnelle assistée par ordinateur est réalisée avec un programme français de la firme Dassault systèmes: le programme CATIA, habituellement utilisé pour la création aérospatiale et industrielle. Le système hôte est un ordinateur IBM 4341 sous VM/CMS dirigeant un ordinateur virtuel de 15 méga-octets de mémoire vive et 200 méga-octets de disque dur. Les images sont retranscrites sur une station de travail IBM 5080 d'une

← **Figure III.1.** Reconstitution tridimensionnelle assistée par ordinateur. Les contours parasitaires dessinés sur une feuille de plastique transparent sont introduits dans l'ordinateur grâce à une table à numériser et une souris: les contours de la paroi cellulaire, les prolongements tubulaires, du noyau (rouge), des structures membranaires (jaunes et grises), l'appareil de Golgi et des portions de mitochondries sont définis points par point (A). Chaque point est relié au suivant pour créer les contours (B). Ceux-ci sont reliés les uns aux autres afin de créer un réseau de mailles (C, lignes blanches), servant à l'élaboration d'une surface (D, lignes en pointillés). La reconstruction est achevée par la création d'une image réaliste à partir des surfaces (E).

Figure III.2.

Coupes s eri ees d'un petit trophozo ite de *P. carinii* de lapin.



A

B



C

D

résolution de 928 x 928 pixels, développant 128 couleurs.

Pour chaque section parasitaire les contours de la paroi, des prolongements tubulaires, des noyaux, des portions de mitochondries, des saccules endomembranaires et de l'appareil de Golgi, sont redessinés sur une feuille de plastique transparent (21x29,7), et sont introduits dans l'ordinateur grâce à une table à numériser et à une souris. Chaque point ou groupe de points, chaque section peuvent être effacés ou modelés (Voir Fig. 1A). Chaque point numérisé doit être relié au suivant pour créer les contours (Fig. 1B). Chaque contour est relié au contour sus- et sous-jacent de façon à créer un réseau de mailles (représentation théorique de l'épaisseur de la coupe) (Fig. 1C, lignes blanches). Ce réseau de mailles sert de support pour la création d'une surface (Fig. 1D, ligne en pointillés). Des constructions similaires sont réalisées pour des structures plus complexes.

La couleur, l'intensité, la transparence et les lumières ambiantes sont arbitrairement définies et appliquées pixel par pixel aux différentes surfaces créées de manière à obtenir une image réaliste des structures parasitaires (Fig. 1E).

D. Résultats.

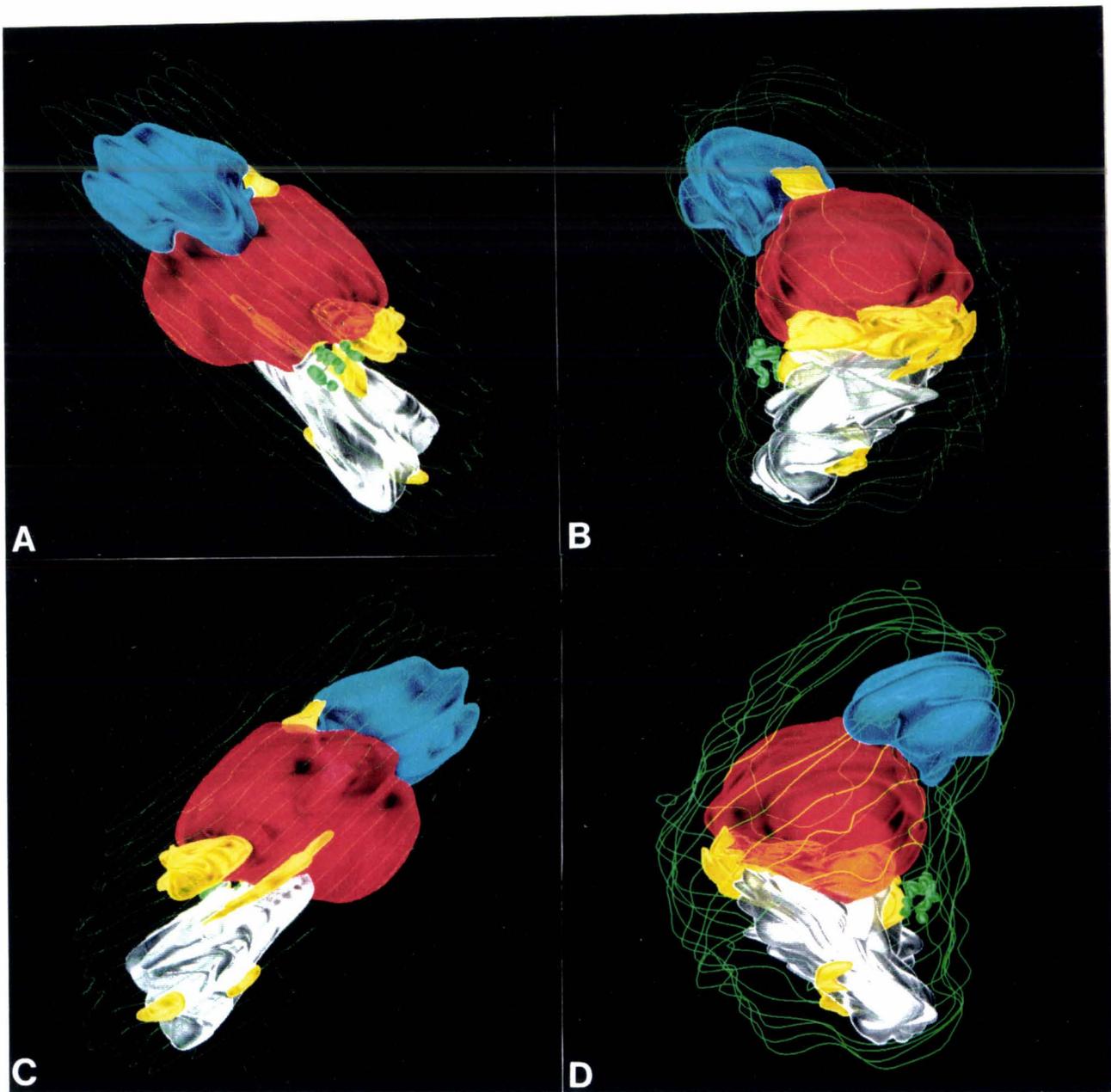
Le trophozoïte décrit dans ce chapitre a été sélectionné parmi un grand nombre observés et dessinés à partir des coupes sériées sur feuilles transparentes. Ces coupes sériées (Figure III.2) nous permettent d'observer un parasite constitué d'un noyau avec un nucléole (Fig. 2A et B), un REL (Fig. 2B), un REG (Fig. 2B), une mitochondrie unique présentant des zones de bourgeonnement (Fig. 2A et B).

Le noyau occupe plus de 30% du volume cytoplasmique (Fig. 3 et 4, rouge). Le réticulum endoplasmique (Fig. 3 et 4, jaune) est formé de structures endomembranaires tubulaires ramifiées communiquant avec la citerne périnucléaire (Fig. 2C). Certains trophozoïtes développent une à plusieurs vacuoles autophagiques aux contours complexes en étroite communication avec la citerne périnucléaire (Fig 2C et D; Fig. 3 et 4, gris). Une portion de REG (Fig. 3b au-dessus du noyau, et Fig. 4, à droite du noyau) se présente sous forme de dentelle. Une autre, localisée entre la vacuole autophagique et le noyau, est plus

← Figure III.2. Coupes sériées d'un petit trophozoïte de *P. carinii* de lapin. Noyau avec nucléole (A et B, Nu), REG en forme de cordon (A, REG), REL tubulaire (B), mitochondrie unique avec des zones de bourgeonnements (A et B, ►); vacuole autophagique aux contours complexes en communication avec la citerne périnucléaire, occupant une grande surface cytoplasmique (C et D, ⇌); vésicules golgiennes (B, cercle et encart). La paroi présente quelques prolongements tubulaires (B, →). Trait = 0,5 µm.

Figure III.3.

Reconstitution 3-D d' un trophozoïte de petite taille.



développée (Fig. 3B et D, Fig. 4). Deux petites surfaces supplémentaires de REG et REL sont en étroite communication avec la vacuole autophagique (Fig. 3 et 4). Le REL, représenté par des structures tubulaires (Fig. 3C), est connecté à la vacuole autophagique, et recouvre une petite portion du REG situé en bas à gauche du noyau (Fig. 4).

La vacuole autophagique, occupant une large portion du volume cytoplasmique (Fig. 3C), présente de nombreuses petites dilatations dans la zone proche du REL (Fig. 3C), ainsi qu'une zone creuse (Fig. 3A). Douzes petites vésicules golgiennes ont été localisées à proximité de la vacuole autophagique (Fig. 2B, cercle, et encart; Fig. 3A, B et D, vert; Fig. 4, en transparence derrière le noyau).

La mitochondrie (Fig. 2A et B; Fig. 3 et 4, bleu) occupe une bonne portion du volume cytoplasmique et présente des zones d'expansion à degré de développement varié.

La paroi (Fig. 4, vert) présente quelques prolongements tubulaires apparaissant sous forme de replis.

E. Discussion.

Les coupes sériées nous ont permis de définir avec précision les organites de *P. carinii*. Les nombreuses micrographies nous ont révélé la complexité des contours du système endomembranaire. Le programme CATIA s'est avéré très utile pour illustrer avec rigueur et définir cette complexité, et pour déterminer la taille et le volume relatif occupé par chaque organite (Figure III.3 et 4).

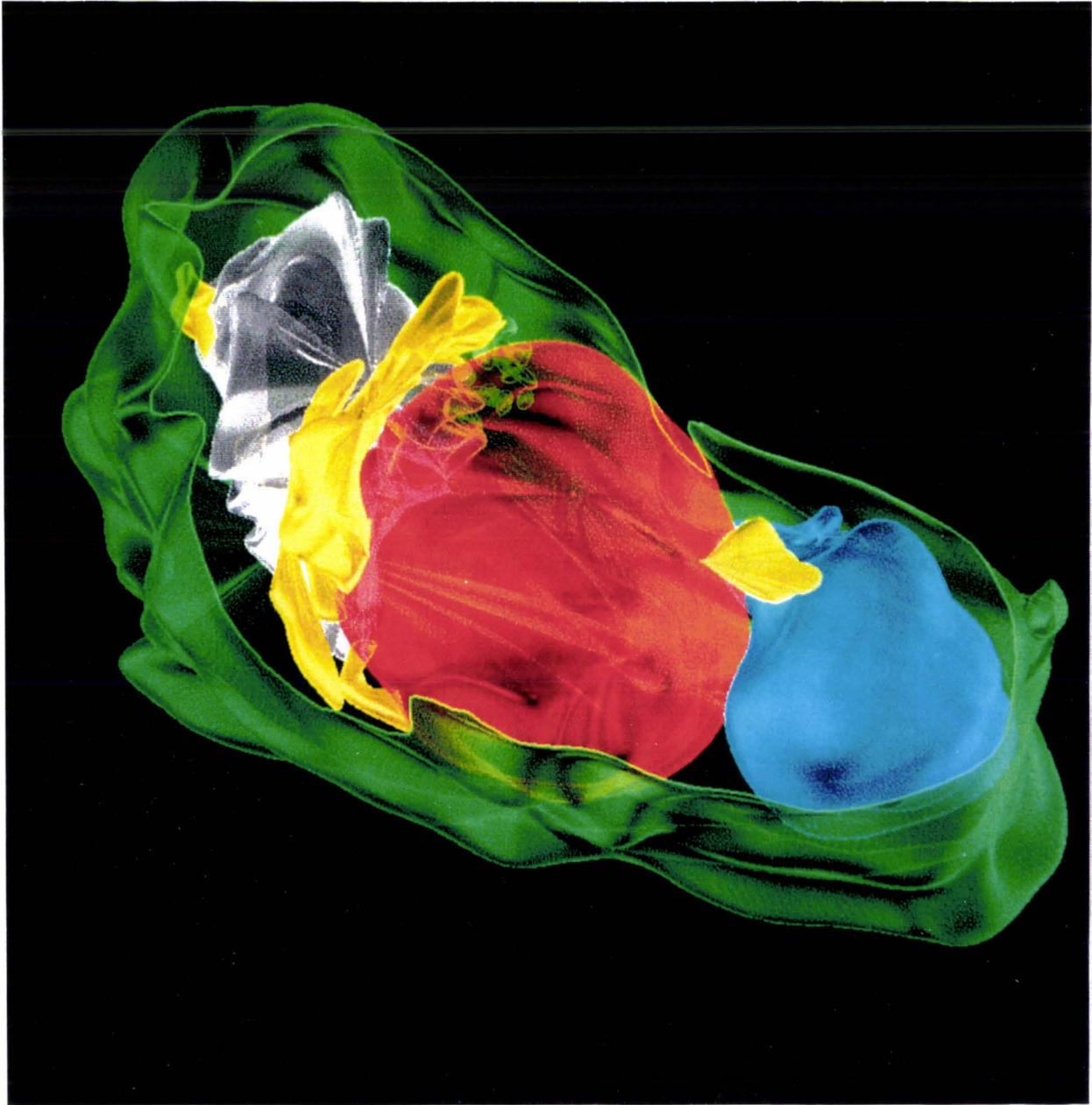
Dans la mesure où l'importance du rôle physiologique d'un organite est relié à son développement, la mitochondrie pourrait jouer un rôle primordial pour le trophozoïte de petite taille. En conséquence, le métabolisme énergétique pourrait être le processus physiologique majeur à ce stade de développement du parasite.

L'autophagie réalisée par les lysosomes secondaires (ou vacuoles autophagiques) est

← **Figure III.3.** Reconstitution 3-D d'un trophozoïte de petite taille. Le noyau (rouge) occupe plus de 30% du volume cellulaire. La mitochondrie (bleue) apparaît comme l'organite majeur et présente des zones de bourgeonnements. RE (jaune) apparaît modérément développé. Le REL tubulaire (C) est en communication avec la vacuole autophagique (grise); cette dernière occupe un large volume cytoplasmique (A, C et D). La paroi est présentée sous forme de lignes numérisées vertes.

Figure III.4.

Reconstruction 3-D d'un trophozoïte de petite taille.

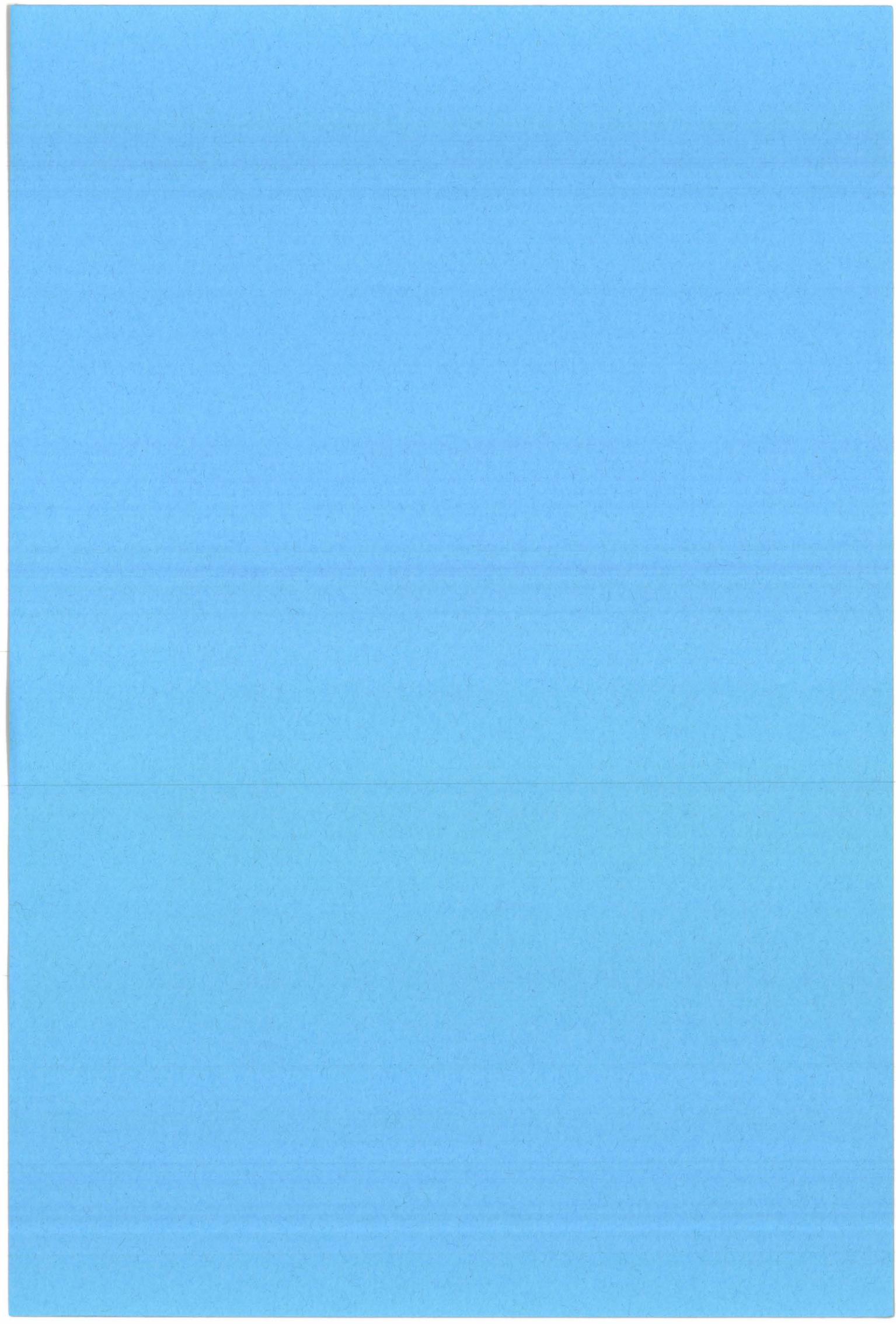


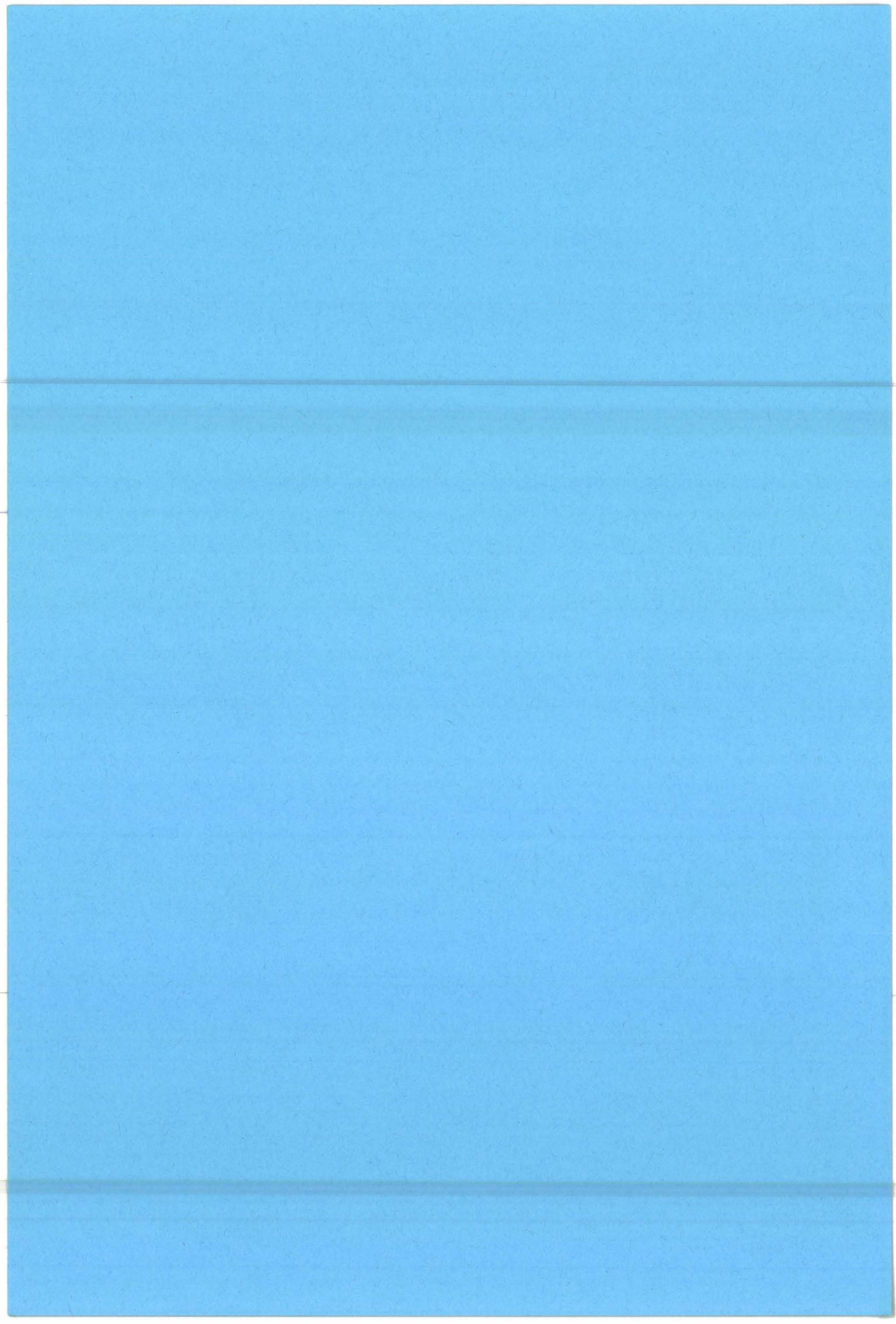
une propriété générale des cellules eucaryotes; elle est liée au phénomène normal de rénovation et de renouvellement des composés cellulaires. L'autophagie a été observée dans certaines conditions, par exemple chez les protozoaires privés de nutriments (DeRobertis et DeRobertis, 1980). Cette observation est en accord avec nos observations dans la mesure où le trophozoïte décrit ici, de petite taille (1,5 μ m), se trouvait dans la lumière alvéolaire pulmonaire et n'était alors pas encore attaché aux cellules épithéliales pulmonaires de type I. L'attachement spécifique du parasite à ces cellules semble être en effet un processus obligatoire pour la croissance et le développement des petits trophozoïtes (Yoshida, 1989). Bien que le noyau et les organites cytoplasmiques apparaissent normaux à l'échelle ultrastructurale, ce petit trophozoïte pourrait être à la "recherche" d'un contact avec un pneumocyte de type I (Figure III.2).

Le faible nombre de prolongements tubulaires et de vésicules golgiennes (Figure III.4), le réticulum endoplasmique de petite taille, suggèrent que la synthèse protéique et le processus de glycosylation, impliqués dans la synthèse pariétale, se réalisent de manière modérée.

En conclusion, la reconstitution 3-D de ce petit parasite nous apporte une meilleure compréhension des relations morphologiques existant entre les divers organites, et nous permet d'émettre des hypothèses d'ordre physiologique. La reconstitution et l'analyse des autres stades parasitaires devrait nous apporter des informations sur l'évolution des organites et leur(s) implication(s) physiologique(s) dans les changements morphologiques au cours du cycle (voir Chap. IV).

← **Figure III.4.** Reconstruction 3-D d'un trophozoïte de petite taille. Le RE (jaune) est constitué de structures membranaires tubulaires ramifiées en communication avec la vacuole autophagique (grise) et la citerne périnucléaire. Quatre prolongements tubulaires (replis) sont observés à proximité de la vacuole autophagique, une près de la mitochondrie (même codes-couleur que pour la Fig. II.3).





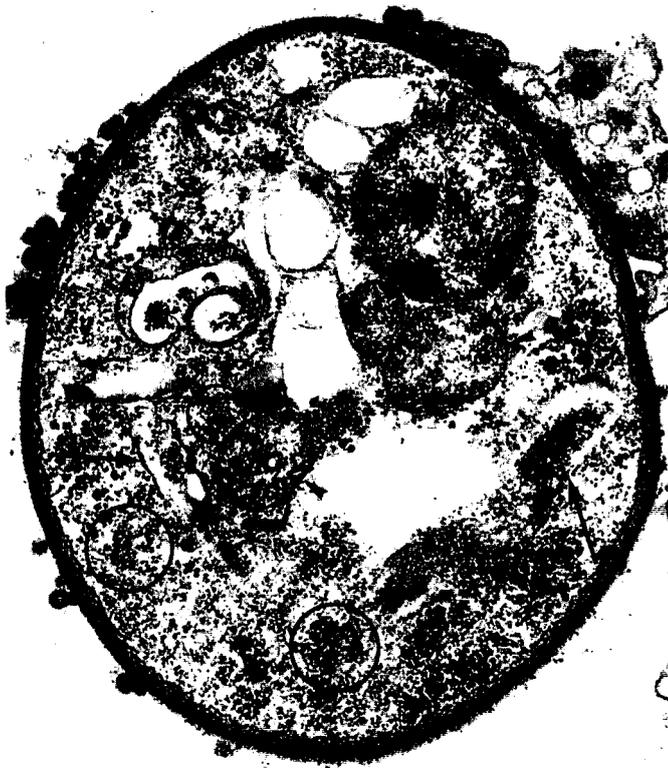
IV. Reconstitution tridimensionnelle de *P. carinii* du lapereau. II. Le prékyste intermédiaire.

A. Résumé.

La reconstitution tridimensionnelle d'un prékyste intermédiaire binucléé a été réalisée à partir de coupes sériées et du programme informatique CATIA (Dassault systèmes). La présence d'une seule mitochondrie, de structures endoplasmiques bien développées et de morphologie complexe, et d'un grand nombre de vésicules golgiennes a été établie. Une meilleure compréhension de l'architecture ultrastructurale de *Pneumocystis carinii* du lapin nous a permis de formuler des hypothèses sur l'évolution et la physiologie de ce système endomembranaire. Ainsi, la présence de structures sacculaires endoplasmiques bien développées et de plus de 230 vésicules golgiennes à proximité de ces structures, pourrait être impliquée dans la différenciation des structures pariétales parasitaires, et pourrait aussi être reliée au phénomène de division nucléaire et d'individualisation des corps intrakystiques.

B. Introduction.

La reconstitution tridimensionnelle à partir de coupes sériées et assistée par ordinateur est une méthode qui permet une meilleure compréhension de la complexité de l'organisation cellulaire des trophozoïtes de *P. carinii* (voir Chap. III). Dans ce chapitre, en utilisant les mêmes méthodes, l'étude du système endomembranaire d'un prékyste intermédiaire à deux noyaux, dont la caractéristique pariétale est le développement d'une couche peu dense aux électrons sous-jacente à la couche externe dense, et où se réalise des divisions nucléaires probablement méïotiques (Matsumoto et Yoshida, 1984; Dei-Cas et coll., 1990; Palluault et coll., 1990), a été entreprise. Une discussion sur l'évolution hypothétique de ce système endomembranaire et sur ses implications d'ordre physiologique au cours du cycle est proposée.



A



B



C



D

C. Matériels et méthodes.

Le modèle biologique, la préparation des échantillons pour la MET, et la reconstitution 3-D ont été décrits dans le chapitre III C.

D. Résultats.

Les coupes sériées, (Figure IV.1): deux noyaux, présentant pour chacun d'eux un nucléole, sont localisés aux pôles opposés du cytoplasme et à proximité de la membrane plasmique (Fig. 1).

De nombreuses sections mitochondriales (Fig. 1) sont observées. Deux catégories morphologiques de mitochondries, reliées par de fines connexions (Fig. 1C), peuvent être distinguées. La première se présente sous forme de portions aux contours spiralés avec une protubérance centrale (fig. 1). Des granules de glycogène sont observés dans la zone cytoplasmique délimitée par les spirales mitochondriales. La deuxième se présente sous forme de sections rondes ou ovoïdes.

De nombreuses sections de SE bien développés sont présentes (Fig. 1). Ce SE n'est plus en communication avec la citerne périnucléaire. Aucun réticulum endoplasmique n'est observé distinctement.

Par contre, de nombreuses vésicules golgiennes sont observées regroupées à proximité du SE (Fig. 1, cercle), et quelques unes d'entre elles sont dans le SE.

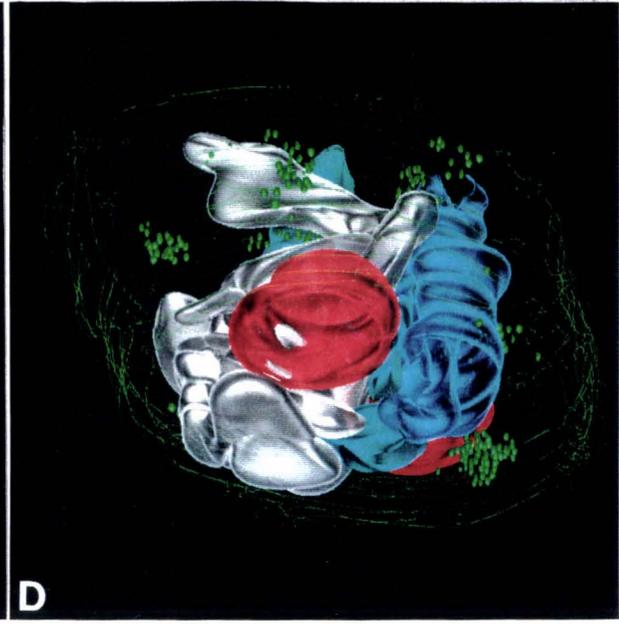
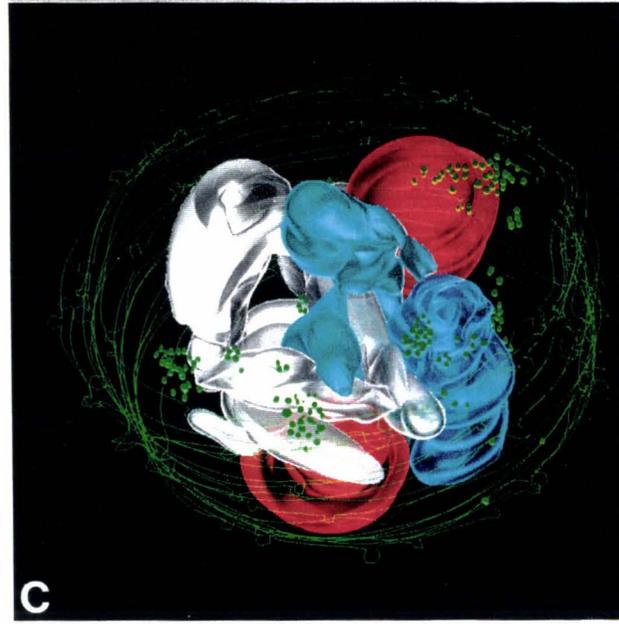
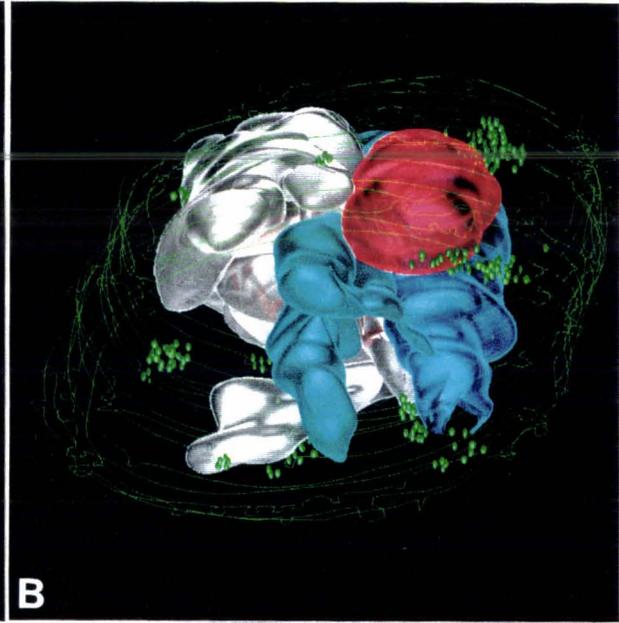
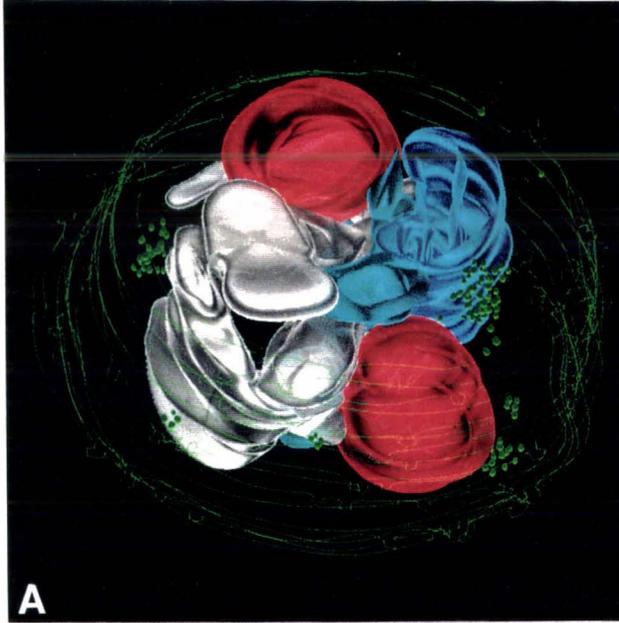
Reconstitution 3-D (Figure IV.2 et 3): Les noyaux ne sont pas les plus grandes structures de ce stade (Fig. 2, rouge). L'organite le plus développé est le SE₂ (Fig. 2 et 3, gris), se présentant sous forme de 5 citernes allongées et interconnectées.

Plus de 230 vésicules golgiennes ont été comptées, et sont régulièrement regroupées dans 5 zones cytoplasmiques, à proximité du SE₂ et de la paroi (Fig. 3, vert). Quelques vésicules golgiennes bourgeonnent à partir du SE (Fig. 2A et 3A, en bas à gauche; Fig; 2D

← **Figure IV.1.** Coupes sériées d'un prékyste intermédiaire binucléé de *P. carinii*. Les noyaux (N) sont localisés à des pôles opposés du cytoplasme et à proximité de la membrane plasmique. De nombreuses sections de mitochondries sont observées (♣). Des sections peuvent présenter des contours spiralés (▼▼), ronds ou ovoïdes. Des granules de glycogène sont présents dans le cytoplasme et dans la zone délimitée par la mitochondrie spiralée. Le SE₂ (→) occupe une grande surface cytoplasmique, et ne communique plus avec la citerne périnucléaire. Des amas de vésicules golgiennes sont observés à proximité du SE₂ (Fig.A, B, D, cercle). Trait = 0,5 µm.

Figure IV.2.

Reconstitution 3-D d'un prékyste intermédiaire binucléé.



et 3D, en haut à gauche). Un autre groupe de vésicules golgiennes est observé à proximité du noyau.

La mitochondrie est très développée (Fig. 2, bleu). La portion hélicoïdale et la portion ovoïde occupent un grand volume cytoplasmique. La portion ovoïde présente des zones de constriction (Fig. 2B et C). La mitochondrie et le SE₂ sont situés entre les deux noyaux.

E. Discussion.

Les coupes sériées et la reconstitution tridimensionnelle assistée par ordinateur nous ont permis de définir la configuration spatiale des divers organites cellulaires et de réaliser une représentation complète d'un prékyste intermédiaire de *P. carinii*. L'établissement de la présence d'une seule mitochondrie, d'un SE₂ complexe et très développé, et d'un grand nombre de vésicules golgiennes, est le résultat principal de ce travail. L'ampleur du SE₂ et de la mitochondrie suggère que leur rôle est prépondérant dans ce stade (Figure IV.2).

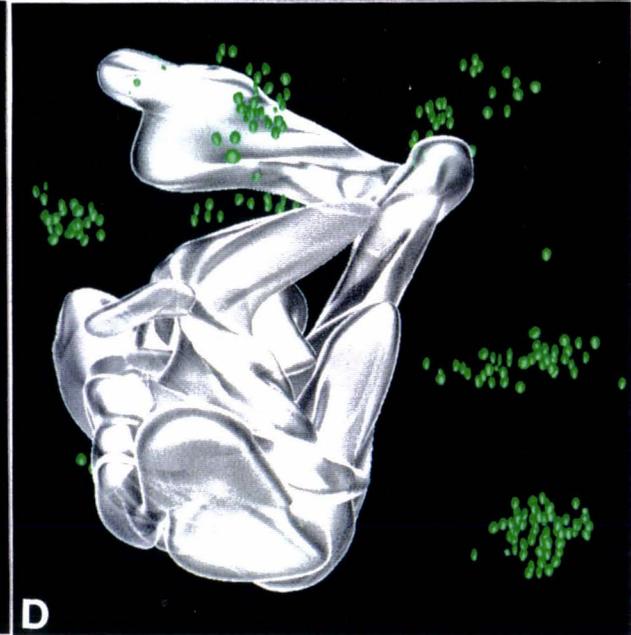
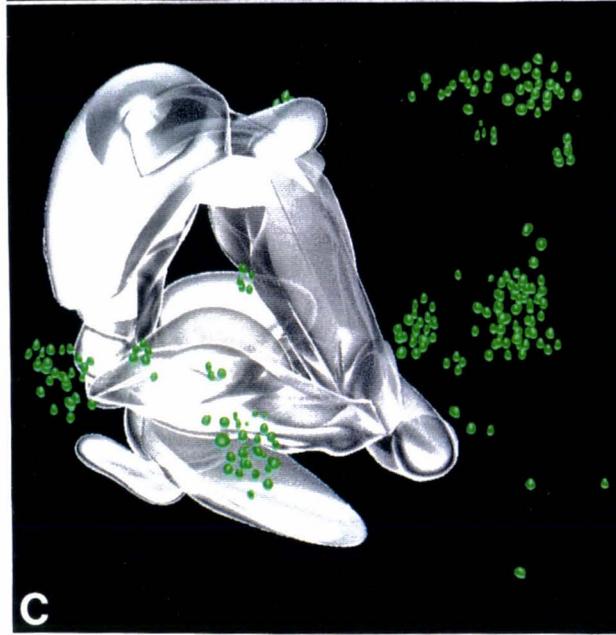
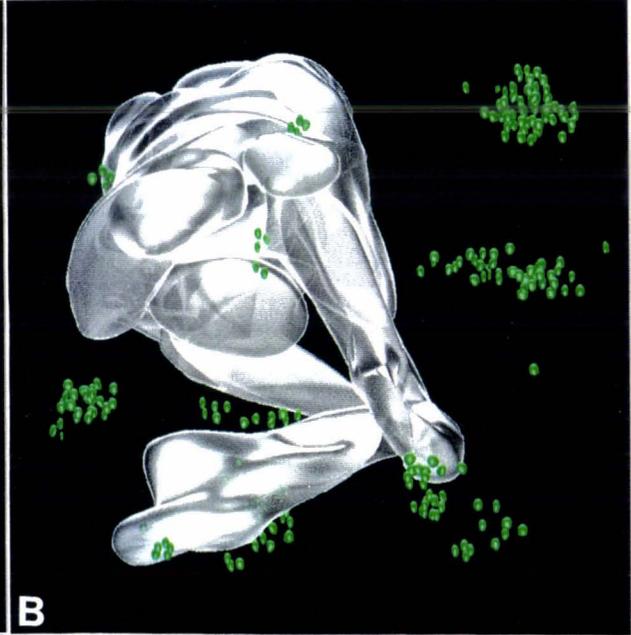
Cette mitochondrie développée présente de nombreuses zones de constriction qui pourraient se singulariser au stade prékyste tardif. La transition d'une structure mitochondriale relativement simple chez les trophozoïtes de petite taille, vers une structure très développée chez les prékystes intermédiaires, pourrait être reliée à la division nucléaire et à la formation des corps intrakystiques à mitochondrie sphéroïde. La signification de l'aspect spiralé de la mitochondrie reste à définir.

Deux types de SE ont été rapportés et décrits (Palluault et coll., 1990, 1991b). Le premier type (SE₁, voir Chap. III, Figure III.3) observé chez les trophozoïtes, est de petite taille, et présente des activités autophagiques. Le second (SE₂, voir Chap. II, Figure II.1.b) n'est présent que chez les trophozoïtes de grande taille et les prékystes. Ce SE₂ est en communication avec la citerne périnucléaire jusqu'à ce que la première division nucléaire se réalise (Palluault et coll., 1990). La présence d'un SE₂ bien développé et de 230

← **Figure IV.2.** Reconstitution 3-D d'un prékyste intermédiaire présentant deux noyaux (rouge), un SE₂ (gris), une mitochondrie (bleu), et 235 vésicules golgiennes (vert). La paroi est représentée par des lignes numérisées vertes.

