

S

**THÈSE**

pour l'obtention du

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

**Etude de l'expression phénotypique de la  
diversité génétique de *Pneumocystis carinii*:  
infectivité et spécificité parasitaire**

par

**El Moukhtar ALIOUAT**

soutenue le 12 décembre 1995, devant les membres du jury :

Président : Pr André DHAINAUT, Service de Biologie Animale, USTL, Villeneuve d'Ascq

Rapporteur : Pr Joseph SCHREVEL, LBPC, Paris

Rapporteur : Dr Mohamed Ali OUAISSI, Institut Pasteur, Lille

Directeur de Thèse : Dr Eduardo DEI-CAS, U42 INSERM, Villeneuve d'Ascq

Examineur : Pr Daniel CAMUS, U42 INSERM, Villeneuve d'Ascq

Examineur : Dr Domingo GARGALLO, Laboratoires GLAXO, Madrid

Examineur : Dr Marie-Claude PREVOST, U326 INSERM, Toulouse

*Je dédie ce travail de thèse à la mémoire de ma mère  
qui reste à jamais dans mon coeur*

*A mon père, mes soeurs, mes frères*

*Aux membres du jury,*

Je tiens à remercier Mr le Pr **Daniel Camus** qui m'a accueilli dans son unité et m'a conseillé avec beaucoup de bienveillance au cours de ce travail de thèse.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma profonde reconnaissance à Mr le Dr **Eduardo Dei-Cas** qui est à l'origine de ce travail, pour sa sympathie, sa disponibilité, ses conseils, pour m'avoir constamment motivé et transmis son amour de la recherche.

Je tiens à remercier Mr le Pr **André Dhainaut** qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je tiens à remercier Mr le Pr **Joseph Schrevel**, Mr le Dr **Mohamed Ali Ouaisi**, Mr le Dr **Domingo Gargallo** et Mme le Dr **Marie-Claude Prevost**, qui m'honorent de leur présence dans ce jury et qui ont accepté de consacrer un peu de leur temps précieux pour rapporter ou examiner ce travail.



*Aux personnes qui ont participé ou aidé à la réalisation de ce travail,*

Mme **Chantal Mullet** et Mr **Philippe Delcourt** qui m'ont apporté leur aide précieuse dans ce travail et souvent soutenu dans les moments difficiles,

Mlle le Dr **Edith Mazars** et Mlle **Karine Guyot** qui m'ont initié aux techniques de biologie moléculaire et aidé pour certaines expériences clés de ce travail,

Mlles **Nathalie Séguy** et **Cécile-Marie Denis** qui m'ont très souvent aidé, conseillé dans mon travail, et qui par leur lecture attentive et leur gentillesse, m'ont aidé à corriger et à réaliser ce manuscrit,

Mme le Dr **Marie-Claude Prevost**, Mme **Clotilde Cariven** et Mr le Dr **Roger Escamilla** (INSERM U 326, Toulouse) qui, par leur passion de la recherche, leur enthousiasme inébranlable et leur rigueur scientifique ont permis la naissance d'une collaboration fructueuse sur le surfactant pulmonaire,

Mr le Dr **Lucien Dujardin**, qui nous a apporté de riches conseils sur les cultures *in vitro* de *Pneumocystis carinii*,

Mr le Dr **Jean-Charles Cailliez** avec qui j'ai partagé la passion de la recherche et qui, par sa bonne humeur, a rendu agréable l'ambiance de travail au sein du groupe,

Mr le Dr **François Palluault**, Mr le Dr **Christian Slomianny**, Mr le Dr **Jean-François Dubremetz** et Mr **Etienne Dewailly**, pour leur aide précieuse et efficace en microscopie électronique à transmission, et le Dr **Jean-Pierre Tissier** (INRA, Villeneuve d'Ascq) qui, avec son enthousiasme et sa passion de la microscopie électronique à balayage, nous a permis d'admirer *Pneumocystis carinii* sous un autre angle.

Mr le Dr **Pierre Billaut**, Mr le Dr **Jean-Yves Cesbron**, Mr **Emile Fleurbaix** et Mr **Jean-Pierre Decavel** (Institut Pasteur de Lille) qui, grâce à leurs colonies de souris SCID et de rats nude non porteurs latents de *Pneumocystis carinii*, leur aide et leurs conseils précieux, nous ont permis d'explorer la spécificité parasitaire de ce micro-organisme,

Mme le Dr **Agnès Wattez** et Mr le Dr **Jean-Pierre Maufroid** (Université des Sciences et Technologie de Lille I) qui m'ont permis de découvrir le monde de l'enseignement supérieur en m'apportant leurs précieux conseils et leur amour de ce métier,

Tous les membres de l'unité 42, qui ont témoigné à mon égard beaucoup de sympathie et d'attention,

*Je leurs exprime mes plus vifs remerciements et toute ma gratitude.*

# Etude de l'expression phénotypique de la diversité génétique de *Pneumocystis carinii* : infectivité et spécificité parasitaire.

## Sommaire

|  |           |
|--|-----------|
| Abréviations et anglicismes  | 1         |
| <b>1- INTRODUCTION DU SUJET</b>  | <b>5</b>  |
| <b>2- GÉNÉRALITÉS</b>  | <b>8</b>  |
| 2-1 Historique   | 8         |
| 2-2- <i>Pneumocystis carinii</i>   | 9         |
| 2-2-1 Morphologie et cycle biologique  | 9         |
| 2-2-2 Les modèles animaux de pneumocystose                                   | 11        |
| 2-2-3 Culture <i>in vitro</i> de <i>P. carinii</i>                           | 12        |
| 2-2-3-1 Co-culture   | 13        |
| 2-2-3-2 Culture axénique   | 14        |
| 2-2-3-3 Culture d'explants pulmonaires parasités                             | 14        |
| 2-2-4 Position taxonomique   | 15        |
| 2-2-5 Hétérogénéité génétique  | 16        |
| 2-2-5-1 Polymorphisme antigénique  | 17        |
| 2-2-5-2 Polymorphisme isoenzymatique   | 18        |
| 2-2-5-3 Polymorphisme caryotypique   | 18        |
| 2-2-5-4 Polymorphisme des séquences nucléiques                               | 19        |
| 2-3 La pneumocystose   | 19        |
| 2-3-1 Répartition géographique et spectre d'hôte de <i>P. carinii</i>        | 19        |
| 2-3-2 Transmission   | 20        |
| 2-3-3 Présentation clinique  | 22        |
| 2-3-4 Réponse immune   | 23        |
| 2-3-5 Traitement   | 25        |
| 2-4 Relation hôte-parasite   | 26        |
| 2-4-1 Mécanismes d'attachement de <i>P. carinii</i> aux cellules pulmonaires | 26        |
| 2-4-1-1 Mécanismes d'attachement des microorganismes pathogènes              | 26        |
| 2-4-1-2 Attachement de <i>P. carinii</i>                                     | 29        |
| 2-4-1-3 Interaction de <i>P. carinii</i> avec la matrice extracellulaire     | 29        |
| 2-4-1-4 Rôle des lectines cellulaires et parasitaires                        | 32        |
| 2-4-2 Intéractions de <i>P. carinii</i> avec le surfactant pulmonaire        | 33        |
| 2-4-2-1 Le surfactant  | 33        |
| 2-4-2-2 Interaction de <i>P. carinii</i> avec le surfactant                  | 35        |
| <b>3- MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>  | <b>38</b> |
| 3-1 Sources de <i>P. carinii</i>   | 38        |
| 3-2 Obtention de <i>P. carinii</i>   | 38        |
| 3-2-1 Méthode d'extraction par agitation-filtration                          | 38        |
| 3-2-2 Méthode de quantification de <i>P. carinii</i>                         | 39        |
| 3-3 Systèmes expérimentaux <i>in vitro</i>                                   | 40        |

|   |    |
|---|----|
| 3-3-1 Lignées cellulaires   | 40 |
| 3-3-2 Attachement et développement de <i>P. carinii in vitro</i>  | 40 |
| 3-3-3 Mise en évidence de la matrice de fibronectine  | 41 |
| 3-3-4 Culture <i>in vitro</i> de <i>P. carinii</i> de rat   | 41 |
| 3-3-4-1 Suivi de la culture   | 41 |
| 3-3-4-2 Production en masse de parasites <i>in vitro</i>  | 42 |
| 3-3-5 Etude en microscopie électronique à transmission et à balayage                                    | 42 |
| 3-3-5-1 Microscopie électronique à transmission   | 42 |
| 3-3-5-2 Microscopie électronique à balayage   | 43 |
| <b>3-4 Modèles <i>in vivo</i></b>   | 44 |
| 3-4-1 Hôtes expérimentaux   | 44 |
| 3-4-2 Méthodes d'inoculation  | 45 |
| 3-4-2-1 Inoculation nasale de <i>P. carinii</i> chez la souris SCID                                     | 45 |
| 3-4-2-1-1 Technique   | 45 |
| 3-4-2-1-2 Cinétique d'infection   | 45 |
| 3-4-2-2 Inoculation trachéale de <i>P. carinii</i> chez le rat nude                                     | 46 |
| <b>3-5 Evaluation de l'infectivité de <i>P. carinii</i> provenant de cultures <i>in vitro</i></b>       | 46 |
| <b>3-6 Etudes sur l'infectivité de <i>P. carinii</i> en fonction de l'espèce de l'hôte</b>              | 47 |
| <b>3-7 Suivi ultrastructural des premières phases de l'infection</b>                                    | 47 |
| <b>3-8 Expérience de co-infection</b>   | 48 |
| <b>3-9 Analyse nucléique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et hybridation</b>              | 48 |
| 3-9-1 Extraction de l'ADN   |    |
| 3-9-2 Amplification génique par polymérisation en chaîne  | 49 |
| 3-9-3 Hybridation   | 50 |
| 3-9-3-1 Transfert de l'ADN sur membrane   | 50 |
| 3-9-3-2 Préparation des sondes  | 51 |
| 3-9-3-2-1 Marquage radioactif   | 51 |
| 3-9-3-2-2 Purification de la sonde marquée  | 51 |
| 3-9-3-3 L'hybridation   | 51 |
| 3-9-3-3-1 La préhybridation   | 51 |
| 3-9-3-3-2 Conditions d'hybridation  | 52 |
| 3-9-3-3-3 Révélation autoradiographique   | 52 |
| <b>3-10 Influence du surfactant sur le développement de <i>P. carinii in vitro</i></b>                  | 52 |
| <b>3-11 Exploration de l'implication du Surfactant dans le développement de la pneumocystose</b>        | 53 |
| 3-11-1 La pneumocystose spontanée du lapin  | 53 |
| 3-11-1-1 Obtention du liquide de lavage broncho-alvéolaire  | 53 |
| 3-11-1-2 Dosage des protéine totales  | 54 |
| 3-11-1-3 Etude quantitative et qualitative des lipides totaux   | 54 |
| 3-11-2 Cinétique de l'infectivité expérimentale chez la souris SCID                                     | 55 |
| <b>4- RÉSULTATS</b>   | 57 |
| <b>4-1 Comportement <i>in vitro</i> d'isolats de <i>P. carinii</i> provenant du rat et de la souris</b> | 57 |
| 4-1-1 Evaluation de l'attachement - développement de <i>P. carinii</i> de rat et de souris              | 57 |
| 4-1-1-1 <i>P. carinii</i> de rat <i>in vitro</i>  | 57 |
| 4-1-1-2 <i>P. carinii</i> de souris <i>in vitro</i>   | 58 |