Figure IV.3.

Reconstitution 3-D du SE₂.

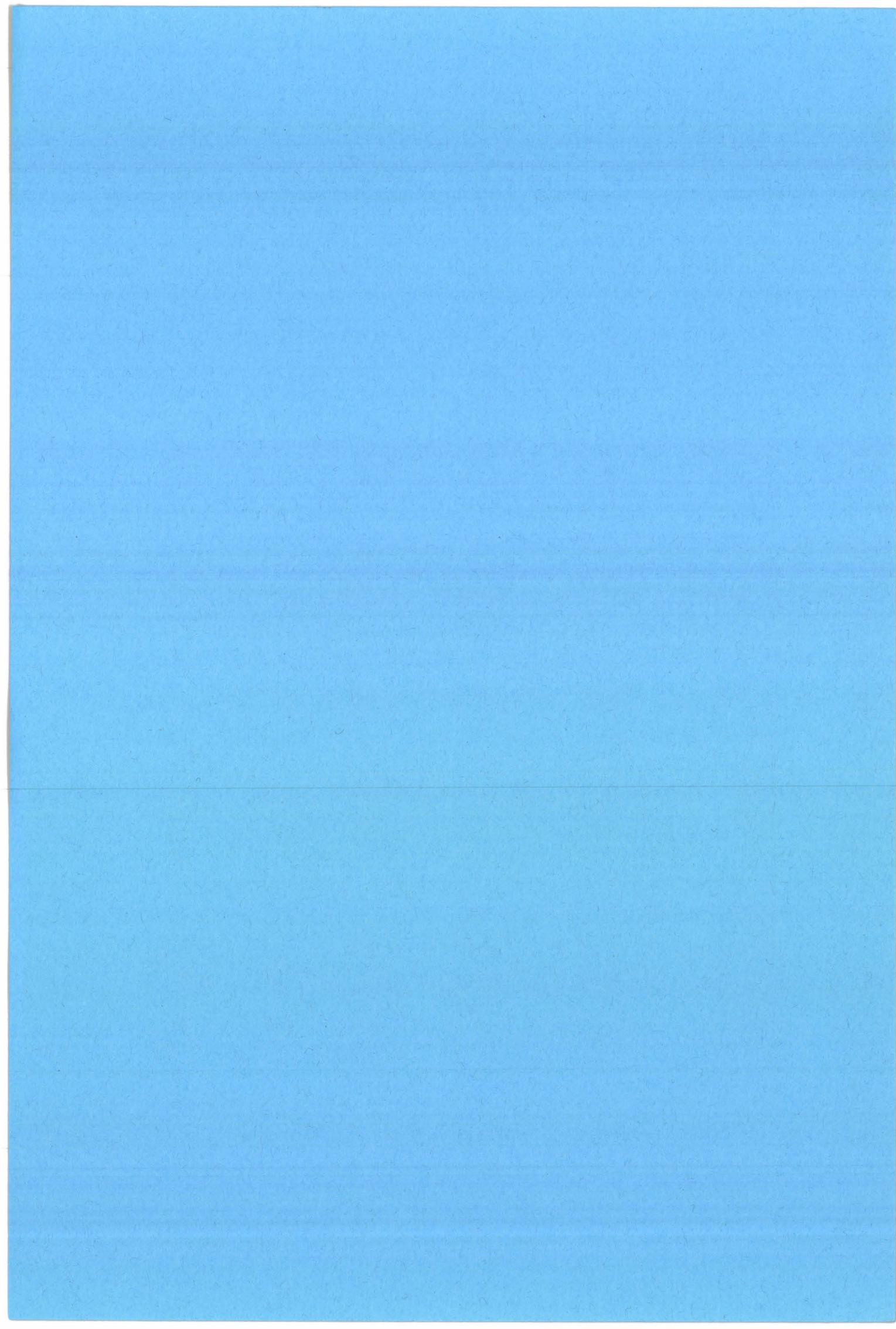


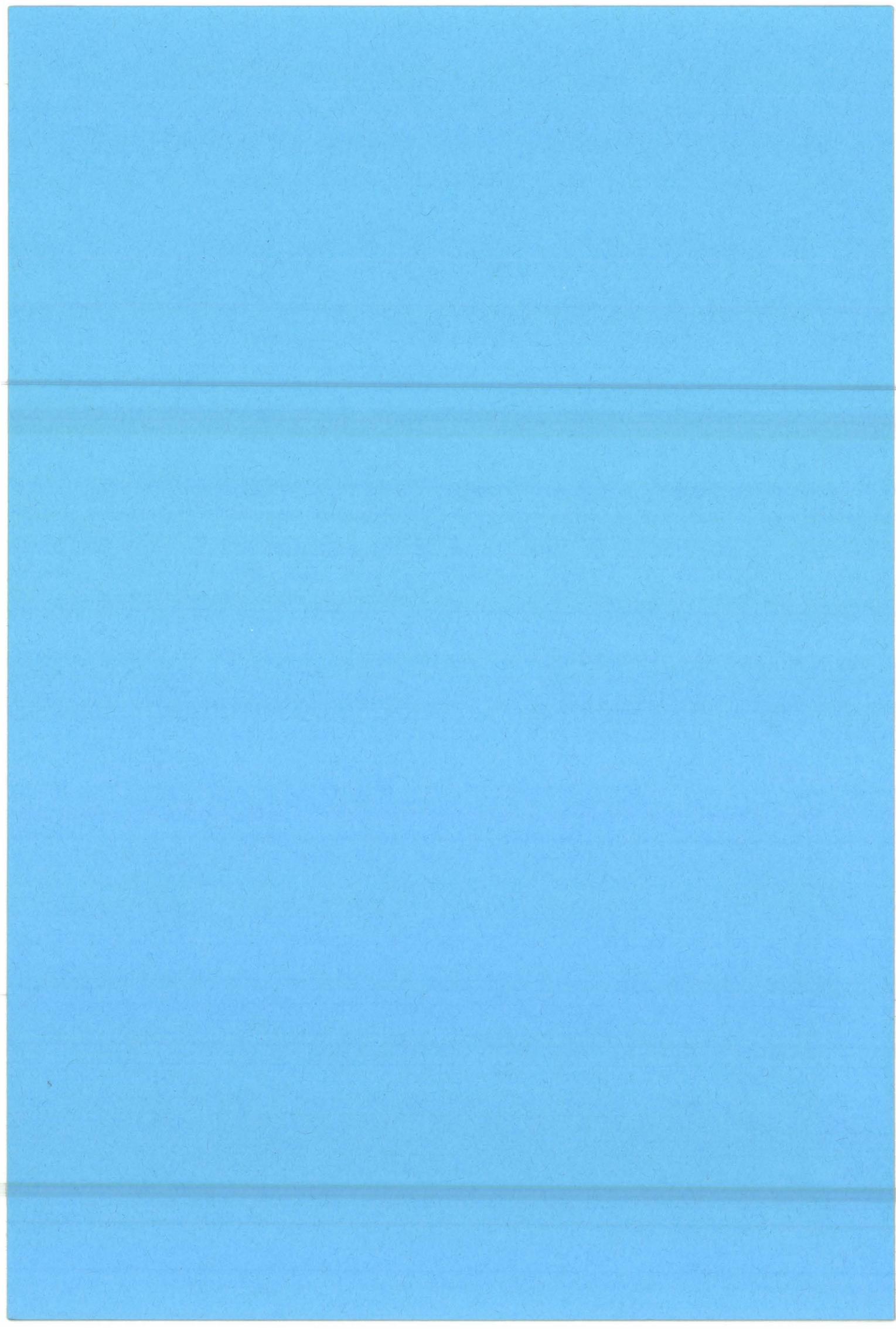
vésicules golgiennes à sa proximité (Figure IV.3) est à mettre en parallèle avec la morphogenèse de la paroi kystique, plus particulièrement à la formation de la couche intermédiaire peu dense. Cette hypothèse est confortée par le faible nombre de vésicules golgiennes retrouvées chez le petit trophozoïte (Palluault et coll., 1990b), qui ne présente pas de couche peu dense. Un SE bien développé est aussi trouvé dans les trophozoïtes de grande taille présentant une zone de constriction cytoplasmique et dans lesquels plus de 240 vésicules golgiennes ont été observées. Ainsi, l'implication du SE₂ dans la division nucléaire et la formation des CIK pourrait être envisagée.

La reconstitution 3-D permet une meilleure compréhension de l'architecture ultrastructurale (particulièrement celle du système endomembranaire) des deux stades parasitaires décrits (petit trophozoïte et prékyste intermédiaire binucléé). Le nombre inégal de vésicules golgiennes entre ces deux stades est ici clairement démontré. Le développement du SE₂ pourrait être relié au grand nombre de vésicules golgiennes ainsi qu'à la présence de sites polysaccharidiques reconnus par la Con A (Cushion et coll., 1988; DeStephano 1990; Palluault 1990; Yoshikawa et coll. 1987b, 1988). En effet, le fait que la Con A détecte des sites polysaccharidiques dans la paroi parasitaire, et que les vésicules golgiennes bourgeonnent à partir du SE, suggère que ce dernier est impliqué dans la synthèse des glycoprotéines pariétales (voir Chap. VI et VII).

En conclusion, la reconstitution 3-D assistée par ordinateur nous permet de mieux comprendre la morphologie ultrastructurale de *P. carinii*. L'utilisation de ces outils sur les autres stades parasitaires devrait apporter une connaissance morphologique complète de ce microorganisme. Grâce à ces techniques, les données qui restent actuellement controversées sur le nombre de mitochondries, leur développement au cours du cycle et la nature de leurs crêtes pourront être ainsi rediscutées (voir Chap. V).

← **Figure IV.3.** Reconstitution 3-D du SE₂ (gris) et des vésicules golgiennes (vertes). Ce saccule se présente sous forme d'une citerne plate interconnectée avec quatre autres citernes allongées. Les vésicules golgiennes sont regroupées en quatre amas distincts.





V. Reconstitution tridimensionnelle et étude cytochimique de la mitochondrie de *P. carinii* du lapereau.

A. Résumé.

La reconstitution tridimensionnelle et la détection d'activité cytochrome *c* oxydase ont été entreprises sur la mitochondrie de *Pneumocystis carinii* du modèle lapin. La mitochondrie des trophozoïtes de petite taille présente de petites zones de bourgeonnement qui se développent pour occuper un large volume cytoplasmique dans les trophozoïtes de grande taille. Tous les stades parasitaires présentent une activité cytochrome *c* oxydase dans la membrane interne mitochondriale; cette activité semble plus importante chez les trophozoïtes et les corps intrakystiques. Le tétrachlorure de diaminobenzidine colore la paroi parasitaire, suggérant une production locale de peroxyde d'hydrogène. La mitochondrie de *P. carinii* du modèle lapin présente des crêtes à base plate et allongée, se prolongeant sous forme de tubules dans la matrice. Ces données nouvelles sur la morphologie, le développement et l'activité de la mitochondrie sont discutées et comparées à celles obtenues chez *P. carinii* provenant d'autres modèles.

B. Introduction.

Bien que de nombreuses études ultrastructurales aient été entreprises sur *P. carinii* (Barton et Campbell, 1969; Dei-Cas et coll., 1989; DeStephano et coll., 1990a; Frenkel, 1976; Goheen et coll., 1989; Ham et coll., 1971; Haque; 1987; Henshaw et coll., 1985; Itatani et Marshall, 1988; Matsumoto et Yoshida, 1984; Millard et coll., 1990; Nielsen et Settnes, 1991; Palluault et coll., 1990; Ruffolo et coll., 1989; Takeuchi, 1980; Vavra et Kucera, 1970; Vossen et coll., 1978; Yoneda et Walzer, 1980, 1981; Yoshida, 1989), peu de données ont été rapportées sur le nombre, la structure et le développement des mitochondries. Certaines études rapportent la présence d'une, deux (Frenkel, 1976), ou plusieurs (Barton et Campbell, 1969; Vossen et coll., 1978, Yoneda et Walzer, 1982) mitochondries, ou bien encore, quelques mitochondries présentant des crêtes lamellaires très pauvrement développées (Vavra et Kucera, 1970; Takeuchi, 1980, Ruffolo et coll., 1989). Les mitochondries seraient très pauvrement développées à tous les stades (Yoshida, 1989).

Elles se présenteraient en amas au stade prékystique (Matsumoto et Yoshida, 1984; Takeuchi, 1980; Vávra et Kucera, 1970). Toutefois, l'observation ultrastructurale après cryofracture révèle des mitochondries plus grandes que celles observées sur coupes ultrafines, la plupart présentant des structures ramifiées (Yoshikawa et coll., 1987d). Récemment, l'utilisation de coupes sériées a permis de rapporter chez *P. carinii* du modèle lapin, la présence d'une mitochondrie unique chez les trophozoïtes de petite taille (Palluault et coll., 1991b) ainsi que chez les prékystes intermédiaires binucléés (Palluault et coll., 1991c). Dans la continuité de cette étude nous présentons dans ce chapitre la reconstitution 3-D de la mitochondrie des trophozoïtes de petite taille, de grande taille, et celle des prékystes intermédiaires binucléés. La recherche d'une activité cytochrome *c* oxydase a été entreprise pour essayer d'évaluer cette activité, de la comparer à celle des cellules pulmonaires hôtes et de mieux définir par le marquage cytochimique engendré la structure des crêtes mitochondriales.

C. Matériels et méthodes.

1. Modèle biologique et préparation des échantillons pour la MET.

Le modèle biologique, la préparation des échantillons pour la MET et la reconstitution 3-D ont été décrits dans le chapitre III C.

2. Préparation des échantillons pour la détection d'activité cytochrome *c* oxydasique.

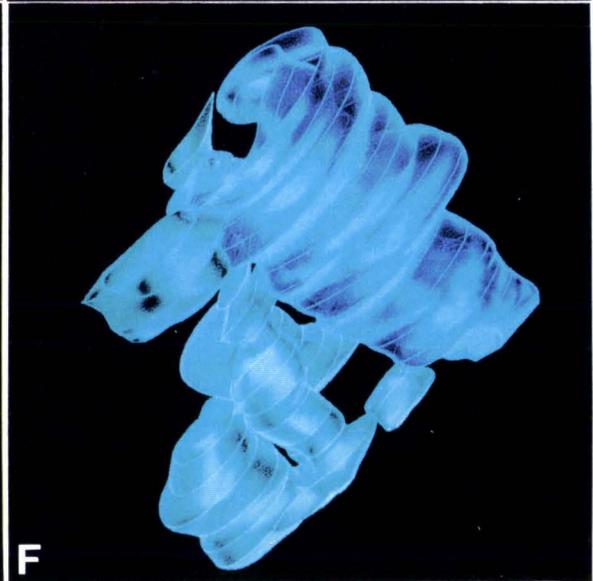
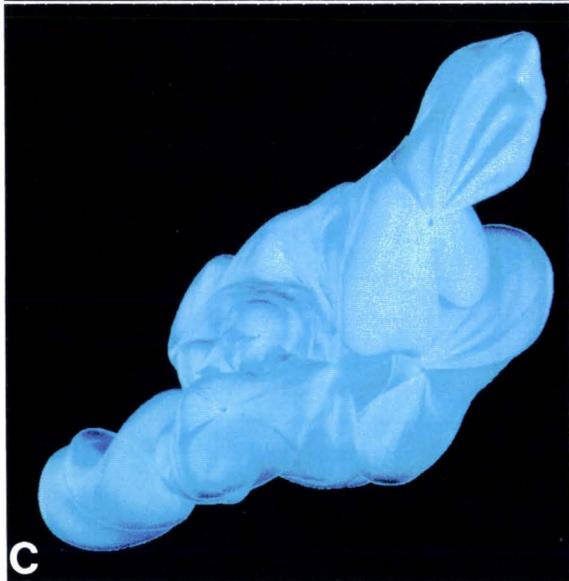
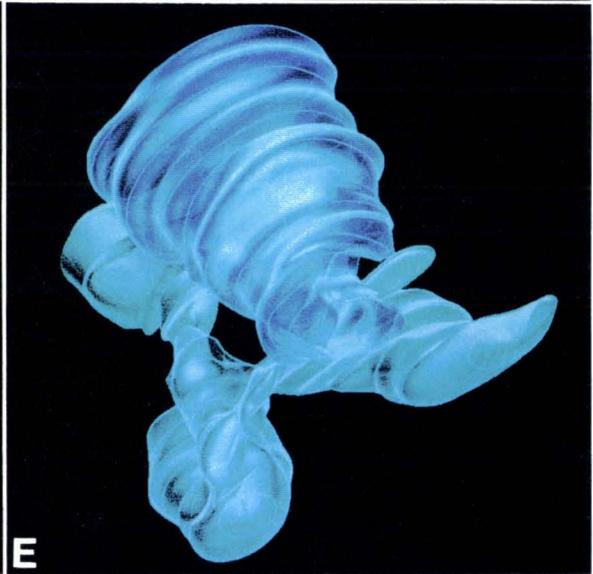
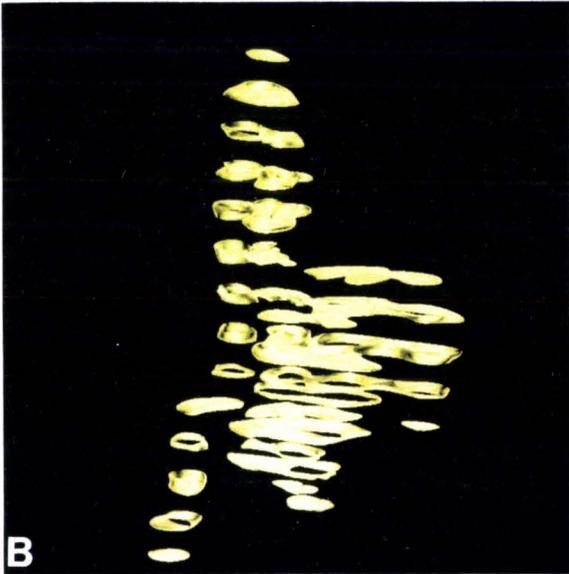
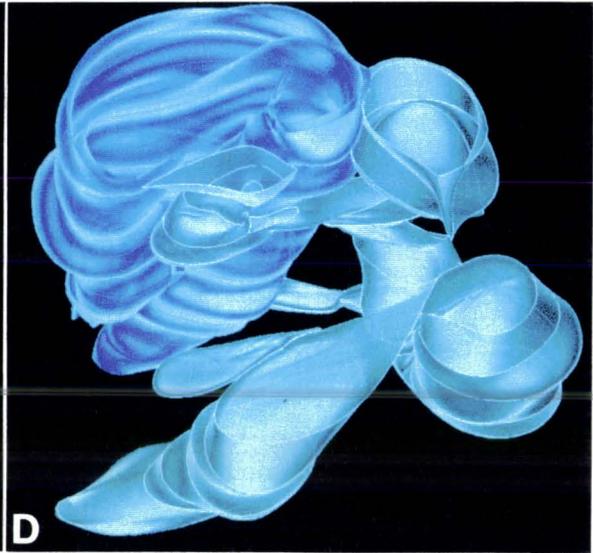
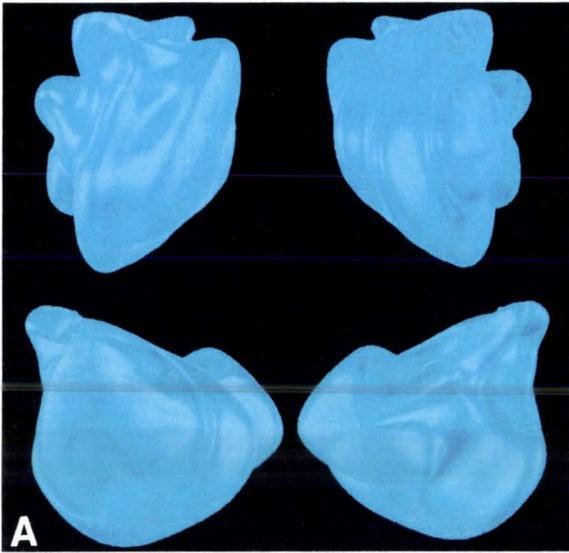
La méthode utilisée a été adaptée à partir de celles décrites par Seligman et coll. (1967) et Hirai et Ogawa (1986).

Les petits cubes de poumons parasités (1 mm³) sont:

- fixés 10 min sur glace (glutaraldéhyde 1,25%, dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7,2).
- lavés 1 h à 4°C (tampon phosphate 0,2M, pH 7,2; 7% de saccharose).
- immergés 10 min à température ambiante dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7,4 contenant:
 - 0,1 mg/ml de catalase (foie de bovin, C-40, Sigma) éliminant le H₂O₂ endogène,
 - 7% de saccharose.
- immergés 1-6 h à 37°C dans du tampon phosphate (0,1M, pH 7,4) contenant:
 - 1,0 mg/ml de DAB-tétrahydrochlorure (Sigma),
 - 1 mg/ml de cytochrome *c* (coeur de cheval, type V, Sigma),
 - 0,1 mg/ml de catalase,
 - 7% de saccharose.

Figure V.1.

Reconstitution 3-D de la mitochondrie de *P. carinii* du lapin.



- postfixés 1 h à température ambiante dans un tampon phosphate (0,1M, pH 7,4) contenant:
 - 1% de tétr oxyde d'osmium,
 - 7% de saccharose.

La déshydratation et l'inclusion en résine se font comme décrit au Chapitre III, C.

Les échantillons de contrôles sont incubés dans un milieu ne contenant pas le substrat (cytochrome *c*), ou ne contenant pas de DAB, ou encore avec un inhibiteur de l'activité cytochrome *c* (cyanure de potassium, KCN). Pour ce dernier contrôle, les tissus fixés sont ensuite préincubés pendant 1 h dans un milieu contenant

- 0,01 M de KCN,
- 7% de saccharose, en tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4.

Le KCN (0,01 M) est aussi additionné dans le milieu contenant le substrat. L'incubation s'effectue pendant 1-6 h.

D. Résultats.

Reconstitution 3-D, (Figure V.1): L'utilisation de coupes sériées nous a permis de détecter une mitochondrie unique depuis le stade trophozoïte de petite taille jusqu'au stade prékyste intermédiaire binucléé. Depuis le stade prékyste intermédiaire tétranucléé jusqu'au stade prékyste tardif, de 2 à 8 sections de mitochondries peuvent être dénombrées à proximité des noyaux, mais aussi dans le cytoplasme de kystes en cours de dégénérescence. La mitochondrie observée dans les petits trophozoïtes améboïdes (Fig. 1A) est sphéroïde, et occupe un grand volume cytoplasmique. Elle présente de petites zones de bourgeonnement. La mitochondrie des trophozoïtes de grande taille est développée et ramifiée, mais occupe un volume cytoplasmique moindre en comparaison à celui pris chez les petites formes (Fig. 1B et C). A ce stade, ainsi qu'au stade prékyste précoce, un nombre maximum de huit zones de bourgeonnement peut être observé sur une section. La mitochondrie des prékystes binucléés est très ramifiée et peut développer une portion spiralée (Fig. 1D, E et F). La portion allongée peut présenter des zones de constriction.

← **Figure V.1.** Reconstitution 3-D de la mitochondrie de *P. carinii*. A. Quatre vues complémentaires de la mitochondrie d'un trophozoïte de petite taille. Elle présente de petites zones de bourgeonnement. B et C. Mitochondrie d'un trophozoïte de grande taille (deux vues différentes; en représentation sériée pour B). Les zones de bourgeonnement sont développées et allongées. D, E et F. Mitochondrie d'un prékyste intermédiaire (trois vues complémentaires). Les ramifications sont très allongées; certaines présentent des zones de constriction. La portion spiralée (ouverte artificiellement en D et F) est hélicoïdale.

Figure V.2.

Activité cytochrome oxydase dans les alvéoles pulmonaires parasitées.



Activité cytochrome oxydase (Figure V.2, 3 et 4): Les membranes mitochondriales apparaissent contrastées par la présence d'un dépôt dense aux électrons dans l'espace intermembranaire (Fig. V ci-après ,et Fig. 2 et 3).

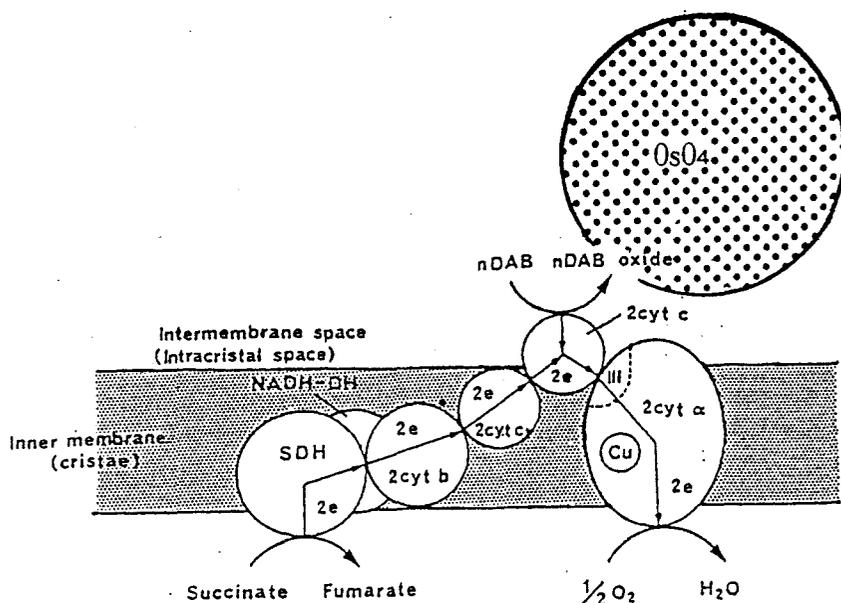


Figure V.

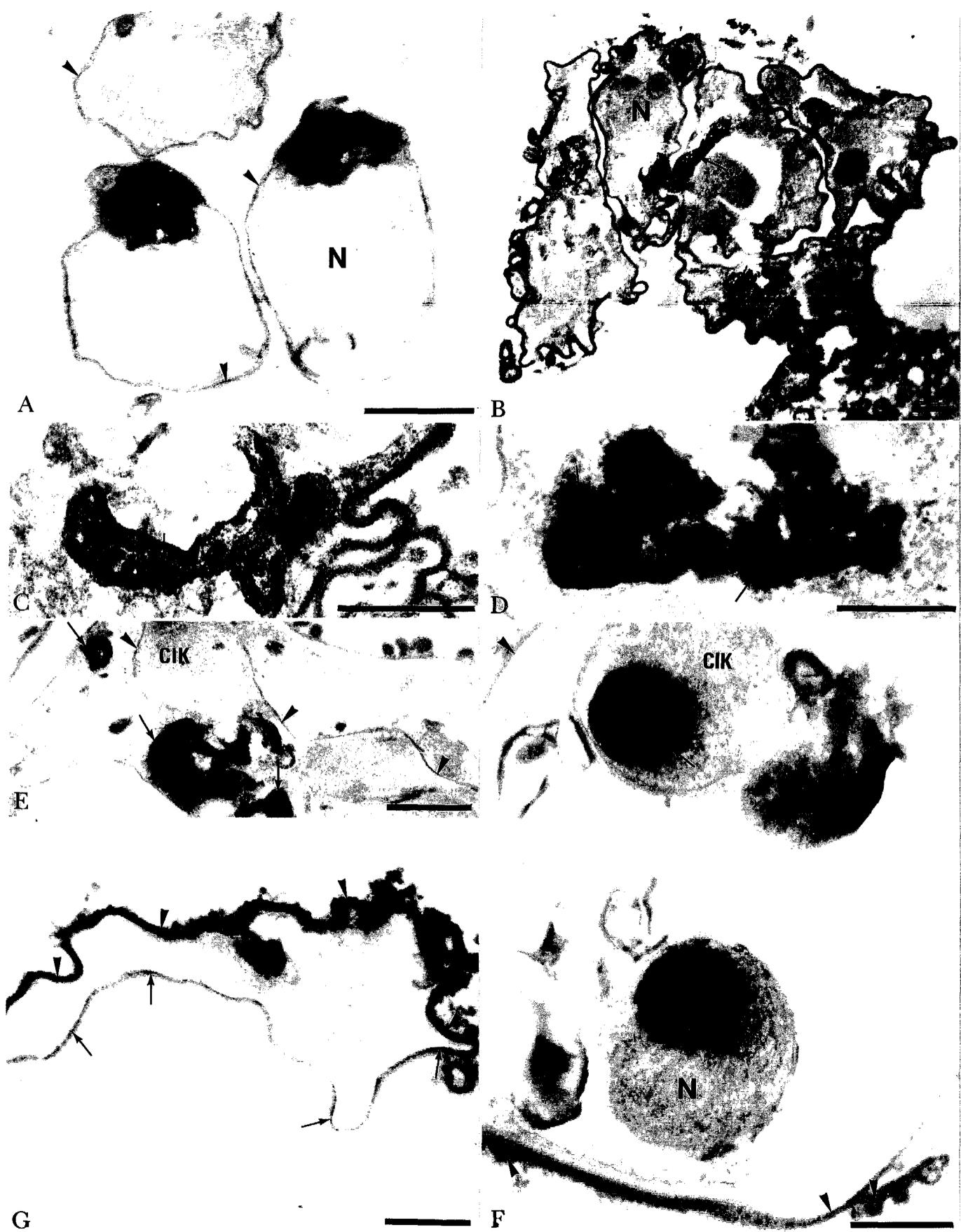
Chaîne de transfert des électrons dans la membrane mitochondriale interne, et localisation des sites de réaction de la cytochrome oxydase (complexe cytochrome *c*-cytochrome *a*) avec le DAB/OsO₄ (traduit et adapté de Hirai et Ogawa, 1986).

Un marquage dense aux électrons est observé dans la mitochondrie de tous les stades parasitaires, ainsi que dans les mitochondries des cellules hôtes pour une incubation de 2 h avec le substrat (Fig. 2). Ce marquage est intense pour les trophozoïtes de petite taille (Fig. 3A) et les CIK (Fig. 3F). Il se présente sous forme d'un dépôt linéaire, mais est plus fréquemment circulaire dans les trophozoïtes plus développés (Fig. 3B, C et D). Un marquage dense et écumeux est fréquemment observé dans la mitochondrie des trophozoïtes de grande taille (Fig. 3D) et celle des prékystes intermédiaires (Fig; 2 et 3E). Un marquage faible peut être noté dans la mitochondrie des CIK "en forme

← Figure V.2. Activité cytochrome oxydase dans les alvéoles pulmonaires parasitées. Un marquage dense aux électrons est observé sur la mitochondrie des trophozoïtes (→) et celle des prékystes intermédiaires (⇌). Les mitochondries des pneumocytes de type I (PI) et de type II (PII), ainsi que celle des macrophages (M) sont aussi marquées. Trait = 1 µm.

Figure V.3.

Activité cytochrome oxydase de *P. carinii*.



de banane", ainsi que dans celle des formes kystiques dégénérées.

La paroi parasitaire présente un marquage important (Fig. 3B, F et G). Ce dépôt est plus marqué à la surface pariétale exposée à la lumière alvéolaire qu'à la zone d'attachement aux pneumocytes de type I.

Dans les échantillons contrôles préincubés en milieu sans substrat, les membranes mitochondriales sont finement marquées alors que celles des cellules hôtes ne le sont pas (Fig. 4A et B). Dans ces témoins, la paroi parasitaire est toujours marquée mais moins intensément qu'en présence de substrat. Lorsque le DAB est omis, ou en présence de KCN, aucun marquage n'est décelé, hormis sur les lysosomes des macrophages (Fig. 4C) et sur les corps lamellaires des pneumocytes de type II (Fig. 4D). Aucun marquage de la paroi n'est observé dans ces deux contrôles.

E. Discussion.

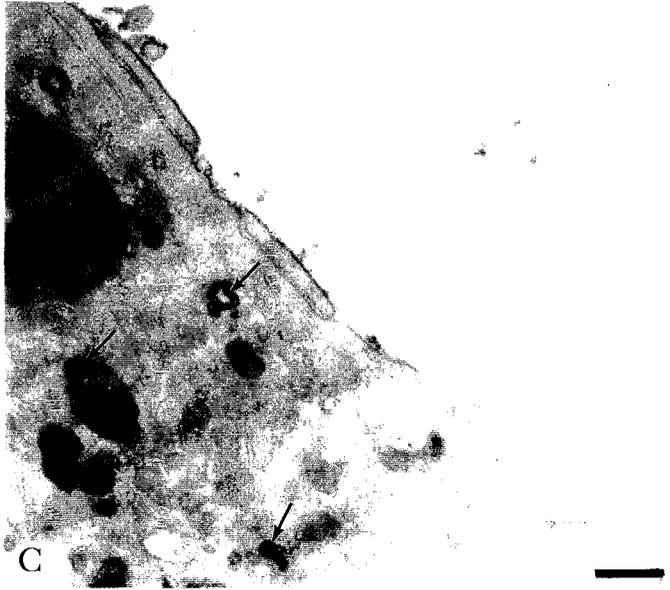
La réalisation de coupes sériées et la reconstitution 3-D assistée par ordinateur nous ont permis dans un travail antérieur de déterminer la configuration spatiale des divers organites et d'obtenir une représentation complète d'un trophozoïte de petite taille (Palluault et coll., 1991b) et d'un prékyste intermédiaire binucléé (Palluault et coll., 1991c). Ces mêmes techniques ont été appliquées pour l'étude de la mitochondrie de *P. carinii* du modèle lapin (Figure V.1).

Les marquages denses aux électrons, révélant une activité cytochrome oxydase, plus particulièrement retrouvés dans les mitochondries des CIK, des grands trophozoïtes, et des prékystes tardifs, semblent indiquer que tous ces stades, appelés à de profonds remaniements cytoplasmiques, ont un métabolisme respiratoire plus intense (Figure V.3).

← **Figure V.3.** Activité cytochrome oxydase de *P. carinii*. A. Un marquage intense est observé sur la mitochondrie des trophozoïtes de petite taille. La paroi est très légèrement marquée (►). B, C et D. Pour les trophozoïtes de grande taille, le marquage peut être linéaire (B, →), circulaire (C, →), ou encore épais et écumeux (D, →); membrane cellulaire (►). E. Dans les prékystes tardifs, lors de la formation des corps intrakystiques (CIK), les mitochondries présentent un activité cytochrome oxydase se traduisant par un marquage épais (→); membrane plasmique s'invaginant dans le cytoplasme kystique (►). F. Dans les kystes matures, la mitochondrie des CIK est fortement marquée (→). Un léger marquage peut être observé sur la couche externe dense aux électrons de la paroi kystique et les prolongements tubulaires (►). G. Trophozoïte présentant un marquage très intense sur la face pariétale exposée à la lumière alvéolaire (►); ce marquage est moins important sur la face en contact avec le pneumocyte de type I (→). N, noyau. Trait = 0,5 µm.

Figure V.4.

Echantillons contrôles.



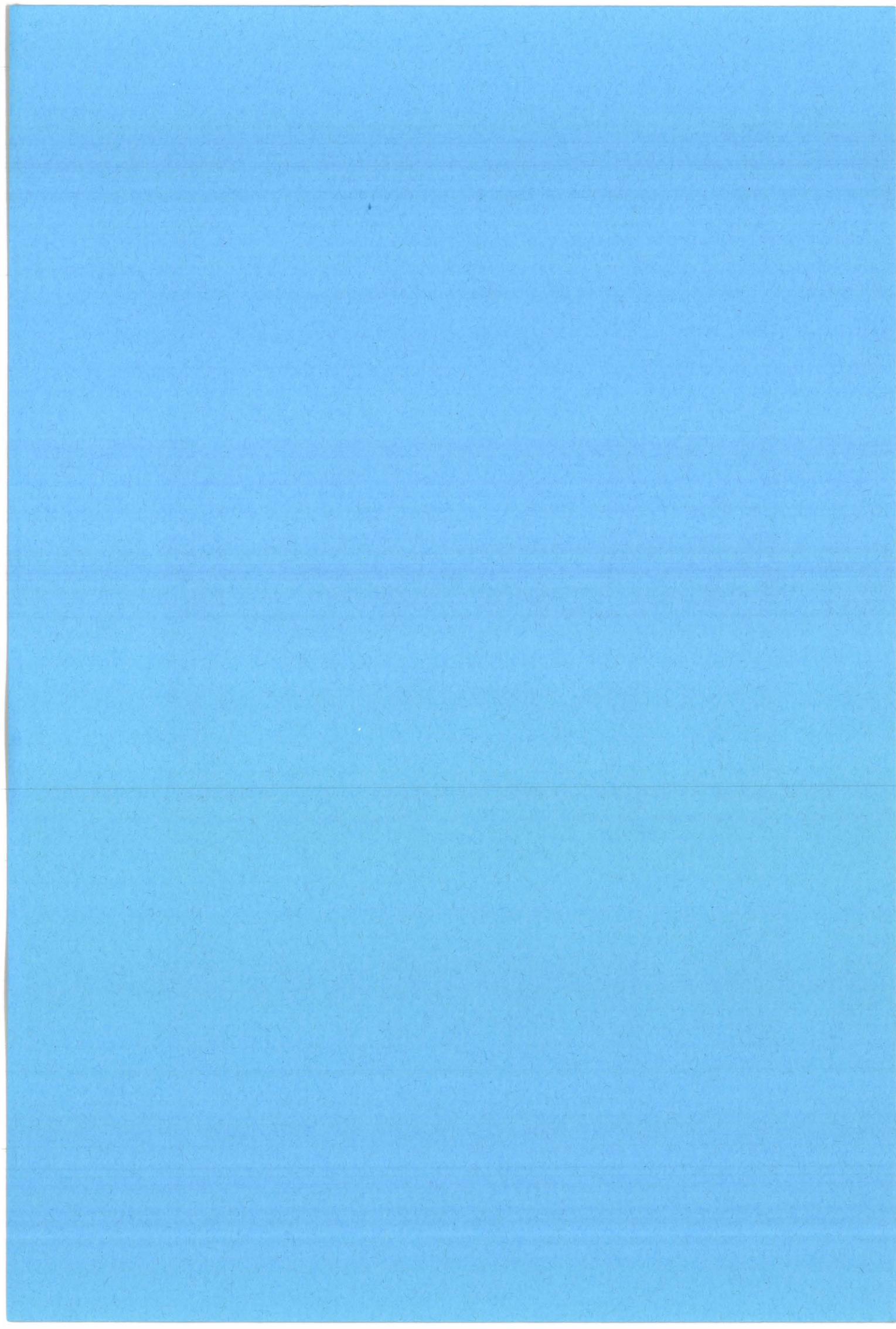
La présence d'une mitochondrie ronde chez les CIK, sphéroïde et avec de petites zones développées chez les trophozoïtes de petite taille, ramifiée chez les trophozoïtes de grande taille ainsi que chez les prékystes précoces, et très développée avec des zones de constriction chez les prékystes intermédiaires, nous suggère que cette mitochondrie se développe par élongation des zones de bourgeonnement. Les zones de constriction pourraient donner naissance par scission à plusieurs petites mitochondries au stade prékyste tardif, qui deviendront la mitochondrie unique des CIK. Les crêtes mitochondriales se présentent, dans nos conditions expérimentales, sous forme tubulaire avec toutefois une base aplatie (Figure V.4.A et B). Ces résultats diffèrent de ceux rapportés précédemment et cités dans l'introduction de ce chapitre. Ces divergences peuvent traduire une différence hôte-spécifique, mais il est plus vraisemblable qu'elles soient liées aux variations des conditions expérimentales propres à chaque étude en MET. La présence de crêtes mitochondriales lamellaires rapportées par certains auteurs (Vávra et Kucera, 1970; Takeuchi, 1980; Ruffolo et coll., 1989), leur a permis de rapprocher *P. carinii* des *Fungi*. Ce critère apparaît peu fiable dans la mesure où, l'observation ultrastructurale des mitochondries est faite sur des préparations parasitaires incomplètement préservées. De plus, la présence de crêtes lamellaires a été rapportée chez de nombreux protozoaires (cryptomonadines, eugléniens, zooflagellés) (De Puytorac et coll., 1987), et, bien que chez les champignons pathogènes les crêtes mitochondriales soient souvent lamellaires, dans d'autres groupes fongiques elles sont tubulaires (Garrison, 1983).

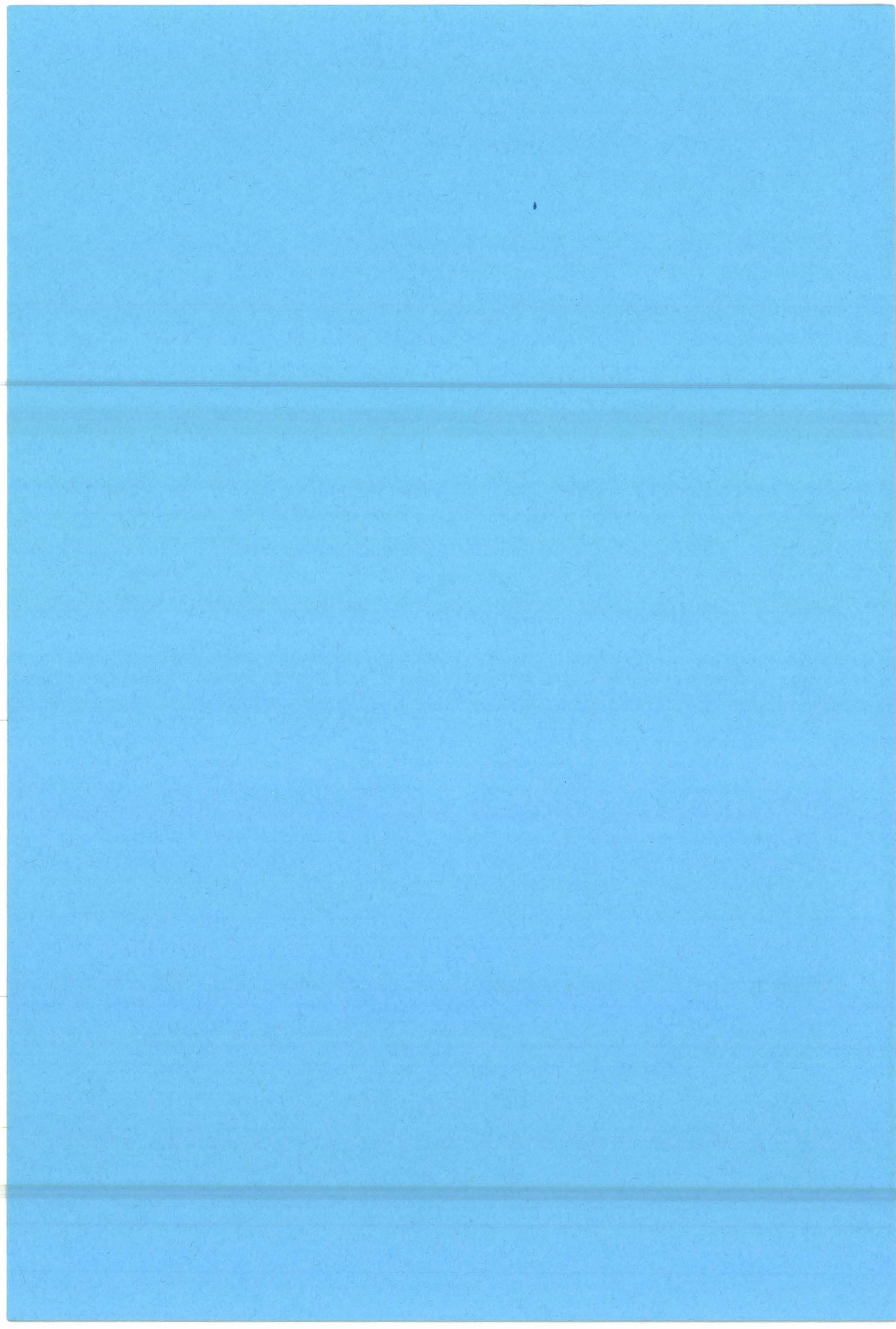
Dans la mesure où l'épaisseur des coupes réalisées pour cette étude a été constante, l'intensité du marquage observé sur les mitochondries des cellules hôtes et parasitaires peut être comparé. Les contrôles réalisés en absence de substrat nous permettent de révéler des activités oxydasiques endogènes. Elles semblent être plus importantes chez les parasites que

← **Figure V.4.** Echantillons contrôles. **A et B.** Echantillons incubés dans un milieu ne contenant pas de cytochrome *c*. Les membranes mitochondriales sont très finement marquées, traduisant la présence de cytochrome *c* endogène. **A:** prékyste intermédiaire; **B:** trophozoïte. Le marquage contraste les membranes qui apparaissent linéaires (**A**, →), ou tubulaires (**B**, →) suivant le plan de coupe. **C et D.** Echantillons incubés dans un milieu sans DAB. Un marquage osmiophile est détecté dans les phagolysosomes des macrophages (**C**, →), et dans les corps lamellaires des pneumocytes de type II (**PII**) (**D**). Trait = 0,5 µm.

chez la cellule hôte. Toutefois, une évaluation quantitative comparative de ces activités serait vaine dans la mesure où la diffusion des divers réactifs utilisés ne peut être estimée dans ce milieu pulmonaire hétérogène. De plus, les coupes tangentielles des crêtes seraient une source d'erreur non négligeable.

La paroi parasitaire est colorée par le DAB (Figure V.3.G). Ce marquage est plus intense sur la face exposée à la lumière alvéolaire que sur la face en contact avec le pneumocyte de type I. Cette différence ne peut pas être expliquée par un manque de pénétration du DAB dans la mesure où l'activité cytochrome c oxydase est observable dans toutes les cellules pulmonaires et parasitaires. Une production locale d' H_2O_2 pourrait expliquer ce marquage pariétal. Cette production d' H_2O_2 pourrait résulter d'une activité oxydase telle celle de la superoxyde dismutase, antérieurement rapportée chez *P. carinii* de rat (Pesanti, 1984), ou bien encore issue d'autres oxydases peroxysomales utilisant comme substrat l'Acétyl-Co A, des acides aminés, le glycolate, l'urate, la xanthine, le glutathion, ou des monoamines. Ces spéculations, ajoutées à la présence récemment rapportée d'une seconde membrane dans la paroi kystique, semblent conférer à cette paroi un rôle important pour la survie du parasite dans un environnement hostile (DeStephano et coll., 1990a), comme celui de la lumière alvéolaire où les tensions à l'interface eau-air sont fortes et soumises à de fortes variations. La production locale de peroxyde d'hydrogène au niveau pariétal, bien que jamais décrite à notre connaissance chez les cellules eucaryotes, doit être prise en compte lors de l'utilisation d'outils ou de sondes révélés par le DAB.





VI. Influence de la pression osmotique sur la préservation du système endomembranaire de *P. carinii*. Inclusion en Epon.

A. Résumé.

Une forte pression osmotique a été utilisée pour préserver des phénomènes de lyse osmotique durant la fixation l'ultrastructure de *Pneumocystis carinii* provenant des modèles lapin, rat, et souris SCID. Les organites et le cytosol sont correctement préservés pour une tonicité comprise entre 850 et 1 300 milliosmoles. Dans ces conditions expérimentales, nous avons pu établir que le réticulum endoplasmique est très développé dans tous les stades parasitaires. L'appareil de Golgi, les vacuoles autophagiques, les corps denses, les saccules endoplasmiques de type II, et la membrane pariétale externe récemment décrite, sont retrouvés systématiquement dans tous les stades. Les implications biologiques de ces résultats sont discutées.

B. Introduction.

Le problème de la fixation de *P. carinii* a suscité bon nombre de travaux (Diekmann et coll., 1954; Wessel et Riecken, 1958; Seifert, 1960; Bommer, 1961, 1962, 1964; Kucera, 1963; Huneycutt et coll., 1964; Barton et Campbell, 1967, 1969; Huang et Marshall, 1970; Brzosko et Wojewodska, 1969; Vávra et Kucera, 1970; Ham et coll., 1971; Campbell, 1972; Frenkel, 1976; Vossen et coll., 1976, 1977, 1978; Takeuchi, 1980; Yoneda et Walzer, 1980, 1981; Haleston et coll., 1981; Matsumoto et coll., 1984, 1989; Yoshida et coll., 1984; Filiale et coll., 1985; Henshaw et coll., 1985; Gigliotti et coll., 1986; Haque et coll., 1987; Yoshikawa et coll., 1987b et c, 1988, 1991; Itatani et Marsall, 1988; Watts, 1988; Dei-Cas et coll., 1989; Goheen et coll., 1989; Ruffolo et coll., 1989; Blumenfeld et coll., 1990; DeStephano et coll., 1990a; Millard et coll., 1990; Garner et coll., 1991; Nielsen et Settnes, 1991; Soulez et coll., 1991a et b). De nombreuses études ultrastructurales ont été menées sur *P. carinii* (Yoshida, 1989), utilisant des méthodes variées afin de préserver et maintenir l'intégrité cellulaire du parasite.

Certains auteurs se sont attachés à varier la technique de fixation: fixation du poumon parasité par perfusion ou par immersion (Barton et Campbell, 1969; Vávra et

Kucera, 1970; Vossen et coll., 1978; Yoshida et Yoshida, 1984; Matsumoto et coll., 1984; Henshaw et coll., 1985; Millard et coll., 1990; Nielsen et Settnes, 1991); le fixateur: glutaraldéhyde-acroléine en tampon phosphate (Vàvra et Kucera, 1970; Ruffolo et coll., 1989); acide picrique (Vàvra et Kucera, 1970); mélange acroléine-acide tannique ou, glutaraldéhyde-acroléine-acide tannique (Ruffolo et coll., 1989); solution de permanganate en solution tamponnée ou non (Vàvra et Kucera, 1970; Takeuchi, 1980); mélange acide tannique-glutaraldéhyde en tampon véronal ou en tampon cacodylate (Yoshida et coll., 1984; Matsumoto et Yoshida, 1984; Itatani et Marshall, 1988; Ruffolo et coll., 1989); la postfixation: mélange tétroxyde d'osmium-ferrocyanure ou tétroxyde d'osmium-acide tannique (Goheen et coll., 1989); la déshydratation: en ajoutant de l'acétate d'uranyle ou de l'acide phosphotungstique durant les premières étapes de la déshydratation (Itatani et Marshall, 1988); l'osmolarité des différentes solutions: certains auteurs se sont attachés à respecter une osmolarité de 380 mOsm pour les étapes de fixation et de lavage (Vàvra et Kucera, 1970; Vossen et coll., 1978).

La plupart de ces techniques apportent des résultats acceptables (Ruffolo et coll., 1989), mais ne préservent pas le parasite de la lyse osmotique et de l'extraction de matériel cytoplasmique, particulièrement dramatiques pour le stade trophozoïte, expliquant peut être la pauvreté en organites remarquée par certains auteurs (Hughes, 1989; Yoshida, 1989).

Dans la mesure où le degré et la qualité de la fixation dépendent en partie de la vitesse de pénétration du fixateur à travers les membranes, et que cette vitesse est modulée par la différence de tonicité entre la solution de fixation et les tissus à fixer (Hayat, 1970), nous avons postulé que toutes les solutions utilisées pour maintenir l'intégrité cellulaire de *P. carinii* dans son environnement naturel (le surfactant pulmonaire) étaient hypotoniques. Dans cette étude, nous avons testé une large gamme de tonicités pour les différentes solutions utilisées pour la préparation d'échantillons en MET. Une méthode originale prévenant la lyse osmotique et l'extraction cellulaire du matériel cytolasmique est proposée.

C. Matériels et méthodes.

1. Modèles biologiques.

a. Lapereau.

Ce modèle est décrit dans le chapitre III C.

b. Souris.

Des souris SCID (Institut Pasteur de Lille, France) âgées de 8 à 10 semaines et non parasitées, sont maintenues en cage, et reçoivent une nourriture standard jusqu'à la mort. Des souris non-SCID, naturellement parasitées développent une PPC par administration de corticoïdes (40 mg/l de métasulfobenzoate de prednisolone, Houdé, Puteaux, France) pendant 3 mois dans l'eau de boisson et sont utilisées ici comme source pour la transmission du parasite aux souris SCID. Ces deux catégories de souris sont mises en contact 26 jours et sacrifiées 46 jours plus tard. Plus de 1,5 million de kystes peuvent être alors retrouvés dans les poumons de ces souris SCID (Soulez et coll., 1991b).

c. Rat.

Des rats Wistar reçoivent de la dexaméthasone (Merk Sharp & Dhome Chibret, Paris) à une concentration de 2 mg/l dans l'eau de boisson (Schmatz et coll., 1990) et sont sacrifiés après 2 mois de traitement.

2. Préparation des échantillons pour études ultrastructurales en MET.

Des petits blocs de poumon parasité (1 mm³) sont fixés pendant 3 h à température ambiante par immersion dans une solution de glutaraldéhyde 1,25% en tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5), puis lavées toute la nuit à température ambiante en tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5). L'osmolarité de ces deux solutions est ajustée par addition d'électrolytes (NaCl) ou de non-électrolytes (saccharose).

a. Osmolarité des fixateurs et solutions tamponnées.

	Osmolarité (milliosmoles)					
	450	580	870	1300	1750	2580
Saccharose (M finale)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,6
NaCl (M finale)	0,07	0,13	0,27	0,4	0,53	1,07

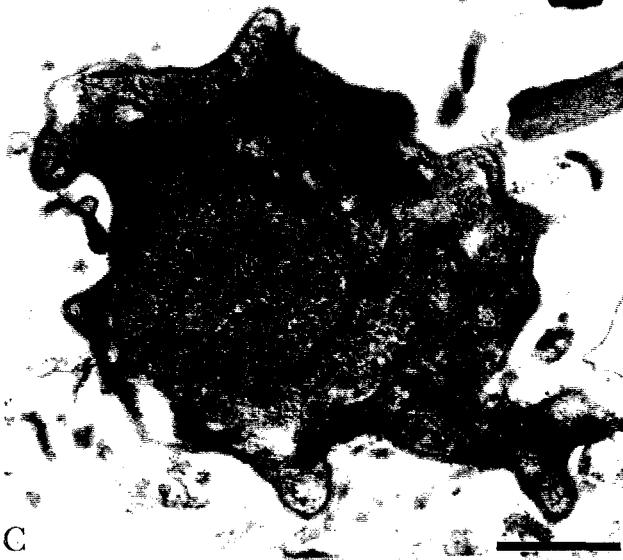
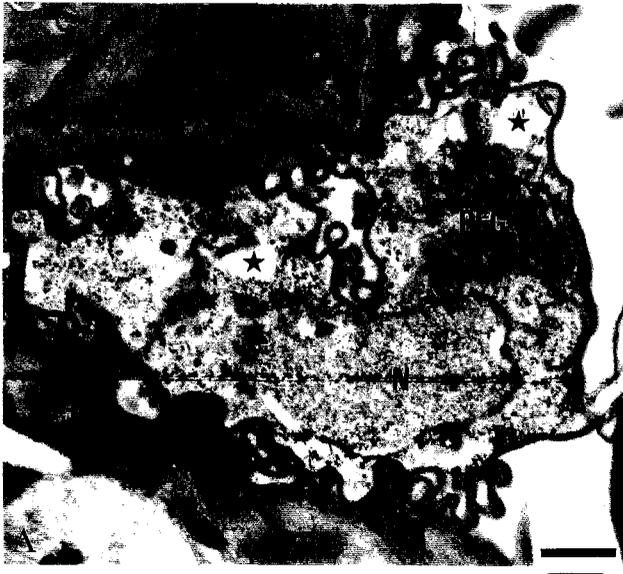
Quelques échantillons pulmonaires ont été fixés dans une solution contenant 2,5% de glutaraldéhyde et ajustée à 850 mOsm. Certains échantillons ont été lavés dans un tampon phosphate 0,1 M (190 mOsm). Tous les échantillons ont été ensuite postfixés 1 h à température ambiante en tétroxyde d'osmium 1% dans du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5). La déshydratation, l'inclusion et la préparation des coupes ont été réalisées comme décrit dans le chapitre III C.

Figure VI.1.

Influence de l'osmolarité sur la préservation ultrastructurale de *P. carinii*.

Figure VI.2. A.

Ultrastructure de *P. carinii* de lapin fixé et lavé sous une tonicité de 870 mOsm.



3. Contraste des échantillons par l'iodure de zinc (IZO).

La technique de contraste du système endomembranaire par l'IZO a été réalisée pour quelques échantillons. La méthode est la même que celle décrite dans le chapitre III C 3. L'osmolarité des solutions de fixation et de lavage a été ajustée à 870 mOsm par addition de saccharose.

D. Résultats.

Effet de l'osmolarité sur la préservation ultrastructurale, (Figure VI.1): Lorsque la tonicité du fixateur et de la solution de lavage sont à 450 mOsm, approximativement 95% des parasites présentent des lyses osmotiques et des extractions cytosoliques. Les composants cytoplasmiques sont partiellement préservés pour 5% des trophozoïtes dans la zone centrale de l'échantillon pulmonaire (Fig. 1A). Ce pourcentage monte à environ 15% lorsque la tonicité est de 580 mOsm (Fig. 1B). Une osmolarité comprise entre 870 et 1300 mOsm permet d'obtenir entre 70 et 90% de trophozoïtes bien préservés (Fig. 1C et D; Fig. 2A à E). Ces résultats sont similaires pour *P. carinii* de tous les modèles testés (rat, souris et lapin). Lorsque la tonicité des solutions atteint ou dépasse 1750 mOsm, les prékystes intermédiaires semblent protégés des extractions cytoplasmiques, mais le noyau des trophozoïtes est rompu.

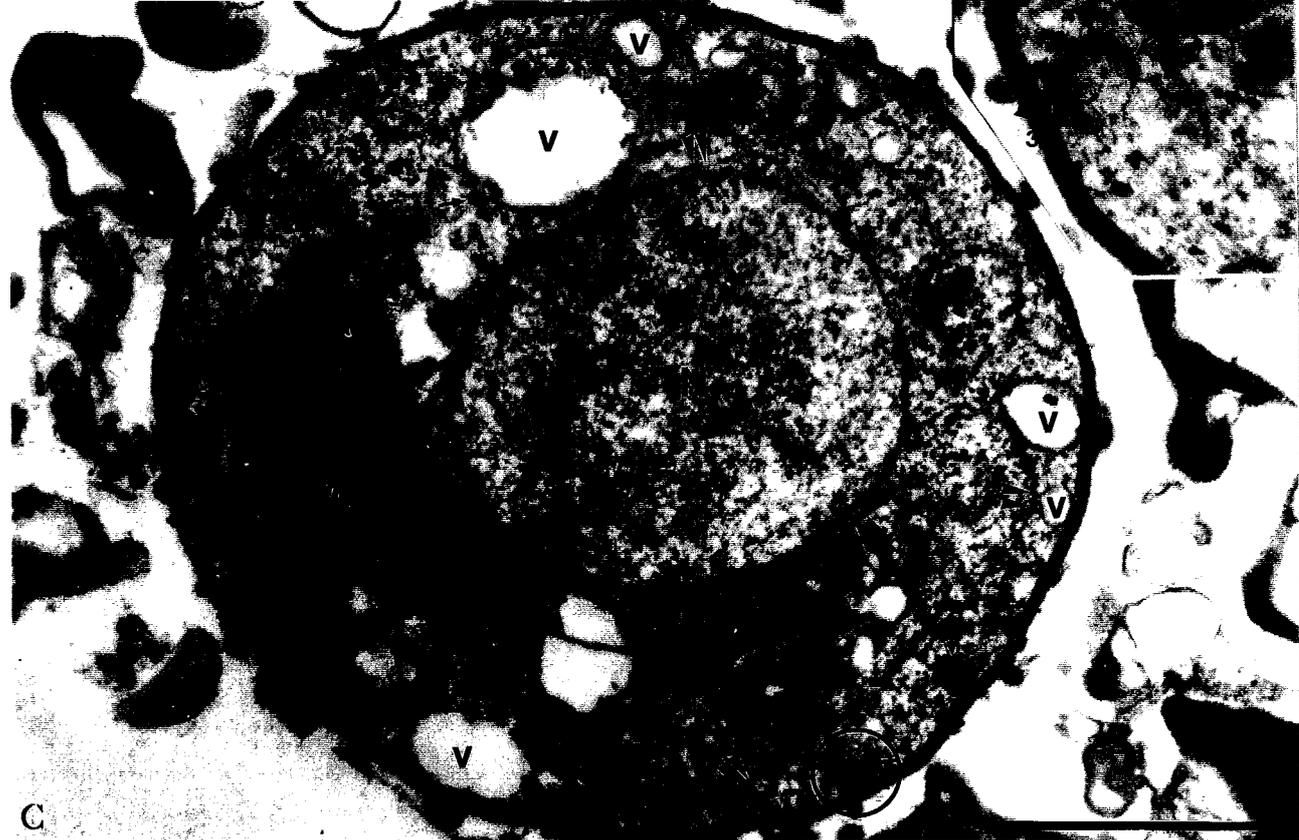
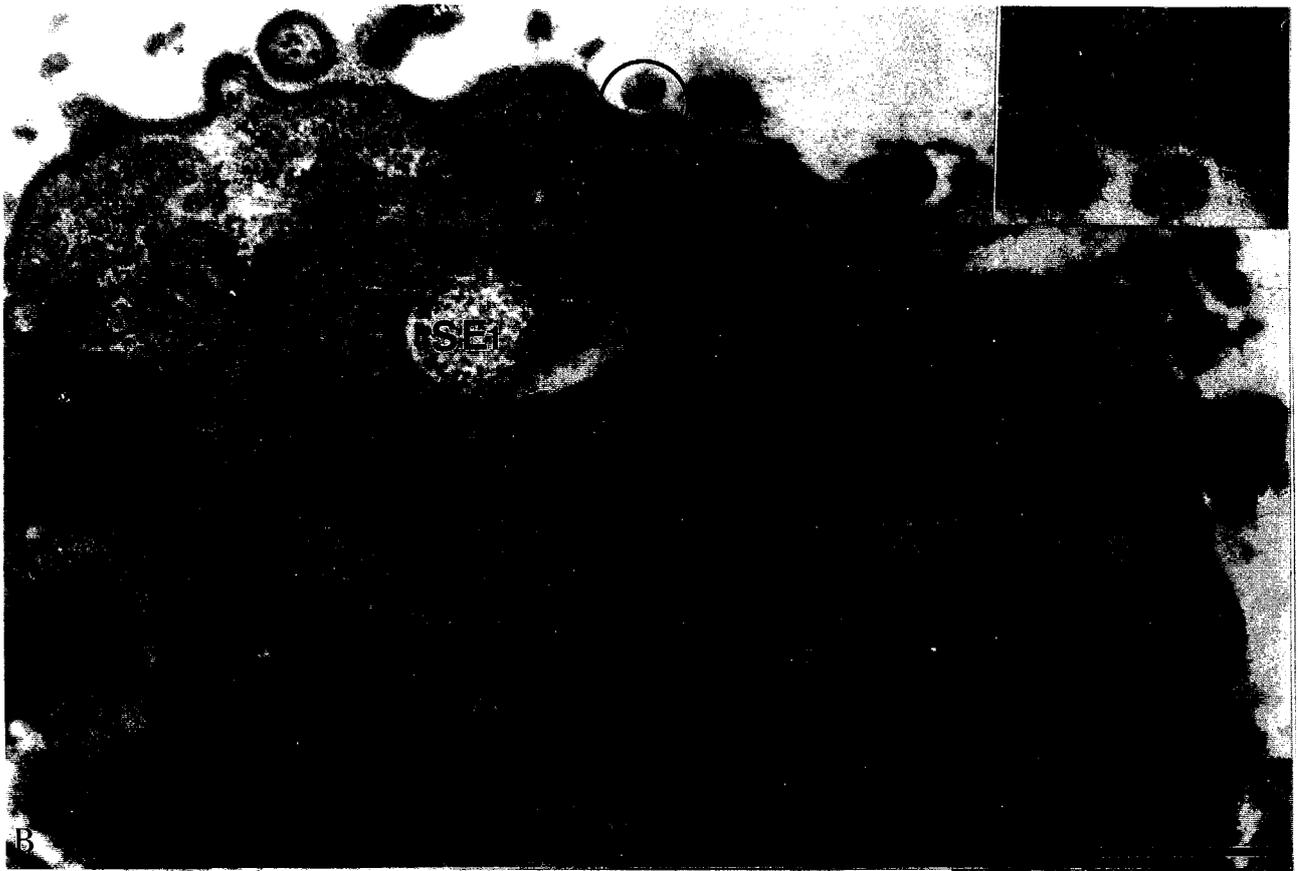
Ultrastructure de *P. carinii* pour une tonicité comprise entre 870 et 1300 mOsm, (Figure VI.2.A à E): un dépôt osmiophile dense est observé dans la paroi des trophozoïtes, apposé à la membrane plasmique (Fig. 2B, et encart). Ce dépôt est toujours présent dans la paroi des prékystes précoces (Fig. 2C, et encart). Dans la paroi kystique, ce dépôt se

← **Figure VI.1.** Influence de l'osmolarité sur la préservation ultrastructurale de *P. carinii*. A. Trophozoïte de grande taille partiellement préservé (tonicité ajustée à 450 mOsm): le REG et le noyau (N) sont correctement préservés, mais les lyses osmotiques et les extractions cytoplasmiques (*) sont toujours présentes; 95% des parasites sont incorrectement préservés à cette tonicité. B. Prékyste intermédiaire (tonicité de 580 mOsm): les lyses osmotiques (*) sont toujours présentes pour 15% des parasites à-peu-près correctement fixés; environ 85% des parasites sont partiellement voir totalement détruits (*, en haut à droite). C. Petit trophozoïte (tonicité de 870 mOsm): les zones de lyses osmotiques ne sont plus visibles pour environ 70% des trophozoïtes. D. Trophozoïte (tonicité de 1300 mOsm): 90% des trophozoïtes sont correctement préservés; les SE₁ peuvent être observés dans le cytoplasme dense; des zones cytoplasmiques remplies de matériel clair sont observables.

← **Figure VI.2.** Ultrastructure de *P. carinii* fixé et lavé sous une tonicité de 870 mOsm. A. Dans le cytoplasme d'un petit trophozoïte fixé et lavé sous une tonicité de 870 mOsm, les vésicules golgiennes (→) peuvent être aisément observées; quelques unes bourgeonnent de l'appareil de Golgi (⇌), d'autres établissent un contact avec la membrane plasmique via une sorte de canal (cercle). Trait = 0,5 µm.

Figure VI.2 (suite).

Ultrastructure de *P. carinii* de lapin fixé et lavé sous une tonicité de 870 mOsm.



retrouve entre la couche externe dense et la couche sous-jacente peu dense (Fig. 2D et E).

Les vésicules golgiennes sont observées en contact étroit avec les membranes endoplasmiques et avec la membrane plasmique (Fig. 2A). Les SE_1 sont très fréquemment observés dans le cytoplasme des trophozoïtes (Fig. 2B). Des vacuoles, des corps denses, et des microtubules sont visibles dans les prékystes précoces (Fig. 2C) et intermédiaires (Fig. 2E, et encart). Des sections longitudinales aplaties mais aussi circulaires des crêtes mitochondriales peuvent être observées.

Lorsque les échantillons pulmonaires sont fixés dans un milieu hypertonique, puis lavés dans un milieu hypotonique (190 mOsm), tous les parasites présentent des zones de lyse osmotique avec extraction cytoplasmique partielle ou totale.

Le réactif IZO contraste le système endomembranaire des parasites fixés en milieu hypertonique (Fig. 3). Le cytoplasme des trophozoïtes apparaît très riche en réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi est très développé. Ce système membranaire est particulièrement abondant et bien contrasté dans les prékystes. Aucune différence ultrastructurale significative n'a été notée lorsque la tonicité des différentes solutions a été ajustée avec un électrolyte ou un non-électrolyte.

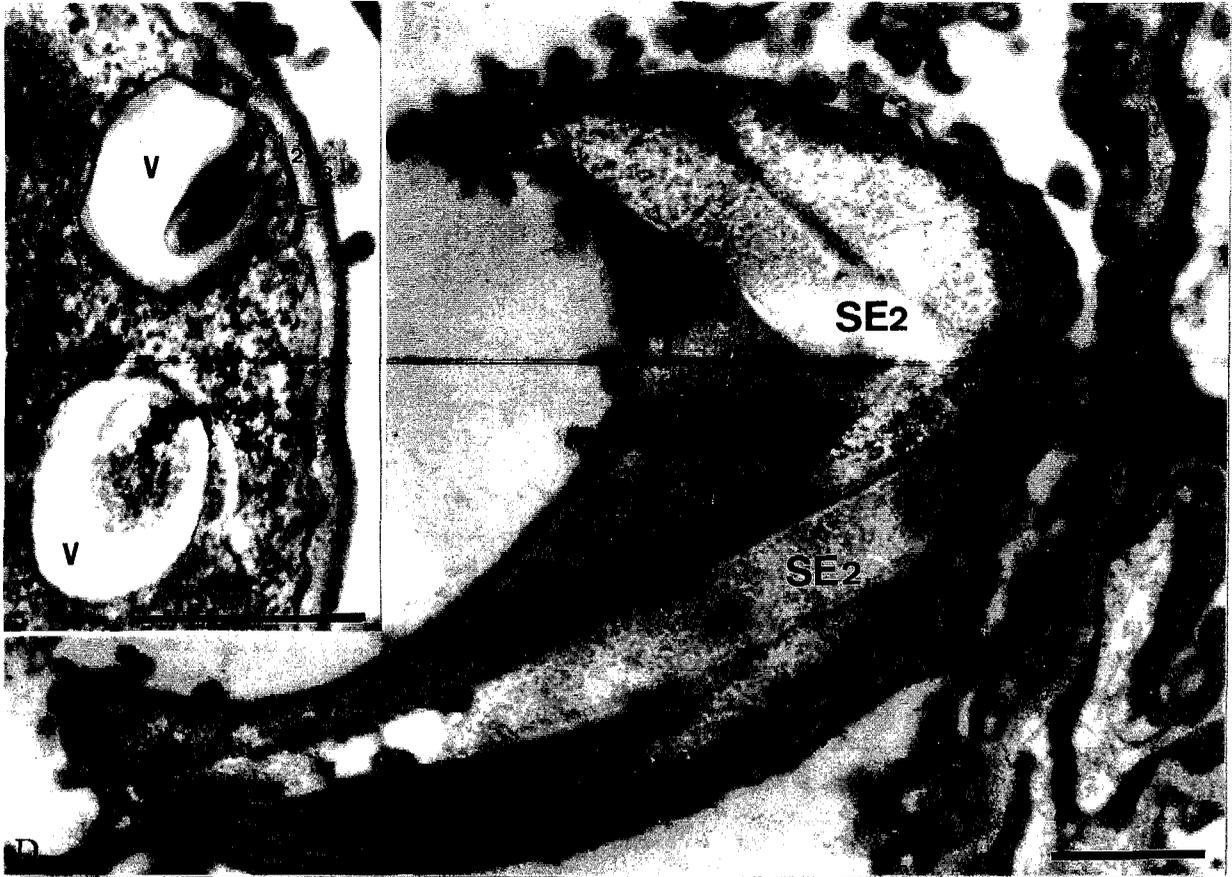
E. Discussion.

La plupart des préparations ultrastructurales menées sur *P. carinii* ont été faites avec des milieux de fixation et de lavage légèrement hypertoniques (330–380 mOsm). Certaines fixations étaient réalisées en milieux hypertoniques (par exemple, en tampon phosphate 0,1 M/5% de gluraldéhyde, soit # 900 mOsm) suivies d'un lavage hypotonique (tampon phosphate 0,1 M, # 190 mOsm). Les échantillons étaient alors soumis à une variation de tonicité d'environ 700 mOsm, qui devait probablement être à l'origine de l'extraction de

← **Figure VI.2 (suite).** Ultrastructure de *P. carinii* du lapin fixé et lavé sous une tonicité d'environ 870 mOsm. B. Trophozoïte de grande taille. Les SE_1 sont fréquemment observés. Un dépôt osmiophile dense (►, et encart) est retrouvé dans la couche dense (3) de la paroi (cercle, et encart), en apposition sur la membrane plasmique (1). C. Prékyste précoce. Le cytosol, les sections allongées et rondes des crêtes mitochondriales (Mi), les vacuoles (V), les corps denses (→, et → dans l'encart), les microtubules (▲▲), sont bien préservés et sont aisément observables. Le dépôt osmiophile (► dans l'encart) est au-dessus de la membrane plasmique (1) dans la couche dense (3) de la paroi (cercle). Trait = 0,5 µm.

Figure VI.2 (suite).

Ultrastructure de *P. carinii* de lapin fixé et lavé sous une tonicité de 870 mOsm.



composants cytoplasmiques. Replacé dans le contexte environnement, c'est à dire en tenant compte que *P. carinii* vit dans le liquide alvéolaire de surface (le surfactant), l'immersion des échantillons pulmonaires dans des fixateurs de même tonicité (isotonicité des deux milieux) devait *a priori* minimiser les chocs osmotiques et permettre la pénétration du fixateur par simple diffusion.

Le fait qu'une forte tonicité des milieux, comprise entre 870–1300 mOsm, permette une bonne préservation du contenu cytoplasmique pour 70% des parasites, peut apparaître surprenant. En effet, ces fortes tonicités sont loin de celles généralement retrouvées dans les milieux physiologiques dits isotoniques, habituellement utilisés. La tonicité du milieu pulmonaire où évoluent les parasites (surfactant = substance active de surface) est difficile à établir. Toutefois, le surfactant, décrit sur le plan fonctionnel comme étant un matériel qui atténue les tensions de surface à l'interface eau-air (Rooney, 1985), peut être récolté partiellement, après LBA et centrifugation, sur un gradient de NaCl-saccharose entre les zones d'osmolarité comprises entre 300 et 750 mOsm (Berggren et coll., 1985). La densité de ces composés phospholipidiques additionnée à celle des autres constituants du milieu alvéolaire (apoprotéines, sels, substances cellulaires exocytées ou diffusées) nous laisse présager une forte tonicité dans ce microenvironnement soumis à de fréquentes variations.

Le surfactant joue un rôle important dans la biologie du parasite (Sheehan et coll., 1986). Dans nos conditions expérimentales, la deuxième membrane des CIK (Barton et Campbell, 1969; Vávra et Kucera, 1970; Haque et coll., 1987) et des kystes (DeStephano et coll., 1990a), est aisément observée sous forme d'un fin dépôt osmiophile chez les trophozoïtes (Figure VI.2B, et encart), les prékystes (Figure VI.2.C et 2D, et encarts), et dans la paroi kystique (Figure VI.2E). Cette paroi complexe doit jouer un rôle essentiel dans la survie du parasite face à un environnement hostile (DeStephano et coll., 1990a).

← **Figure VI.2 (suite).** Ultrastructure de *P. carinii* de lapin fixé et lavé sous une tonicité de 870 mOsm. **D.** Les vacuoles (v) dans le cytoplasme des prékystes intermédiaires (encart x 64 000) sont facilement observables et peuvent être en contact avec la membrane plasmique (1); le dépôt osmiophile (►) se localise entre la couche pariétale externe dense (3) et la couche sous-jacente claire (2). Dans les kystes dégénérés le SE₂, occupant une large portion du cytoplasme, est préservé. **E.** Vue de détail d'un kyste mature contenant des CIK, présentant les membranes plasmiques (1), la couche intermédiaire peu dense (2), la couche externe dense (3), et la seconde membrane (►). Trait = 0,5 µm.

Figure VI.3.

Ultrastructure de *P. carinii* de lapin fixé et lavé sous une tonicité de 870 mOsm et postfixé au réactif IZO



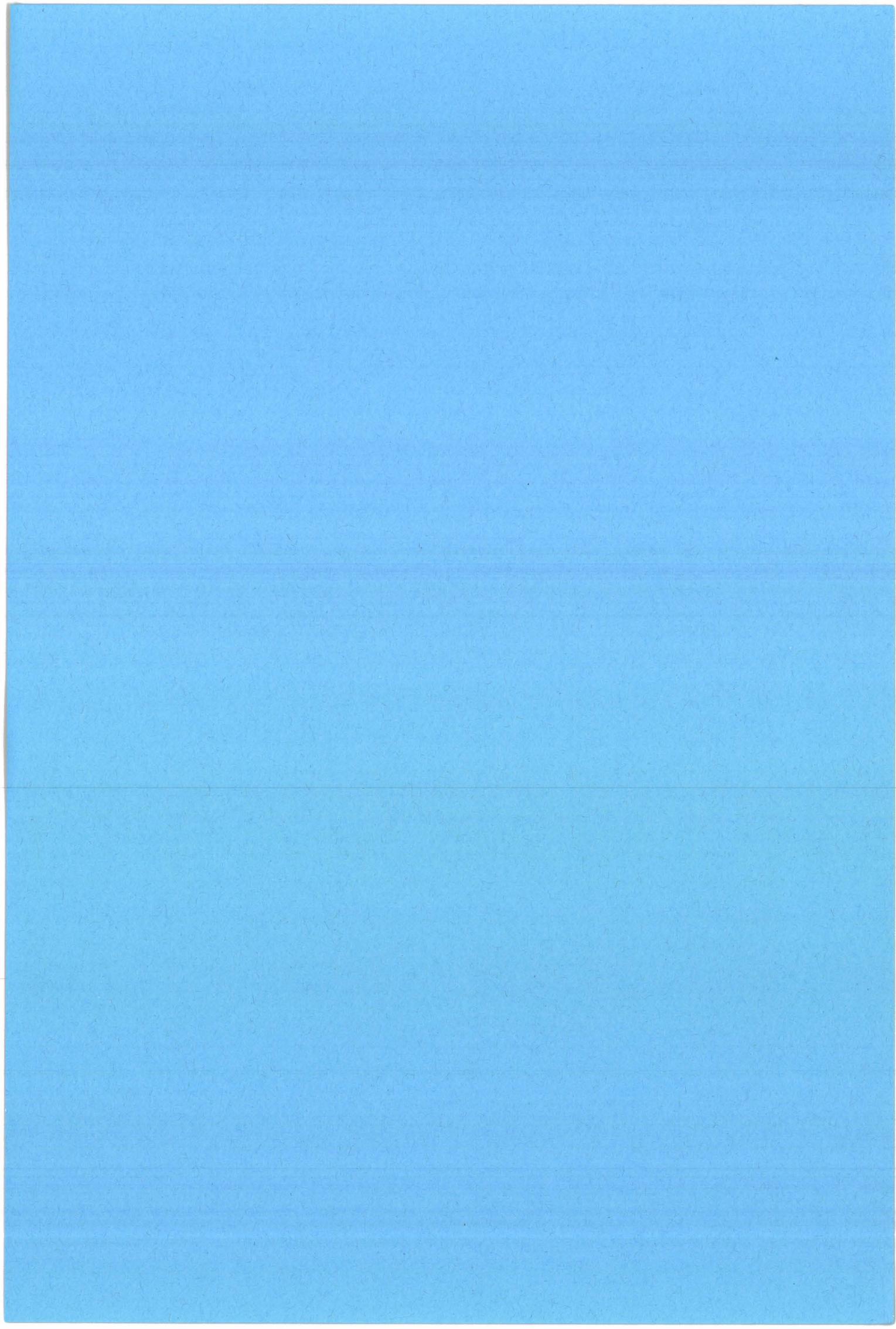
La forte pression osmotique du fixateur et de la solution de lavage, utilisée sur *P. carinii* provenant de lapins, de rats, et de souris, nous a permis, en minimisant la lyse osmotique, de découvrir un réticulum endoplasmique bien développé dans tous les stades parasites, un appareil de Golgi qui n'a plus rien de rudimentaire, de fréquentes et nombreuses vacuoles autophagiques (SE₁), un SE₂ très développé. En effet, les SE₁ antérieurement décrits dans quelques trophozoïtes (Palluault et coll., 1990, 1991b) sont maintenant retrouvés dans la plupart des formes végétatives et dans les prékystes. Des vacuoles d'exo- ou d'endocytose peuvent aussi être observées (Figure VI.2.D, encart). Le SE₂, observé antérieurement chez les trophozoïtes de grande taille et les prékystes intermédiaires, mais jamais dans les formes kystiques (Palluault et coll., 1990, 1991b et c), est maintenant systématiquement retrouvé. Il peut même être observé dans certaines formes kystiques dégénérées (Figure. VI.2.D). Bien que son apparition semble précéder une division nucléaire, son rôle reste inconnu.