|   |     |
|---|-----|
| 4-1-2 Mise en évidence de la fibronectine dans la matrice extracellulaire des cellules cultivées  | 58  |
| 4-1-3 Analyse de l'attachement de <i>P. carinii</i> en microscopie électronique à transmission et à balayage  | 58  |
| 4-1-3-1 <i>In vivo</i>  | 58  |
| 4-1-3-2 <i>In vitro</i>   | 59  |
| 4-1-4 Développement <i>in vitro</i> de <i>P. carinii</i> de rat   | 60  |
| 4-1-4-1 Croissance  | 60  |
| 4-1-4-2 Intégrité morphologique   | 61  |
| 4-1-4-3 Pouvoir infectieux  | 61  |
| <b>4-2 Comportement <i>in vivo</i> d'isolats de <i>P. carinii</i> provenant de rat et de souris</b>   | 62  |
| 4-2-1 Instillation nasale de la souris SCID avec <i>P. carinii</i>  | 62  |
| 4-2-1-1 Etablissement du modèle   | 62  |
| 4-2-1-2 Cinétique de l'infection  | 62  |
| 4-2-1-3 Etude ultrastructurale de la phase A  | 63  |
| 4-2-2 Inoculation trachéale du rat nude avec <i>P. carinii</i>  | 63  |
| 4-2-3 Spécificité parasitaire   | 63  |
| 4-2-3-1 Infections croisées   | 63  |
| 4-2-3-2 Analyse par PCR et hybridation de sondes spécifiques  | 64  |
| <b>4-3 Exploration du rôle des facteurs liés au microenvironnement alvéolaire sur l'infectivité de <i>P. carinii</i> et sur la spécificité parasitaire</b>                                      | 65  |
| 4-3-1 Les phases précoces de l'infection par <i>P. carinii</i> chez des hôtes spécifiques et non spécifiques : rôle de l'attachement, aux cellules alvéolaires, dans la spécificité parasitaire | 65  |
| 4-3-2 L'élimination des parasites chez l'hôte non spécifique  | 65  |
| 4-3-3 Influence de la co-infection sur la spécificité parasitaire de <i>P. carinii</i>  | 66  |
| 4-3-4 Incidence de la composition du surfactant sur l'infectivité de <i>P. carinii</i>  | 67  |
| 4-3-4-1 Influence du surfactant sur le développement de <i>P. carinii in vitro</i>  | 67  |
| 4-3-4-2 Le surfactant au cours de la pneumocystose spontanée du lapereau au sevrage (pneumocystose naturelle)   | 67  |
| 4-3-4-3 Le surfactant au cours de la pneumocystose expérimentale de la souris SCID  | 68  |
| <b>5- DISCUSSION</b>  | 70  |
| <b>5-1 Modèles de pneumocystose : la souris SCID et le rat nude</b>   | 70  |
| <b>5-2 Spécificité parasitaire de <i>P. carinii</i></b>   | 72  |
| 5-2-1 <i>In vivo</i>  | 72  |
| 5-2-2 <i>In vitro</i>   | 73  |
| <b>5-3 Impact de la spécificité parasitaire de <i>P. carinii</i></b>  | 75  |
| <b>5-4 Exploration des mécanismes de la spécificité parasitaire de <i>P. carinii</i></b>  | 77  |
| 5-4-1 Rôle de l'attachement dans la spécificité parasitaire   | 77  |
| 5-4-2 Spécificité parasitaire et co-infection   | 79  |
| 5-4-3 Rôle du surfactant dans l'infection de <i>P. carinii</i>  | 80  |
| <b>5-5 Conclusion</b>   | 83  |
| <b>6- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>   | 85  |
| <b>PUBLICATIONS</b>   | 104 |

## Abréviations et anglicismes

A : adénine  
 ADN : acide désoxyribonucléique  
 ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire  
 ADNr 16S : gène de l'ARNr 16S de la petite sous-unité ribosomale  
 ADNr 5S : gène de l'ARNr 5S de la grande sous-unité ribosomale  
 ADNr 5,8S : gène de l'ARNr 5,8S de la grande sous-unité ribosomale  
 ADNr 26S : gène de l'ARNr 26S de la grande sous-unité ribosomale  
 ARNr : acide ribonucléique ribosomal  
 BET : bromure d'éthyldium  
 BTO : bleu d'orthotoluidine  
 C : cytosine  
 CHEF : contour clamped homogeneous electric field  
 CIK : corps intrakystiques  
 CL : cardiolipine  
 DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
 EDTA : éthylène diamine tétra acétique  
 FIGE : field inversion gel electrophoresis pour électrophorèse en champs inversés  
 Fn : fibronectine  
 G : guanine  
 GPI : glucosephosphate isomérase (EC.5.3.1.9)  
 ITS : internal transcribed spacer ou espaceur interne transcript  
 kb : kilobase  
 LAP : leucine aminopeptidase (EC.3.4.11)  
 LBA : lavage broncho-alvéolaire  
 LysoPC : lysophosphatidylcholine  
 MDH : malate déshydrogénase (EC.1.1.1.37)  
 ME : enzyme malique (EC.1.1.1.40)  
 MLEE : électrophorèse enzymatique multilocus  
 MMR : macrophage mannose receptor  
 MSG : glycoprotéine majeure de surface  
 mt ADNr : gène de la grande sous-unité de l'ARNr mitochondrial  
 nt : nucléotide  
 6-PGD : 6-phosphogluconate déshydrogénase (EC.1.1.1.44)  
 OFAGE : orthogonal field alternation gel electrophoresis pour électrophorèse en champs orthogonaux alternés  
 PA : acide phosphatitique  
 pb : paires de bases  
 PC : phosphatidylcholine  
 PCR : polymérase chain reaction  
 PE : phosphatidyléthanolamine  
 PG : phosphatidylglycérol  
 PI : phosphatidylinositol  
 PL : phospholipides totaux  
 PPC : pneumonie à *Pneumocystis carinii*

PS : phosphatidylsérine  
PT : protéines totales  
SCID : severe combined immunodeficiency : déficience en lymphocytes B et T  
SDS : sodium dodécylsulfate  
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise  
SP-A :protéine hydrophyle A du surfactant  
SP-B :protéine hydrophobe B du surfactant  
SP-C :protéine hydrophobe C du surfactant  
SP-D : protéine hydrophoyle D du surfactant  
Sph : sphingomyéline  
SSC : citrate de sodium trisodique  
SSPE : phosphate sodique EDTA  
STE : sodium tris EDTA  
SVF : sérum de veau foetal  
T : thymidine  
TAE : tris acétate EDTA  
TAFE : transversed alternative gel electrophoresis pour électrophorèse transversale alternée  
Taq polymérase : ADN polymérase de *Thermus aquaticus*  
TBE : tris borate EDTA  
TE : tris EDTA  
Tris : tris (hydroxy-méthyl) amino-méthane  
TS : thymidylate synthétase (EC.2.1.1.45)  
UV : ultraviolets  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
Vn : vitronectine

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

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

Soulez B., Palluault F., Dei-Cas E., **Aliouat E.M.**, Camus D. 1991. Production of a monoclonal antibody using lymphocytes from *Pneumocystis carinii* infected mice. J. Protozool. 38 (suppl.) : 189-190.

Dei-Cas E, Cailliez J.C., Palluault F., **Aliouat E.M.**, Mazars E., Soulez B., Suppin J. Camus D. 1992. Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent? Eur. J. Epidemiol. 8 : 460-470.

**Aliouat E.M.**, Dei-Cas E., Ouaisi A., Palluault F., Soulez B., Camus D. 1993. *In vitro* attachment of *Pneumocystis carinii* from mouse and rat origin. Biol. Cell 77 : 209-217.

**Aliouat E.M.**, Cailliez J.C., Seguy N., Dei-Cas E., Polonelli L., Gerloni M., Conti S., Camus D. 1993. Inhibitory effect of a yeast killer toxin to the *in vitro* *Pneumocystis carinii* attachment. Serodiagn. Immunother. Infect. Disease. 5 : 102-106.

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

**Aliouat E.M.**, Mazars E., Dei-Cas E., Billiaut P., Camus D. 1994. *Pneumocystis* cross infection experiments, using SCID mice and nude rat as recipient host, showed strong host-species specificity. J. Euk. Microbiol. 41 : 71S.

Cailliez J.C., Séguy N., **Aliouat E.M.**, Polonelli L., Camus D., Dei-Cas E. 1994. A yeast killer toxin against *Pneumocystis carinii*: a hypothetical way to control pneumocystosis. Medical Hypotheses 43 : 167-171

Séguy N., **Aliouat E.M.**, Dei-Cas E., Polonelli L., Camus D., Cailliez J.C. 1994. Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* killer toxin. J. Euk. Microbiol. 41: 109S.

Denis C.M., Cailliez J.C., **Aliouat E.M.**, Delcourt P., Lepage G., Hermant N., Lamouret M., Dei-Cas E. 1994. Does *Pneumocystis carinii* remain infectious in the blood stream?. J. Euk. Microbiol. 41 : 86S.

Dei-Cas E., Mazars E., Ödberg-Ferragut C., **Aliouat E.M.**, Durand I., Dridba M., Palluault F., Cailliez J.C., Seguy N., Creusy C., Camus D. 1994. Ultrastructural, genomic, isoenzymatic and biological features make it possible to distinguish rabbit *Pneumocystis* from other mammal *Pneumocystis* strain. J. Euk. Microbiol. 41 : 84S.