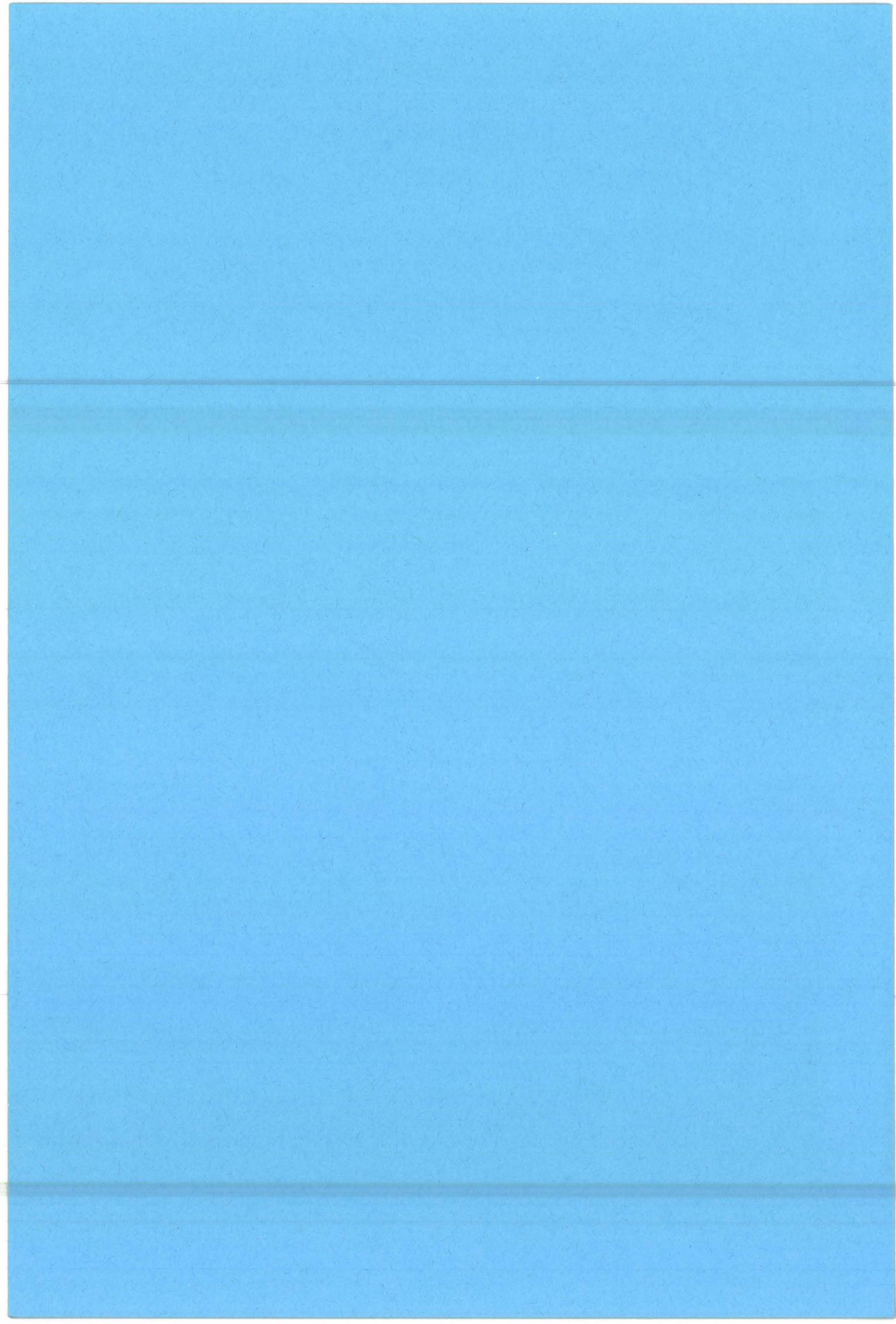
Dans les trophozoïtes de taille moyenne, les vésicules golgiennes, qui se développent par bourgeonnement à partir de structures endoplasmiques (Figure VI.3), peuvent être observées bourgeonnant à partir de l'enveloppe nucléaire (non montré), comme chez certains sporozoaires (Slomianny et Prensier, 1990). Ces vésicules qui se développent à partir de l'appareil de Golgi peuvent aussi établir un contact étroit avec la membrane plasmique *via* une sorte de canal (Figure VI.2.A). Ces observations pourraient évoquer une voie potentielle de transport vers la paroi de matériaux synthétisés dans cet appareil.

L'observation de sections allongées ou circulaires des crêtes mitochondriales conforte les résultats présentés au chapitre V.

Hormis la présence de cette seconde membrane retrouvée maintenant à tous les stades, nos observations prises dans leur ensemble suggèrent que *P. carinii* présente une organisation cellulaire typique des cellules eucaryotes.

← **Figure VI.3.** Ultrastructure de *P. carinii* de lapin fixé et lavé sous une tonicité de 870 mOsm et postfixé au réactif IZO contrastant les membranes. Le réticulum endoplasmique (RE), le noyau (N), les mitochondries (Mi), et les vésicules golgiennes bourgeonnant à partir de l'appareil de Golgi (→, et → dans l'encart) sont facilement identifiables dans les trophozoïtes (en haut à gauche et dans l'encart); le prékyste intermédiaire présente un système endomembranaire en cours de profond remaniement. Trait = 0,5 µm.





VII. Influence de la pression osmotique sur la préservation du système endomembranaire de *Pneumocystis carinii* inclus en London resin white. L'appareil de Golgi et la synthèse de la paroi.

A. Résumé.

Une méthode pour fixer et inclure en résine hydrophile (London Resin White) *Pneumocystis carinii* provenant de lapins ou de souris SCID, a été développée pour des études immunocytochimiques. Cette méthode, faisant appel à de fortes pressions osmotiques (environ 870 mOsm) depuis la fixation jusqu'à l'inclusion, permet de préserver les structures membranaires cytoplasmiques des parasites et de maintenir leur immunoréactivité. Des études cytochimiques réalisées sur ces préparations avec des lectines couplées à des particules d'or (Con A, SBA, UEA I) ont montré leur réactivité sur des composants cytoplasmiques (réticulum endoplasmique, vésicules golgiennes). La streptavidine couplée à des particules d'or a aussi été testée et réagit avec la paroi parasitaire et les composés cytoplasmiques; ce conjugué doit être utilisé avec précaution pour toute étude immunocytochimique sur *P. carinii*.

B. Introduction.

Dans le chapitre VI, nous avons montré qu'une pression osmotique comprise entre 870 et 1300 mOsm était nécessaire au cours de la fixation et du lavage, pour maintenir et préserver l'intégrité de *P. carinii* lors de son inclusion en résine hydrophobe (Epon), (Palluault, 1992a).

Un nombre limité d'études ultrastructurales rapportant l'utilisation de lectines (Yoshikawa et coll., 1988; Pesanti et Shanley, 1988; Palluault et coll., 1990), ou d'immunoglobulines (Ig) (Blumenfeld et coll., 1990), a été réalisé sur *P. carinii* inclus en résine hydrophile. Ces études démontrent la présence de polysaccharides dans la paroi parasitaire, reconnus par la Con A-Au (Yoshikawa et coll., 1988; Pesanti et Shanley, 1988; Palluault et coll., 1990), ou des lectines biotinylées (Con A et MPA) révélées par la streptavidine-Au (Yoshikawa et coll., 1988). La présence d'immunoglobulines G complexées à la paroi parasitaire a été établie en utilisant des anti-IgG couplées à des

particules d'or (Blumenfeld et coll., 1990), et la localisation d'épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux produits contre *P. carinii* de rats a été réalisée avec des anticorps anti-Ig de souris biotinylés, révélés par de streptavidine-Au (Yoshikawa et coll., 1991).

Aucune des préparations parasitaires actuellement utilisées pour la détection de sites réactifs vis-à-vis de lectines ou d'anticorps anti-*P. carinii* ne permettent une détection fine des structures cytoplasmiques marquées par ces sondes. En effet, la plupart des organites et des autres composants cytoplasmiques sont détruits ou extraits à l'issue des techniques de fixation et d'inclusion, classiquement utilisée pour des études cytochimiques ou immunologiques (Voir Chap. II, Fig. II.4).

Dans ce chapitre, en utilisant des fixateurs variés, nous proposons une méthode pour inclure *P. carinii* en LRW, méthode qui maintient les structures parasitaires intactes. Une détection sur coupe ("postembedding") de sites réactifs vis-à-vis de la Con A, la SBA, et l'UEA I, d'affinité respective pour les CH₃- α -D-Mannoses, α - et β -N Ac- Galactoses, α -L-Fucoses et α -L-Fucose (1-2)D-G-Galactose- β -(1-4) NAc- D-Glucose (1-6)R (Yohikawa et coll., 1988), a été réalisée, afin de déterminer les effets de la technique sur la réactivité des composants parasitaires, et pour définir le ou les organites impliqués dans le développement de la paroi. Un contrôle de l'antigénicité des structures parasitaires après inclusion dans nos conditions expérimentales a été réalisé en utilisant un sérum polyclonal. La streptavidine est connue pour avoir une forte affinité pour la biotine (Weber et coll., 1989). Fréquemment utilisée comme amplificateur dans le système avidine-biotine en cytochimie optique et ultrastructurale, la streptavidine possède une séquence RYD (Arginine-Tyrosine-Aspartate) qui mime le récepteur RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) de la fibronectine (Alon et coll., 1990). Elle a été testée sur nos préparations.

C. Matériels et méthodes.

1. Modèles biologiques.

Les modèles lapin et souris SCID sont les mêmes que ceux décrits dans le chapitre

2. Préparation des échantillons pour la MET.

a. Fixateurs et inclusion sous forte pression osmotique.

Les échantillons pulmonaires parasités (1 mm^3) sont fixés par immersion dans des solutions de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5) contenant les fixateurs suivants:

- paraformaldéhyde 2%, glutaraldéhyde 0,1%, de tonicité ajustée à environ 870 mOsm par:
 - NaCl (0,188 M), ou
 - saccharose (0,273 M),

- formaldéhyde 1%, glutaraldéhyde 0,05%, de tonicité ajustée à environ 870 mOsm par:
 - NaCl (0,3 M), ou
 - saccharose (0,44 M),

- glutaraldéhyde 1%, de tonicité ajustée à environ 870 mOsm par :
 - NaCl (0,188 M) ou
 - saccharose (0,273 M).

Les échantillons sont ensuite lavés plusieurs fois à température ambiante, puis toute la nuit à 4°C en tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5) de tonicité ajustée à 870 mOsm par addition de NaCl (0,412 M), ou de saccharose (0,6 M).

La déshydratation s'effectue en:

- Ethanol 30%, 10 min à 4°C .
- Ethanol 50%, 10 min à -20°C .
- Ethanol 70%, 10 min à -20°C .

Certains échantillons sont déshydratés en alcool de tonicité ajustée à 870 mOsm par addition de NaCl (0,54 M).

Les échantillons sont ensuite immergés 2 x 1 h à -20°C dans un mélange éthanol 95%-LRW (1 vol./2 vol.) avec ou sans NaCl (0,54 M) ou 7,5% de polyvinyl pyrrolidone (PVP, M. WT 40 000, TAAB Lab.). Les échantillons sont ensuite immergés 4 x 1 h à -20°C , puis toute la nuit à 4°C , puis 1 h à température ambiante dans du LRW pur. La polymérisation se réalise pendant 20 h à 40°C .

b. Colorations.

Les coupes collectées sur des grilles de nickel à un trou, membrées au Formvar, sont colorées suivant la technique décrite par Roth et coll. (1990), et adaptée dans notre étude pour les tissus inclus en LRW. Brièvement, les grilles sont déposées de 1 min 30 sec à 5 min à température ambiante et en chambre noire, dans une solution contenant de l'acétate d'uranyle (1,8%) et de la méthyl-cellulose (0,2%). Le pH de la solution mère d'acétate d'uranyle à 4% est ajusté à 6,5 par addition de NaOH 0,1N, juste avant la dilution avec la méthyl-cellulose. Ce mélange est utilisé immédiatement.

3. Localisation de sites polysaccharidiques.

Pour la détection de sites polysaccharidiques sur *P. carinii*, nous avons utilisé un marquage direct par des lectines couplées à des particules d'or (Con A-Au₂₀, SBA-AU₁₀, UEA I-Au₁₀), de concentration respective d'environ 250, 160, 64 µg/ml obtenues par ultracentrifugation (35 000g, 30 min, sur "Beckman airfuge, air driven ultracentrifuge"). Le tampon phosphate (0,01 M, 0,15 M NaCl, PBS) a été ajusté à pH 7 pour la Con A et la SBA, et à 7,2 pour l'UEA I. 0,5% de lait écrémé Gloria et 0,05% de Tween 20 y ont été ajoutés. Pour la ConA, 0,1 mM de CaCl₂ et 0,1 mM de MnCl₂ ont été ajoutés aux solutions tamponnées.

Les grilles ont été déposées 10 min à 37°C sur les tampons respectifs supplémentés de 2,5% de lait écrémé Gloria avant d'être déposées 2 h à 37°C sur les solutions de lectines marquées. Après plusieurs lavages en PBS et en eau distillée, la coloration est effectuée.

Pour les tests d'inhibition, les lectines Con A-Au₂₀, SBA-AU₁₀, UEA I-Au₁₀ ont été respectivement préincubées 2 h à 37°C dans une solution contenant les sucres compétiteurs (300 µg/ml de α-D-mannopyranoside, NAc-D-galactosamine, α-L-fucose).

4. Localisation de sites reconnus par la streptavidine.

Avant l'incubation sur la streptavidine-Au₁₀ (Janssen Life Sciences Products, Belgique), les grilles sont préincubées 10 min sur du PBS (0,01 M, 0,15 M NaCl) supplémenté de 4% d'albumine. Après plusieurs lavages en PBS et eau distillée, les grilles sont colorées.

Pour les contrôles, les grilles sont préincubées 2 h à 37°C dans une solution de streptavidine non marquée, ou dans une solution contenant le peptide RGD (20 mg/ml, amicalement délivré par le Dr. M. Ouaiissi, Institut Pasteur de Lille, France), puis incubées dans la streptavidine-Au₁₀.

5. Immunolocalisation.

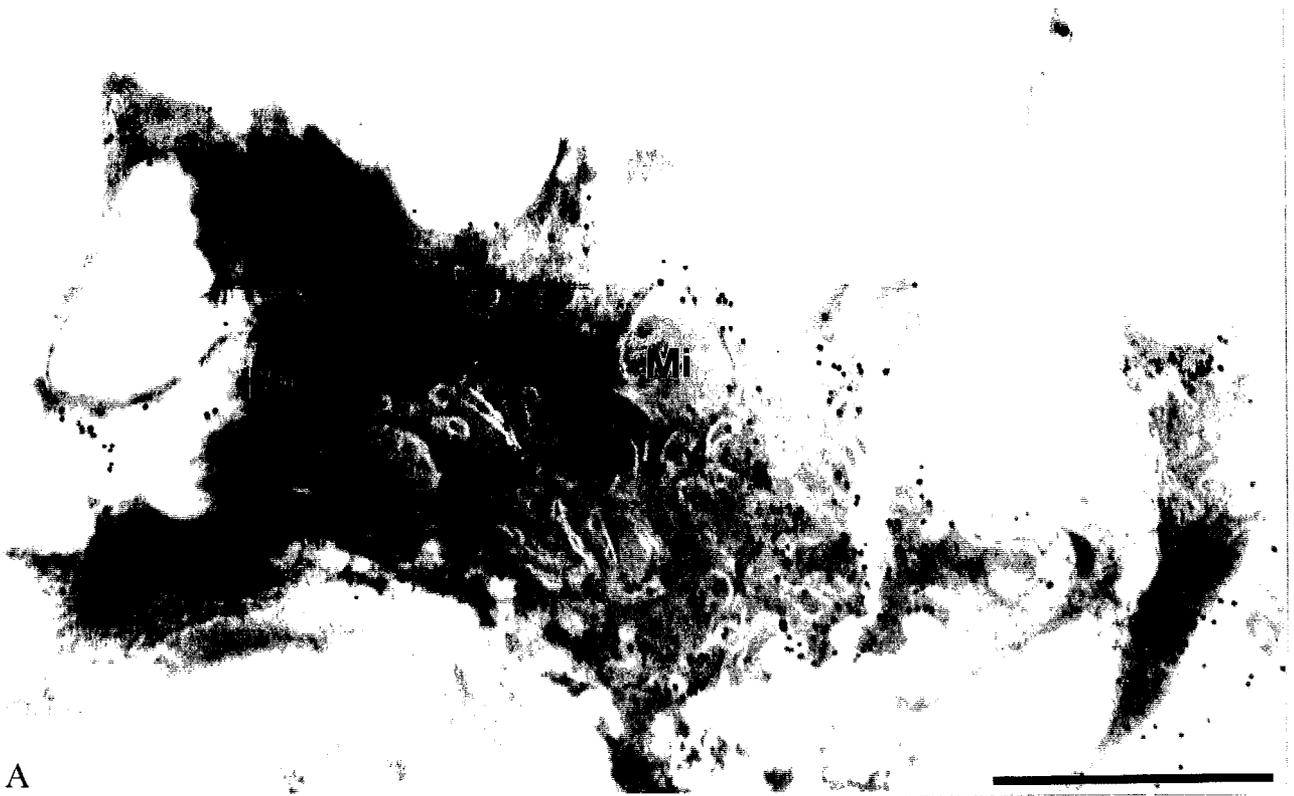
Le sérum d'un patient ne développant pas de PPC ni de SIDA, mais réagissant en immunofluorescence vis-à-vis de *P. carinii*, a été utilisé. Les coupes de poumon de souris SCID parasitées sont déposées 30 min à température ambiante sur une solution de PBS-Tween-Lait (0,01 M, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20, 2,5% lait écrémé Gloria), puis transférées 1 h à 37°C sur une solution de PBS saturée de protéine A (500 µg/ml), lavées en PBS-Tween à température ambiante, déposées sur le sérum humain (1/800 en PBS-Tween), lavées de nouveau comme ci-dessus, puis transférées sur une solution de PBS-Tween contenant de la protéine A-Au₈ pendant 30 min à 37°C.

Quelques grilles n'ont pas été saturées en protéine A et ont été déposées sur le sérum humain, lavées, puis déposées sur une solution (1/50 en PBS-Tween) contenant des anticorps de chèvre anti-IgG humaine marqués à l'or (GA-IgG H-Au₁₀, Janssen).

Pour les échantillons de contrôles, les grilles préincubées en protéine A sont déposées sur de la protéine A-Au₈, ou sont directement déposées sur la solution GA-IgG H-Au₁₀, pendant 30

Figure VII.1.

Marquage à la streptavidine-Au₁₀ sur coupe de poumons de souris parasitées par *P. carinii*, fixés avec 1% de paraformaldéhyde et 0,05% de glutaraldéhyde, pour une tonicité de 870 mOsm.



A



B

min à 37°C.

D. Résultats.

Inclusion en LRW: la meilleure inclusion obtenue pour *P. carinii* provenant de lapin et de souris est celle où la pression osmotique de 870 mOsm a été maintenue depuis la fixation jusqu'au mélange éthanol/LRW. Les divers fixateurs utilisés et l'ajustement de la tonicité par un électrolyte ou un non-électrolyte apportent des résultats ultrastructuraux globalement identiques. Lorsque la tonicité n'est pas maintenue dans les différents alcools ou dans le mélange éthanol/LRW, la plupart des trophozoïtes présentent des zones de lyse osmotique ou des extractions cytoplasmiques totales.

Marquage à la streptavidine-Au₁₀, (Figure VII.1): de nombreuses particules d'or sont observées sur les cellules pulmonaires, et plus particulièrement sur les pneumocytes de type II (Fig. 1A), et sur les parasites (Fig. 1B), incubés avec de la streptavidine-Au₂₀. Dans les trophozoïtes (Fig. 1B), ce marquage se retrouve sur le noyau, dans le réticulum endoplasmique, dans le cytosol, et à un plus faible taux sur la paroi. Ce marquage est encore observé lorsque les grilles sont préincubées avec le peptide RGD. Lorsque les grilles sont saturées avec de la streptavidine non marquée, aucun marquage spécifique n'est détecté.

Détection de sites polysaccharidiques, (Figure VII.2): un marquage direct avec des lectines marquées à l'or a été réalisé. La Con A adhère aux prolongements tubulaires pariétaux et aux composants cytoplasmiques (Fig. 2A). Ce marquage est observé sur l'appareil de Golgi et sur quelques vésicules golgiennes (Fig. 2B et C). Le marquage à la SBA-Au₁₀ est moins intense et est localisé dans et à côté des SE₁ (Fig. 2D). Le marquage à l'UEA I-Au₁₀ est essentiellement présent sur les prolongements tubulaires (Fig. 2D), et plus rarement dans le cytoplasme.

Immunoréactivité, (Figure VII.3): l'immunoréactivité de *P. carinii* provenant de

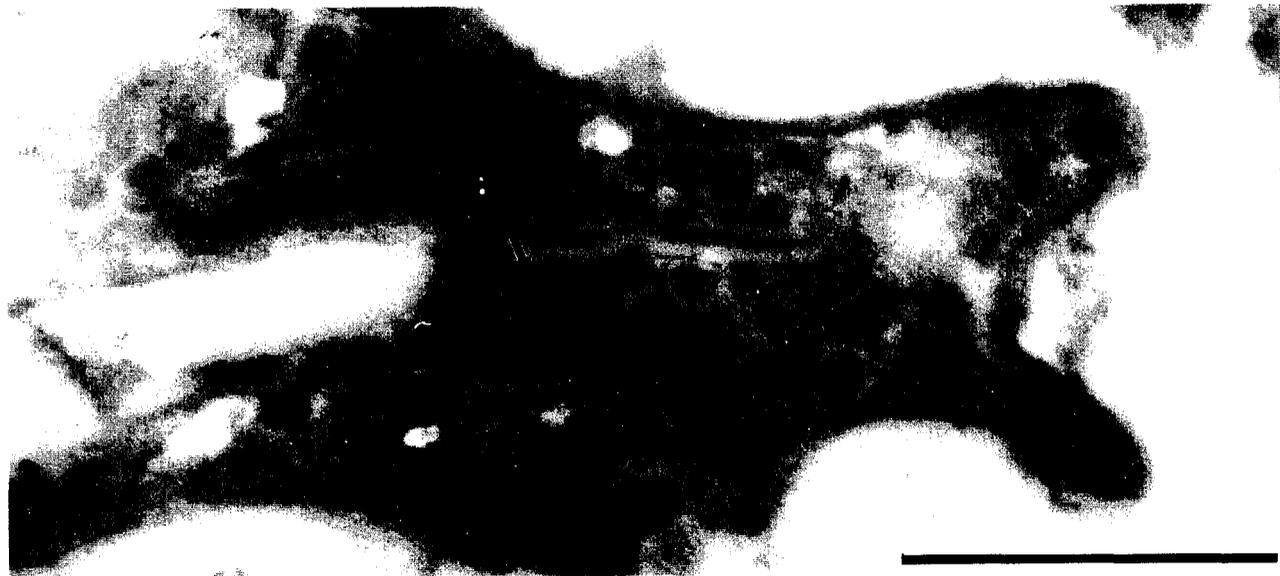
← **Figure VII.1** Marquage à la streptavidine-Au₁₀ sur coupe de poumons de souris parasitées par *P. carinii*, fixés avec 1% de paraformaldéhyde et 0,05% de glutaraldéhyde, pour une tonicité de 870 mOsm. A. Pneumocyte de type II. B. Trophozoïte présentant un marquage cytosolique important (►). Ce marquage est aussi présent dans la paroi (→). Mitochondrie (Mi), noyau (N). Trait = 0,5 µm.

Figure VII.2.

Marquage à la Con A-Au₂₀ sur coupe de poumons de souris parasitées par *P. carinii*, fixés avec 1% de paraformaldéhyde et 0,05% de glutaraldéhyde, pour une tonicité de 870 mOsm.



A



C

souris SCID face aux anticorps anti-*Pneumocystis*, présents dans du sérum humains, est préservée dans nos conditions de fixation et d'inclusion. Il est possible de détecter ces derniers non seulement avec la protéine A-Au₈ (Fig. 3A), mais aussi avec la solution de GA-IgGH-Au₁₀ (Fig. 3B). Ce marquage est amplement observable sur la paroi et sur le cytosol.

E. Discussion.

Dans le chapitre VI, nous avons montré qu'une forte pression osmotique était nécessaire dans les solutions de fixation et de lavage pour maintenir et préserver lors des inclusions en Epon les structures cytoplasmiques de *P. carinii* (Palluault, 1992a). Les méthodes utilisées antérieurement pour l'inclusion du parasite en résine hydrophile LRW, résine de choix pour les études immunocytochimiques, passent par l'omission de la postfixation au tétroxyde d'osmium pour assurer une bonne réactivité des composants cellulaires. Ces méthodes aboutissent à des extractions cytosoliques et à la destruction totale de certains organites qui engendrent une impossibilité totale d'effectuer des études fines sur les constituants parasitaires. Néanmoins, cette méthode a permis d'obtenir de bons marquages de paroi parasitaire avec la Con A-Au (Yoshikawa et coll., 1988; Palluault et coll., 1990). Afin de minimiser ces extractions cellulaires, nous avons maintenu une pression osmotique de 870 mOsm depuis la fixation jusqu'à la préinclusion en éthanol/LRW. Les organites cytoplasmiques et le cytosol sont alors facilement observables. L'utilisation d'électrolytes ou de non-électrolytes peut être envisagée pour maintenir l'osmolarité désirée. Des fixateurs variés peuvent être choisis et employés en fonction de la sensibilité désirée pour les études que l'on veut réaliser.

Notre étude cytochimique avec la Con A (Figure VII.2) révèle que la sensibilité des

← Figure VII.2. Marquage à la Con A-Au₂₀ sur coupe de poumons de souris parasitées par *P. carinii*, fixés avec 1% de paraformaldéhyde et 0,05% de glutaraldéhyde, pour une tonicité de 870 mOsm. A. Trophozoïte présentant un marquage important des prolongements tubulaires et du système endomembranaire (→). B. Le marquage est observé dans l'appareil de Golgi (→) et sur les vésicules golgiennes (⇔). C. Petit trophozoïte présentant un marquage sur l'appareil de Golgi (→) et à côté de la paroi (⇔). Noyau (N). Trait = 0,5 μm.

Figure VII.2 (suite).

Marquage à la SBA-Au₁₀ et à l'UEA I-Au₁₀ sur coupe de poumons de souris parasitées par *P. carinii*, fixés avec 1% de paraformaldéhyde et 0,05% de glutaraldéhyde, pour une tonicité de 870 mOsm.



sites polysaccharidiques est maintenue dans des organites bien préservés et dans la paroi.

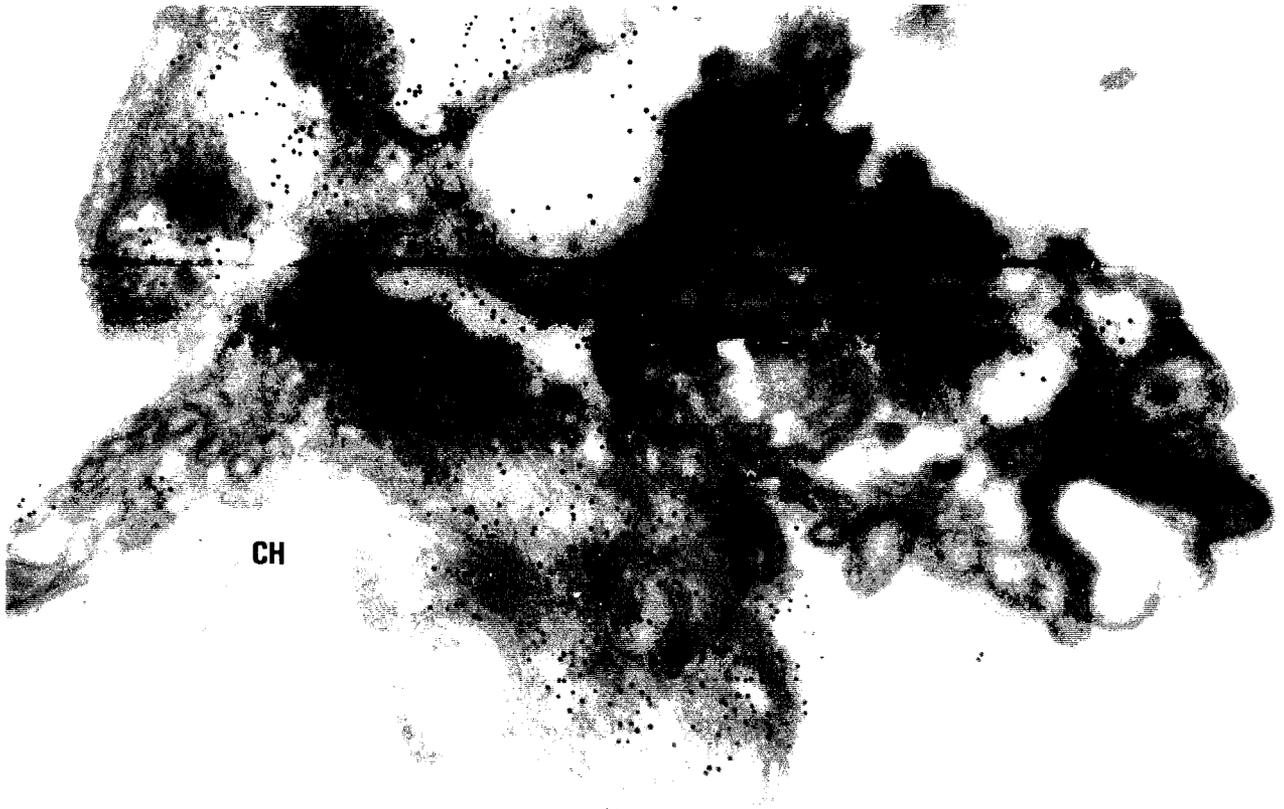
Toutefois, une fixation de 3 h amène à une diminution sensible de la réactivité de la paroi, par comparaison aux résultats obtenus antérieurement (Yoshikawa et coll., 1988, Palluault et coll., 1990; voir Chap. II, Fig. II.4). Il n'en reste pas moins qu'un marquage dense est observé sur l'appareil de Golgi et sur quelques vésicules golgiennes récemment observées en contact étroit avec la paroi *via* une sorte de petit canal (Palluault, 1992a). Le pourcentage de vésicules marquées est relativement bas, et est en accord avec les données biochimiques annoncées dans un récent article de synthèse rapportant que la paroi kystique de *P. carinii* serait composée de 8% de polysaccharides, et de 50% de lipides (Walzer, 1991). La SBA et l'UEA I (Figure VII.2, suite), jamais utilisées auparavant au niveau ultrastructural, réagissent sur des organites cytoplasmiques, suggérant que des polysaccharides spécifiques (respectivement α - et β -NAc-galactoses, α -L-fucoses; α -L-fucose (1-2)D-G-galactose- β -(1-4) NAc-D-glucose (1-6)R) sont présents dans le parasite et peuvent potentiellement participer à son métabolisme. Ce marquage, retrouvé sur la paroi parasitaire, est en accord avec les résultats des détections en microscopie optique antérieurement rapportés (Cushion et coll., 1988).

Le marquage avec la streptavidine-Au révèle de nombreux sites réactifs dans le parasite (cytosol, noyau, et réticulum endoplasmique). Le marquage cytosolique peut être lié à la présence de biotine endogène naturellement couplée à une enzyme: l'acétyl Coenzyme A carboxylase. Cette enzyme couplée à la biotine est impliquée dans la synthèse cytosolique des acides gras (Stryer, 1981), particulièrement active dans les pneumocytes de type II qui sont à l'origine de la synthèse du surfactant. De plus, ce marquage parasitaire est en accord avec les résultats publiés de l'analyse biochimique des acides gras de *P. carinii* (Kaneshiro et coll., 1989). Une contradiction apparaît toutefois avec les interprétations de ces auteurs qui concluent qu'il semble peu probable que *P. carinii*

← **Figure VII.2 (suite).** D. Marquage à la SBA-Au₁₀ sur coupe de poumons de souris parasitées par *P. carinii*, fixés avec 1% de paraformaldéhyde et 0,05% de glutaraldéhyde, tonicité de 870 mOsm. Le marquage est moins intense que pour la Con A et est localisé dans et autour du SE₁. E. Marquage à l'UEA I-Au₁₀. Le marquage est localisé sur les prolongements tubulaires, et plus rarement dans le cytoplasme. Trait = 0,5 μ m.

Figure VII.3.

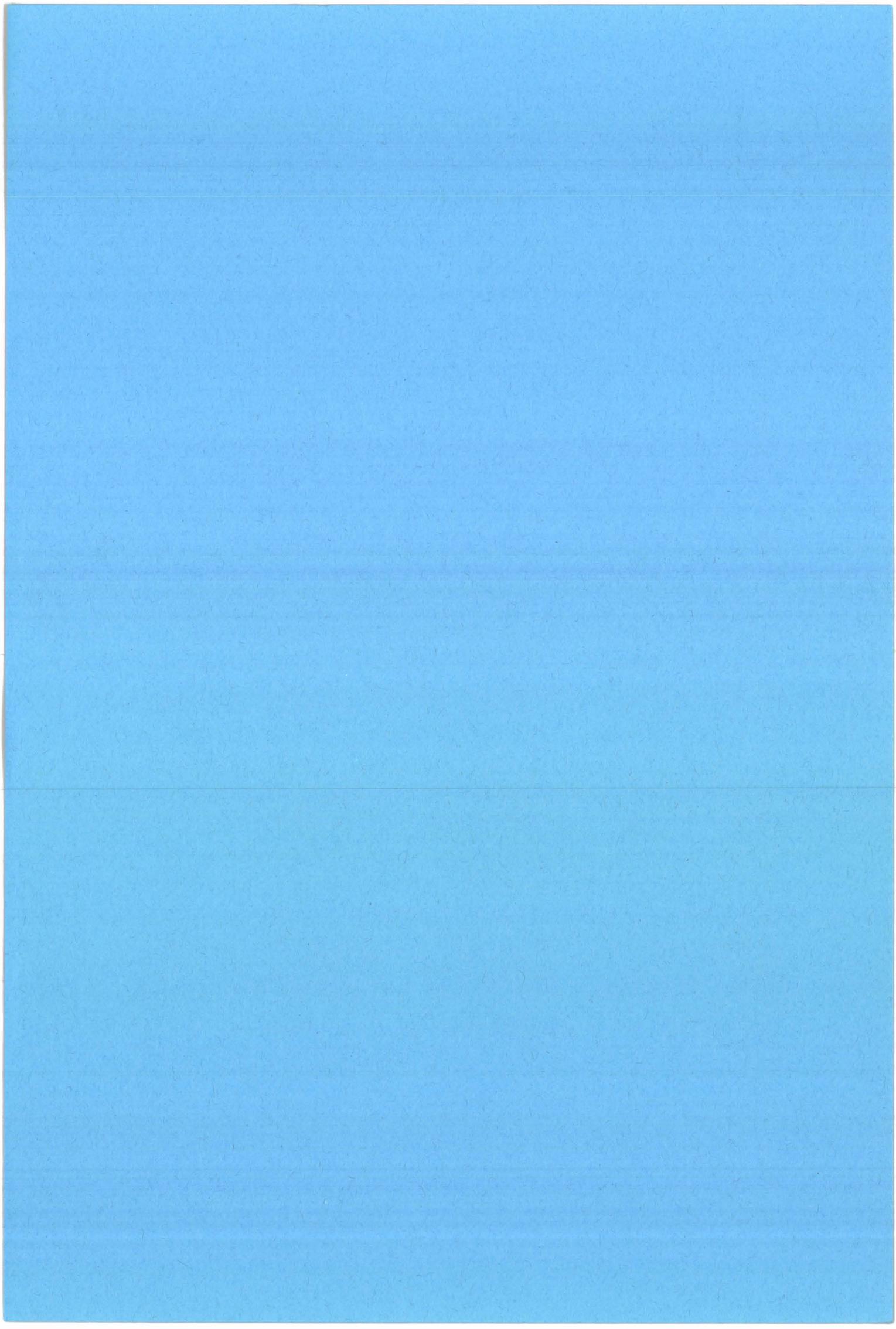
Localisation d'immunoglobulines humaines sur coupe de poumons de souris SCID parasitées par *P. carinii*, fixés avec 1% de paraformaldéhyde et 0,05% de glutaraldéhyde, pour une tonicité de 870 mOsm.

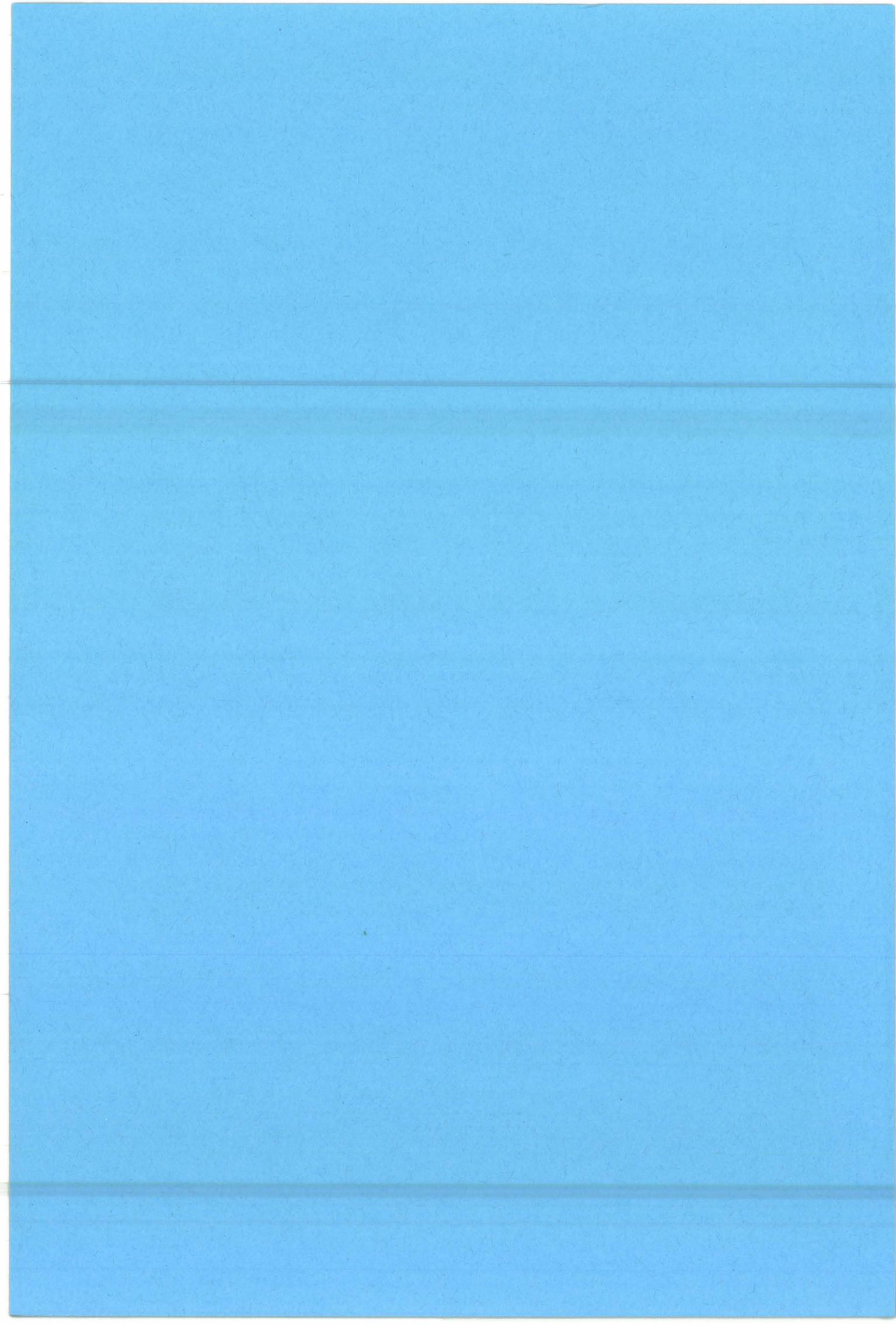


possède les capacités à synthétiser *de novo*, à allonger et à désaturer les chaînes d'acides gras. Néanmoins, si la biotine est présente dans le parasite, elle peut soit rester inactive, ou soit, comme le conclue plus prudemment P. Walzer (1991), "*P. carinii* pourrait synthétiser *de novo* un petit taux de ses propres lipides métaboliques pour ses propres besoins". Toutes ces observations additionnées à la présence de la seconde membrane pariétale (DeStephano et coll., 1990a; Palluault 1992a), suggèrent très fortement que les lipides jouent un rôle important dans la biologie de *P. carinii*.