Mazars E., Ödberg-Ferragut C., Dei-Cas E., Fourmaux M., **Aliouat E.M.**, Brun-Pascaud M., Mougeot G., Camus D. 1994. Polymorphism of the thymidylate synthase gene of

*Pneumocystis carinii* from different host species. J. Euk. Microbiol. 42 : 26-32.

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

Dei-Cas E., Mazars E., **Aliouat E.M.**, Ödberg-Ferragut C., Durand I., Denis C.M., Camus D. 1995. Infectious sources, reservoir and transmission of pneumocystosis. in : Parasitology for the 21st Century : ICOPA VIII, Ozcel and Alkan (eds), CAB International, Oxford, 175-186.

Cailliez J.C., Séguy N., Denis C.M., **Aliouat E.M.**, Mazars E., Polonelli L., Camus D., Dei-Cas E. 1995. *Pneumocystis carinii* : an atypical fungal microorganism. Journal of veterinary and medical mycology. Soumis.



# **1- INTRODUCTION DU SUJET**

## 1- INTRODUCTION DU SUJET

*Pneumocystis carinii* est un microorganisme eucaryote très répandu qui parasite le poumon de l'homme et d'autres mammifère (Hugues, 1987). Il détermine au cours du SIDA et d'autres états d'immunodépression, une pneumopathie grave, fatale en l'absence de traitement (Kovacs *et al.*, 1989a). Cette pneumonie est l'une des causes principales du décès des patients sidéens en Europe et en Amérique du Nord (Dei-Cas *et al.*, 1990). La situation apparaît cependant différente en Afrique sub-saharienne, où la pneumonie à *P. carinii* (PPC) est beaucoup moins fréquente chez les patients sidéens (Carme *et al.*, 1991).

Il faut ajouter qu'en dehors du contexte du SIDA, de nombreux cas de pneumocystose sont détectés chez des patients sous traitement immunosuppresseur lors de cancer, greffe d'organe ou d'autres situations pathologiques (Walzer, 1991a ; Sepkowitz *et al.*, 1995).

Malgré ces fortes prévalence et mortalité, *P. carinii* reste un microorganisme mal connu, en particulier en ce qui concerne sa nature, son cycle biologique et ses modalités de transmission (Wakefield *et al.*, 1992; Dei-Cas *et al.*, 1992 et 1995). La connaissance de ces aspects aurait des retombées pratiques évidentes sur les plan thérapeutique et prophylactique. Il n'existe à ce jour aucun système de culture continue de *P. carinii*, ce qui retarde les recherches fondamentales et appliquées sur ce parasite. De plus les modèles animaux utilisés par les différentes équipes, étaient imparfaits jusqu'à ces dernières années.

Assurément, les progrès récents les plus marquants dans les recherches sur *P. carinii*, ont concerné sa biodiversité. En effet, depuis quelques années, un nombre croissant de publications souligne une forte diversité génétique chez *P. carinii*. L'ensemble des données rapportées sur ce sujet met en évidence :

- des différences antigéniques de *P. carinii* en fonction de l'espèce animale parasitée (Walzer *et al.*, 1987a; Kovacs *et al.*, 1989b; Gigliotti, 1992), mais aussi des différences antigéniques parmi des isolats parasitaires provenant d'une même espèce-hôte (Andrews *et al.*, 1994; Vasquez *et al.*, 1994),

- des différences caryotypiques (Hong *et al.*, 1990; Weinberg *et al.*, 1991; Stringer *et al.*, 1993b; Weinberg *et al.*, 1994a) et génomiques (Sinclair *et al.*, 1991; Wakefield *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1993; Stringer *et al.*, 1993a; Peters *et al.*, 1994a; Weinberg *et al.*, 1994c; Ortiz

Rivera *et al.*, 1995, Mazars *et al.*, 1995) entre isolats de *P. carinii* provenant d'espèces hôtes différentes, mais aussi entre ceux provenant d'hôtes de la même espèce (Cushion *et al.*, 1993a et b; Wakefield *et al.*, 1994a; Weinberg *et al.*, 1994a; Ortiz Rivera *et al.*, 1995).

Une étude sur la diversité génétique et isoenzymatique de *P. carinii* en fonction de l'espèce hôte a été menée dans notre laboratoire depuis 1991 (Mazars *et al.*, 1994, Mazars *et al.*, 1995). Elle a permis de détecter des différences en fonction de l'espèce hôte (homme, rat, souris et lapin), au niveau d'un fragment d'environ 400 pb du gène de la thymidylate synthétase (TS) de *P. carinii* (Mazars *et al.*, 1995). De plus, à partir de nombreux isolats parasitaires analysés sur le plan isoenzymatique (par "multilocus enzyme electrophoresis" : MLEE), des différences ont été détectées, d'une part en fonction de l'espèce hôte, et d'autre part au sein d'isolats parasitaires de rat (Mazars *et al.*, 1994).

Ces différences aux niveaux antigénique, caryotypique, génomique et isoenzymatique de *P. carinii*, suggèrent que les populations parasitaires infectant chaque espèce de mammifère sont distinctes et que certaines d'entre elles le seraient au sein d'une même espèce hôte. Ces observations amènent à poser plusieurs questions :

- sur le plan taxonomique : ces différences traduisent-elles l'existence d'espèces, de sous-espèces ou simplement de souches différentes de *P. carinii* ? S'il y a plusieurs espèces de *P. carinii*, sont-elles inféodées chacune à une espèce hôte ?
- sur le plan épidémiologique : ces différences caractérisent-elles des populations diverses avec une capacité infectieuse variable en fonction de l'espèce-hôte ? En d'autres termes, *P. carinii* provenant d'une espèce hôte donnée, est-il capable d'infecter un hôte d'espèce différente ? Quel est le réservoir de la pneumocystose humaine ? Existe-t-il des souches de *P. carinii* plus ou moins virulentes et/ou avec des sensibilités médicamenteuses variables ?

Le principal objectif de ce travail a été de répondre à une question fondamentale soulevée par l'ensemble des travaux sur la biodiversité de *P. carinii* : quelle est l'expression phénotypique de la diversité génétique des populations naturelles de *P. carinii*, sur les plans de l'infectivité et de la spécificité parasitaire ?

Dans ce cadre, nous avons conduit, *in vivo* et *in vitro*, une étude comparative entre isolats de *P. carinii* provenant d'hôtes d'espèce différentes.

*In vivo*, l'infectivité de *P. carinii* de rat, de souris et de lapin a été étudiée chez des hôtes spécifiques (espèce d'où provient l'isolat) et non spécifiques (espèce différente de celle d'où provient l'isolat). Pour cela, il nous fallait des modèles animaux de pneumocystose. Or, la plupart des auteurs utilisent des animaux qui, porteurs latents de *P. carinii*, développent spontanément une PPC après 3 mois d'immunodépression par des corticoïdes (modèles "par révélation"). Ces modèles sont intéressants surtout comme sources de parasites, pour tester des molécules anti-*P. carinii*, dans des études physiopathologiques, mais ne sont pas utilisables pour tester l'infectivité d'un isolat de *P. carinii*. Pour évaluer le pouvoir infectieux du parasite, nous avons été amenés à développer des modèles de pneumocystose par inoculation de *P. carinii* chez animaux de laboratoire non porteurs latents (modèles "par inoculation"). Ces modèles, la souris SCID et le rat athymique, permettent d'obtenir, dans des délais plus courts, des infections intenses et reproductibles.

*In vitro*, nous avons étudié le comportement d'isolats de *P. carinii* provenant du rat et de la souris, en évaluant leur capacité d'adhésion aux cellules cultivées en monocouche et leur potentiel de développement dans ces systèmes de co-culture. Ils nous ont aussi permis de mieux comprendre la reconnaissance et l'adhésion de *P. carinii* aux cellules pulmonaires, lors des premières phases de l'infection.

Dans un deuxième temps, nous avons exploré différents facteurs susceptibles de modifier la capacité de *P. carinii* à s'installer et à proliférer dans le poumon et donc d'influencer la spécificité parasitaire. Plus précisément, nous avons décrit les phases précoces de la pneumocystose expérimentale chez des hôtes spécifiques et non spécifiques et réalisé des expériences de co-infection avec des inoculums spécifiques et non spécifiques. Enfin, nous avons étudié *in vitro* et *in vivo*, le rôle du surfactant pulmonaire sur le pouvoir infectieux de *P. carinii*. Pour cette dernière partie, nous avons utilisé des cultures de parasites sur cellules épithéliales alvéolaires de rat et deux modèles animaux de pneumocystose, l'un expérimental, la souris SCID (Aliouat *et al.* 1993a) et l'autre naturel, le lapin au sevrage (Soulez *et al.*, 1989; Dei-Cas *et al.*, 1990).

## **2- GÉNÉRALITÉS**

---

## 2- GÉNÉRALITÉS

### 2-1 Historique

*Pneumocystis carinii* a été décrit pour la première fois, en 1909, par Carlos Chagas dans des poumons de cobaye et d'homme infestés par *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). En 1910, Antonio Carini le décrivit chez des rats infestés par *T. lewisi* (Carini, 1910). Ces deux auteurs suggérèrent que les formes kystiques décrites correspondaient à un nouveau stade dans le cycle biologique des Trypanosomes.

En 1912, P. Delanoë et M. Delanoë montrèrent sa présence dans des poumons de rats non infestés par *Trypanosoma spp.* Ils l'identifièrent comme une nouvelle entité, affirmèrent son tropisme pulmonaire et le nommèrent *Pneumocystis carinii* (Delanoë et Delanoë, 1912). En 1942, Van der Meer et Brug (1942) montrèrent le rôle de ce micro-organisme en pathologie humaine.

Durant les années 1950, des progrès importants dans la connaissance du parasite furent réalisés. Ainsi, Vanek et Jirovec définirent ce parasite comme l'agent étiologique d'une forme particulière de pneumonie interstitielle décrite chez des prématurés et des enfants malnutris des orphelinats d'Europe Centrale et de l'Est, pendant et après la seconde guerre mondiale (Vanek, 1951 ; Vanek et Jirovek, 1952). Puis, Weller rapporta qu'une pneumonie à *P. carinii* (PPC) pouvait être obtenue chez des rats traités par des corticoïdes (Weller, 1955). Enfin, l'iséthionate de pentamidine fut décrit comme le premier médicament efficace contre la pneumocystose (Ivady et Paldy, 1958). Au cours des années 60-70, *P. carinii* fut reconnu comme une cause de pneumonie grave chez les patients immunodéprimés lors de traitements chimiothérapeutiques et de déficits immunitaires congénitaux (Walzer *et al.*, 1974).