Enfin, l'immunoréactivité des structures parasitaires face aux anticorps semble correctement maintenue dans nos conditions expérimentales (Figure VII.3), ce qui ouvre le chemin à des études immunologiques poussées. Une mise en garde est posée sur l'utilisation de la streptavidine dans le système avidine-biotine dans le cadre d'études immunocytochimiques.

Figure VII.3. Localisation d'immunoglobulines humaines sur coupe de poumons de souris SCID parasitées par *P. carinii*, fixés avec 1% de paraformaldéhyde et 0,05% de glutaraldéhyde, pour une tonicité de 870 mOsm. Les immunoglobulines sont détectées soit par la protéine A-Au8 (A), ou par des anticorps de chèvres anti-IgG humaines marquées à l'or (B). Cellule hôte (CH). Trait = 0,5 µm.





VIII. SYNTHÈSE et DISCUSSION.

Notre étude s'est essentiellement portée sur *P. carinii* provenant du lapin, modèle développant une pneumocystose spontanée au sevrage, sans administration de corticoïdes, pour se préserver, lors des analyses morphologiques ultrastructurales, des effets induits par une immunodépression artificielle sur le parasite et l'environnement pulmonaire (Soulez et coll., 1989).

La culture du parasite n'étant pas à ce jour mise au point, les manipulations ont été réalisées à partir d'échantillons prélevés *in vivo* afin d'éviter les artéfacts induits par l'extraction (dégradation des parasites), et d'avoir un aperçu des relations entre le pneumocyte de type I et les trophozoïtes.

Dans ce contexte, nous avons décrit l'ultrastructure de *P. carinii* de lapin, et proposons un cycle hypothétique (voir Figure VIII.1) dont l'intérêt est de se rapprocher de celui décrit pour *P. carinii* du poumon humain (Campbell, 1972).

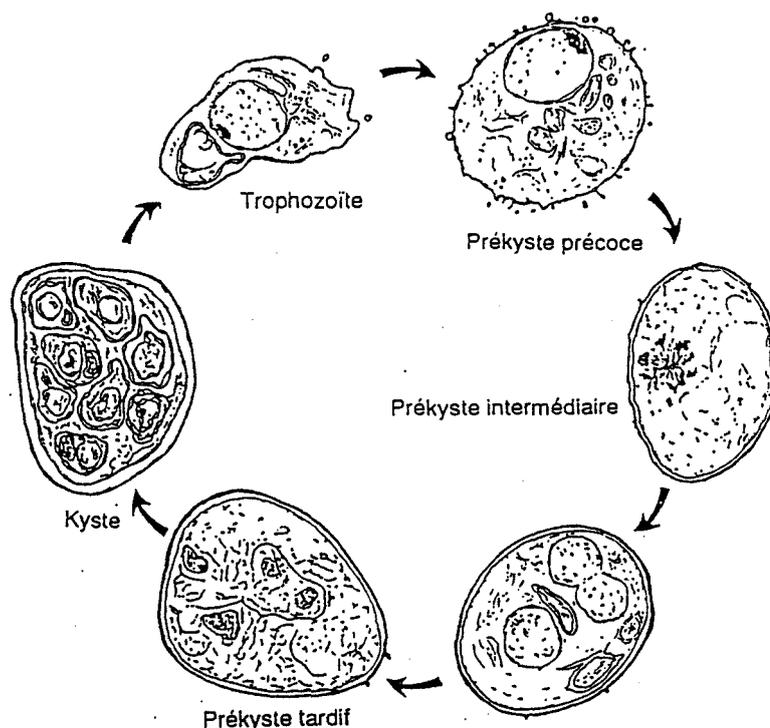


Figure VIII.1.

Cycle de *P. carinii* du lapin. Les flèches indiquent la succession hypothétique des différents stades observés (extrait et modifié de Palluault et coll., 1990a).

Au cours de nos nombreuses observations sur le modèle lapin ainsi que sur le modèle souris, il n'a jamais été possible de noter la présence de trophozoïtes à multiplication endogène, qui ne sont à ce jour observés que dans les poumons de rats. Ceci reste à éclaircir.

Nos études ultrastructurales et cytochimiques et la reconstitution tridimensionnelle nous ont permis d'établir que *P. carinii* présente une organisation cellulaire complexe, mais assimilable sans difficulté à celle d'une cellule eucaryote (voir Figure VIII.2).

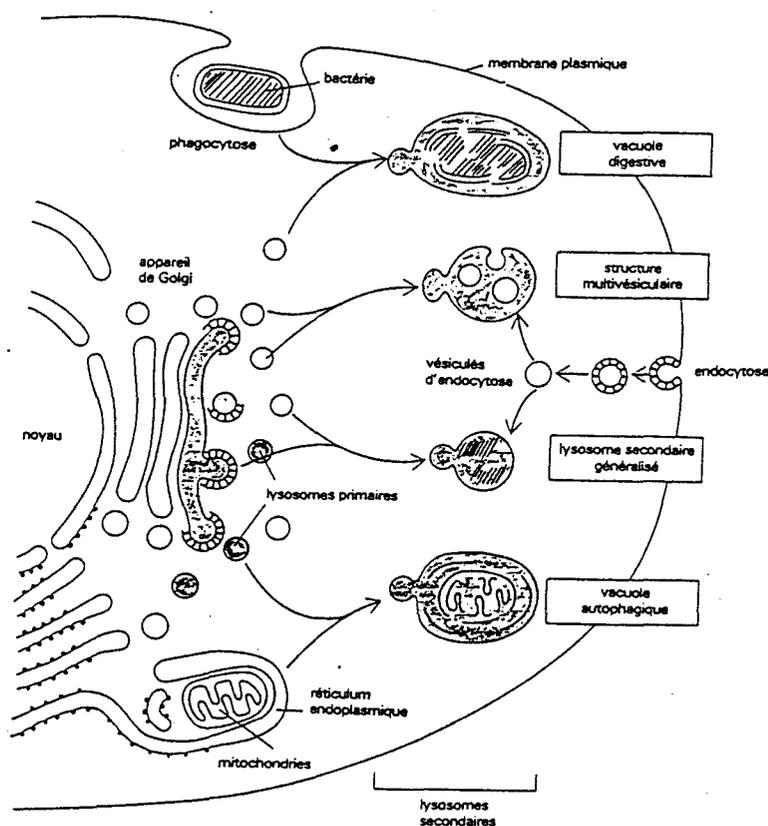


Figure VIII.2.

Organisation du système endomembranaire et formation des lysosomes primaires et secondaires d'une cellule eucaryote (extrait de Alberts et coll. *Biologie moléculaire de la cellule*, Flammarion Médecine Sciences Ed. 1986, France, page 369).

Nous avons mis en évidence la présence d'un appareil de Golgi d'où bourgeonnent des vésicules contenant des sites polysaccharidiques reconnus par la Con A. Ces vésicules, retrouvées dans tous les stades, et présentant des activités dites golgiennes, sont peu nombreuses dans les trophozoïtes de petite taille, et se retrouvent en quantité très

importante (> 230) dans les trophozoïtes de grande taille et les prékystes. Ces vésicules établissent un contact étroit avec la paroi *via* des petits canaux. Cette paroi possède des sites polysaccharidiques peu nombreux reconnus par la Con A. Ces observations suggèrent que ces vésicules sont impliquées dans le processus de transport des composés glycosylés vers la paroi, pour en assurer sa synthèse. Cet argument est conforté par le fait que l'augmentation du nombre de ces vésicules est antérieure au développement de la paroi prékystique et kystique.

Des lysosomes secondaires ou vacuoles autophagiques (SE₁) ont été mis en évidence. Ils semblent participer de manière permanente au renouvellement et à la maintenance des structures cellulaires au cours du développement rapide des trophozoïtes.

De nombreuses vacuoles aux contours membranaires bien définis et présentant un contenu dense peuvent être observées. Un second type de vacuole, dont le contenu semble avoir été extrait lors des déshydratations pour l'inclusion en Epon, laisse présager d'un métabolisme parasitaire lipidique intense. Ceci est conforté par plusieurs arguments. En effet, la paroi kystique serait composée de 50% (du poids sec) de lipides, et ces lipides pourraient être synthétisés *de novo* à un faible taux par le parasite ou être puisés dans le surfactant alvéolaire (Walzer, 1991, résultats annoncés). La présence d'un marquage très important du parasite par la streptavidine, comparable à celui obtenu sur les pneumocytes de type II, véritables usines à synthèse de surfactant, nous amène à penser que *P. carinii* posséderait une quantité importante de biotine cytosolique endogène qui serait impliquée, avec l'acétyl Coenzyme A carboxylase, dans la synthèse des acides gras. La présence d'une seconde membrane, observée dans nos conditions expérimentales dans la paroi de tous les stades parasitaires, est encore en faveur d'un contenu lipidique pariétal important. Le faible nombre de vésicules golgiennes marquées par la Con A nous indique que le transport de composés polysaccharidiques ne joue pas un rôle quantitativement important dans la synthèse de la paroi. Enfin, des données récemment acquises sur des parasites inclus sous forte pression osmotique (non présentées dans ce manuscrit de thèse) nous ont révélé la présence de corps multi-vésiculaires clairs et de corps multivésiculaires sombres dans le

Trophozoïte de grande taille

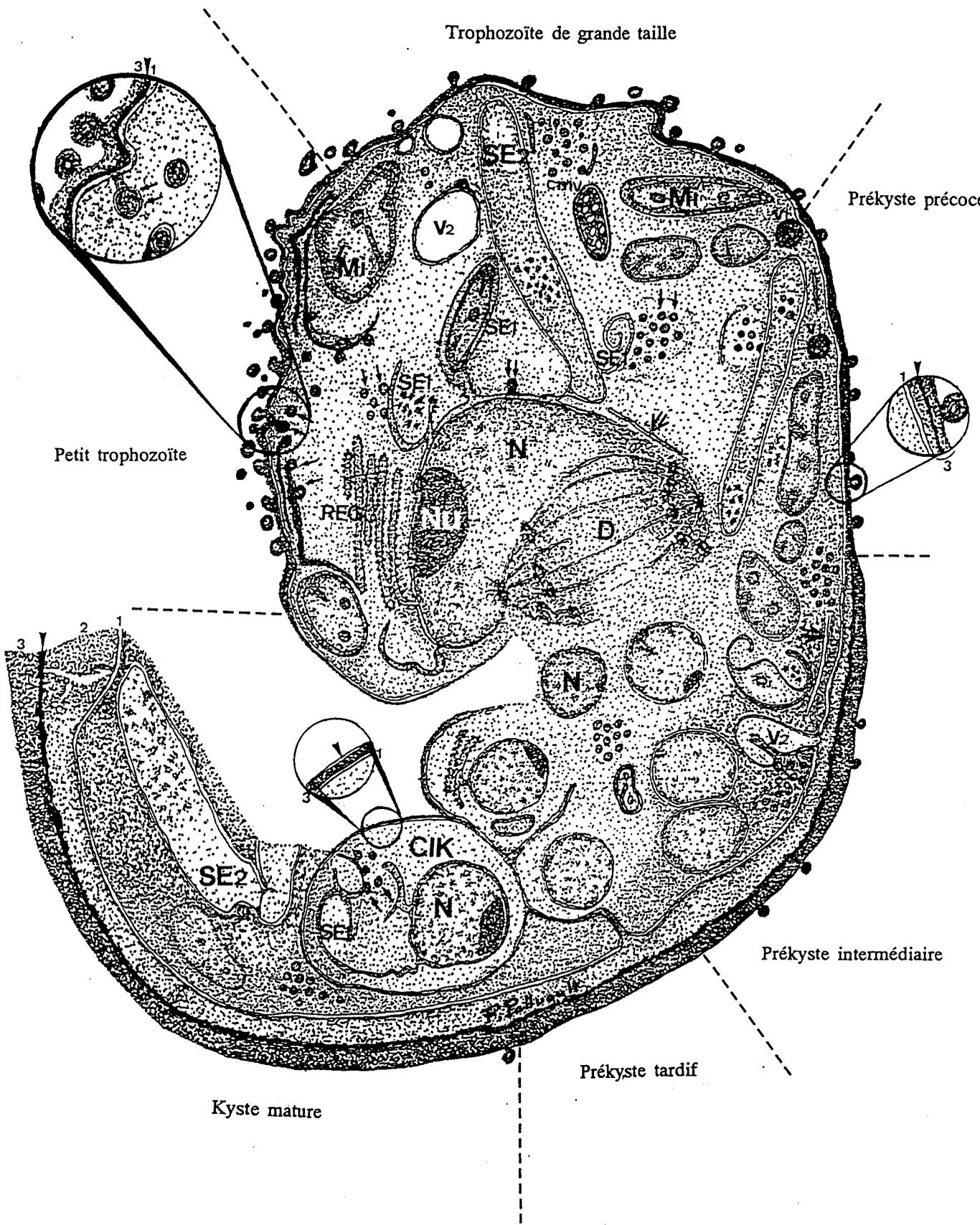
Prékyste précoce

Petit trophozoïte

Prékyste intermédiaire

Prékyste tardif

Kyste mature



cytoplasme parasitaire. De telles structures sont aussi retrouvées dans les pneumocytes de type II, où ils assurent la synthèse et le renouvellement du contenu des corps lamellaires à l'origine de la synthèse du surfactant. L'étude du rôle de ces corps multi-vésiculaires est en cours.

La présence d'une seule mitochondrie à crêtes tubulaires est une observation nouvelle dont il faudra tenir compte dans l'analyse comparative des données morphologiques au cours des discussions sur la position taxonomique.

La présence d'un SE₂ dans les trophozoïtes de grande taille et dans les formes prékystiques et kystiques reste énigmatique. Ces structures membranaires liées à l'enveloppe nucléaire jusqu'à la première division nucléaire pourraient avoir un rôle dans la répartition des noyaux au sein de la cellule lors des divisions nucléaires. Cette fonction reste à argumenter.

L'ensemble de ces données nouvelles est résumé dans la Figure VIII.3.

Une forte tonicité des milieux de fixation et de lavage est nécessaire pour préserver et maintenir l'intégrité cellulaire du parasite. Cette forte tonicité permet au fixateur de diffuser et de se complexer aux structures parasitaires sans engendrer de lyse osmotique. La fixation correcte du parasite (sans phénomène de lyse, ni extraction) passe par l'isotonicité entre le milieu de fixation et le milieu dans lequel vit le parasite (milieu alvéolaire). Le milieu alvéolaire semble donc être un milieu à forte tonicité. La relevance biologique de ce phénomène nous amène à supposer un rôle *in vivo* très important de la paroi pour protéger et assurer les échanges métaboliques entre le parasite et son environnement hyperosmotique. La présence de la seconde membrane, si elle est encore fonctionnelle, va dans ce sens. De plus, la production locale d'H₂O₂ sur la paroi, observée à l'échelle ultrastructurale par un marquage important au DAB, traduirait une activité

← **Figure VIII.3.** Dessin schématique de l'évolution hypothétique des structures endomembranaires et de la paroi de *P. carinii*. Couche externe dense aux électrons (3); couche intermédiaire peu dense (2); membrane plasmique (1); seconde membrane (▼); saccules endoplasmiques de type 1 et 2 (SE₁, SE₂); réticulum endoplasmique granulaire (REG); vésicules golgiennes (⇔), noyau et nucléole (N, Nu), division nucléaire (D); microtubules (⊥), mitochondrie (Mi); vacuoles à contenu dense ou clair (v₁ et v₂); corps intrakystiques (CIK); corps multi-vésiculaires (cmv) (extrait et actualisé de Palluault et coll., 1991a).

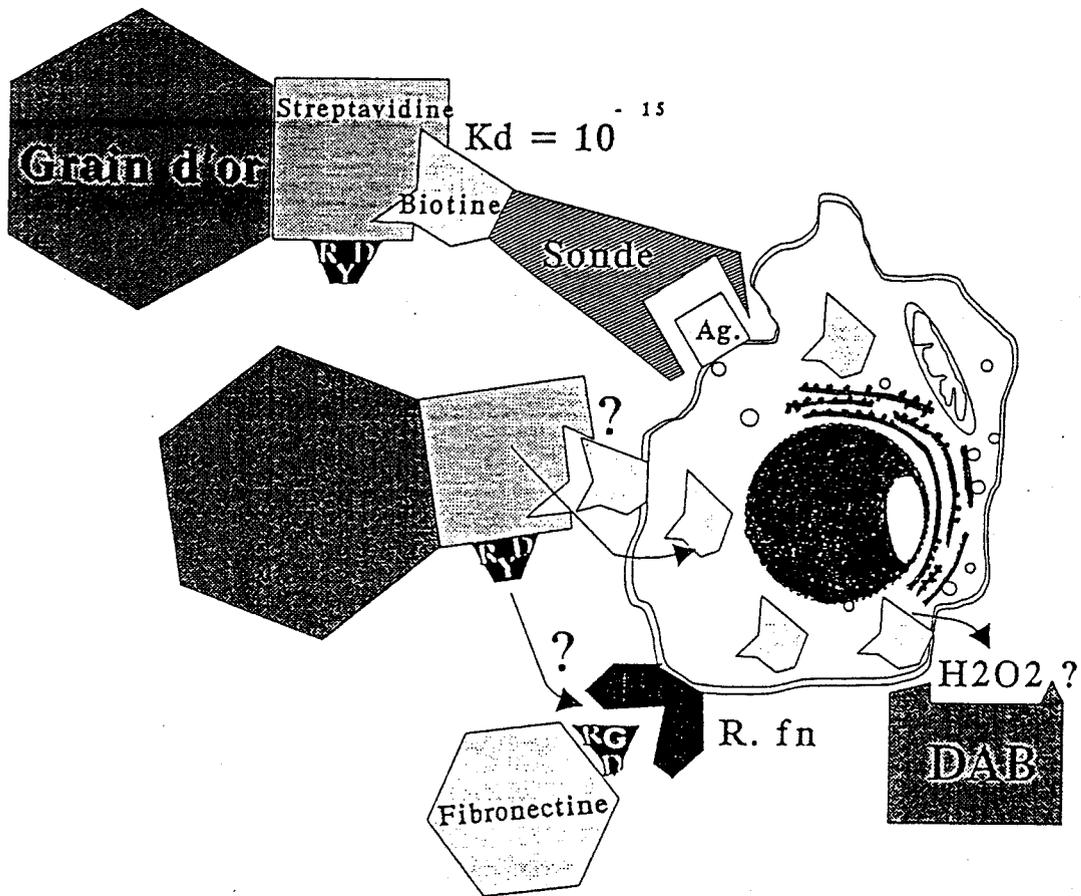


Figure VIII. 4.

Dessin schématique montrant les relations potentielles entre *P. carinii*, la streptavidine (Voir Chap. VII) et le DAB (voir Chap V).

oxydase nécessaire à l'élimination des produits radicalaires alvéolaires et à la survie du parasite dans cet environnement.

La forte tonicité, utilisée pour fixer correctement le parasite, pourrait aussi indiquer que l'emploi de milieux hypertoniques faciliterait l'obtention d'extraits parasitaires purs et viables, et être utile pour la mise au point de milieux de culture (travaux en cours).

Les réactifs biotinylés révélés par un conjugué à la streptavidine, ou les réactifs couplés à la peroxydase et révélés par le DAB, sont à employer avec une extrême prudence sur *P. carinii*. En effet, dans un article récent (Alon et coll. 1990), il a été montré que la streptavidine possède une séquence Arginine-Tyrosine-Acide aspartique (RYD) qui mime la séquence Arginine-Glycine-Acide aspartique (RGD, domaine impliqué dans les phénomènes d'adhésion) de la fibronectine. Par ailleurs, il a été établi récemment que *P. carinii* possède des récepteurs reconnaissant la séquence RGD de la fibronectine (Pottratz et Martin, 1990). D'autre part, la streptavidine se fixe de façon naturelle sur le parasite. Le complexe avidine-biotine ayant une constante de dissociation de $10^{-15}M$, traduisant une affinité exceptionnelle (Weber et coll., 1989), les résultats issus de l'emploi de réactifs biotinylés révélés par la streptavidine doivent être relativisés dans la mesure où ils pourraient non pas retranscrire la spécificité de l'outil biotinylé mais l'affinité de la streptavidine d'une part pour la biotine endogène parasitaire, et d'autre part pour les récepteurs parasitaires de la fibronectine (voir Figure VIII.4).

Ces observations nous amènent à envisager l'étude des mécanismes fins nécessaires au parasite pour s'attacher aux pneumocytes de type I, ainsi qu'à essayer de définir les relations métaboliques existant entre le milieu pulmonaire, la paroi et le système endomembranaire décrit dans cette thèse. Cette étude des relations et/ou des échanges entre l'environnement pulmonaire et le parasite à travers le développement de la paroi parasitaire devrait nous permettre d'une part de mieux comprendre les mécanismes cruciaux du cycle parasitaire, et d'autre part d'entrevoir les possibilités de blocage de ces mécanismes dans

le développement du parasite. Certaines substances de synthèse efficaces contre *Plasmodium falciparum in vitro* (Dr. Vial, Montpellier), bloquant les transporteurs de choline, pourraient avoir un effet *in vivo* sur *P. carinii* qui, d'après nos observations, semble être doté d'un métabolisme lipidique intense.

Enfin des études préliminaires sur l'attachement *in vitro* de *P. carinii* semblent indiquer qu'il existe une spécificité hôte-dépendant. Le parasite s'attacherait mieux à des cellules dérivées de l'hôte dont il a été extrait (Aliouat et coll., en préparation). Notre travail s'oriente sur la définition de cette spécificité au niveau pariétal par l'étude:

- i/ de l'influence de l'environnement dans la synthèse et le développement de la paroi,
- ii/ de l'influence et/ou de l'intervention d'anticorps présents à la surface du parasite et des épitopes spécifiques sur les deux cellules,
- iii/ de l'adaptation hôte-spécifique, active ou non, au niveau pariétal pour que le parasite puisse s'attacher à une cellule hôte hétérologue.

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- Abraham J.** 1975. A scanning electron microscopic study of *Pneumocystis carinii* pneumonia using backscattered electrons and silver stains. *Fed. Proc.* **34**: 847.
- Alon R., Bayer E., Wilcheck M.** 1990. Streptavidin contains an RYD sequence which mimics the RGD receptor domain of fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **170**: 1236–1241.
- Barka T., Anderson P.** 1962. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* **10**: 741–753.
- Barton E., Campbell W.** 1967. Further observations on the ultrastructure of *Pneumocystis*. *Arch. Pathol.* **83**: 527–534.
- Barton E., Campbell W.** 1969. *Pneumocystis carinii* in lungs of rats treated with cortisone acetate. *Am. J. Pathol.* **54**: 209–236.
- Benchimol M., De Souza W.** 1985. *Tritrichomonas foetus*: cytochemical visualization of the endoplasmic reticulum–Golgi complex and lipids. *Exp. Parasitol.* **59**: 51–58.
- Berggren P., Curstedt T., Grossman G., Nilsson R., Robertson B.** 1985. Physiological activity of pulmonary surfactant with low protein content: effect of enrichment with synthetic phospholipids. *Exp. Lung. Res.* **8**: 29–51.
- Blumenfeld W., Mandrell R., Jarvis G., McLeod Griffiss J.** 1990. Localization of host immunoglobulin G to the surface of *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* **58**: 456–463.
- Bommer W.** 1961. Elektronen mikroskopische Untersuchungen an *Pneumocystis carinii* aus menschlichen Lungen. *Deut. Med. Wschr.* **86**: 1309–1313.
- Bommer W.** 1962. *Pneumocystis carinii* from human lungs under electron microscope. *Am. J. Dis. Child.* **104**: 657–661.
- Bommer W.** 1964. Die interstitielle plasmacelluläre Pneumonie und *Pneumocystis carinii*. *Ergeb. Microbiol. Immunostatsforsch. Exp. Therapie* **38**: 116–197.
- Brzosko W., Wojewodska I.** 1969. Studies on ultrastructure on *Pneumocystis carinii*. *Exp. Med. Microbiol.* **21**: 221–234.
- Campbell W.** 1972. Ultrastructure of *Pneumocystis carinii* in human lung: life cycle in human pneumocystosis. *Arch. Pathol.* **93**: 312–324.
- Chagas C.** 1909. Nova tripanozomiaza humana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1**: 159–218.
- Csillag A.** 1955. Contribution to the taxonomical classification of the so-called *Pneumocystis carinii*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **1**: 1–8.
- Cushion M.** *In vitro* studies of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **36**: 45–52.
- Cushion M., DeStephano J., Walzer P.** 1988. *Pneumocystis carinii*: surface reactive carbohydrates detected by lectin probes. *Exp. Parasitol.* **67**: 137–147.

- Cushion M., Ebbets D. 1989. Growth and metabolism of *Pneumocystis carinii* in axenic culture. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1385-1394.
- Dei-Cas E., Soulez B., Camus D. 1989. Ultrastructural study of *Pneumocystis carinii* in explant cultures of rabbit lung and cultures with and without feeder cells. *J. Protozool.* **36**: 55S-57S.
- Dei-Cas E., Soulez B., Palluault F., Charet P., Camus D. 1990a. *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. *Médecine/Sciences* **6**: 517-525.
- Dei-Cas E., Soulez B., Palluault F., Saquer J., Charet P., Camus D. 1990b. La pneumocystose chez le lapin. Article accepté par le comité scientifique du congrès INRA sur la recherche cunicole (Paris, 12-13 décembre 1990) et publié intégralement dans les comptes rendus du congrès.
- Dei-Cas E., Jackson H., Palluault F., Aliouat E., Hancock V., Soulez B., Camus D. 1991. Ultrastructural observations on the attachment of *Pneumocystis carinii* in vitro. *J. Protozool.* **38**: 205S-207S.
- Dei-Cas E., Caillez J., Palluault F., Aliouat E., Mazars E., Soulez B., Suppin J., Camus D. 1992. Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent? *Eur. J. Clin. Epidemiol.*: sous presse.
- Delanoë P., Delanoë M. 1912. Sur les rapports des kystes de Carini des poumons de rats avec le *Trypanosoma lewisi*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **155**: 39-41.
- De Puytorac P., Grain J., Mignot J. 1987. Précis de Protistologie. Boubée et Fondation Singer Polignac ed., Paris, p 63.
- DeRobertis E., DeRobertis E. 1980. Cell and Molecular Biology. Seventh edition. Holt-Saunders International Editions, Tokyo.
- DeStephano J., Cushion M., Sleight R., Walzer P. 1990a. Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. I. Evidence for an outer surface membrane. *J. Protozool.* **37**: 428-435.
- DeStephano J., Cushion M., Puvanesarajah V., Walzer P. 1990b. Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. II. Sugar composition. *J. Protozool.* **37**: 436-441.
- Dieckmann H., Lindner E., Stopka E. 1954. Befunde bei interstitieller plasmacellularer Pneumonie. *Beitr. Pathol. Anat.* **114**: 48-64.
- Edman J., Kovacs J., Masur H., Santi D. 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the *Fungi*. *Nature* **334**: 519-522.
- Edman U., Edman J., Lundgren B., Santi D. 1989. Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 6503-6507.
- Ernst P., Chen M., Wang N., Cosio M. 1983. Symbiosis of *Pneumocystis carinii* and cytomegalovirus in a case of fatal pneumonia. *Can. Med. Assoc. J.* **128**: 1089-1092.
- Filice G., Carnevale G., Lanzarini P., Castelli F., Olliaro P., Orsolini P., Carosi G., Rondanelli E. 1985. Life cycle of *Pneumocystis carinii* in the lung of immunocompromised host: an ultrastructural study. *Microbiologica* **8**: 319-328.

- Frenkel J. 1976. *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl. Cancer. Inst. Monogr.* **43**: 13–27.
- Frenkel J., Bartlett M., Smith J. 1990. RNA homology and the reclassification of *Pneumocystis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 1–2.
- Furuta T., Ueda S., Fujiwara K. 1984. Effect of T-cell passive transfer on *Pneumocystis carinii* infection in nude mice. *Jpn. J. Exp. Med.* **54**: 57–64.
- Gajdusek D. 1957. *Pneumocystis carinii*—etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. *Pediatrics* **19**: 543–565.
- Garner R., Walker A., Horst M. 1991. Morphologic and biochemical studies of chitin expression in *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **38**: 12S–14S.
- Garrison R. 1983. Ultrastructural cytology of pathogenic *Fungi*. Dans: *Fungi Pathogenic for Humans and Animals*. Howard D. H. ed., New York, Marcel Dekker, Inc.: 229–321.
- Gigliotti F., Stokes D., Cheatham A., Davis D., Hughes W. 1986. Development of monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* **154**: 315–322.
- Gigliotti F., Hughes W. 1988. Passive immunoprophylaxis with specific monoclonal antibody confers partial protection against *Pneumocystis carinii* pneumonitis in animal models. *J. Clin. Invest.* **81**: 1666–1668.
- Gill V., Evans G., Stock F., Parrillo J., Masur H., Kovacs J. 1987. Detection of *Pneumocystis carinii* by fluorescent-antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1837–1840.
- Goheen M., Blumershine R., Hull M., Bartlett M., Smith J. 1989. Enhancement of the fine structure of *Pneumocystis carinii* using potassium ferrocyanide and tannic acid. *Proc. 47th annual meeting Electron Microscopy Soc. America: 984–985*. GW Bailey, Ed, San Francisco.
- Gomori G. 1946. A new histochemical test for glycogen and mucin. *Am. J. Clin. Pathol.* **10**: 177–179.
- Gradus M., Gilmore M., Lerner M. 1988. An isolation method of DNA from *Pneumocystis carinii*: a quantitative comparison to known parasitic protozoan DNA. *Comp. Biochem. Physiol.* **89B**: 75–77.
- Graves D., McNabb S., Ivey M., Worley M. 1986a. Development and characterization of monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* **51**: 125–133.
- Graves D., McNabb S., Worley M., Downs T., Ivey M. 1986b. Analysis of rat *Pneumocystis carinii* antigens recognized by human and rat antibodies by using Western immunoblotting. *Infect. Immun.* **54**: 96–103.
- Graves D. 1989. Immunological studies of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **36**: 60–69.
- Grocott R. 1955. A stain for *Fungi* in tissue sections and smears: using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am. J. Clin. Pathol.* **55**: 975–979.

- Haleston P., Curry A., Rankin E. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a light microscopical and ultrastructural study. *J. Clin. Pathol.* **34**: 1138–1146.
- Ham, E., Greenberg S., Reynolds R., Singer D. 1971. Ultrastructure of *Pneumocystis carinii*. *Exp. Mol. Path.* **14**: 362–372.
- Haque A., Plattner S., Cook R., Hart M. 1987. *Pneumocystis carinii*. Taxonomy as viewed by electron microscopy. *Am. J. Clin. Pathol.* **87**: 504–510.
- Hayat M. 1970. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications. Vol 1. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Henshaw N., Carson J., Collier A. 1985. Ultrastructural observations of *Pneumocystis carinii* attachment to rat lung. *J. Infect. Dis.* **151**: 181–186.
- Hirai K., Ogawa K. 1986. Cytochemical quantitation of cytochrome oxidase activity in rat pulmonary alveolar epithelial cells and possible defect in type I cells. *J. Electron Microsc.* **35**: 19–28.
- Huang S., Marshall K. 1970. *Pneumocystis carinii* infection. A cytologic, histologic and electron microscopic study of the organism. *Am. Rev. Resp. Dis.* **102**: 623–635.
- Hughes W. 1982. Comparison of cyclosporin and dexamethasone to induce pneumocystosis in rats. *J. Infec. Dis.* **145**: 767.
- Hughes W. 1987. *Pneumocystis carinii* pneumonitis. Vol. 1. CRC Press Inc., Boca Raton, Vol. 1. 131, p 10.
- Hughes W. 1989. *Pneumocystis carinii*: Taxing taxonomy. *Eur. J. Epidemiol.* **5**: 265–269.
- Huneycutt H, Anderson R, Hendry W. 1964. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Case studies with electron microscope. *Am. J. Clin. Path.* **41**: 411–418.
- Itatani C., Marshall G. 1988. Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* in situ and from bronchoalveolar lavage. *J. Parasitol.* **74**: 700–712.
- Jackson H., Colthurst D., Hancock V., Marriott M., Tuite M. 1991. No detection of characteristic fungal protein elongation factor EF-3 in *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* **163**: 675–677.
- Jirovec O., Vanek J. 1956. Weitere Beiträge zur Morphologie von *Pneumocystis carinii*. *Zbl. Allg. Path. Anat.* **94**: 499–517.
- Kaneshiro E., Cushion M., Walzer P., Jayasimhulu K. 1989. Analysis of *Pneumocystis* fatty acids. *J. Protozool.* **36**: 69S–72S.
- Kernbaum S., Masliah J., Alcindor L., Bouton C., Christol D. 1983. Phospholipase activities of bronchoalveolar lavage fluid in rat *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Br. J. Exp. Pathol.* **64**: 75–80.
- Kovac J., Gill V., Swan J., Ognibene F., Shelhamer J., Parrillo J., Masur H. 1986. Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* **2**: 1–

3.

- Kovacs J., Halpern J., Swan J., Moss J., Parrillo J., Masur H. 1988. Identification of antigens and antibodies specific for *Pneumocystis carinii*. *J. Immunol.* **144**: 2023–2031.
- Kovacs J., Allegra C., Beaver J., Boarman D., Lewis M., Parrillo J., Chabner B., Masur H. 1989. Characterization of *de novo* folate synthesis in *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii*: Potential for screen therapeutic agents. *J. Infect. Dis.* **160**: 312–320.
- Kucera K. 1963. On the morphology and developmental cycle of *Pneumocystis carinii* of human and rat origin. *Progress in Biology. Proc. 1st Internat. Congress. Protozool. Pragues 1961*, 482–484.
- Kungskrai J., Webster H., Yuthavong Y. 1990. Folate and cobalamin metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today* **6**: 388–392.
- Lee C., Bolinger C., Bartlett M., Kohler R., Wilde II J., Smith J. 1986. Production of a monoclonal antibody against *Pneumocystis carinii* by using a hybrid of rat spleen and mouse myeloma cells. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 505–508.
- Leibovitz E., Rigaud M., Pollack H., Lawrence R., Chandwani S., Krasinski K., Borkowski W. 1990. *Pneumocystis carinii* pneumonia in infants infected with the human immunodeficiency virus with more than 450 CD4 T lymphocytes per cubic millimeter. *N. Engl. J. Med.* **323**: 531–533.
- Limper A., Pottratz S., Martin II J. 1991. Modulation of *Pneumocystis carinii* adherence to culture lung cells by mannose-dependent mechanism. *J. Lab. Clin. Med.* **118**: 492–499.
- Linder E., Lundin L., Vorma H. 1987. Detection of *Pneumocystis carinii* from lung samples using monoclonal antibodies to an 82 kDa parasite component. *J. Immunol. Methods* **98**: 57–62.
- Masur H., Ognibene F., Yarchoan R. 1989. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann. Int. Med.* **111**: 223–231.
- Matsumoto Y., Yoshida Y. 1984. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: Synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J. Protozool.* **31**: 420–428.
- Matsumoto Y. and Yoshida Y. 1986. Advance in *Pneumocystis carinii* biology. *Parasitol. Today* **2**: 137–142.
- Matsumoto Y., Matsuda S., Tegoshi T. 1989. Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **36**: 21S–22S.
- Mazer M., Kovacs J., Swan J., Parrillo J., Masur H. 1987. Histochemical study of selected deshydrogenase enzymes in *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* **55**: 727–730.
- Millard P., Wakefield A., Hopkin J. 1990. A sequential ultrastructural study of rat lungs infected with *Pneumocystis carinii* to investigate the appearances of the organism, its relationships and its effects on pneumocytes. *Int. J. Exp. Path.* **71**: 895–904.
- Nielsen M., Settnes O. 1991. Morphology of *Pneumocystis carinii* and activation of the plasmalemmal vesicular system in alveolar epithelial cells or the host. An ultrastructural study. *APMIS* **99**: 219–225.

- Novikoff A., Novikoff P. 1977. Cytochemical contributions to differentiating GERL from Golgi apparatus. *Histochem. J.* **9**: 525-551.
- Palluault F., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B., Camus D. 1990. Golgi complex and lysosomes in rabbit derived *Pneumocystis carinii*. *Biol. Cell.* **70**: 73-82.
- Palluault F., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Camus D. 1991a. 3-D reconstruction in Parasitology. *Parasitol. Today* **7**: 125-217.
- Palluault F., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B., Camus D. 1991b. Three-dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii*. I. Trophozoite. *J. Protozool.* **38**: 402-407.
- Palluault F., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B., Camus D. 1991c. Three-dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii*. II. Intermediate precyst. *J. Protozool.* **38**: 407-411.
- Palluault F., Slomianny C., Soulez B., Dei-Cas E., Camus D. 1992a. High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embedding. *Parasitol. res.* **Sous presse**.
- Palluault F., Soulez B., Slomianny C., Dei-Cas E., Cesbron J.-Y., Camus D. 1992b. High osmotic pressure for *Pneumocystis carinii* LR White embedding enables fine ultrastructural and immunocytochemical studies. I. Golgi complex and cell wall synthesis. *Parasitol. Res.* **Sous presse**.
- Palluault F., Slomianny C., Pietrzyk B., Soulez B., Dei-Cas E., Camus D. 1992c. Three-dimensional and cytochemical study of the mitochondrion of rabbit-derived *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **Soumis**.
- Pesanti E., Cox C. 1981. Metabolic and synthetic activities of *Pneumocystis carinii* in vitro. *Infect. Immun.* **34**: 908-914.
- Pesanti E. 1984. *Pneumocystis carinii*: oxygen uptake, antioxidant enzymes, and susceptibility to oxygen-mediated damage. *Infect. Immun.* **44**: 7-11.
- Pesanti E. 1987. Phospholipid profile of *Pneumocystis carinii* and its interaction with type II epithelial cells. *Infect. Immun.* **55**: 736-741.
- Pesanti E., Shanley J. 1988. Glycoproteins of *Pneumocystis carinii*: characterization by electrophoresis and microscopy. *J. Infect. Dis.* **158**: 1353-1359.
- Pifer L., Hughes W., Stagno S., Woods D. 1978. *Pneumocystis carinii* infection: Evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics* **61**: 35-41.
- Pixley F., Wakefield A., Banerji S., Hopkin J. 1991. Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. *Mol. Microbiol.* **5**:1347-1351.
- Pottratz S., Martin II J. 1990. Role of fibronectin in *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells. *J. Clin. Invest.* **85**: 351-356.
- Poulain D., Hopwood V., Vernes A. 1985. Antigenic variability of *Candida albicans*. *Crit. Rev. Microbiol.* **12**: 223-270.

- Radding J., Armstrong M., Ullu E., Richards F. 1989. Identification and isolation of a major cell surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun.* **57**: 2149–2157.
- Rambourg A., Leblond Y. 1990. L'appareil de Golgi: apport de la microscopie électronique tridimensionnelle à l'étude de sa structure et de ses fonctions. *Médecine/Sciences* **6**: 35–45.
- Rooney S. 1985. The surfactant system and lung phospholipid biochemistry. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131**: 439–460.
- Roth J., Taatjes D., Tokuyasu K. 1990. Contrasting of Lowicryl K4M thin sections. *Histochem.* **95**: 123–136.
- Ruffolo J., Cushion M., Walzer P. 1989. Ultrastructural observations on life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **36**: 53S–54S.
- Schmatz D., Romancheck M., Pittarelli L., Schwartz R., Formtling R., Nollstadt K., Vanmiddlesworth F., Wilson K., Turner M. 1990. Treatment of *Pneumocystis carinii* with 1, 3- β glucan synthesis inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 5950–5954.
- Seifert K. 1960. Elektronenmikroskopische Untersuchung von *Pneumocystis carinii* der Menschen. *Beitr. Path. Anath.* **123**: 398–411.
- Seligman A., Plapinger R., Wasserkrug H., Deb C., Hanker J. 1967. Ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity by the NADI reaction with osmiophilic reagents. *J. Cell Biol.* **34**: 787–800.
- Settnes P., Bille-Hansen V., Jorsal S., Henriksen S. 1991. The piglet as potential model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Protozool.* **38**: 140S–141S.
- Sheehan P., Stokes D., Yeh Y., Hughes W. 1986. Surfactant phospholipids and lavage phospholipase A2 in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **134**: 3526–531.
- Shiota T. 1986. Simultaneous demonstration of cyst walls and intracystic bodies of *Pneumocystis carinii* in paraffin embedded lungs sections using Gomori's methenamine silver nitrate and giemsa stain. *J. Clin. Pathol.* **39**: 1269–1271.
- Shiota T. 1987. Light microscopic observation of the so-called parenthesis-like structure of *Pneumocystis carinii* in smears stained by Gomori's methenamine silver nitrate. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* **15**: 269–273.
- Sinclair K., Wakefield A., Banerji S., Hopkin J. 1991. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**: 221–227.
- Slomianny C., Prensier G., Charet P. 1985. Ingestion of erythrocytic stroma by *Plasmodium chabaudi* trophozoite: ultrastructural study by serial sectioning and 3-dimensional reconstruction. *Parasitol.* **90**: 579–588.
- Slomianny C., Prensier G. 1990. A cytochemical ultrastructural study of the lysosomal system of different species of malaria parasites. *J. Protozool.* **37**: 465–470.

- 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**: 355-356.
- Soulez B., Dei-Cas E., Palluault F., Camus D. 1991a. Morphological evaluation of *Pneumocystis carinii* after extraction from infected lung. *J. Parasitol.* **77**: 449-453.
- Soulez B., Palluault F., Cesbron J., Dei-Cas E., Capron A., Camus D. 1991b. Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice. *J. Protozool.* **38**: 123S-125S.
- Soulez B., Palluault F., Dei-Cas E., Aliouat E., Camus D. 1991c. Production of monoclonal antibody using lymphocytes from *Pneumocystis* infected mice. *J. Protozool.* **36**: 189S-190S.
- Stagno S., Pifer L., Hughes W., Brasfield D., Tiller R. 1980. *Pneumocystis carinii* pneumonitis in young immunocompetent infants. *Pediatrics* **66**: 56-62.
- Stringer S., Stringer J., Blase M., Walzer P., Cushion M. 1989. *Pneumocystis carinii* : sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with *Fungi*. *Exp. Parasitol.* **68**: 450-461.
- Stryer L. 1981. Biochemistry. 2nd ed. W H Freeman and Company, San Francisco.
- Takeuchi S. 1980. Electron microscopic observation of *Pneumocystis carinii*. *Jpn. J. Parasit.* **29**: 427-453.
- Tanabe K., Takasaki S., Watanabe J., Kobata A., Egawa K., Nakamura Y. 1989. Glycoproteins composed of major surface immunodeterminants of *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* **57**: 1363-1368.
- Thiéry J. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.* **6**: 987-101.
- Tronchin G., Poulain D., Vernes A. 1984. Cytochemical and ultrastructural studies of *Candida albicans*. III. Evidence for modifications of the cell wall coat during adherence to human buccal epithelial cell. *Arch. Microbiol.* **139**: 221-224.
- Tegoshi T. 1988. New system of *in vitro* cultivation of *Pneumocystis carinii* without feeder cells. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.* **97**:1473-82.
- Uni S., Iseki M., Takada S. 1978. Scanning electron microscopy of *Pneumocystis carinii* in the rat lungs treated by frozen cracking methods. *Jpn. J. Chest. Disease.* **37**: 357-362.
- Vierbuchen M., Ortmann M., Uhlenbruck G. 1990. Endogenous carbohydrate-binding proteins in *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* **58**: 3143-3146.
- Vávra J., Kucera K. 1970. *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J. Protozool.* **17**: 463-483.
- Vossen M., Beckers P., Meuwissen J., Stadhouders A. 1976. Microtubules in *Pneumocystis carinii*. *Z. Parasitenkd.* **49**: 291-292.

- Vossen M., Bergers A., Stadhouders A., Beckers P., Meuwissen J. 1977. New aspect of the life cycle of *Pneumocystis carinii*. *Z. Parasitenkd.* **51**: 213–217.
- Vossen M., Beckers P., Meuwissen J., Stadhouders A. 1978. Developmental biology of *Pneumocystis carinii*, an alternative view on the life cycle of the parasite. *Z. Parasitenkd.* **55**: 101–118.
- Walker A., Garner R., Horst M. 1990. Immunocytochemical detection of chitin in *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* **58**: 412–415.
- Walzer P. 1984. Experimental models of *Pneumocystis carinii* infections. Dans: *Pneumocystis carinii Pneumonia*. Young L.S., ed., Marcel Dekker, Inc., New York, p.7.
- Walzer P., Linke M. 1987a. A comparison of antigenic characteristics of rat and human *Pneumocystis carinii* by immunoblotting. *J. Immunol.* **138**: 2257–2265.
- Walzer P., Standforth D., Linke M., Cushion M. 1987b. *Pneumocystis carinii*: immunoblotting and immunofluorescent analysis of serum antibodies during experimental rat infection and recovery. *Exp. Parasitol.* **63**: 319–328.
- Walzer P. 1989. Symposium: Historical perspectives on *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **36**: 39–41.
- Walzer P. 1991. Immunopathogenesis of *Pneumocystis carinii* infection. *J. Lab. Clin. Med.* **118**: 206–216.
- Watanabe J., Hori H., Tanabe K., Nakamura Y. 1989. Phylogenetic association of *Pneumocystis carinii* with the "Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group" indicated by the 5S ribosomal RNA sequences. *Mol. Biol. Parasitol.* **32**: 163–168.
- Watts J. 1988. *Pneumocystis carinii*: histologic, cytopathologic and ultrastructural aspects. *American Society of clinical Pathology Teleconference, September 27*, pp. 1–19.
- Weber P., Ohlendorf D., Wendoloski J., Salemme F. 1989. Structural origins of high-affinity of biotin binding to streptavidin. *Science* **243**: 85–88.
- Wessel W., Ricken D. 1958. Elektronenmikroskopische Untersuchung von *Pneumocystis carinii*. *Virchow's Arch. Path. Anal.* **331**: 545–557.
- Williams D., Radding J., Dell A., Khoo K., Rogers M., Richards F., Armstrong M. 1991. Glucan synthesis in *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **38**: 427–437.
- Yoneda K., Walzer P. 1980. Interaction of *Pneumocystis carinii* with host lungs: an ultrastructural study. *Infect. Immun.* **29**: 692–703.
- Yoneda K., Walzer P. 1981. Mechanism of pulmonary alveolar injury in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in the rat. *Br. J. Exp. Path.* **62**: 339–346.
- Yoneda K., Walzer P., Richey C., Birk M. 1982. *Pneumocystis carinii*: Freeze-fracture study of stages of the organism. *Exp. Parasitol.* **53**: 68–76.

- Yoshida Y., Matsumoto Y., Yamada M., Okabayashi K., Yoshikawa H., Nakazawa M.** 1984. *Pneumocystis carinii*: electron microscopic investigation on the interaction of trophozoites and alveolar lining cell. *Zbl. Bakt. Hyg. A* **256**: 390–399.
- Yoshida Y.** 1989. Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **36**: 53–60.
- Yoshikawa H., Yoshida Y.** 1986. Freeze–fracture studies on *Pneumocystis carinii*. I. Structural alteration of the pellicle during the development from trophozoite to cyst. *Z. Parasitenkd.* **72**: 463–477.
- Yoshikawa H., Morioka H., Yoshida Y.** 1987a. Freeze fracture localization of filipinsterol complexes in plasma– and cytomembranes of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **34**: 131–137.
- Yoshikawa H., Tegoshi T., Yoshida Y.** 1987b. Detection of carbohydrates on *Pneumocystis carinii* by fluorescein–conjugated lectins. *Parasitol. Res.* **74**: 43–49.
- Yoshikawa H., Yoshida Y.** 1987c. Localization of silver desposits on *Pneumocystis carinii* treated with Gomori's methenamine silver nitrate stain. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A.* **264**: 363–372.
- Yoshikawa H., Morioka H., Yoshida Y.** 1987d. Freeze–fracture studies on *Pneumocystis carinii*. II. Fine structure of the trophozoite. *Parasitol. Res.* **73**: 132–139.
- Yoshikawa H., Yoshida Y.** 1987e. Freeze–fracture studies on *Pneumocystis carinii*. III. Fine structure of the precyst and cyst. *Parasitol. Res.* **74**: 36–42.
- Yoshikawa H., Morioka H., Yoshida Y.** 1988. Ultrastructural detection of carbohydrates in the pellicle of *Pneumocystis carinii*. *Parasitol. Res.* **74**: 537–543.
- Yoshikawa H., DeBault L., Graves D.** 1991. Ultrastructural localization of epitopes recognized by monoclonal antibodies produce to rat *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **38**: 18–20S.

X. ARTICLES.

Palluault F., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B., Camus D. 1990. Golgi complex and lysosomes in rabbit derived *Pneumocystis carinii*. *Biol. Cell.* **70**: 73-82.

Palluault F., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Camus D. 1991a. 3-D reconstruction in Parasitology. *Parasitol. Today* **7**: 125-217.

Palluault F., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B., Camus D. 1991b. Three-dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii*. I. Trophozoite. *J. Protozool.* **38**: 402-407.

Palluault F., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B., Camus D. 1991c. Three-dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii*. II. Intermediate precyst. *J. Protozool.* **38**: 407-411.

Palluault F., Slomianny C., Soulez B., Dei-Cas E., Camus D. 1992a. High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embedding. *Parasitol. res.* **Sous presse.**

Palluault F., Soulez B., Slomianny C., Dei-Cas E., Cesbron J.-Y., Camus D. 1992b. High osmotic pressure for *Pneumocystis carinii* LR White embedding enables fine ultrastructural and immunocytochemical studies. I. Golgi complex and cell wall synthesis. *Parasitol. Res.* **Sous presse.**

Palluault F., Slomianny C., Pietrzyk B., Soulez B., Dei-Cas E., Camus D. 1992c. Three-dimensional and cytochemical study of the mitochondrion of rabbit-derived *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* **Soumis.**

Golgi complex and lysosomes in rabbit derived *Pneumocystis carinii*

François Palluault¹, Eduardo Dei-Cas^{1,2}, Christian Slomianny¹, Benoît Soulez^{1,2}, Daniel Camus^{1,2}

¹INSERM (U 42), Unité de Biologie et Biochimie parasitaires et fongiques, domaine du CERTIA, 369, rue Jules-Guesde, Flers-Bourg, 59650 Villeneuve d'Ascq; ²Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille, France

(Received 25 June 1990; accepted 3 December 1990)

Summary – The ultrastructural morphology of *Pneumocystis carinii* obtained from nonimmunosuppressed rabbit is described in details. Golgi complex and primary lysosomes of *P carinii* are described here for the first time. They are easily revealed by the zinc iodide-osmium tetroxide cytochemical reagent. Thiamine pyrophosphatase and β -glycerophosphatase activities are found in the parasite but cytidine 5' monophosphatase activity is not observed. A weak thiamine pyrophosphatase activity is detected in Golgi vesicles. An endomembranous saccular structure, present from the intracystic body stage to the precystic stage, apparently plays the role of secondary lysosome. A second type of endomembranous saccular structure, only present in the well developed trophozoitic and precystic forms is also described. The presence of carbohydrates in the cell wall of the parasite was demonstrated by periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate staining and lectin concanavalin A labeling. The development of Golgi vesicles preceded the transition from double-layered to three-layered parasite stages.

Pneumocystis carinii / Golgi complex / phosphatase / carbohydrates / lysosomes

Introduction

Pneumocystis carinii is an opportunistic agent which was discovered in 1909 [9]. In the 1980's, *P carinii* emerged as the leading opportunistic pathogen and major cause of mortality in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

Carbohydrates were detected on the surface of *P carinii* [13, 15, 26–28] obtained from lungs of artificially immuno-depressed rats. Using thiocarbohydrazide-silver proteinate (TCH-SP) or Concanavalin A (ConA), carbohydrates have been found on the external dense layer and on the middle layer of precystic and cystic wall [28]. The external dense layer of trophozoites was also labeled by ConA. A labeling of the outer dense layer of all stages was observed using the lectin *Macura pomifera* (MPA) [28]. The degradation of the cyst wall by zymolyase suggested the presence of β -1,3-glucans [13]. However, the detection of carbohydrates has not been related to the presence of Golgi complex.

In the present work, we examined the ultrastructural morphology of *P carinii* developing in the lung of young rabbits at weaning [19]. The cytoplasmic organelles of the different parasite stages were studied using ultrastructural cytochemical methods performed on lung's thin sections. Golgi, lysosome and endoplasmic reticulum structures were more developed in three-layered than in double-layered parasite stages.

Biological models

Pneumocystis carinii was obtained from lungs of untreated California-New Zealand hybrid rabbits at weaning [19]. The terminology of Yoshida [25], was used to describe the different life cycle stages of *P carinii*. Briefly, five

stages were ultrastructurally recognizable: the trophozoite, the early, intermediate and late precyst, and the cyst with intracystic bodies (ICB).

Materials and methods

Transmission Electron Microscopy (TEM)

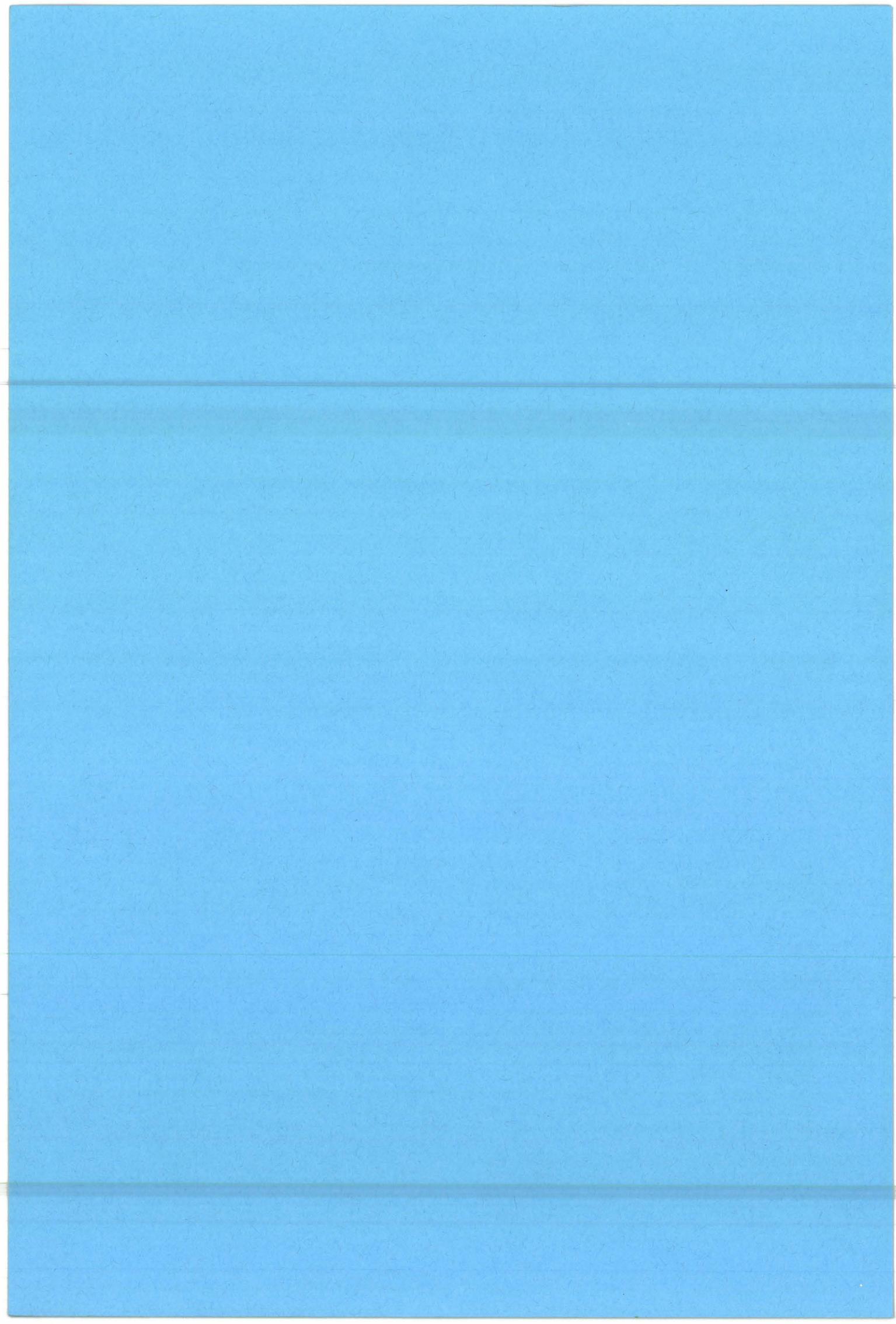
P carinii parasitized rabbit lungs were cut into cubes of 1 mm³ and fixed by immersion in a cacodylate-buffered 2.5% glutaraldehyde solution (pH 7.3, 0.1 M) for 2 h at 4°C. Samples were postfixed in buffered 1% OsO₄ solution for 1 h at room temperature, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Epon. Ultrathin sections were performed with an ultramicrotome Reichert-Jung. Some samples have been serially sectioned.

The enhancing endomembrane systems was obtained using the zinc iodide-osmium tetroxide technique (ZIO) as described by Benchimol *et al* [3]. Control samples were incubated in a 1 mM dithiothreitol (DTT) phosphate buffered solution (pH 6.8, 0.1 M) for 30 min at room temperature before incubation in the ZIO solution.

Ultrastructural cytochemistry

Carbohydrate detection

Periodic acid-Thiosemicarbazide-silver proteinate (PA-TSC-SP) staining PA-TSC-SP staining was performed following the method described by Thiéry [21]. Briefly, samples were fixed by immersion in a cacodylate-buffered 1% glutaraldehyde solution (pH 7.3, 0.1 M) for 2 h at 4°C. Samples were postfixed in buffered 1% OsO₄ solution for 1 h at room temperature, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Epon. Thin sections were collected on parlodion-coated nickel grids and incubated in 1% periodic acid solution for 30–60 min at room temperature. The sections were washed and stained in a 1% TSC in 10% acetic acid for 1 h to 75 h, quickly washed in 10% acetic acid and then washed in distilled water for 1 h in a wet cham-



ber. Thin sections were then incubated in a 1% silver proteinate solution for 30 min at room temperature in a dark chamber. Samples were washed before observation. Control samples were not treated with periodic acid before staining with TSC-SP.

Postembedding labeling with ConA

Samples were fixed in a cacodylate-buffered 4% paraformaldehyde 0.1% glutaraldehyde solution (pH 7.3, 0.1 M) for 30 min on ice, dehydrated in ethanol and embedded in Epon or in LRW (London Resin White). Thin sections were collected on parlodion-coated nickel grids and pre-incubated in Tris buffer pH 7 with 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂ supplemented with 5% bovine serum albumine (BSA) for 5 min at room temperature. They were then directly incubated for 30 min in ConA-Au₂₀ (120–240 µg/ml) (Sigma, France). Grids were washed with the same buffer supplemented with 0.1% BSA and washed with distilled water. Some samples were etched before labeling with saturated sodium metaperiodate solution for 10 min at room temperature followed by 10⁻¹ N HCl hydrolysis for 30 min at room temperature. Epon thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. LRW thin sections were only stained with a 4% uranyl acetate solution in distilled water. Three types of controls were carried out. The first consisted of an incubation of the control samples in a ConA-Au₂₀ 0.2 M α -D-mannopyranoside (Sigma, France) mixture for 30 min, before staining. The second was a pre-incubation of thin sections with unlabeled ConA (120 µg/ml) before labeling with ConA-Au₂₀. The third was an incubation of the thin sections in a colloidal gold solution without ConA.

For indirect labeling, grids were incubated at room temperature with biotinylated ConA (10 µg/ml) for 30 min, washed in Tris buffer pH 7 and incubated in streptavidin-Au₁₀ (Janssen, Belgium). The same controls as for direct labeling were performed. An additional one was performed by incubation of sections in streptavidin-Au₂₀ without pre-incubation in biotinylated ConA.

Phosphatase activity

Thiamine pyrophosphatase (TPPase), and cytidine 5' monophosphatase (CMPase) activities were investigated using the method of Novikoff *et al* [14]. For detection of β -glycerophosphatase (β -GPPase) activity, lung samples were fixed in cacodylate-buffered 2.5% glutaraldehyde-0.025% CaCl₂ solution (0.1 M, pH 7.4) for 1 h at 4°C. Samples were washed once in cacodylate buffer, twice in buffered 1.5% dimethylsulfoxide (DMSO) 0.33 M sucrose solution, and then washed in sodium acetate buffer (0.1 M pH 4.5) with 7.5% sucrose. Incubation was performed in the following substrate: 1 ml of 3% sodium β -glycerophosphate solution in 10 ml of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5, containing 7.5% sucrose and 25 mg PbNO₃, for 1 h (37°C). Controls were incubated without substrate. After washing, post-fixation in OsO₄ for 30 min at 4°C and embedding in Epon were performed as above.

Results

The amoeboidal young trophozoites had an outer electron dense layer 20–25-nm thick, laying on a 6–7-nm thick plasma membrane. Small tubular expansions with an internal diameter of about 100 nm were observed. The perinuclear *cisternae* communicated with the *cisternae* of the rough (RER) or smooth endoplasmic reticulum (SER) (fig 1A). A low number of Golgi vesicles were detected (fig 1A). As trophozoite grew, two types of endoplasmic structures were distinguished. The first consisted of one, two or more coiled endoplasmic saccules (ES₁) (fig 1B), which packaged cytoplasm with or without glycogen particles or mitochondria. The second type consisted of a large and flattened single ES (ES₂) (fig 1B). Golgi vesicles were also observed near the 2 types of endoplasmic structures (fig 1B).

All the precystic stages were ovoid. The early precyst displayed many tubular expansions but not as numerous as those of the trophozoite. The pellicle of the early precyst resembled the pellicle of trophozoites but the outer electron dense layer was thicker (25–30 nm). Cross sections of mitochondria were numerous. Golgi vesicles were frequently detected. Their number increased with the development of the precyst. Primary lysosomes or Golgi vesicles, and glycogen particles, were found in the cytoplasmic portions packaged in the ES₂ (fig 1C).

The cell wall of intermediate precyst (fig 1D) was characterized by a less electron-dense middle layer between the outer electron-dense layer and the plasma membrane. The middle layer reached a thickness of about 20 nm. The nuclear divisions seemed asynchronous since three or five nuclei were sometimes observed on serial thin sections. A nucleus-associated organelle was seen at the periphery of each nucleus (data not shown). The nuclear envelope was partially preserved during nuclear division. Numerous cross sections of mitochondria were observed. The ES structures were present in the early and intermediate precysts.

The late precyst (data not shown) was characterized by the ICB morphogenesis. The outer dense layer of the cell wall was about 40-nm thick whereas the middle layer reached a thickness of 24–28 nm. Mitochondria were frequently found next to the nucleus.

The mature cyst (fig 1E and F) had a larger cell wall consisting of an external dense layer of about 50-nm thick and a middle, less dense layer with a thickness of about 40–45 nm. Cytoplasmic organelles and mitochondria were altered. Eight ICB with three different morphological aspects were found in the mature cyst on serial thin sections. The first one (fig 1E) was a small round ICB (about 1 µm diameter) with a nucleus, an RER and a mitochondrion. The second one was a more developed ICB similar to the young trophozoite shown in figure 1A but without tubular expansions. The last one was a dense, banana-shaped ICB where the nucleus, surrounded by RER, was observed (fig 1F).

ZIO impregnation

The ZIO reagent used after treatment with DTT, strongly enhanced the contrast of the endomembrane system and mitochondria. The staining was associated with the nuclear envelope of the trophozoites (fig 2A, C and D). Nuclear pores (55–80 nm) were easily observed on thicker ultrathin sections (100–150 nm) (fig 2D). The endoplasmic reticulum of the trophozoitic form communicated with the perinuclear cisterna (fig 2A) and showed many expansions that were often flattened and coiled. Golgi vesicles were easily detected by the ZIO reagent (fig 2B). ES structures were highly contrasted and the continuity with the perinuclear cisternae was easily observed (fig 2C and D). The two types of ES structures were impregnated. The first one displayed ES₁ with packaged mitochondria (fig 2C) or, more frequently, cytoplasm (fig 2C, E, F). Golgi vesicles were frequently observed next to the ES₁ (fig 2C). The second one (fig 2D) corresponded to the ES₂ shown in figures 1B and C. The continuity between the perinuclear cisternae and this ES₂ is clearly shown in fig 2D. In this figure, Golgi vesicles were found near the apical portion of the ES.

The ZIO staining was also associated with the nuclear envelope, the RER and the mitochondrion of ICB (fig 2E, 2F). Moreover, ICB, ES structures, and Golgi vesicles,

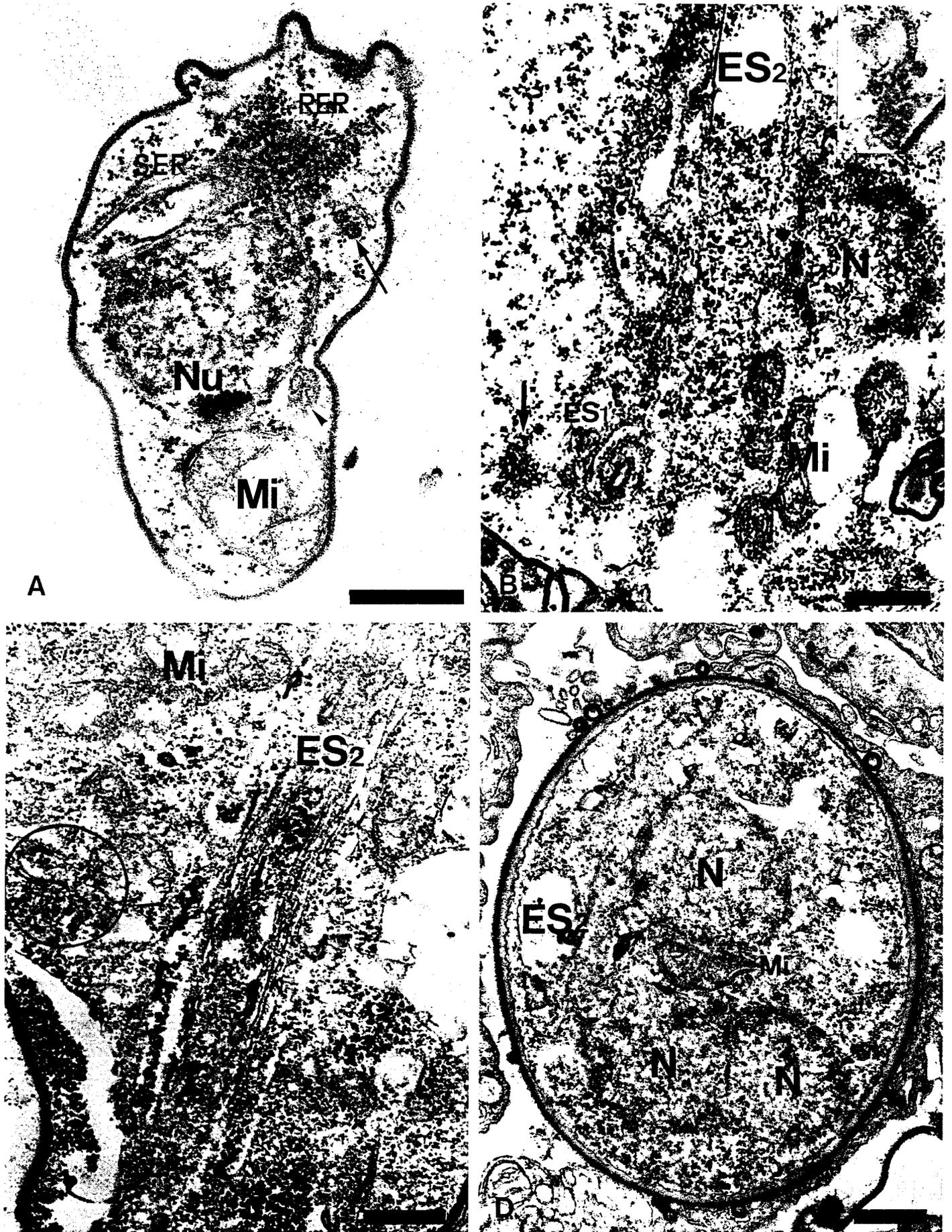


Fig 1. Ultrastructure of rabbit-derived *P. carinii*. A. Small sized trophozoite with budding (arrowhead) mitochondria (Mi). Nucleolus (Nu), rough endoplasmic reticulum (RER), smooth endoplasmic reticulum (SER), Golgi vesicles (arrow); $\times 44\ 000$. B. Large sized trophozoite cross sections of mitochondria (Mi) and nucleus (N); the first type of ES₁ is coiled and is communicating with the second type of ES (ES₂); Golgi vesicles (arrow) are observed next to ES₁; $\times 35\ 000$. Inset shows Golgi vesicles of another trophozoite. C. Early precyst. The ES₂ is packaging Golgi vesicles (arrow); many Golgi vesicles are observed in the cytoplasm (circle); cross sections of mitochondria (Mi) are seen next to the ES; $\times 31\ 000$. D. Intermediate precyst with 3 nuclei (N), ES₂ is here separated from the perinuclear cisterna, mitochondria (Mi); $\times 18\ 000$.

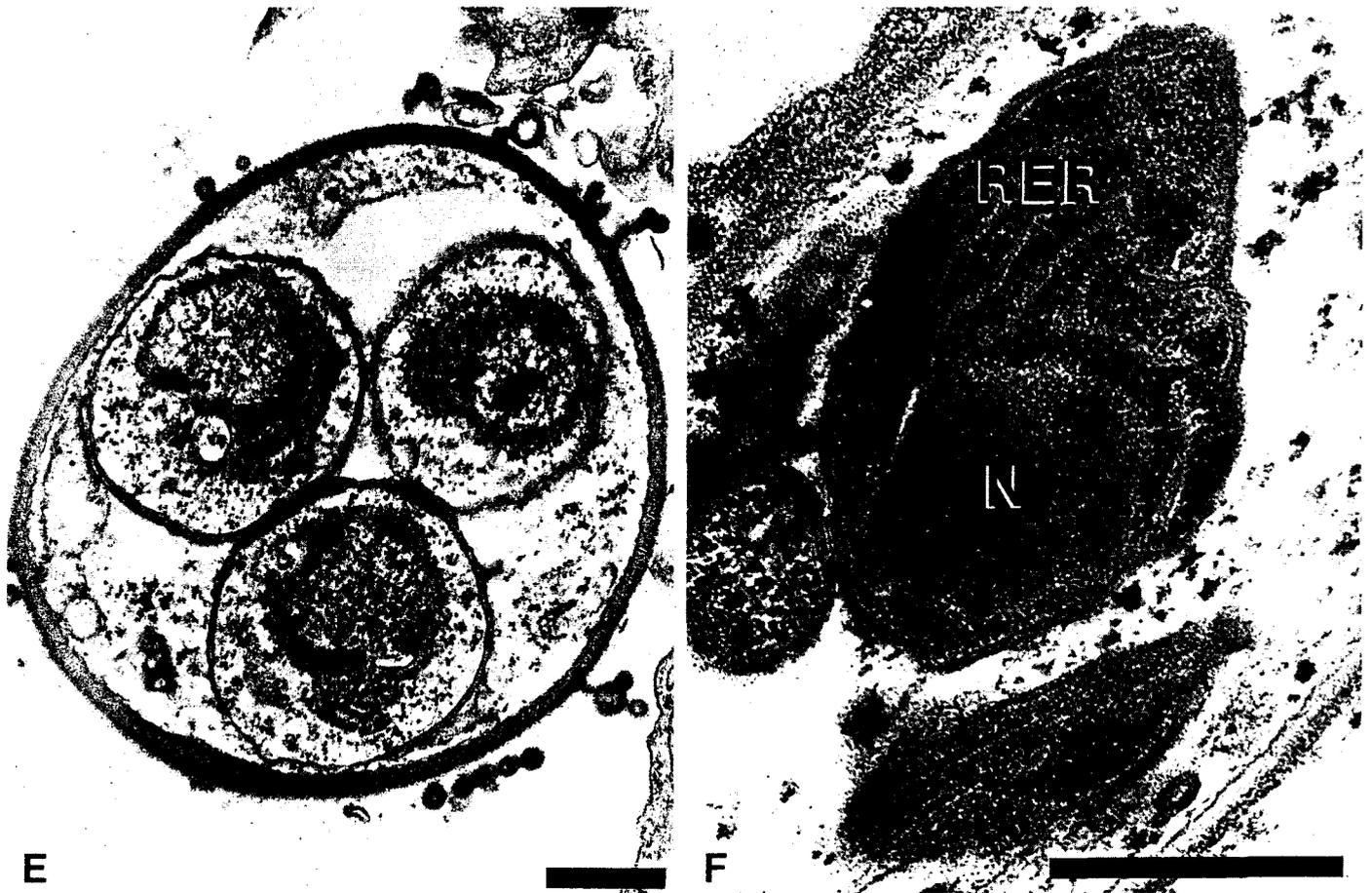


Fig 1 (continued). E. Mature cyst with 3 small and round mononucleate ICB; $\times 32\ 000$. F. Three-layered mature cyst with electron-dense banana-shaped ICB; nucleus (N) and rough endoplasmic reticulum (RER); $\times 78\ 200$. Bar: $0.5\ \mu\text{m}$.

which apparently developed from the ES by budding, were impregnated by the ZIO reagent (fig 2G).

No major modification of the ZIO staining was observed when the DTT treatment was omitted for all the parasite stages except that Golgi vesicles were not stained (data not shown).

Carbohydrate detection

PA-TSC-SP staining

The less electron-dense middle layer of the cell wall was weakly and heterogeneously stained by PA-TSC-SP in precystic forms (fig 3B, D). At all stages, glycogen granules were stained in the cytoplasmic area limited by the ES. Positive reaction was observed in parasites incubated in periodic acid for 30 min, then in TSC-SP solution for 1 h.

A longer treatment with periodic acid and/or TSC-SP reagent did not enhance the staining. No positive reaction was observed in trophozoite after PA-TSC-SP treatment except on the glycogen granules (fig 3F).

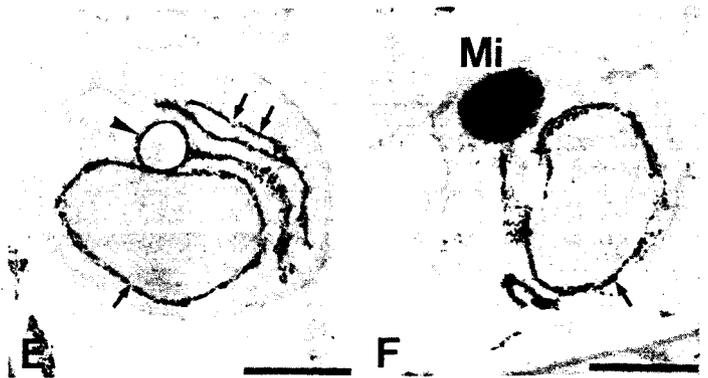
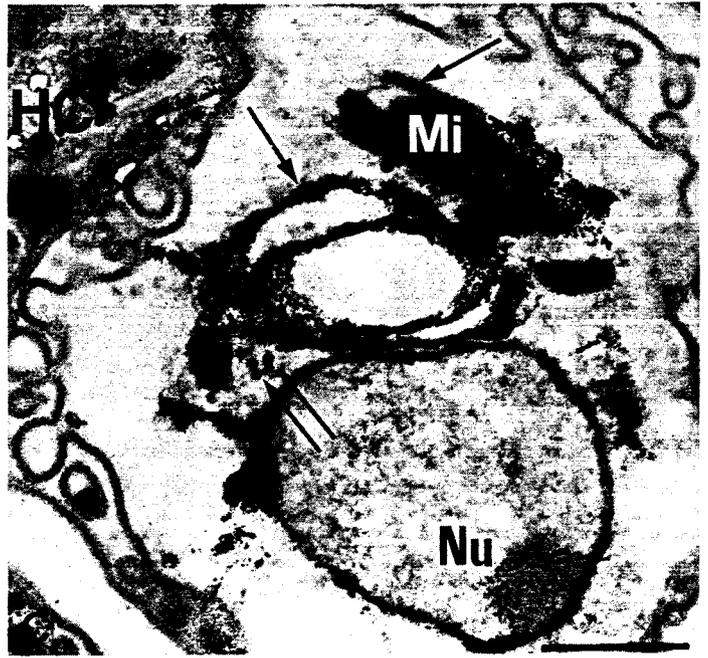
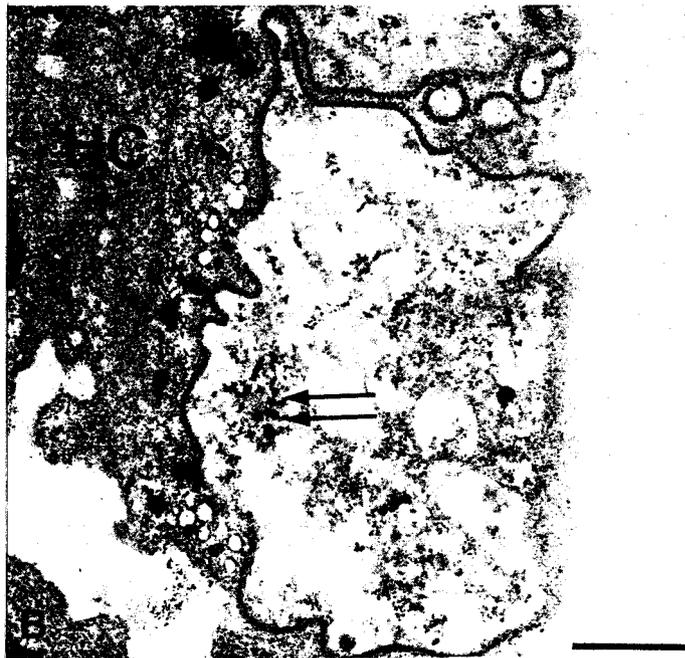
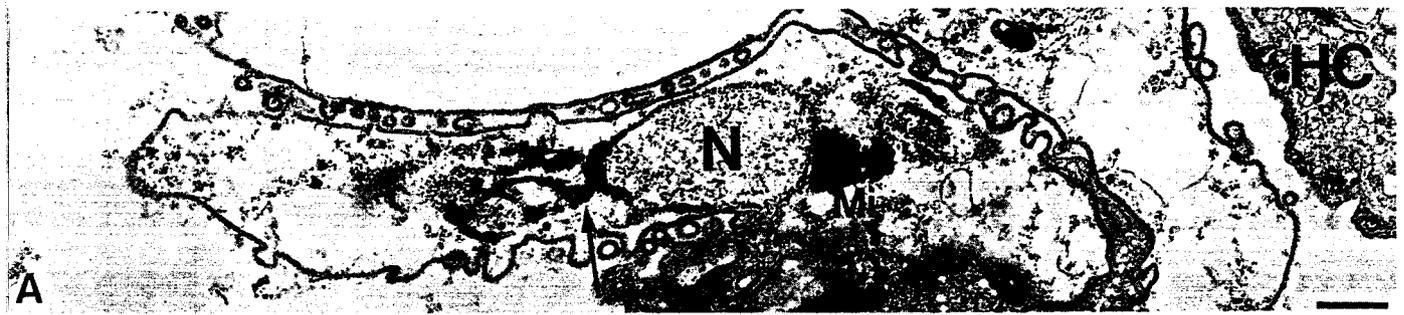
Staining was only detected on the plasma membrane of trophozoites in control samples incubated in TSC-SP without periodic oxidation (fig 3E). The middle layer of the cystic wall as well as the glycogen granules (fig 3A, C) of all stages were not stained in the controls.

Postembedding labeling with ConA-Au₂₀

The parasitic surface structures displayed more intense labeling in *P. carinii* organisms embedded in LRW. The pellicle of trophozoites (fig 4A, B) as well as the cell wall of precystic and cystic forms, and the surface of ICB, (fig 4C), were labeled with the ConA-Au₂₀. The labeling

Fig 2. *P. carinii* treated with the zinc iodide-osmium tetroxide reagent.