A partir des années 1980, avec l'apparition de la pandémie du SIDA, *P. carinii* émergea au premier plan des parasites opportunistes. Environ 60 à 80 % des adultes et 40 % des enfants atteints du SIDA contractaient une PPC en Europe et aux USA (Hughes, 1987 ; Masur, 1989a ; Murray *et al.*, 1990). La meilleure connaissance de la symptomatologie, l'utilisation d'une prophylaxie primaire et secondaire et la standardisation des protocoles thérapeutiques ont permis ces dernières années une diminution de l'incidence de la PPC au cours du SIDA à 35 à 40 % (Bennet *et al.*, 1990). Cependant, malgré la prophylaxie primaire, le nombre de cas de PPC inaugurale du SIDA reste constant (Luchon *et al.*, 1994). En Europe,

comme en Amérique du Nord, *P. carinii* et *Toxoplasma gondii* sont les deux agents étiologiques majeurs responsables de l'hospitalisation des patients sidéens en réanimation. En revanche, en Afrique subsaharienne, la PPC présente une incidence moins importante chez les patients sidéens (Elvin *et al.*, 1989 ; Carme *et al.*, 1991 ; Atzori *et al.*, 1993).

Il faut ajouter qu'en dehors du contexte du SIDA, de nombreux cas de pneumocystose sont détectés chez des patients sous traitement immunosuppresseur lors de cancer ou de greffe d'organe. Ainsi, en absence de chimioprophylaxie, 43 % en moyenne des enfants avec leucémie aiguë lymphoblastique, 26 % des patients atteints de maladie de Hodgkin et 9-16 % des patients bénéficiant d'une allogreffe de moelle, développent une PPC (Sepkowitz *et al.*, 1995). Le taux de mortalité de la PPC chez ces patients, non infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), est d'environ 50 % (Walzer, 1991a ; Sepkowitz *et al.*, 1995).

## 2-2- *Pneumocystis carinii*

Alors que la PPC est une affection fréquemment rencontrée chez les patients sidéens et chez les patients soumis à une immunodépression thérapeutique, l'agent responsable reste mal connu.

### 2-2-1 Morphologie et cycle biologique

*P. carinii* présente un fort tropisme pour l'alvéole pulmonaire. De nombreuses études ultrastructurales, réalisées sur des poumons humains ou d'animaux infestés par *P. carinii*, ont permis de mettre en évidence trois formes parasitaires : le trophozoïte, le prékyste et le kyste mature (Tableau 1) :

- le **trophozoïte**, forme végétative, est uninucléé. Il s'attache spécifiquement et très étroitement aux pneumocytes de type I. Le trophozoïte mesure de 2 à 8  $\mu\text{m}$  de diamètre et est délimité par une membrane cellulaire aux contours amoeboïdes, sur laquelle repose une couche pelliculaire dense aux électrons (Figure 1). Ce serait la présence de cholestérol dans la membrane cellulaire qui, en favorisant sa fluidité, participerait au maintien de l'aspect amoeboïde de ce stade (Yoshikawa *et al.*, 1987). Ces formes présentent de nombreux prolongements tubulaires cytoplasmiques (*filopodia* ou filopodes). Le rôle de ces derniers serait de faciliter l'attachement à la surface des pneumocytes de type I, d'augmenter la surface parasitaire de contact et accroître ainsi les échanges nutritifs avec ses cellules hôtes (Itatani et Marshall, 1988 ; Nielsen et Settnes, 1991). Enfin, aucun flagelle, ni cil, ni cytostome ou

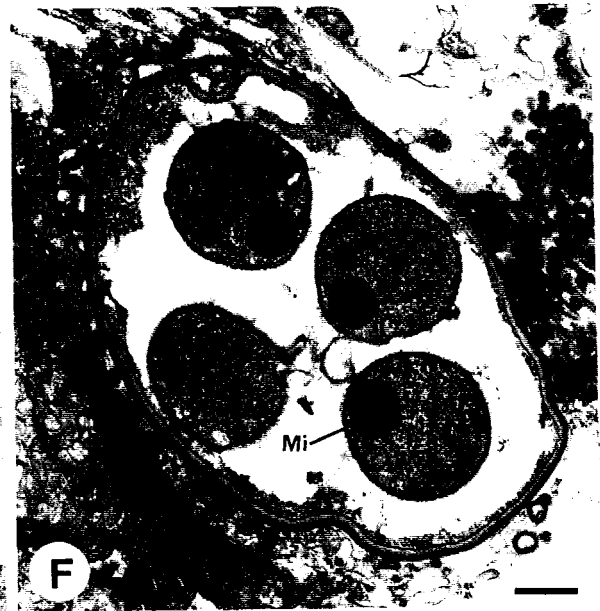
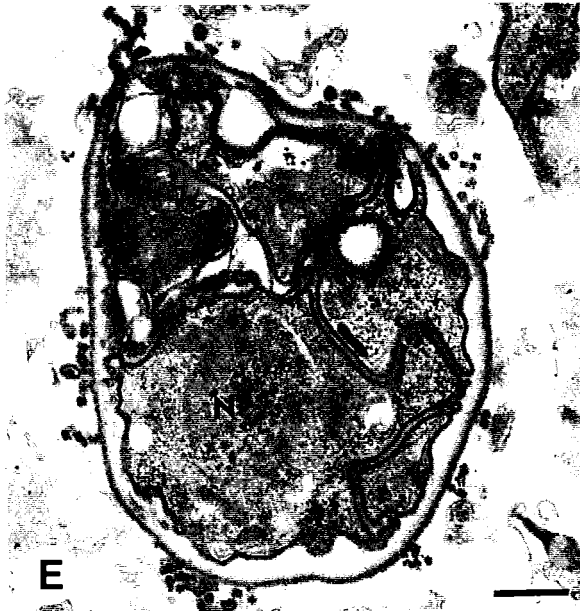
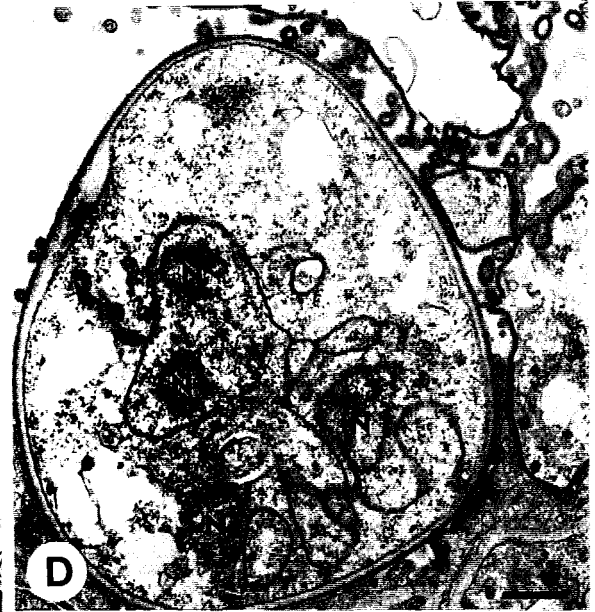
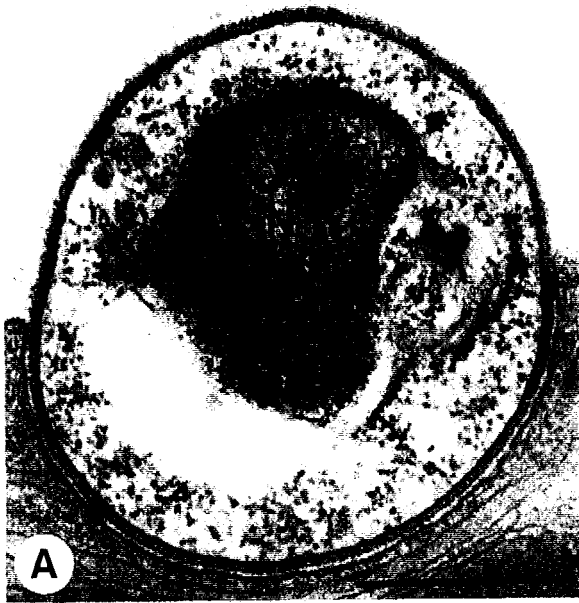
Tableau 1. Les stades parasitaires de *Pneumocystis carinii* en microscopie photonique et électronique selon Dei-Cas *et al.* (1990).

|  | Trophozoïte   | Prékyste   |   |  | Kyste  |
|--|---|--|---|--|--|
|  |   | Précoce  | Intermédiaire   | Tardif   |  |
| MP <sup>(1)</sup><br>BTO*<br>RAL555***   | -<br>+  | -<br>+   | +<br>+  | +<br>+   | +<br>+   |
| ME <sup>(2)</sup> [11]<br>Forme<br>Noyaux<br>Complexe<br>synaptonémal<br>GAN****<br>Fuseaux de division<br>Mitochondries<br>Paroi<br>Filopodia | irrégulière<br>1<br><br>Non<br>Non<br>Non<br>allongées<br>2 couches<br>20-30 nm<br>nombreux | ovoïde<br>1 (2 µm)<br><br>Oui<br>Non<br>Non<br>groupées<br>2 couches<br>40-50 nm<br>quelques | ovoïde<br>2-4<br><br>Non<br>Oui<br>Oui<br>groupées<br>3 couches<br>100 nm<br>quelques | ovoïde<br>4-8 (0,5 µm)<br><br>Non<br>Oui<br>Non<br>?<br>3 couches<br>80-120 nm<br>quelques | ovoïde<br>1****<br><br>Non<br>Non<br>Non<br>1****<br>3 couches<br>épaisses<br>quelques |

\* Bleu de toluidine O : coloration métachromatique des formes à paroi à trois couches. \*\* Coloration panoptique : paroi à 3 couches non colorée (halo clair). \*\*\* Dans chaque corps intrakystique. \*\*\*\* Organite associé au noyau. (1) MP : microscopie photonique ; (2) ME : microscopie électronique.



**Figure 1.** Différents stades de *Pneumocystis carinii* en microscopie électronique à transmission. **A** : jeune trophozoïte attaché à un pneumocyte de type I ; **B** : trophozoïte dans la lumière alvéolaire ; **C** : prékyste intermédiaire. La paroi cellulaire caractéristique et deux noyaux sont bien visibles ; **D** : prékyste intermédiaire dans lequel l'individualisation des corps intrakystiques est plus avancée ; **E** : kyste mature contenant des corps intrakystiques amoéboïdes ; **F** : kyste mature montrant 4 corps intrakystiques sphériques. CIK : corps intrakystiques ; Mi : mitochondrie ; N : noyau. La pointe de flèche signale des filopodes. Barre = 0,5  $\mu\text{m}$ .



complexe apical ne sont observés (Yoshida, 1989).