A. Trophozoite with well developed, distended, smooth endoplasmic reticulum (arrow), stained mitochondria (Mi), nucleus (N). Host cell (HC); $\times 18\ 000$. B. Trophozoite with Golgi vesicles (arrows). Host cell (HC); $\times 30\ 000$. C. Trophozoite with the first type of endoplasmic saccules (arrow) packaging cytoplasm and mitochondria (Mi); Golgi vesicles (double arrow) are also seen next to the ES₁; nucleolus (Nu); host cell (HC); $\times 38\ 400$. D. Large sized trophozoite: the ES₂ is communicating with the perinuclear cisterna (arrow). Nuclear pores (small arrow and inset) are seen; Golgi vesicles (double arrow) are observed next to the ES₂; $\times 28\ 000$. Inset: $\times 86\ 000$. E, F. Intracystic body with well stained nuclear envelope (arrow), endoplasmic reticulum (double arrow) and small ES₁ (arrowhead); mitochondria (Mi); $\times 27\ 400$. G. intracystic body showing a nuclear pore (twist arrow), an endoplasmic structure (ES₁ and Golgi vesicles budding from the endoplasmic structures (double arrow); $\times 47\ 100$. Bar: $0.5\ \mu\text{m}$.



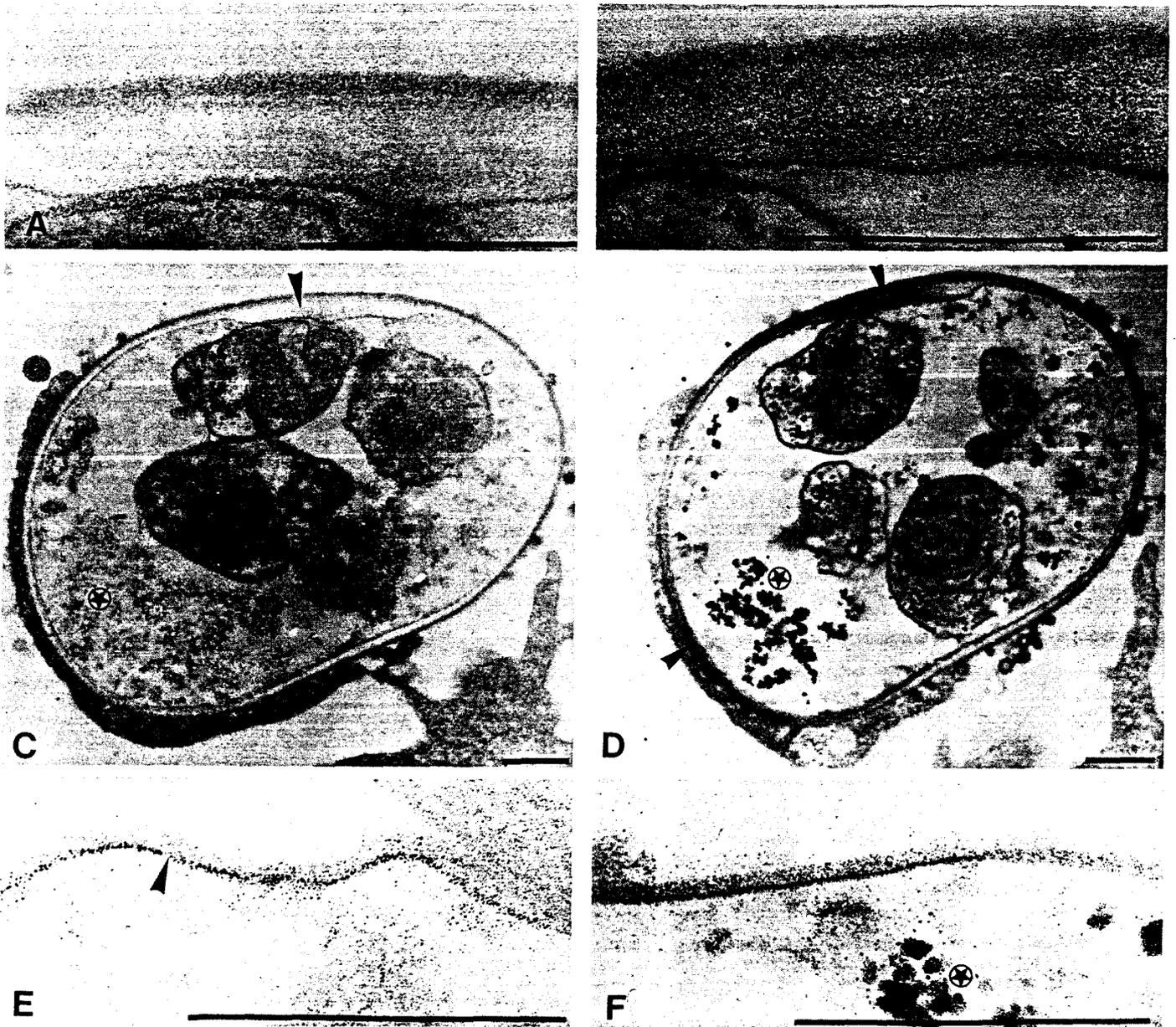
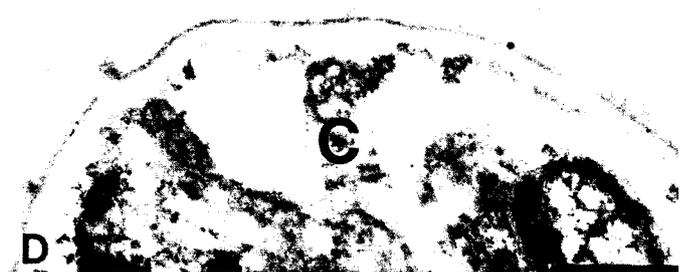
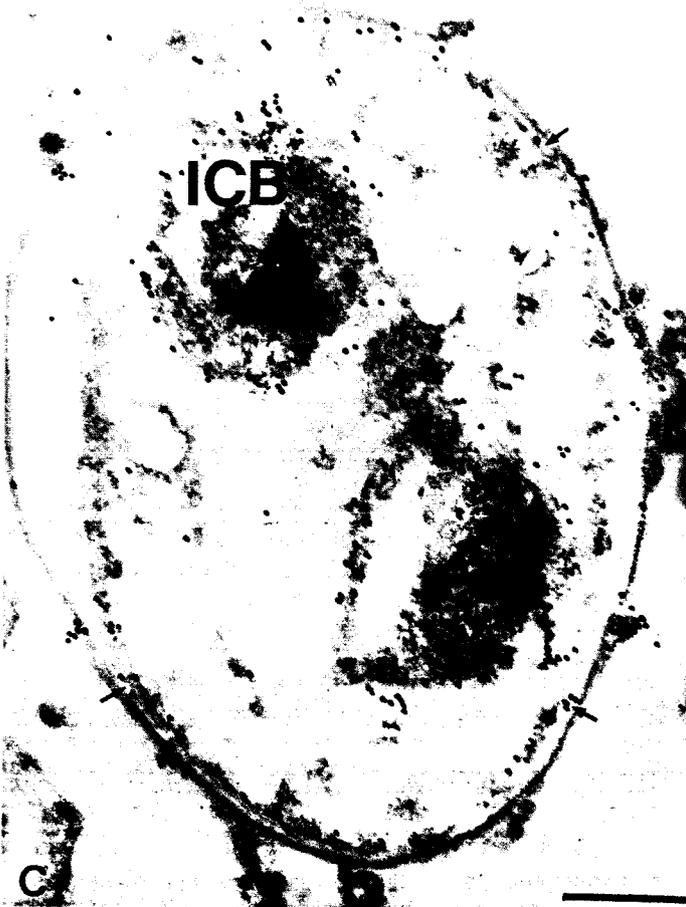
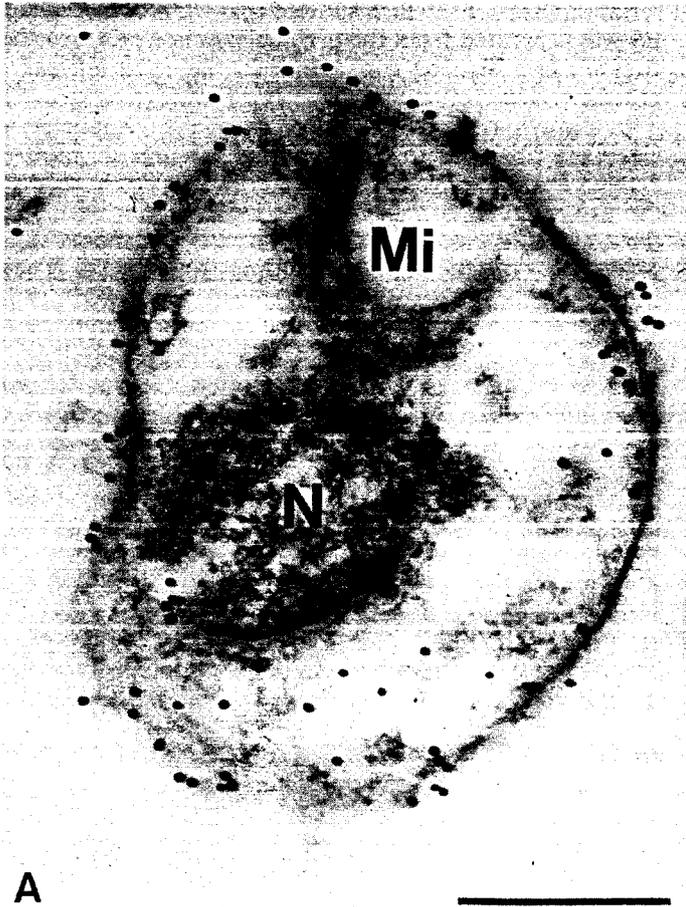


Fig 3. Detection of carbohydrates in *P. carinii* using PA-TSC-SP staining.

A. Control: when pretreatment with periodic acid was omitted no positive reaction to TSC-SP was observed on the cell wall (mature cyst); $\times 86\ 000$. B. High magnification of the same mature cyst wall showed in A, preincubated in periodic acid, and then incubated in TSC-SP reagent. The outer electron dense layer is not reactive to PA-TSC-SP. the less electron dense middle layer is weakly reactive: $\times 116\ 400$. C. Low magnification of the mature cyst showed in A (control). The middle layer of the cell wall (arrow head) and glycogen particles (star) are not stained; $\times 20\ 000$. D. Low magnification of the same mature cyst showed in B. The middle layer of the cell wall (arrow head) is heterogeneously reactive to PA-TSC-SP. Glycogen particles (star) are also reactive; $\times 20\ 000$. E. High magnification of the pellicle of a trophozoite in a control sample (without pretreatment with periodic acid). The cytoplasmic membrane is stained by TSC-SP (arrowhead) whereas the outer electron dense layer is no reactive; $\times 116\ 400$. F. Trophozoite stained by PA-TSC-SP. The electron dense layer is not reactive to PA-TSC-SP whereas glycogen particles are stained (star); $\times 10\ 000$. Bar: $0.5\ \mu\text{m}$.

Fig 4. Detection of carbohydrates of *P. carinii* with ConA-Au₂₀ ($120\ \mu\text{g}/\text{ml}$). A. Small trophozoite embedded in LRW showing many gold particles on the outer dense layer of its pellicle. Nucleus (N), mitochondria (Mi); $\times 54\ 000$. B. Small trophozoite embedded in Epon showing many gold particles in the cytoplasm and next to the endomembrane system (arrow). Pellicle and tubular expansion are also labeled; $\times 96\ 000$. C. Cell wall of a mature cyst (embedded in LRW) showing gold particles on its electron-dense and electron-lucent layers (arrows). The inner face of the plasma membrane is also labeled. The surface of intracystic body (ICB) is showing many gold particles; $\times 33\ 000$. D, E, F. control samples. D. Cyst (C) (embedded in Epon) incubated in 20 nm colloidal gold particles: no specific labeling is seen; $\times 33\ 000$. E. Trophozoite (T) (embedded in LRW) incubated in ConA-Au₂₀ and inhibitory sugar (α -D-mannopyranoside). No labeling is detected; $\times 47\ 000$. F. Degenerated cyst (DC) (embedded in LRW) preincubated in unlabeled ConA solution and then in ConA-Au₂₀. No gold particle is seen; $\times 36\ 000$. Bar: $0.5\ \mu\text{m}$.



was sometimes more distinct in the inner face of the plasma membrane (fig 4C). Tubular expansions and the remaining pellicle of "empty" trophozoites were sharply labeled.

A more intense intracytoplasmic labeling was observed in parasites embedded in Epon. The RER of trophozoites (fig 4B) and ICB was labeled by ConA-Au₂₀. Unsuspected vesicular structures were revealed after etching and labeling in the cystic forms. Controls were not labeled (fig 4D-F).

The avidin-biotin staining results are not related here, because in control experiments, the endomembrane system structures of trophozoites incubated only in the streptavidin colloidal gold conjugate were labeled (data not shown).

Phosphatase cytochemistry

In order to characterize Golgi and lysosome structures, phosphatase activities were investigated. Three substrates (CMP, TPP and β GP) were used. No CMPase activity was detected. In trophozoite, a TPPase activity was localized in the nucleus (fig 5A), in cytoplasmic vesicles and in the zone packaged by ES₁ (fig 5B). A non specific light staining was observed in the pellicle of trophozoites. No staining was found in precysts.

β -GPase activity was observed in the nucleus of trophozoites and early precysts (fig 5C, D, E). The pellicle of trophozoites occasionally presented a β -GPase activity, also found in the zone of attachment between parasites and host cells (fig 5E). Collapsed cysts also displayed β -GPase activity in degenerated cytoplasmic organelles (fig 5E). Controls did not display staining (data not shown).

Discussion

Investigations have been carried out using non-immunodepressed rabbits [19] in order to avoid the influence of corticosteroids during the observation of *P. carinii*. In this model, all parasite stages of *P. carinii* were found. However, daughter cell formation within thin-walled stages [24] was never observed in our model. Nucleus, mitochondria and RER were found in all stages of rabbit-derived *P. carinii*. Similar structures were described in rat- [2, 7, 9, 11-13, 20, 23, 24], human- [8] or mouse-derived *P. carinii*. In contrast, tubular expansions were less numerous in *P. carinii* from rabbit than in *P. carinii* from mouse (Dei-Cas *et al*, unpublished data).

Two types of ES structures were well detected, especially when the ZIO reagent was used. The first type of ES structures that packaged mitochondria or cytoplasm, suggested an autophagic activity and therefore, might be considered as a secondary lysosome. The TPPase activity, known as a marker of Golgi complex [17], was found in the cytoplasm packaged by this type of ES, indicating that Golgi activities may occur here.

The second type of ES structure was present in well developed trophozoites and in precysts with two or more nuclei. The appearance of such a structure in the trophozoite seemed to precede the binary fission of this form. This type of ES structure was always observed in intermediate precyst where nuclear divisions took place [6]. It may play a role in the division process. This hypothesis was consistent with the results of a study performed on

serial thin sections, which showed that the second type of ES was separated from the perinuclear cisterna when the first nuclear division took place in the *P. carinii* early precyst.

In a previous investigation [5], small cytoplasmic vesicles were observed in the trophozoitic stage of rabbit-derived *P. carinii* developing *in vitro*. In the present report, the use of the ZIO reagent made it possible to visualize these Golgi-like vesicles. Our observations strongly suggested their development by budding from the ES. They were not stained by the ZIO reagent when DTT pretreatment was omitted. The development of Golgi vesicles took place from the ICB to the precystic stages.

Carbohydrate was detected in the cell wall of rat-derived *P. carinii* [13, 26-28] but Golgi complex structures were not observed [25]. Using the ZIO method and serial thin sections of *P. carinii* isolated from young rabbits, we were able to observe Golgi structures. The present results on the cell wall carbohydrate composition are in agreement with the observations reported on the rat-derived *P. carinii* [28]. Indeed, while ConA labeled the outer-dense and the inner-lucent layers of the cyst cell wall, PA-TSC-SP only stained the inner layer. This suggested that the two layers are different in carbohydrate composition. Surface and cytoplasmic labeled structures were better preserved in LRW-embedded and in Epon-embedded samples, respectively.

A relatively small amount of carbohydrate was detected in the cell wall as well as in the endoplasmic reticulum which could be consistent with the apparently low activity of the Golgi complex. Recently, the use of zymolyase, whose key enzyme is β -1,3-glucan laminaripentaohydrolase, suggested the presence of β -1,3-glucans in the cyst wall [13]. Accordingly, echinocandins and papulocandins, two β -1,3-glucan synthesis inhibitors, were effective against *P. carinii in vivo* [18]. However, these compounds have shown limited inhibition of *P. carinii* β -1,3-glucan synthesis, and their mode of action against the parasite could be different from that in *C. albicans* [18]. β -1,3-glucans are not sensitive to periodic acid oxidation [14]. Although *P. carinii* stained with periodic acid-Schiff (PAS) [28], its staining was less intense than fungal reactivity (unpublished observations). The presence of highly-ramified carbohydrate polymers could also explain the poor staining and labeling observed.

Although *P. carinii* shared tinctorial affinity, biochemical, cytochemical, and genomic characteristics with fungal organisms [6, 10], the cyst wall was less reactive to ConA and PA-TSC-SP than the cell wall of *C. albicans* [16]. The cell wall of this yeast is about 200-300 nm thick and nine layers were distinguished by Thiéry's staining [16]. In contrast, the cyst wall of *P. carinii* is about 100 nm thick and Thiéry's reagent only stained the inner electron-lucent layer. In addition, although the reactivity of the *P. carinii* cell wall to ConA was considered strong [4, 27, 28], the lectin solution used in *C. albicans* studies was usually less concentrated [22] than that used for *P. carinii*. More precisely, the concentration of ConA-Au used to label the cell wall of *C. albicans* is 8-10 μ g/ml (JC Cailliez, personal communication). In contrast, the concentration of ConA-Au used to label cyst wall of *P. carinii* is about 100-240 μ g/ml [28, and present work].

For indirect labelling, using avidin-Au₁₀ control samples (not pre-incubated in ConA-biotin) were labeled. This could be due to experimental conditions. However, the presence of biotin may also explain this labeling.

β -GPase and TPPase activities in cytoplasmic vesicles

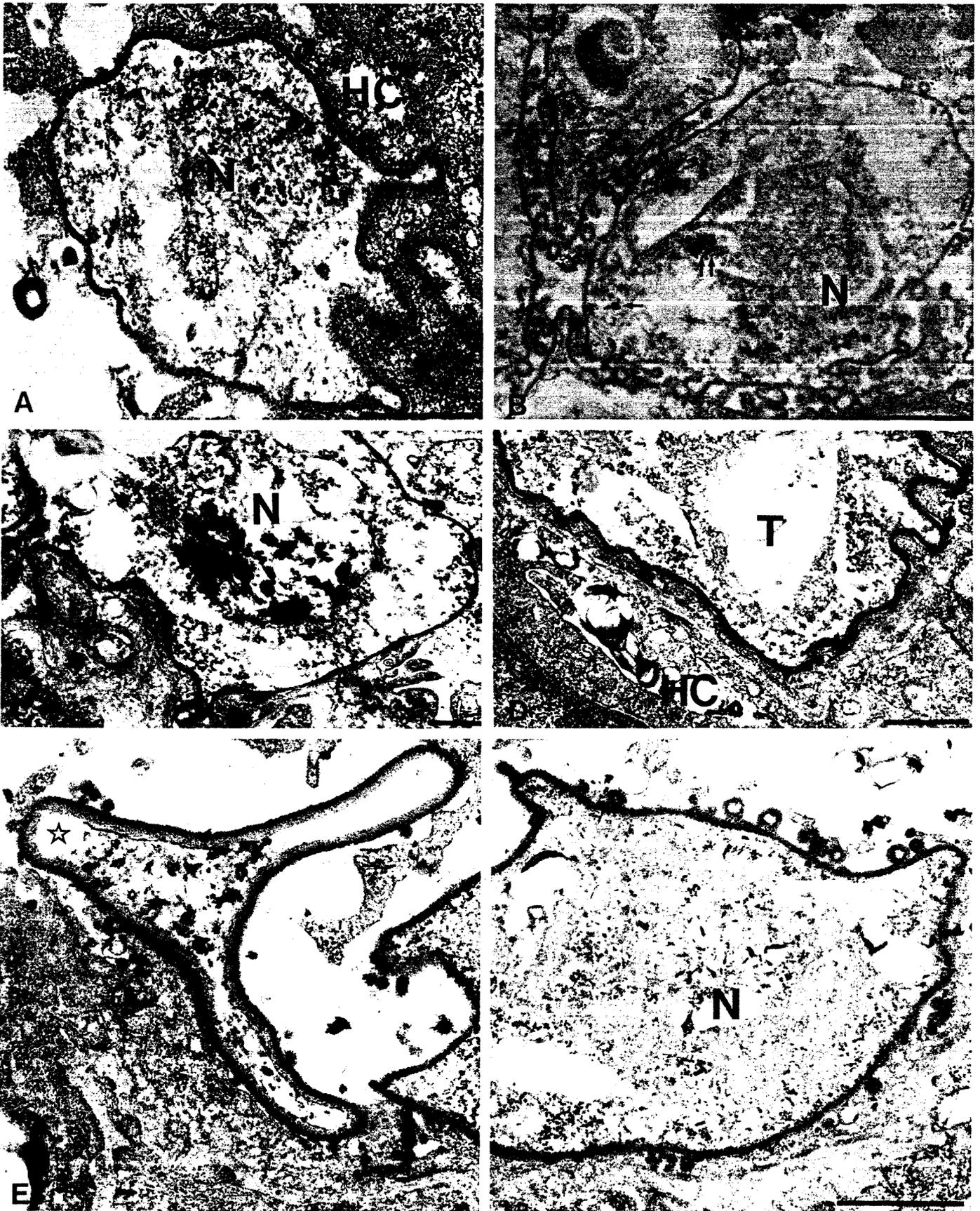


Fig 5. Ultrastructural localization of phosphatase activity in *P. carinii*. A. Trophozoite TPPase activity is detected in the nucleus (N). Host cell (HC); $\times 44000$. B. Trophozoite TPPase activity is present in the nucleus (N), in the Golgi vesicles (arrow) and in the cytoplasmic area (double arrow) packaged by ES. Unspecific staining is observed in the pellicle; $\times 24200$. C. Trophozoite β -GPase activity is detected in the nucleus (N) and in a cytoplasmic area next to the nucleus; $\times 18800$. D. Trophozoite (T) β -GPase activity is also observed on the zone of attachment to the host cell (HC); $\times 30000$. E. β -GPase activity is seen in the nucleus of a precyst (N) and in the cytosol of a degenerated cyst (open star); $\times 46000$. Bar: $0.5 \mu\text{m}$.

are additional proof of the presence of primary lysosomes and Golgi vesicles [17]. Moreover, in a recent study of 3-dimensional reconstruction (in preparation), it was shown that large-sized trophozoite and intermediate precyst displayed more than 200 Golgi vesicles. Transition from the bi-layered to the three-layered stage may involve higher activity of the cell wall compound synthesis. β -GPase activity was also observed in the pellicle of trophozoites, particularly at the attachment zone. This suggests a phosphatase activity at the host cell parasite interface. The presence of lead phosphate precipitates in the nucleus, which is considered by some authors as artefact [1], has previously been reported in *P. carinii* using *p*-nitrophenylphosphate as a substrate [2].

Acknowledgments

This study was supported in part by the "Agence Nationale de Recherche sur le SIDA" (ANRS) and by a research grant from the "Conseil Régional Nord-Pas de Calais". The authors would like to express their gratitude to J Herbaut for her invaluable co-operation and technical assistance.

References

- Barka T, Anderson PJ (1962) Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J Histochem Cytochem* 10, 741-753
- Barton EG, Campbell WG (1969) *Pneumocystis carinii* in lungs of rats treated with cortisone acetate. *Am J Pathol* 54, 209-236
- Benchimol M, De Souza W (1985) *Trichomonas foetus*: cytochemical visualization of the endoplasmic reticulum-Golgi complex and lipids. *Exp Parasitol* 59, 51-58
- Cushion MT, De Stephano JA, Walzer PD (1988) *Pneumocystis carinii*: Surface reactive carbohydrates detected by lectin probes. *Exp Parasitol* 67, 137-147
- Dei-Cas E, Soulez B, Camus D (1989) Ultrastructural study of *Pneumocystis carinii* in explant cultures of rabbit lung and cultures with and without feeder cells. *J. Protozool* 36, 55S-57S
- Dei-Cas E, Soulez B, Palluault F, Charet P, Camus D (1990) *Pneumocystis carinii*, un défi pour les biologistes. *Med Sci* 6, 517-525
- Ham EK, Greenberg SD, Reynolds RC, Singer DB (1971) Ultrastructure of *Pneumocystis carinii*. *Exp Mol Path* 14, 362-372
- Haque A, Plattner SB, Cook RT, Hart MN (1987) *Pneumocystis carinii*. Taxonomy as viewed by electron microscopy. *Am J Clin Pathol* 87, 504-510
- Hughes WT (1987) *Pneumocystis carinii* pneumonitis. Vol 1. CRC Press Inc, Boca Raton, 131 p
- Hughes WT (1989) *Pneumocystis carinii*: taxing taxonomy. *Eur J Epidemiol* 5, 265-269
- Itatani CA, Marshall GJ (1988) Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* in situ and from bronchoalveolar lavage. *J Parasitol* 74, 700-712
- Matsumoto Y, Yoshida Y (1984) Sporogony in *Pneumocystis carinii*: Synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J Protozool* 31, 420-428
- Matsumoto Y, Matsuda S, Tegoshi T (1989) Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 36, 21S-22S
- Novikoff AB, Novikoff PM (1977) Cytochemical contributions to differentiating GERL from Golgi apparatus. *Histochem J* 9, 525-551
- Pesanti EL, Shanley JD (1988) Glycoproteins of *Pneumocystis carinii*: characterization by electrophoresis and microscopy. *J Infect Dis* 158, 1353-1359
- Poulain D, Hopwood V, Vernes A (1985) Antigenic variability of *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* 12, 223-270
- Rambourg A, Leblond Y (1990) L'appareil de Golgi: apport de la microscopie électronique tridimensionnelle à l'étude de sa structure et de ses fonctions. *Med Sci* 6, 35-45
- Schmatz D, Romancheck M, Pittarelli L, Schwartz R, Fromtling R, Nollstadt K, Vanmiddlesworth F, Wilson K, Turner M (1990) Treatment of *Pneumocystis carinii* with 1, 3- β glucan synthesis inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5950-5954
- 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, 355-356
- Takeuchi S (1980) Electronmicroscopic observation of *Pneumocystis carinii*. *Jpn J Parasitol* 29, 427-453
- Thiéry JP (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microsc* 6, 987-1018
- Tronchin G, Poulain D, Vernes A (1984) Cytochemical and ultrastructural studies of *Candida albicans*. III. Evidence for modifications of the cell wall coat during adherence to human buccal epithelial cell. *Arch Microbiol* 139, 221-224
- Vavra J, Kucera K (1970) *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J Protozool* 17, 463-483
- Vossen MEMH, Beckers PJA, Meuwissen JHETH, Stadhouders AM (1978) Developmental biology of *Pneumocystis carinii*, an alternative view on the life cycle of the parasite. *Z Parasitenk* 55, 101-118
- Yoshida Y (1989) Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 36, 53-60
- Yoshikawa H, Yoshida Y (1987) Localization of silver deposits on *Pneumocystis carinii* treated with Gomori's methenamine silver nitrate stain. *Zentralbl Bakteriologie Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt Orig Reihe A* 264, 363-372
- Yoshikawa H, Tegoshi T, Yoshida Y (1987) Detection of surface carbohydrates on *Pneumocystis carinii* by fluorescein conjugated lectins. *Parasitol Res* 74, 43-49
- Yoshikawa H, Morioka H, Yoshida Y (1988) Ultrastructural detection of carbohydrates in the pellicle of *Pneumocystis carinii*. *Parasitol Res* 74, 537-543

Techniques

Application of 3-D Computer-aided Reconstruction in Parasitology

F. Palluault, B. Pietrzyk, E. Dei-Cas and D. Camus

Three-dimensional (3-D) reconstruction is sometimes useful to describe the fine morphology^{1,2} of the subcellular organization of parasites. François Palluault, Bruno Pietrzyk, Eduardo Dei-Cas and Daniel Camus show how computer-aided reconstruction from serial sections is done.

Pneumocystis carinii, the major opportunistic pathogen found in lungs of patients suffering from acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), is an eukaryotic microorganism. All stages of its life cycle³⁻⁶ are found in the lungs of several mammals. The life cycle (Fig. 1) includes three forms: a mononucleate trophozoite, a precyst and a mature cyst containing eight intracystic bodies that will evolve to trophozoite forms. Electron microscopy has made it possible to distinguish three precystic stages, where the number of nuclei increases from one to eight in the early, intermediate and late precysts³.

The trophozoite and the early precyst have a thin pellicle (20–24 nm) consisting of a plasma membrane and an electron-dense outer layer. The other precystic stages and mature cyst have a thick pellicle (40–140 nm) consisting of a

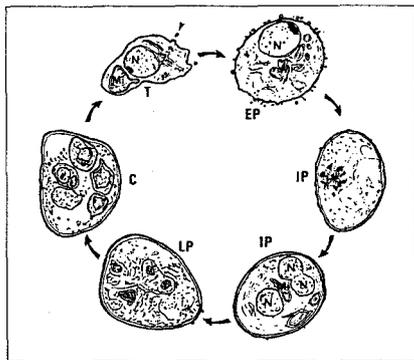
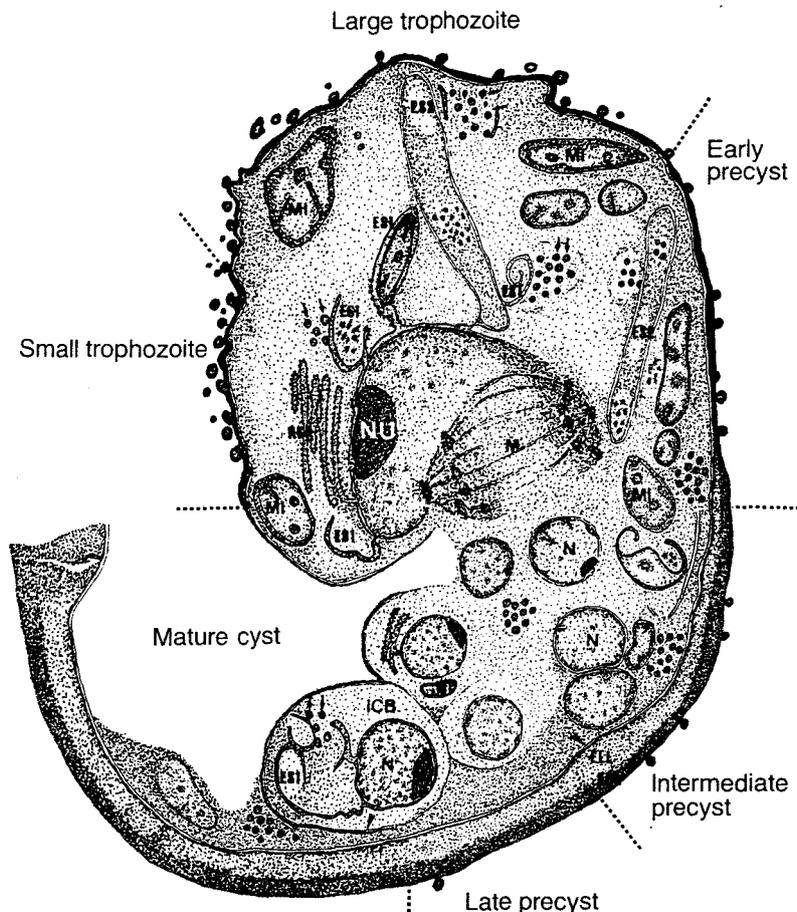


Fig. 1. Life cycle of *Pneumocystis carinii*. Arrows indicate the hypothetical succession of the different stages. Cyst containing intracystic bodies (C); early precyst (EP); intermediate precyst (IP); late precyst (LP); trophozoite (T); mitochondria (Mi); nucleus (N). The arrowhead indicates the tubular expansions.

Box 1. Endomembranous Structures of *Pneumocystis carinii*

The development of the endomembranous system, of the mitochondria and of the surface structures of the trophozoite, precyst and cyst of rabbit-derived *Pneumocystis carinii* is shown in the schematic drawing. The highly complex endomembranous system has been described from analysis of serial thin sections. This has made it possible to visualize the Golgi complex consisting of several Golgi vesicles. Fifteen Golgi vesicles can be detected in the cytoplasm of small trophozoites, and more than 135 are seen in intermediate precysts. Two kinds of endoplasmic saccules (ES) are found next to the Golgi vesicles: the first type (ES1) is seen in the small–large trophozoite stages, where eight ES1 have been recorded. These communicate with the perinuclear cisterna, and Golgi vesicles bud from the ES1. Mitochondria are detected in the cytoplasm surrounded by the ES1, suggesting that autophagy occurs. The second kind of endoplasmic saccule (ES2) is seen in the cytoplasm of the large trophozoite and in the precystic stages. The ES1 and ES2 usually degenerate in the late precystic and cystic stages and the change from a trophozoite with a bilayered pellicle to a three-layered cyst occurs simultaneously with the development of the endomembranous structures.



Electron-dense outer layer (EDL); electron-lucent layer (ELL); first kind of endoplasmic saccule (ES1); second kind of endoplasmic saccule (ES2); intracystic body (ICB); nucleus (N); nucleolus (NU); rough endoplasmic reticulum (RER). The arrowhead shows the plasma membrane and the double arrow identifies the Golgi vesicles.

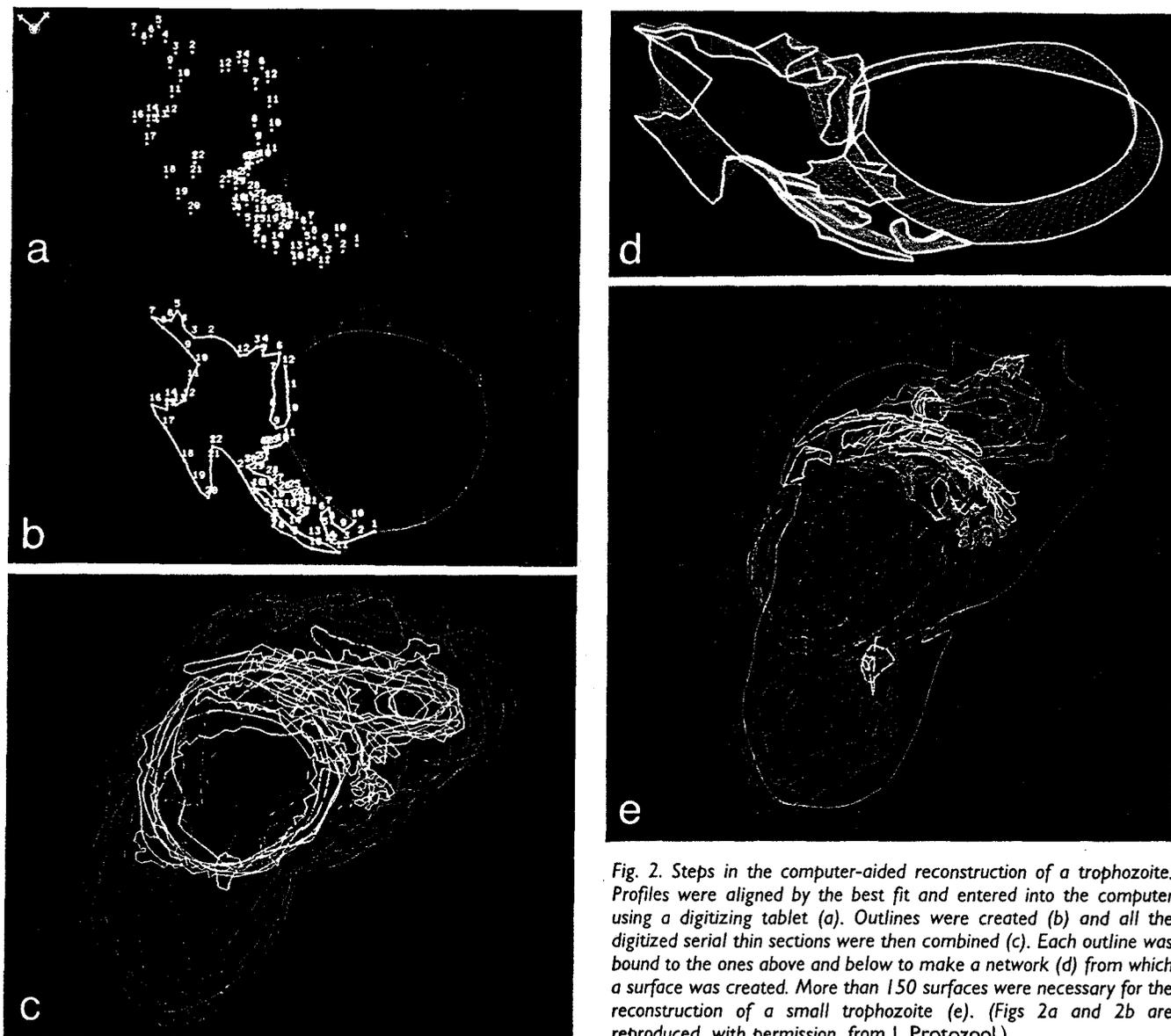


Fig. 2. Steps in the computer-aided reconstruction of a trophozoite. Profiles were aligned by the best fit and entered into the computer using a digitizing tablet (a). Outlines were created (b) and all the digitized serial thin sections were then combined (c). Each outline was bound to the ones above and below to make a network (d) from which a surface was created. More than 150 surfaces were necessary for the reconstruction of a small trophozoite (e). (Figs 2a and 2b are reproduced, with permission, from J. Protozool.)

plasma membrane, an electron-lucent middle layer and an electron-dense outer layer.

Recently, it has been shown that *P. carinii* has a highly complex endomembranous structure that develops during its life cycle (Box 1 and Ref. 6). The highly complex ultrastructural morphology of the *P. carinii* endomembranous system has led us to use computerized 3-D reconstruction from serial thin sections of the parasite. This technology has made possible a better understanding of this highly complex structure.

For our work, serial thin sections (100–120 nm) of *P. carinii*-parasitized rabbit lung were made with a Reichert-Jung ultramicrotome, put on one-hole Formvar-coated grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. Samples were observed and photographed at 75 kilovolts (kV) on a Hitachi H-600 electron microscope.

Computer-aided Reconstruction

Computer-aided reconstructions (Fig. 2) from serial thin sections were made using the CATIA system (Conception Assistée Tridimensionnelle InterActive), a program developed by aeroplane manufacturers (Dassault systèmes, BP 310, 92156 Suresnes, Cedex, France)*. Host system (IBM 4341) under VM/CMS running a virtual machine with 15 megabytes of memory and 200 megabytes of hard disk has been required. Images were displayed using an IBM 5080 workstation with a resolution of 928 × 928 pixels, developing 128 colours.

*Investigators interested in biological applications of CATIA software should contact Hautes Etudes Industrielles, 13 rue de Toul, 59800 Lille, France through Bruno Pietrzyk, HEI graduate engineer, Vision and 3-D Imaging Department.

For each section, profiles were drawn on a clear acetate sheet, outlining cell wall, tubular expansions, nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi complex and mitochondria. Each sheet was then aligned to others by the best fit of the profiles and was manually entered into the computer, using a digitizing tablet. Individual points (Fig. 2a), a set of points or whole sections can be deleted and replaced. Each digitized point was bound to the next one to create outlines (Fig. 2b). Other sheets were then processed identically (Fig. 2c). Each outline was bound to the ones above and below to make a network (Fig. 2d); this network was used to create a surface. Many surfaces were elaborated for the reconstruction of each organelle; more than 150 surfaces were performed for a small-sized trophozoite (Fig. 2e). Tangency between surfaces was established.

Colours, intensity, translucence and ambient light(s) were chosen and applied to each pixel of the surface(s) to produce realistic, shaded images of the parasite (Fig. 3). With our conditions, it took 5.5 h to perform the shading of the trophozoite shown in Fig. 3.

Serial thin sections make it possible to describe precisely the structure of each organelle and numerous micrographs are necessary to understand the complex outlines observed. The CATIA Dassault system program is useful to collate these data into informative images and makes it possible to define the size, the spatial configuration and the relative volume occupied by the organelles. Nevertheless, 3-D reconstruction should be developed only after a careful ultrastructural study of the parasite. This implies a prior definition of an adapted protocol to avoid artefacts resulting from specimen preparation for electron microscopy.

A better understanding of the ultrastructural architecture of rabbit-derived *P. carinii* stages allows the formulation of hypotheses on the evolution and physiology of the endomembrane system.

Thus, the well-developed endoplasmic saccular structure and the presence of more than 230 Golgi vesicles in its vicinity might be implicated in the differen-

tiation of the parasite surface structures and might also be related to nuclear division and the development of intracyclic bodies.

Acknowledgements

During this work, François Palluault was funded by a scholarship of the Conseil Régional Nord-Pas de Calais. This investigation was supported in part by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS). We gratefully thank Christian Slomianny for his advice and help.

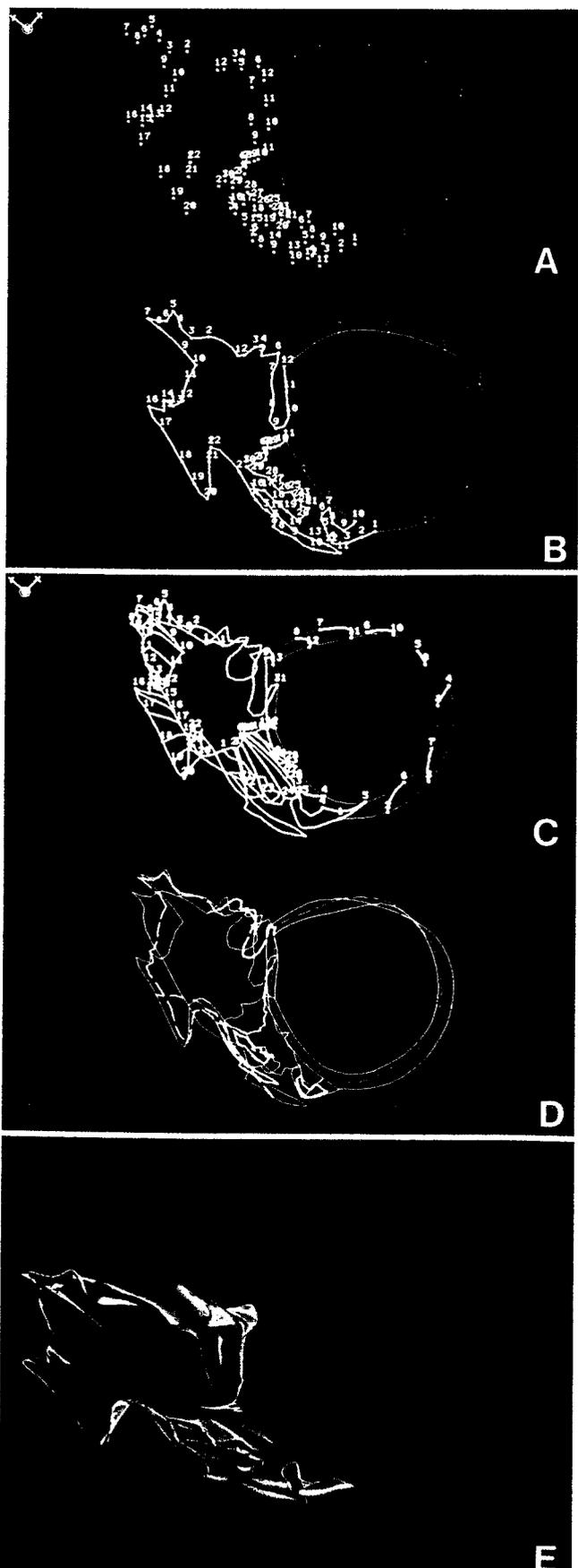
References

- 1 Slomianny, C., Prensier, G. and Charet, P. (1985) *Parasitology* 90, 579–588
- 2 Dei-Cas, E., Dhainaut-Courtois, N. and Vernes, A. (1980) *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 55, 69–86
- 3 Matsumoto, Y. and Yoshida, Y. (1986) *Parasitology Today* 2, 137–142
- 4 Yoshida, Y. (1989) *J. Protozool.* 36, 53–60
- 5 Dei-Cas, E. et al. (1990) *Med. Sci.* 6, 517–525
- 6 Palluault, F. et al. (1990) *Biol. Cell* 70, 73–82

François Palluault, Eduardo Dei-Cas and Daniel Camus are at Unité 42, INSERM, 369 rue Jules Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, France and Bruno Pietrzyk is at Hautes Etudes Industrielles, 13 rue de Toul, 59800 Lille, France.



Fig. 3. Three-dimensional reconstruction of a small trophozoite. The nucleus is in red, the endoplasmic reticulum in yellow, the mitochondrion in blue, the first kind of endoplasmic saccule (ESI) in grey and the Golgi vesicles and surface pellicle (with tubular expansions) in green. (Reproduced, with permission, from *J. Protozool.*)



located next to the autophagic vacuole and the RER (Fig. 2B, circle and inset; Fig. 3A, 3B, and 3D, green; and Fig. 4 through the nucleus).

The mitochondrion (Fig. 2A and 2B, arrowhead; Fig. 3, blue) occupying a large cytoplasmic volume showed many budding zones that were in various stages of development.

The pellicle (Fig. 4, green) showed some tubular expansions that appeared as folds.

DISCUSSION

Using serial-thin sections, we could identify precisely the structure of each organelle, and using numerous micrographs we could understand the complex outlines observed. Then, the CATIA Dassault system program was useful for producing rigorous and realistically shaded images. This system made it possible for us to define the sizes and relative volumes occupied by the organelles.

In so far as the cytophysiological importance of an organelle is related to its volume, the mitochondrion is the main organelle of the small trophozoite. Therefore, cellular energy transformation could be the main physiological process in this life cycle stage.

Autophagy by secondary lysosomes (autophagic vacuoles), a general property of eukaryotic cells, is related to normal renovation and turnover of cellular components. The development of autophagy has been observed in certain conditions, for example in protozoa deprived in nutrients [4]. This was consistent with our observations that this trophozoite (size $\sim 1.5 \mu\text{m}$) was observed in the alveolar lumen but was not attached to epithelial alveolar cells. Indeed attachment with a type I pneumocyte seems to be an obligatory process for the growth and development of trophozoite stage [17]. Then, although the nucleus and cytoplasmic organelles appeared ultrastructurally normal, this small trophozoite might need contact with a type I pneumocyte [3] (Fig. 2).

The low number of tubular expansions and Golgi vesicles, and a relatively small ER (smooth or rough) might suggest that in a small trophozoite, protein synthesis and glycosylation processes implicated in the pellicle development worked at a low level.

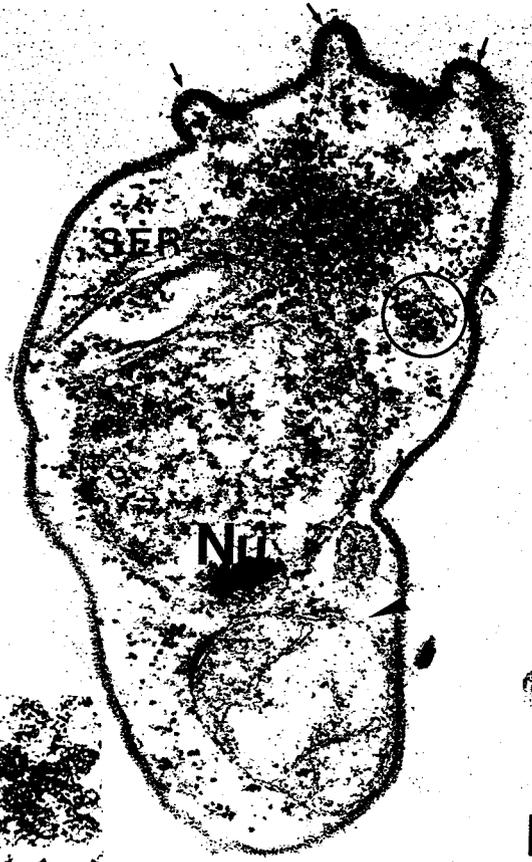
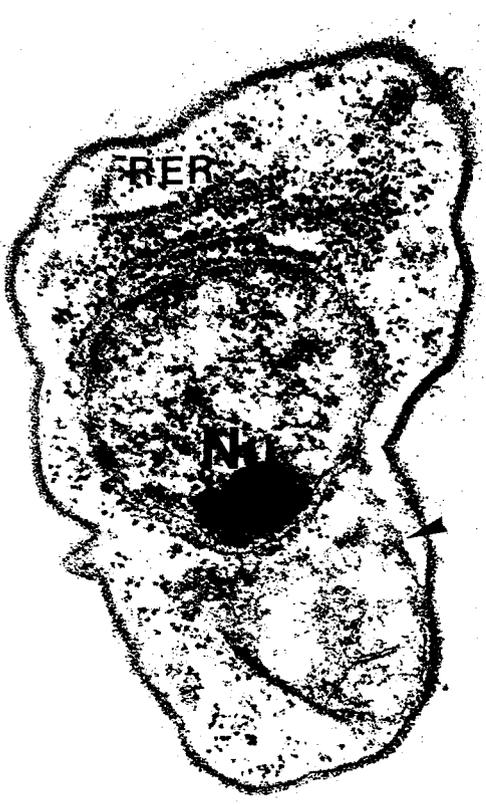
In conclusion, the three-dimensional reconstruction of this small trophozoite enabled us to better understand the morphological relationship among organelles and to suggest cytophysiological hypotheses. The three-dimensional reconstruction of the other parasitic stages will provide information about the evolution of organelles during the life cycle and about their physiology [11].

ACKNOWLEDGMENTS

During this work, Francois Palluault was on scholarship from the Conseil Régional Nord-Pas de Calais. This investigation was supported in part by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS). We gratefully thank Dr. Daniel Poulain for his

←

Fig. 1. Computer-aided reconstruction. Profiles drawn on clear acetate sheets outlining the cell wall, tubular expansions, nucleus (red), endoplasmic structures (yellow and grey), Golgi vesicles, and mitochondria are aligned by the best fit and are entered into the computer using a digitizing tablet (A). Each digitized point is bound to the other one to create the outlines (B) that are bound to the one above and below to create a network (C, white lines). This network creates a surface (D, dotted lines, and blue lines). The reconstruction is ended by the production of a realistic shaded image of the surfaces (E).



A

B



C

D



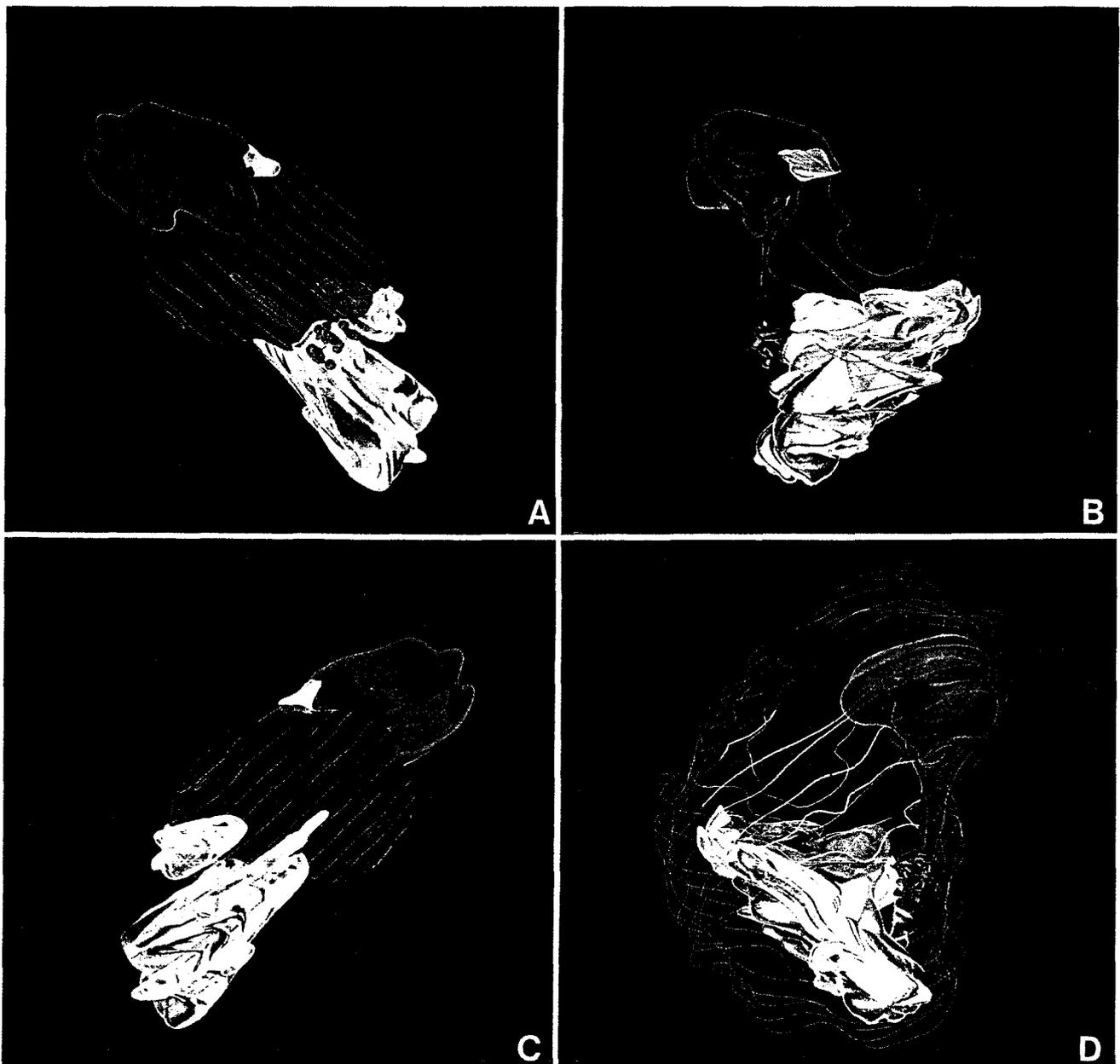


Fig. 3. Three-dimensional reconstruction of a small trophozoite. Nucleus (red) occupies more than 30% of the cell volume. A mitochondrion (blue) appears as the main organelle and shows budding zones. ER (yellow) is apparently weakly developed. The tubular smooth ER (C) is connected with the autophagic vacuole (grey), which occupies a large volume (A, C, D), presents many small dilated zones (C) and hollow (A). Golgi vesicles (green, A, B, D). The pellicle is represented by the digitized outlines (green).

Fig. 2. Serial-thin sections of a small trophozoite. Bar = 0.5 μ m. Nucleus with one nucleolus (A and B, Nu), lace-like RER (A, RER), tubular smooth ER (B, SER), and a mitochondrion with budding area (A and B, arrowhead); autophagic vacuole with intricate outlines connects with the perinuclear cisterna and occupies a large cytoplasmic area (C and D, double arrowhead); Golgi vesicles (B, circle and inset). Pellicle shows tubular expansions (B, small arrow).

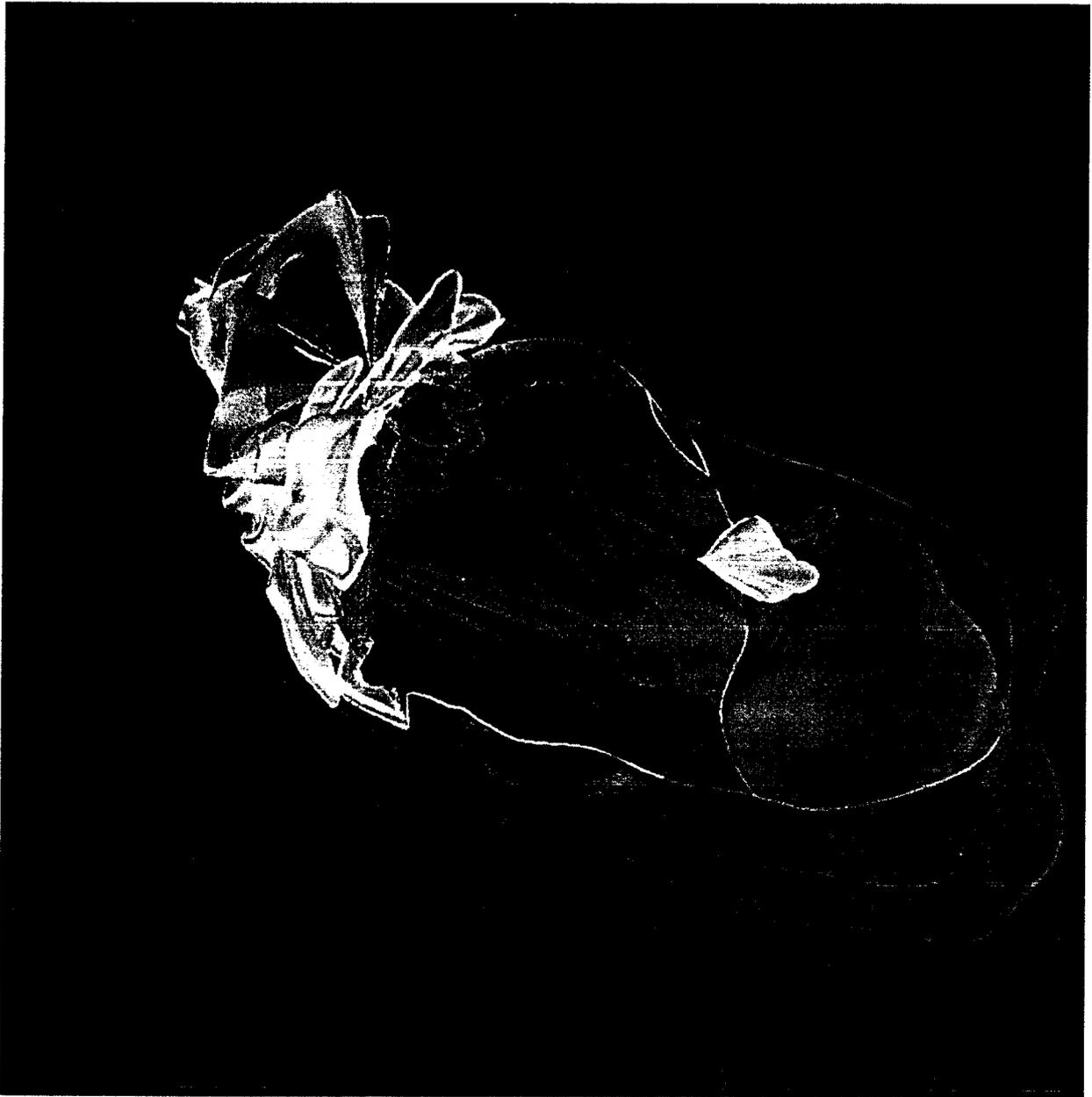


Fig. 4. Three-dimensional reconstruction of a small trophozoite. The ER (yellow) is made of tubular-ramified endomembranous structures that communicate with the perinuclear cisterna and the autophagic vacuole (grey). Pellicle (green) is partially reconstructed. Four tubular expansions (seen as folds) are located near the autophagic vacuole and a single one is located near the mitochondrion.

constant encouragement, and Jacqueline Herbaut and Alain Plockyn for their technical advice.

LITERATURE CITED

1. Barton, E. G. & Campbell, W. J. 1969. *Pneumocystis carinii* in lungs of rats treated with cortisone acetate. *Am. J. Pathol.*, **54**:209-236.
2. Dei-Cas, E., Soulez, B. & Camus, D. 1989. Ultrastructural study of *Pneumocystis carinii* in explant cultures of rabbit lung and cultures with and without feeder cells. *J. Protozool.*, **36**:55S-57S.
3. Dei-Cas, E., Soulez, B., Palluault, F., Charet, P. & Camus, D. 1990. *Pneumocystis carinii*, un défi pour les biologistes. *Médecine/Sciences*, **6**:517-525.
4. DeRobertis, E. D. P. & DeRobertis, E. M. F. 1980. Cell and Molecular Biology, 7th ed. Holt-Saunders International Editions, Tokyo.
5. Ham, E. K., Greenberg, S. D., Reynolds, R. C. & Singer, D. B. 1971. Ultrastructure of *Pneumocystis carinii*. *Exp. Molec. Pathol.*, **14**:362-372.
6. Haque, A., Plattner, S. B., Cook, R. T. & Hart, M. N. 1987. *Pneumocystis carinii*. Taxonomy as viewed by electron microscopy. *Am. J. Clin. Pathol.*, **87**:504-510.
7. Itatani, C. A. & Marshall, G. J. 1988. Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* in situ and from bronchoalveolar lavage. *J. Parasitol.*, **74**:700-712.
8. Matsumoto, Y. & Yoshida, Y. 1984. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J. Protozool.*, **31**:420-428.

9. Matsumoto, Y., Matsuda, S. & Tegoshi, T. 1989. Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.*, **36**:21S–22S.
10. Palluault, F., Dei-Cas, E., Slomianny, C., Soulez, B. & Camus, D. 1990. Golgi complex and lysosomes in rabbit derived *Pneumocystis carinii*. *Biol. Cell*, **70**:73–82.
11. Palluault, F., Pietrzyk, B., Dei-Cas, E., Slomianny, C., Soulez, B. & Camus, D. 1991. Three-dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii*. II. Intermediate precyst. *J. Protozool.*, **38**:407–411.
12. Pesanti, E. L. & Shanley, J. D. 1988. Glycoproteins of *Pneumocystis carinii*: characterization by electrophoresis and microscopy. *J. Infect. Dis.*, **158**:1353–1359.
13. 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**:355–356.
14. Takeuchi, S. 1980. Electronmicroscopic observation of *Pneumocystis carinii*. *Jap. J. Parasit.*, **29**:427–453.
15. Vavra, J. & Kucera, K. 1970. *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J. Protozool.*, **17**:463–483.
16. Vossen, M. E. M. H., Beckers, P. J. A., Meuwissen, J. H. E. Th. & Stadhouders, A. M. 1978. Developmental biology of *Pneumocystis carinii*, an alternative view on the life cycle of the parasite. *Z. Parasitenk.*, **55**:101–118.
17. Yoshida, Y. 1989. Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.*, **36**:53–60.
18. Yoshikawa, H. & Yoshida, Y. 1987. Localization of silver deposits on *Pneumocystis carinii* treated with Gomori's methenamine silver nitrate stain. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A*, **264**:363–372.
19. Yoshikawa, H., Morioka, H. & Yoshida, Y. 1988. Ultrastructural detection of carbohydrates in the pellicle of *Pneumocystis carinii*. *Parasitol. Res.*, **74**:537–543.

Received 12-17-90; accepted 4-22-91

Three-Dimensional Reconstruction of Rabbit-Derived *Pneumocystis carinii* from Serial-Thin Sections II: Intermediate Precyst

FRANCOIS PALLUAULT,¹ BRUNO PIETRZYK,² EDUARDO DEI-CAS,^{1,3}
CHRISTIAN SLOMIANNY,¹ BENOIT SOULEZ,^{1,3} and DANIEL CAMUS,^{1,3}

¹I.N.S.E.R.M. (U. 42), Unité de Biologie et Biochimie Parasitaires et Fongiques, domaine du C.E.R.T.I.A., 369,
rue Jules-Guesde, Flers-Bourg, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

²Hautes Etudes Industrielles, 13, rue de Toul, 59800 Lille, France and

³Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille, France

ABSTRACT. Three-dimensional reconstruction of a binucleate intermediate precyst of *Pneumocystis carinii* was performed from serial-thin sections using the CATIA (Conception Assistée Tridimensionnelle Inter Active) Dassault system program. The presence of a mitochondrion, complex well-developed endoplasmic structures, and numerous Golgi vesicles was established. A better understanding of the ultrastructure of rabbit-derived *P. carinii* stages made it possible to formulate hypotheses on the evolution and physiology of the endomembrane system. Thus, the presence of the well-developed endoplasmic saccular structure and more than 230 Golgi vesicles in its vicinity might be implicated in the differentiation of the parasite surface structures and might also be related to nuclear division and individualization of intracystic bodies.

Key words. Computer-aided reconstruction, endomembrane system, Golgi complex, life cycle, ultrastructure.

As shown in our companion paper [7], the three-dimensional computer-aided reconstruction from serial-thin sections was a high technology method that made it possible to more clearly understand the highly complex endomembrane system of the *Pneumocystis carinii* trophozoite. In the present paper we use the same methods to describe the endomembrane system of a binucleate intermediate precyst stage characterized by the presence of a three-layered pellicle and nuclear divisions [2, 5, 6]. We also discuss hypotheses on the evolution and physiology of the endomembrane system.

MATERIALS AND METHODS

Biological models, serial-thin sections for electron microscopy and computer-aided reconstruction methods were similar to those previously described [7].

RESULTS

Serial-thin sections. Two nuclei, with one nucleolus each, were located at opposite poles of the cell near the plasma membrane (Fig. 1).

Many cross sections of the mitochondrion (Fig. 1, arrowhead) were observed. Two mitochondrial portions, slightly connected

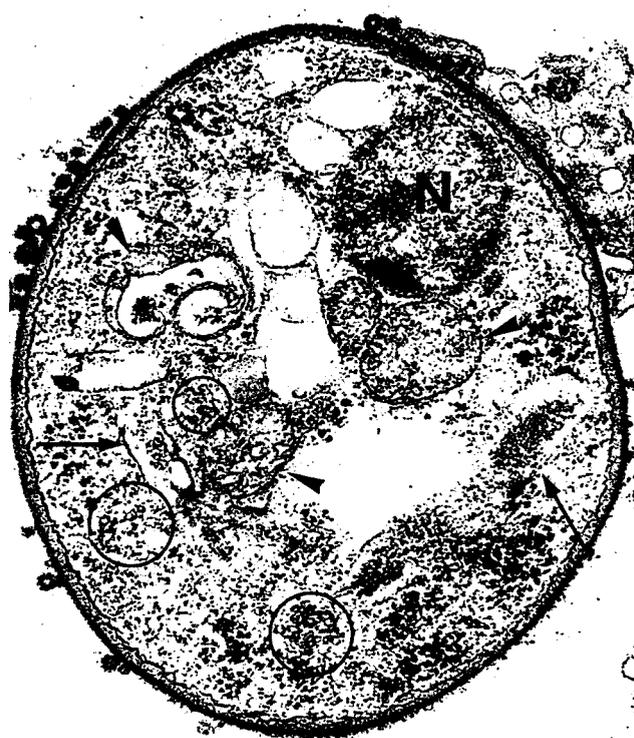
(Fig. 1C, arrowhead), were distinguished. The first presented a spiral form with a distended zone (Fig. 1C and 1D). Glycogen granules were observed in the cytoplasmic area enclosed within the whorl of this structure. The second appeared as many round or elongated cross sections of the mitochondrion.

Many cross sections of a well-developed endoplasmic saccule (ES) were observed (Fig. 1, arrow). This ES did not communicate with perinuclear cisternae and no rough endoplasmic reticulum was seen.

On the other hand, many clusters of Golgi vesicles were observed in the vicinity of the ES (Fig. 1, circle), including a few in the cytoplasmic area included by the ES structure.

Computer-aided reconstruction. Nuclei were not the largest structures of this *P. carinii* organism (Fig. 2, red). The ES, the most developed organelle in this parasitic stage (Fig. 2 and 3, grey), consisted of five flattened, interconnected cisternae (Fig. 2 and 3).

More than 230 Golgi vesicles were counted that were clustered in five groups. These groups were observed next to the ES in the cytoplasmic volume surrounded by the ES, and next to the cell wall. A few Golgi vesicles were seen budding from the ES (Fig. 2 and 3A, lower left; and Fig. 2 and 3D, upper left). Another group was observed next to a nucleus.



A



B



C



D

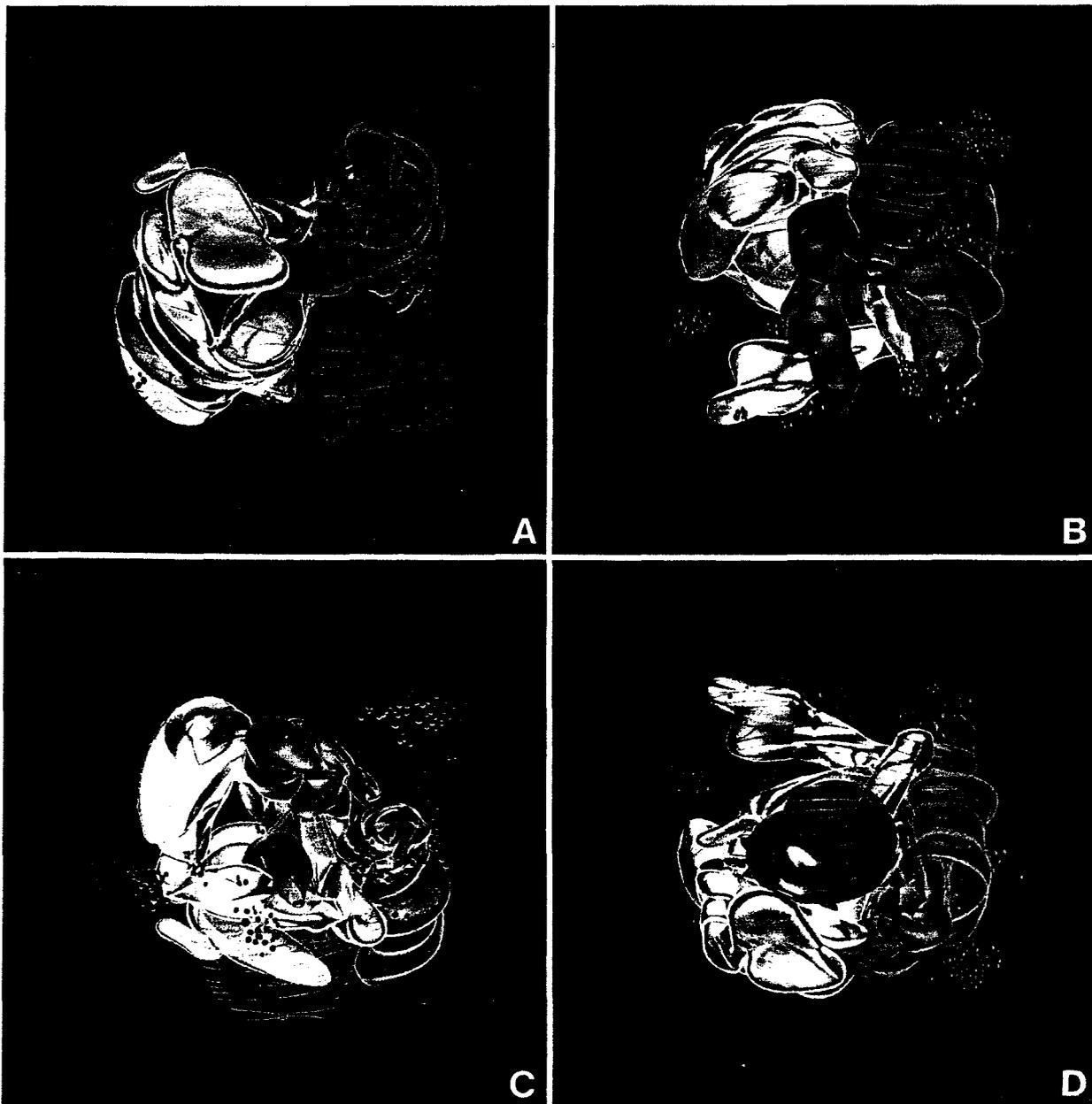


Fig. 2. Three-dimensional reconstruction of the intermediate precyst with two nuclei (red), ES structure (grey), mitochondrion (blue), and 235 Golgi vesicles (green). The precyst wall is represented by digitized outlines.

The mitochondrion was highly developed. The helicoidal portion and the elongated bud occupied a large portion of the cytoplasm. The elongated mitochondrial bud presented some constricted expansions (Fig. 2B and 2C). Mitochondrion and ES were located between the two nuclei.

DISCUSSION

Using serial-thin sections and computer-aided three-dimensional reconstructions we determined the spatial configuration of each organelle and obtained a full representation of the *P.*

Fig. 1. Serial-thin sections of a binucleate intermediate precyst. Bar = 0.5 μm . Nuclei (N) are located at the opposite cellular pole and near the plasma membrane. Many cross sections of mitochondria are observed (arrowhead). Cross sections of the spiral, round, and elongated mitochondrial portions are distinguished. Glycogen granules, observed in the cytoplasmic area, are packaged by the whorled mitochondrion. The ES (arrow), occupying a large cytoplasmic area, is not communicating with perinuclear cisternae. Many clusters of Golgi vesicles are observed in the vicinity of the ES (A, B, D, circle).

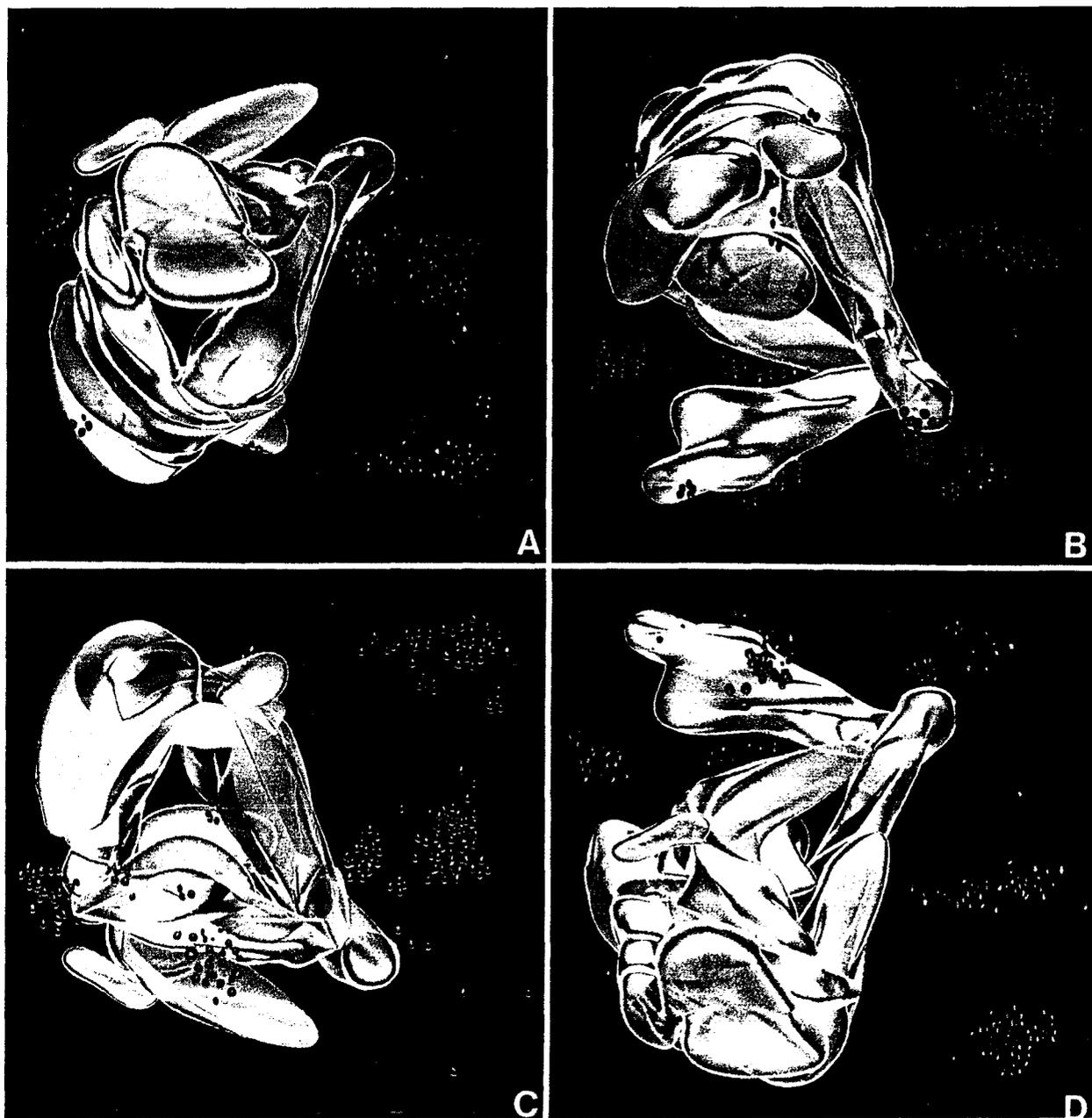


Fig. 3. Three-dimensional reconstruction of the ES (grey) and Golgi vesicles (green). The ES consists of a large flattened cisterna interconnected with four saccules. Golgi vesicles are located in five distinct clusters.

nii binucleate intermediate precyst. The establishment of the presence of a mitochondrion, a complex and well-developed Golgi apparatus, and numerous Golgi vesicles was the main result of our work. The development of the ES and the mitochondrion suggests that the roles of these two organelles are preponderant in the intermediate precystic stage.

A highly developed mitochondrion was found in this intermediate precyst. Mitochondrial buds could become individual mitochondria in the late precyst. The transition from a relatively simple structure in small trophozoites to a highly complex one in intermediate precysts could be related to nuclear division and the formation of intracystic bodies with a spheroid mitochondrion.

The significance of the spiral portion of the mitochondrion remains unclear.

Two kinds of ES were previously described. The first type, observed in trophozoites, is small and developed autophagic activity [6, 7]. The second type is present in well-developed trophozoites and in precysts. This ES was connected with the perinuclear cisterna until the first nuclear division occurred [6]. The presence of a well-developed ES with more than 230 Golgi vesicles in its vicinity could be related to the morphogenesis of the precystic wall, especially to the appearance of the electron-lucent layer. This proposal was in agreement with the low number of Golgi vesicles recorded in the small trophozoite [7], which

as no electron-lucent layer. A well-developed ES was also found in the large, constricted trophozoites [6] that presented more than 240 Golgi vesicles. Thus, an implication of the ES in nuclear division and in individualization of intracystic bodies could not be excluded.

The three-dimensional reconstruction made it possible to understand the ultrastructure (especially of the endomembrane system) of two stages of the rabbit derived *P. carinii* (small trophozoite and binucleated intermediate precyst). The unequal number of Golgi vesicles between these two stages was particularly evident here. The development of the ES could be related to higher quantities of Golgi vesicles and to the presence of Concanavalin A-binding carbohydrates in the parasite [1–4, 6, 8, 9]. Indeed, the fact that Concanavalin A detected carbohydrate binding sites in the wall of precyst, cyst, and in the pellicle of intracystic body, and that Golgi vesicles were budding from the ES suggests that ES could play a role in the synthesis of glycoproteins of the parasite surface structures.

In conclusion, computer-aided reconstruction from the serial-thin sections made it possible to better understand the ultrastructural morphology of *P. carinii*. This tool should be applied to other life cycle stages to assure a total and complete insight into the morphology of *P. carinii*.

ACKNOWLEDGMENTS

During this work, Francois Palluault was on scholarship from the Conseil Régional Nord-Pas de Calais. This investigation was supported in part by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS). We gratefully thank Dr. Daniel Poulain for his constant encouragement, and Jacqueline Herbaut and Alain Plockyn for their technical advice.

LITERATURE CITED

1. Cushion, M., DeStephano, J. & Walzer, P. 1988. *Pneumocystis carinii*: surface reactive carbohydrates detected by lectin probes. *Exp. Parasitol.*, **67**:137–147.
2. Dei-Cas, E., Soulez, B., Palluault, F., Charet, P. & Camus, D. 1990. *Pneumocystis carinii*, un défi pour les biologistes. *Médecine/Sciences*, **6**:517–525.
3. DeStephano, J., Cushion, M., Puvanesarajah, V. & Walzer, P. 1990. Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. II. Sugar composition. *J. Protozool.*, **37**:436–441.
4. Matsumoto, Y., Matsuda, S. & Tegoshi, T. 1989. Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.*, **36**:21S–22S.
5. Matsumoto, Y. & Yoshida, Y. 1984. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J. Protozool.*, **31**:420–428.
6. Palluault, F., Dei-Cas, E., Slomianny, C., Soulez, B. & Camus, D. 1990. Golgi complex and lysosomes in rabbit derived *Pneumocystis carinii*. *Biol. Cell*, **70**:73–82.
7. 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. I. Trophozoite. *J. Protozool.*, **38**:402–407.
8. Yoshikawa, H., Tegoshi, T. & Yoshida, Y. 1987. Detection of surface carbohydrates on *Pneumocystis carinii* by fluorescein conjugated lectins. *Parasitol. Res.*, **74**:43–49.
9. Yoshikawa, H., Morioka, H. & Yoshida, Y. 1988. Ultrastructural detection of carbohydrates in the pellicle of *Pneumocystis carinii*. *Parasitol. Res.*, **74**:537–543.

Received 12-17-90; accepted 4-22-91