- Le **prékyste** mesure de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre et se caractérise par un arrondissement de son contour et une forte diminution du nombre de prolongements tubulaires. Par sa structure et son développement, il est défini comme étant la forme intermédiaire entre le trophozoïte et le kyste mature. L'évolution de ce stade, permet de reconnaître des prékystes précoces, intermédiaires et tardifs.

Le **prékyste précoce** est uninucléé et possède une paroi similaire à celle du trophozoïte. Matsumoto et Yoshida (1984) ont mis en évidence à ce stade des complexes synaptonémaux. Ces structures témoignent de l'appariement et de l'alignement des chromosomes homologues durant la prophase de première division méiotique, zygotène et pachytène.

Le **prékyste intermédiaire** présente de 2 à 8 noyaux. Une couche intermédiaire peu dense aux électrons vient s'intercaler entre la membrane plasmique et la couche dense externe (Figure 1).

Le **prékyste tardif** présente une paroi plus épaisse, qui délimite un cytoplasme dans lequel vont s'individualiser, par invagination de la membrane plasmique, les 8 corps intrakystiques (CIK) uninucléés.

- Le **kyste mature** mesure de 4 à 6  $\mu\text{m}$ . Il possède une paroi semblable à celle des prékystes intermédiaires et tardifs. Il contient 8 CIK bien individualisés, uninucléés (Figure 1). Sur la paroi des CIK, a été décrite une deuxième membrane (Vávra et Kucera, 1970) à double feuillet lipidique. Similaire à la membrane plasmique, elle entoure la couche pariétale dense aux électrons. Cette membrane "externe" a été retrouvée dans la couche externe dense aux électrons de la paroi kystique, affleurant la couche intermédiaire peu dense (DeStéfano *et al.*, 1990a). Après fixation des parasites dans des conditions optimales (pression osmotique élevée), cette membrane apparaît comme un fin dépôt osmiophile chez les trophozoïtes, les prékystes et dans la paroi kystique (Palluault *et al.*, 1992a). Cette membrane pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes d'osmorégulation ainsi que dans l'incorporation d'éléments nutritifs ; elle pourrait aussi participer aux interactions parasite-cellule hôte et être une cible potentielle pour des agents antimicrobiens (DeStéfano *et al.*, 1990a).

Plusieurs cycles biologiques ont été proposés à partir d'études ultrastructurales menées sur différentes espèces hôtes (Campbell, 1972 ; Vossen *et al.*, 1978 ; Yoshida, 1989).

Yoshida a proposé, en 1989, un cycle biologique de *P. carinii* chez le rat : les 8 CIK seraient haploïdes et évolueraient après exkystement en trophozoïtes. Ces derniers rétabliraient la diploïdie par fusion. Le noyau du prékyste précoce subirait une première division méiotique signée par la présence de complexes synaptonémaux (Matsumoto et Yoshida, 1984). La formation des 8 CIK haploïdes se ferait par invagination de la membrane plasmique prékystique autour de chacun des 8 noyaux. A ce cycle sexué s'ajouterait un cycle asexué où les trophozoïtes, haploïdes ou diploïdes, se multiplieraient par division binaire et/ou par endodiogénie (Figure 2).

Les différents stades parasitaires de *P. carinii* sont également identifiables après coloration panoptique au méthanol-Giemsa (Bommer, 1966). Cette coloration est couramment employée en recherche et pour le diagnostic biologique de PPC. La paroi du kyste n'est pas colorée et apparaît comme un halo clair. Les noyaux des trophozoïtes et des CIK sont colorés en pourpre. Les trophozoïtes ont un cytoplasme bleuté. Les réactifs RAL-555 et Diff Quick (Kits commercialisés) permettent de réaliser des colorations panoptiques rapides (moins de 2 minutes) qui colorent tous les stades parasitaires (Figure 3) avec une qualité proche de celle du Giemsa (Soulez *et al.*, 1988 ; Tollerad *et al.*, 1989 ; Soulez *et al.*, 1991).

## 2-2-2 Les modèles animaux de pneumocystose

Les modèles animaux de PPC ont joué, et jouent toujours un rôle central dans l'avancée de la recherche sur *P. carinii*. Ce dernier est retrouvé dans les poumons de nombreux mammifères (Hughes, 1987). Les rats (Weller, 1956), les souris (Hughes, 1987), les furets (Stokes *et al.*, 1987), les lapereaux (Soulez *et al.*, 1989), les porcelets (Settnes *et al.*, 1991), le poulain (Shively *et al.*, 1973), le singe (Richer *et al.*, 1978), le chat et le chien (Settnes et Hasselager, 1984 ; Hagler *et al.*, 1987 ; Shiota *et al.*, 1990). Rats, souris, lapins, furets et porcelets sont utilisés comme hôtes expérimentaux (Walzer, 1991b).

Le modèle le plus couramment utilisé est le rat (Armstrong et Cushion, 1994a). Soumis à un traitement immunodéprimant prolongé, le rat qui hébergerait à l'état latent *P. carinii* développe alors une PPC en quelques mois. Parmi les traitements immunosuppresseurs tels que la cyclophosphamide (Frenkel *et al.*, 1966) ou la cyclosporine (Hughes, 1982b), l'administration de corticoïdes reste le plus efficace pour induire une pneumocystose (Hughes, 1989b). La voie d'administration peut être sous-cutanée (Hughes, 1987) ou orale. Pour cette

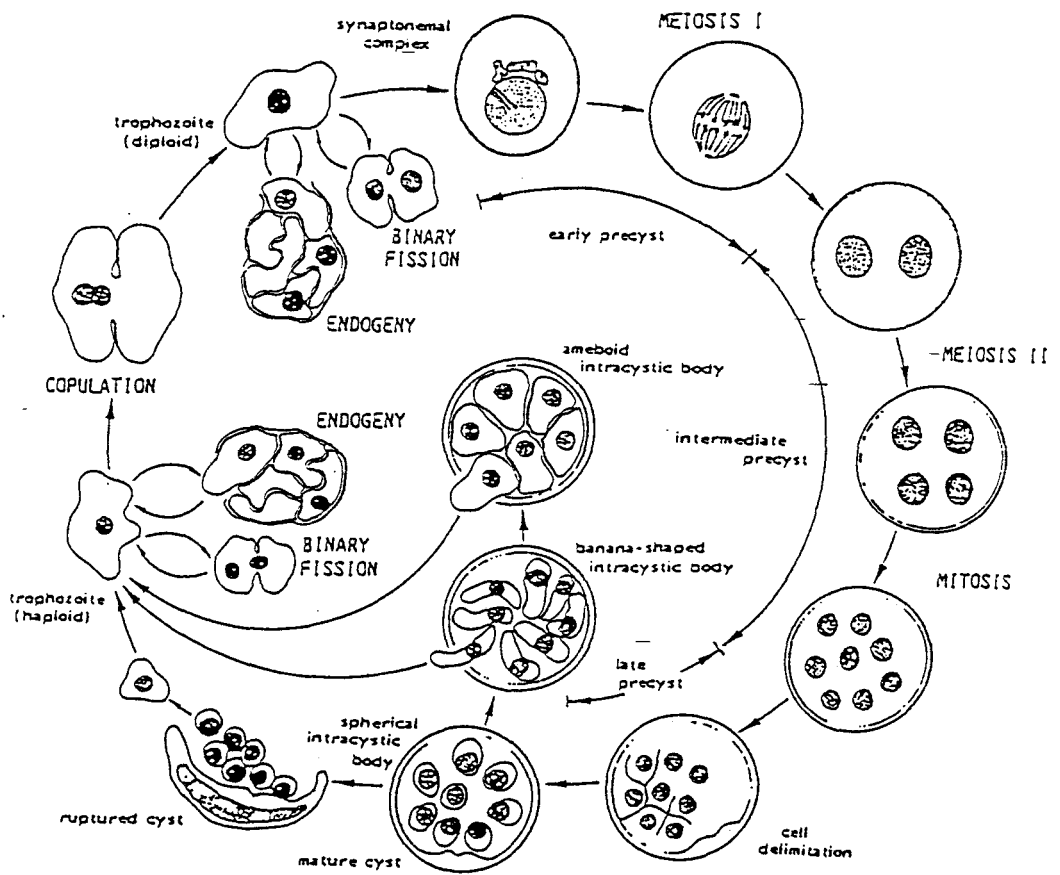
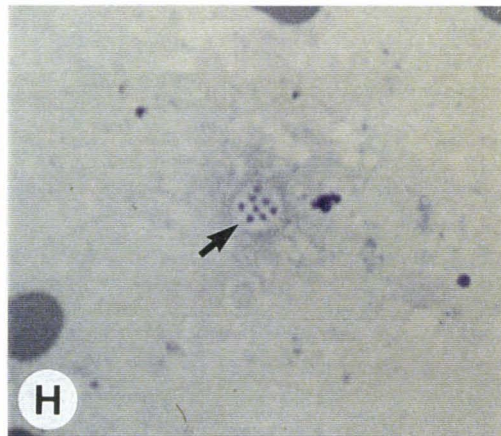
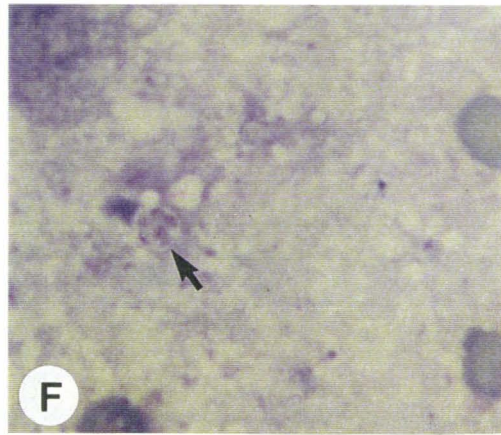
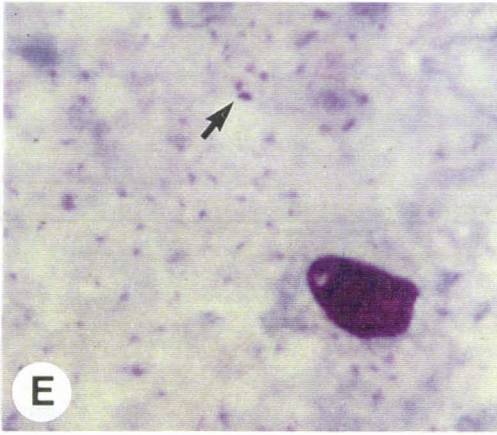
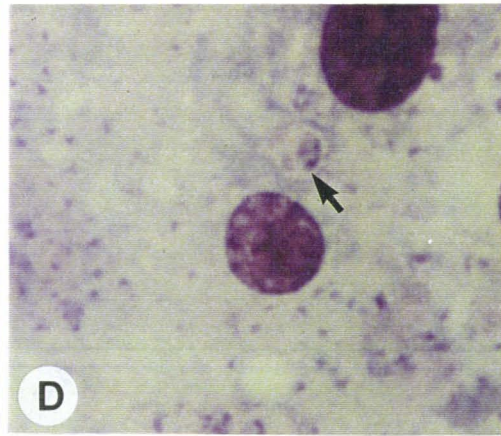
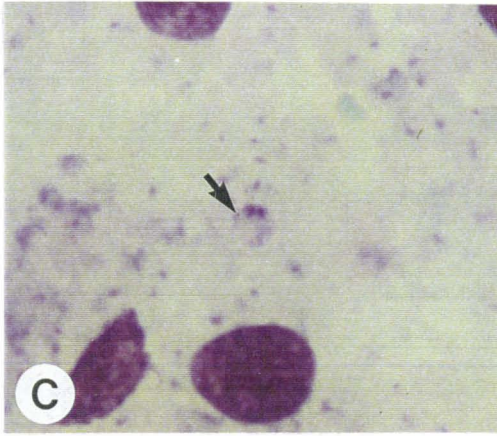
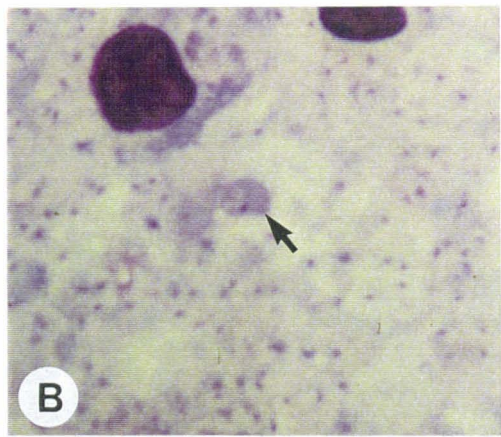
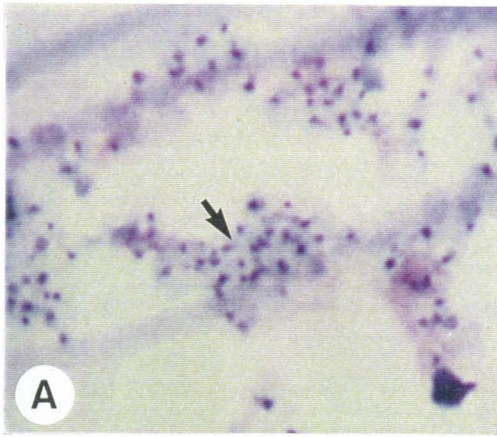


Figure 2. Cycle biologique de *Pneumocystis carinii* proposé par Yoshida (1989).

**Figure 3.** Différents stades parasitaires de *Pneumocystis carinii* colorés au RAL-555.  
**A** : amas de trophozoïtes ; **B** : prékyste précoce ; **C** : prékyste intermédiaire à 2 noyaux ; **D** : prékyste intermédiaire à 3 noyaux ; **E** : prékyste intermédiaire à 4 noyaux ; **F** : prékyste tardif ; **G** et **H** : kystes matures renfermant 8 CIK. Les flèches signalent le stade parasitaire indiqué. Grossissement : x 1100.





dernière, le corticoïde est placé dans l'eau de boisson (Armstrong *et al.*, 1991).

La souris constitue un autre modèle intéressant pour étudier *P. carinii* (Walzer *et al.*, 1977). Comme le rat, des colonies de souris hébergeant *P. carinii* à l'état latent et soumises à l'administration de corticoïdes, développent une pneumocystose (Walzer *et al.*, 1983). Cependant, l'infection engendrée est moins intense et plus variable que celle obtenue chez les rats (Walzer et Powell, 1982). Des souches murines atteintes d'un déficit immunitaire congénital sont aussi utilisées comme hôtes expérimentaux sans adjonction de corticoïdes : des souris "Severe Combined Immunodeficiency" (SCID) (Roths *et al.*, 1990 ; Soulez *et al.*, 1991b) et des souris ou rats athymiques nu/nu (Walzer *et al.*, 1977 ; Walzer et Powell, 1982; Furuta et Ueda, 1987).

Le furet développe aussi une PPC lorsqu'il est traité par les corticoïdes (Gigliotti *et al.*, 1988a). Comparé au rat et à la souris, cet animal supporte mieux l'administration prolongée de ces drogues. De plus, il tolère mieux des manipulations drastiques telles que le lavage broncho-alvéolaire (LBA) (Armstrong et Cushion, 1994a).

Le modèle lapereau, développé dans notre laboratoire depuis plusieurs années, se caractérise par l'apparition d'une pneumocystose spontanée au moment du sevrage, en l'absence d'immunodépression induite (Soulez *et al.*, 1989). Une étude réalisée sur des animaux provenant de plusieurs régions, a montré que l'ensemble des lapereaux sevrés développait une pneumonie d'importance variable mais généralement bénigne. Au cours des semaines suivant le sevrage, les lapins guérissent spontanément et produisent parallèlement des anticorps spécifiques (Dei-Cas *et al.*, 1990).

Au Danemark, *P. carinii* est responsable d'une pneumonie chez des cochons d'élevage (Settnes et Henriksen, 1989 ; Bille-Hansen *et al.*, 1990). La pneumocystose est décrite chez environ 40% des cochons âgés de 4 à 10 semaines (Bille-Hansen *et al.*, 1990).

### 2-2-3 Culture *in vitro* de *P. carinii*

De nombreux aspects concernant la biologie de *P. carinii* restent inconnus du fait de l'absence de sources standard et abondantes de parasites, dépourvues de contaminants pulmonaires. Comme il n'existe, à l'heure actuelle, aucun système de culture continue de *P. carinii*, les recherches restent encore très dépendantes des modèles animaux. La culture de *P. carinii* permettrait des avancées considérables sur un plan fondamental et dans le



développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Sloand *et al.*, 1993).

Dès la description de la PPC, des auteurs ont tenté de cultiver *P. carinii* à partir de prélèvements de patients, en exploitant des milieux de culture standards ou modifiés, utilisés pour les champignons (Biermengrader, 1953 ; Giese, 1953 ; Bauch et Ladstätter, 1953 ; Csillag et Brandstein, 1954 ; Stapka *et al.*, 1957). Ces auteurs rapportaient le développement de "colonies" et concluaient à la nature fongique de *P. carinii*. Mais, tous ces travaux ont été remis en cause et les résultats rapportés n'ont pas pu être reproduits.

C'est réellement à partir des années 1970 que les véritables travaux sur la culture de *P. carinii* prennent leur élan. De nombreux obstacles ont gêné le développement de modèles de culture de *P. carinii*, notamment la difficulté pour quantifier précisément les parasites, l'absence de tests de viabilité fiables et reproductibles, la présence de débris cellulaires après l'extraction des parasites du poumon infecté et parfois la contamination par des agents infectieux tels que les bactéries ou les champignons microscopiques (Armstrong et Cushion, 1994b). Malgré ces difficultés, de multiples tentatives ont été réalisées pour essayer de cultiver *P. carinii*. Elles peuvent être regroupées dans trois stratégies : les cultures sur lignées primaires ou continues de cellules nourricières (co-cultures), les cultures axéniques et les cultures d'explants pulmonaires parasités.

#### 2-2-3-1 Co-culture

La culture de *P. carinii* fut tentée sur de très nombreuses lignées cellulaires continues ou non. La plupart sont des cellules fibroblastiques ou épithéliales des poumons de mammifères, adultes ou foetales : A549 (cellules épithéliales alvéolaires humaines), Vero (fibroblaste de rein de singe vert africain), MRC-5, WI 38 (fibroblastes du poumon humain), WI 38VA13-2RA, HEL (cellules épithéliales embryonnaires du poumon humain), Mv 1 Lu (fibroblastes de vison) (Sloand *et al.*, 1993). Une liste exhaustive des lignées primaires ou continues utilisées pour la culture de *P. carinii* a été publiée dans des revues récentes (Cushion, 1991 ; Sloan *et al.*, 1993).

Les co-cultures de *P. carinii* sont développées soit dans des boîtes de culture classiques ou à la surface de billes (polyester ou matrice de dextran) et incubées en atmosphère enrichie avec 5% de CO<sub>2</sub>, à 35°C ou 37°C (Pifer *et al.*, 1977 et 1978 ; Latorre *et al.*, 1977 ; Cushion *et al.*, 1985 ; Armstrong *et al.*, 1989 ; Cushion, 1989 ; Durkin *et al.*, 1991 ; Mirovsky et

Fishman, 1993).

Les résultats obtenus dans ces différents systèmes sont remarquablement similaires. Le nombre de parasites augmente 2 à 10 fois après 7 à 10 jours de culture, puis décroît rapidement. Si l'on réalise des repiquages, la croissance décroît graduellement et s'arrête après 2 à 3 passages (Cushion et Walzer, 1984 ; Mirovsky et Fishman, 1993). Dans ces expériences, l'infectivité des parasites provenant de la culture a été peu explorée (Mirovsky et Fishman, 1993 ; Aliouat *et al.*, 1995). Toutefois, les parasites seraient métaboliquement actifs durant les premiers jours de culture ou au moins capables d'incorporer l'acide para-aminobenzoïque pour la synthèse de l'acide folique (Kovacs *et al.*, 1989c).

#### 2-2-3-2 Culture axénique

Des résultats intéressants ont également été obtenus sans cellules nourricières. Deux types de milieu ont été utilisés : (i) milieux de culture classiquement utilisés pour l'entretien des cellules (DMEM ou L-15) enrichis en cystéine et supplémentés avec du 2-mercaptoéthanol et de la bathocuprine (Tegoshi et Yoshida, 1989) ; (ii) un milieu de culture composé de néopeptone et de N-acetylglucosamine à pH 4,6 (Cushion et Ebbets, 1990). Contre toute attente, les cultures axéniques de *P. carinii* permettent un développement parasitaire aussi important que celui obtenu dans les systèmes de co-culture.

#### 2-2-3-3 Culture d'explants pulmonaires parasités

La culture d'explant pulmonaire (Stoner *et al.*, 1978) a été adaptée et développée pour la culture de *P. carinii* (Dei-Cas *et al.*, 1989). Des petits fragments de poumon de lapin parasité par *P. carinii* étaient placés sur des cubes d'éponge hémostatiques et maintenus *in vitro* dans des plaques de cultures de 12 puits. L'ensemble était incubé dans du milieu de culture CMRL-1066 supplémenté avec 10% de SVF, en atmosphère contenant 50% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> et 45% N<sub>2</sub>. Le milieu de culture était changé tous les 3 jours.

Dans ce système, le nombre de trophozoïtes est multiplié par 6 après 41 jours de culture. Les parasites et le tissu pulmonaire restent bien préservés jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour de culture. Mais, la nécessité de séparer les parasites des fragments pulmonaires, afin d'utiliser ces micro-organismes pour d'autres expériences, reste l'inconvénient majeur de ce modèle de culture de *P. carinii*.

#### 2-2-4 Position taxonomique

Depuis très longtemps, de nombreux auteurs ont tenté de classer cet organisme eucaryote unicellulaire pour définir clairement sa position taxonomique (Csillag, 1955 ; Vávra et Kucera, 1970 ; Frenkel, 1976 ; Edman *et al.*, 1988 ; Gradus *et al.*, 1988 ; Hughes, 1989a ; Walzer, 1989 ; Frenkel *et al.*, 1990 ; Jackson *et al.*, 1991a ; Pixley *et al.*, 1991 ; Stringer *et al.*, 1992 ; Dei-Cas *et al.*, 1992 ; Wakefield *et al.*, 1992).

L'aspect amoéboïde du trophozoïte et la présence de filopodes rapprochent ce micro-organisme sur le plan morphologique des protozoaires. Kovacs *et al.* (1993) remarquent que *P. carinii*, comme quelques protozoaires (*Trypanosoma brucei*) ou certaines bactéries pathogènes (*Neisseriae*, *Borrelia*), présente un antigène majeur de surface capable de varier; ceci faciliterait l'échappement du parasite vis-à-vis de la réponse immune. Or, ce phénomène n'a pas encore été signalé chez un champignon pathogène. Sa sensibilité vis-à-vis de drogues anti-protozoaires telles que la pentamidine ou encore l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et sa résistance vis-à-vis d'antifongiques courants permettent aussi de le rapprocher de l'embranchement des protozoaires (Dei-Cas *et al.*, 1990). L'absence d'ergostérol dans la membrane de *P. carinii* (Yoshikawa *et al.*, 1987 ; Kaneshiro *et al.*, 1994) constitue un argument contre sa nature fongique bien que certains champignons tels que les Urédinales ne renferment pas d'ergostérol. Notons que cet organisme est capable de synthétiser *de novo* des folates à partir de l'acide para-aminobenzoïque (Kovacs *et al.*, 1989c) comme *T. gondii* et d'autres Apicomplexa. Enfin, la quantité d'ADN par organisme chez *P. carinii* serait plus proche de celle des protozoaires que de celle des Fungi (Gradus *et al.*, 1988).

En revanche, d'autres arguments ont été accumulés dont certains, considérés aujourd'hui comme quasiment définitifs, permettent de positionner *P. carinii* parmi les Fungi (Edman et Sogin, 1994). Dès 1970, Vávra et Kucera ont proposé de classer *P. carinii* parmi les champignons sur ses caractéristiques ultrastructurales. Cette proposition fut reprise par Haque *et al.* (1987). Hughes (1989a) regroupe, à partir d'observations ultrastructurales faites sur *P. carinii*, les arguments morphologiques généralement considérés comme caractéristiques des cellules fongiques : "pauvreté en organites, noyaux indistincts, des espaces vacuolaires, des mitochondries très peu développées, une organisation du réticulum endoplasmique très pauvre". Mais, cette description ne correspond plus avec l'ultrastructure de *P. carinii* décrite à la lumière de méthodes de fixation-inclusion nouvellement établies (Palluault *et al.*, 1992a

et 1992b). Toutefois, les affinités tinctoriales et la structure de la paroi des formes kystiques évoquent celles de la paroi fongique (Matsumoto *et al.*, 1989 ; Hughes, 1989a). De plus, bien que résistant à l'amphotéricine B, ce parasite est sensible à d'autres molécules antifongiques comme les échinocandines et papulocandines (Schmatz *et al.*, 1990). Au niveau de la paroi kystique du parasite, il existerait des  $\beta$ 1-3 glucanes, composés majeurs de la paroi des Fungi (DeStefano *et al.*, 1990b). De plus, des anticorps monoclonaux dirigés contre *P. carinii* croisent avec des micro-champignons (Lundgren *et al.*, 1992).

De nombreux travaux de biologie moléculaires ont révélé chez *P. carinii* des homologies marquées avec des gènes appartenant aux champignons. Ainsi, le gène du facteur d'élongation 3 (EF-3), indispensable à l'élongation protéique chez de nombreux genres fongiques, a été détecté chez *P. carinii* de rat (Ypma-Wong *et al.*, 1992). Ce facteur d'élongation présente un haut degré de similarité avec celui de *S. cerevisiae* (Edman et Sogin, 1994). Les enzymes thymidylate synthétase (TS) et dihydrofolate réductase (DHFR), chez les protozoaires, sont codés par un même gène (Garret *et al.*, 1984) et constituent une même protéine bifonctionnelle (Ivanetich et Santi, 1990). Chez *P. carinii*, ces 2 enzymes sont 2 chaînes polypeptidiques séparées, monofonctionnelles et dont la synthèse est codée par 2 gènes situés sur des chromosomes différents (Edman *et al.*, 1989b et c). De plus, la TS de *P. carinii* présente une séquence aminée similaire à 65 % avec celle de *Saccharomyces cerevisiae* (Edman *et al.*, 1989b) et sa DHFR est proche de celles des Fungi (Edman et Sogin, 1994). De plus, *P. carinii* présente une forte homologie avec les Fungi au vu des séquences de l'ARNr 16S, 5,8S et 26S (Edman *et al.*, 1988 ; Stringer *et al.*, 1989 ; Liu *et al.*, 1992), le gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal mitochondrial ainsi que 6 autres séquences adjacentes dans l'ADN mitochondrial (Pixley *et al.*, 1991 ; Wakefield *et al.*, 1992) et enfin, avec la séquence aminée de la b-tubuline (Dyer *et al.*, 1992). Cependant, les auteurs ne s'accordent pas sur la position taxonomique précise de *P. carinii* parmi les Fungi (Tableau 2).

#### 2-2-5 Hétérogénéité génétique

Lorsque des isolats de *P. carinii* provenant de différents modèles animaux ou de patients infectés sont analysés, un polymorphisme est mis en évidence au niveau antigénique (Walzer et Linke, 1987 ; Lundgren *et al.*, 1991 ; Gigliotti, 1992 ; Bauer *et al.*, 1993 ; Andrews *et al.*, 1994), isoenzymatique (Mazars *et al.*, 1994 ; Dei-Cas *et al.*, 1994),

**Tableau 2.** Position taxonomique de *P. carinii*

| Auteurs                        | Gènes               | Organismes proches  |
|--------------------------------|---------------------|---|
| Edman <i>et al.</i> , 1988     | ARN 16S             | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br><i>Schizosaccharomyces pombe</i> |
| Edman <i>et al.</i> , 1989     | TS                  | <i>S. cerevisiae</i>  |
| Stringer <i>et al.</i> , 1989  | ARN 16S             | <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> ,<br><i>Candida albicans</i> |
| Watanabe <i>et al.</i> , 1989  | ARN 5S              | "Protista Fungi"  |
| Dyer <i>et al.</i> , 1992      | $\beta$ -tubuline   | Périzporiales et Sphaeriales<br>(Ascomycètes)                       |
| Liu <i>et al.</i> , 1992       | ARN 26S<br>ARN 5,8S | <i>S. cerevisiae</i>  |
| Wakefield <i>et al.</i> , 1992 | ADNr mit            | Ustomycètes   |
| Edman <i>et al.</i> , 1994     | ARN 16S             | <i>S. cerevisiae</i> (Ascomycètes)                                  |

caryotypique (Fishman *et al.*, 1989 ; Hong *et al.*, 1990 ; Weinberg et Durant, 1994) et nucléique (Sinclair *et al.*, 1991 ; Wakefield *et al.*, 1992 ; Lee *et al.*, 1993 ; Lu *et al.*, 1994).

### 2-2-5-1 Polymorphisme antigénique

Depuis quelques années, une variabilité antigénique de *P. carinii* a été détectée en fonction de l'espèce hôte. Ainsi, les IgG humaines reconnaissent une protéine de 52 kDa chez *P. carinii* humain et des protéines de 65-70, 60, 50, 35 kDa chez *P. carinii* de rat (Blumenfed *et al.*, 1990). La variabilité antigénique est principalement observée en Western blot, soit avec des anticorps polyclonaux (Graves *et al.*, 1986a ; Walzer et Linke, 1987 ; Kovacs *et al.*, 1988a), soit avec des anticorps monoclonaux (Graves, 1989 ; Kovacs *et al.*, 1989b ; Gigliotti, 1992). Ainsi, la réactivité des anticorps monoclonaux dirigés respectivement contre la MSG (glycoprotéine majeure de surface) de *P. carinii* de rat, de souris, de furet et d'homme a été explorée. Ces études révèlent une variation antigénique parasitaire fonction de l'espèce hôte, sauf pour un épitope. La MSG est donc représentée chez *P. carinii* de différents mammifères par des glycoprotéines similaires, mais distinctes antigéniquement (Gigliotti *et al.*, 1988a ; Lundgren *et al.*, 1991 ; Gigliotti, 1992).

Un second niveau de variation antigénique a été récemment rapporté (Andrews *et al.*, 1994 ; Vasquez *et al.*, 1994). Le Western blot et les tests de prolifération de lymphocytes T ont permis de révéler des réactivités différentes d'anticorps monoclonaux vis-à-vis des MSG de 4 "souches" de *P. carinii* de rat. Ceci suggère une expression variable de la MSG dans les différents isolats (Andrews *et al.*, 1994).

Plusieurs gènes codant pour la MSG ont été identifiés dans l'ADN de *P. carinii* de rat (Kovacs *et al.*, 1993 ; Wada *et al.*, 1993 ; Garbe et Stringer, 1994 ; Sunkin *et al.*, 1994 ; Wada et Nakamura, 1994). Ces gènes multiples permettent la synthèse de protéines similaires mais non identiques. Ces dernières renferment un pourcentage élevé de cystéine (5%), résidus hautement conservés, et contiennent une région hydrophobe sur leur extrémité C-terminale, compatible avec un ancrage membranaire de type glycosyl phosphatidylinositol. Le polymorphisme de la MSG pourrait constituer un mécanisme d'échappement vis-à-vis des défenses de l'hôte (Kovacs *et al.*, 1993 ; Wada *et al.*, 1993).

### 2-2-5-2 Polymorphisme isoenzymatique

Une étude du polymorphisme isoenzymatique de *P. carinii* a été réalisée dans notre laboratoire (Mazars *et al.*, 1994). Trente isolats de *P. carinii* provenant de rats, de souris, et de lapins ont été analysés par MLEE en utilisant 4 systèmes enzymatiques : glucose- phosphate isomérase (GPI), malate déshydrogénase (MDH), 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD), et leucine aminopeptidase (LAP). Des différences ont été détectées, d'une part en fonction de l'espèce hôte au niveau de ces 4 systèmes enzymatiques, d'autre part au sein des isolats parasitaires de rat uniquement pour la MDH. Ainsi, ce travail révèle des différences génétiques chez *P. carinii* inter- et intra-espèce-hôte (Mazars *et al.*, 1994).

### 2-2-5-3 Polymorphisme caryotypique

Plus récemment, des différences dans le génome de *P. carinii* ont été mises en évidence, soit au niveau structural, soit au niveau nucléaire. Ainsi, le caryotype de *P. carinii* a été étudié par électrophorèse en champ pulsé, associée parfois à des hybridations (Tableau 3). Plusieurs informations émanent de ces travaux : (i) le nombre de chromosomes est différent chez *P. carinii* de rat, de souris, de furet et d'homme (Hong *et al.*, 1990 ; Weinberg et Bartlett, 1991 ; Weinberg et Durant, 1994), (ii) le nombre de chromosomes n'est pas modifié après entretien du parasite en culture (Weinberg et Bartlett, 1991 ; Weinberg et Durant, 1994), (iii) les rats peuvent héberger des parasites présentant des caryotypes différents (prototype et/ou variant) (Hong *et al.*, 1990 ; Cushion *et al.*, 1993a et 1993b).

Il est important de remarquer que le nombre de chromosomes observés est très différent en fonction des hôtes mais les propositions diffèrent aussi selon des auteurs. La palette varie de 5 pour *P. carinii* provenant de furet (Weinberg et Bartlett, 1991) à plus de 20 chromosomes pour des isolats parasitaires murins (Hong *et al.*, 1990). Les conditions techniques influencent directement le caryotype obtenu, comme l'ont montré Weinberg et Durant (1994). Les variations peuvent aussi s'expliquer par le fait que les laboratoires utilisent différentes souches de rats (Cushion *et al.*, 1993b). Néanmoins, tout récemment, 3 laboratoires ont développé en collaboration des analyses caryotypiques de *P. carinii* infectant 6 souches de rats différentes: Brown Norway (Charles River), Wistar (Hilltop), Sprague-Dawley (Zivic Miller), Holtzman (Harlan), Sprague-Dawley (Hilltop), Sprague-Dawley (Harlan). Cette étude réalisée par Weinberg *et al.* (1994a) a confirmé l'existence de 4 prototypes de *P. carinii* de rat (Cushion

**Tableau 3.** Etudes sur le caryotype de *Pneumocystis carinii*.

| Auteurs                      | Technique électrophorétique | Source de <i>Pneumocystis carinii</i> | Nombre de chromosomes     | Taille des chromosomes (kb) | Taille du génome haploïde (x 10 <sup>6</sup> pb) |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|--|
| Fishman <i>et al.</i> 1989   | OFAGE                       | rat                                   | 13                        | 200-2000                    | > 8,7  |
| Yonathan <i>et al.</i> 1989  | OFAGE + CHEF                | rat                                   | 16-20                     | 320-680                     | ~ 8  |
| Edman <i>et al.</i> 1989b    | TAFE                        | rat                                   | > 13                      | 295-710                     |  |
| Lundgren <i>et al.</i> 1990  | TAFE                        | rat                                   | > 13                      | 295-710                     | 7-10   |
| Hong <i>et al.</i> 1990      | CHEF                        | rat                                   | 15-19 + 22 <sup>(1)</sup> | 300-700                     | 8-10   |
|                              |                             | homme                                 | 10-12                     | 300-700                     |  |
| Zhang <i>et al.</i> 1991     | FIGE                        | rat                                   | 14-15                     | 295-705                     |  |
| Weinberg <i>et al.</i> 1991  | CHEF                        | rat <sup>(2)</sup>                    | 8                         | 350-700                     |  |
|                              |                             | culture <sup>(2)</sup>                | 8                         | 350-700                     |  |
|                              |                             | furet                                 | 5                         | 580-900                     |  |
| Cushion <i>et al.</i> 1993a  | FIGE                        | rat (prototype)                       | 13 <sup>(3)</sup>         | 250-700                     |  |
|                              |                             | rat (variant)                         | 22 <sup>(3)</sup>         | 350-400 + 600               |  |
| Cushion <i>et al.</i> 1993b  | FIGE + CHEF                 | rat (prototype) <sup>(4)</sup>        | 13-15                     | 300-700                     | 7-8  |
|                              |                             | rat (variant) <sup>(4)</sup>          | 20-24                     |                             |  |
| Stringer <i>et al.</i> 1993b | CHEF                        | rat (prototype)                       | 15 <sup>(3)</sup>         | 300-1000                    |  |
|                              |                             | homme                                 | 13                        | 300-1000                    |  |
| Weinberg <i>et al.</i> 1994a | CHEF                        | rat <sup>(2-5)</sup>                  | 14                        | 315-680                     |  |
|                              |                             | culture <sup>(2-5)</sup>              | 14                        | 315-680                     |  |
|                              |                             | souris                                | 15                        | 315-610                     |  |
|                              |                             | furet                                 | 9                         | 410-760                     |  |

(1) nombre estimé chez les parasites hébergés par le rat Lewis (Harlan); (2) le caryotype de *P. carinii* de rat est analysé, soit après extraction, soit après culture; (3) la sonde d'ADN répété s'hybride avec toutes les bandes du caryotype à 13 bandes et avec les 13 bandes comigrantes du caryotype à 22 bandes. Par PCR, un amplicon de l'ADNr 18S est produit correspondant à la séquence attendue à partir des caryotypes à 13 bandes. A partir des caryotypes à 22 bandes, 2 amplicons sont révélés l'un identique au précédent, l'autre de séquence différente sans intron; (4) pour un même nombre de bandes (13 à 15), 4 profils sont observés révélant 4 prototypes. Une forme supplémentaire ou variante est mise en évidence à l'état de coinfection avec une forme prototype; (5) des sondes radiomarquées ont été construites à partir des gènes de la DHFR, de la TS et de la b-tubuline de *P. carinii* de rat. Chaque sonde s'hybride avec une seule bande des caryotypes de *P. carinii* de rat et de souris.



*et al.*, 1993b) et révéla l'existence d'un 5<sup>ème</sup> prototype.

Dans tous les cas, l'ordre de taille des chromosomes est similaire à celui rapporté chez des protozoaires comme *Leishmania*, *Plasmodium*, ou des micro-champignons comme *S. cerevisiae* (Lundgren *et al.*, 1990). La taille du génome haploïde de *P. carinii* de rat est comprise entre  $7.10^6$  et  $10.10^6$  pb (Tableau 3). En utilisant comme sonde un fragment du gène de la TS sur une banque génomique d'ADN de *P. carinii* de rat, 0,12% des clones sont hybridés ; cette expérience permet d'estimer la taille du génome parasite à environ  $10^7$  pb, soit à peu près 2/3 du génome de *S. cerevisiae* (Stringer, 1994).

#### 2-2-5-4 Polymorphisme des séquences nucléiques

Le premier travail rapportant des différences de séquence est relativement récent puisqu'il date de 1991. Depuis, ce domaine est en pleine évolution. En effet, de nombreuses séquences ou fragments de gènes de *P. carinii* de différentes espèces hôtes ont été publiés : le gène de l'ARN ribosomal mitochondrial, l'ensemble des gènes des ARN ribosomiaux cytoplasmiques (ARNr 16S, 5S, 5,8S et 26S), les séquences répétées et gènes codant pour la MSG, les gènes de l'a-tubuline et de la b-tubuline, le gène arom et le gène de la TS (Tableau 4). Ainsi, des différences en fonction de l'espèce hôte ont été rapportées (Sinclair *et al.*, 1991; Liu et Leibowitz, 1993 ; Peters *et al.*, 1994a ; Sunkin *et al.*, 1994 ; Mazars *et al.*, 1994 et 1995). Depuis peu, des différences ont été détectées entre isolats parasites infectant des hôtes d'une même espèce (Lee *et al.*, 1993 ; Peters *et al.*, 1994b ; Wakefield *et al.*, 1994a ; Ortiz-Rivera *et al.*, 1995).

### 2-3 La pneumocystose

#### 2-3-1 Répartition géographique et spectre d'hôte de *P. carinii*

Ce micro-organisme eucaryote, unicellulaire est un parasite ubiquitaire tant par son spectre d'hôtes que par sa répartition géographique.

Jusqu'à présent *P. carinii* était considéré comme une seule et même espèce euryxène, retrouvé en faible nombre sous une forme saprophyte ou latente dans les poumons de nombreux mammifères sains tels que les marsupiaux, les rongeurs, les édentés, les lagomorphes, les carnivores, les ongulés, les primates (Hughes, 1987).

La distribution géographique de *P. carinii* apparaît mondiale ; de nombreux cas de

**Tableau 4.** Séquences de gènes ou de fragments de gènes de *Pneumocystis carinii*, publiées chez différentes espèces hôtes.

| Gène<br>de <i>P. carinii</i> | Espèce hôte |        |       |       |        |       |          |
|------------------------------|-------------|--------|-------|-------|--------|-------|----------|
|                              | rat         | souris | homme | furet | cheval | lapin | musarai. |
| mt ADNr                      | +           | +      | +*    | +     | +      | +     | +*       |
| ADNr 16S                     | +*          |        | +     |       |        |       |          |
| ADNr 5S                      | +           | +      | +     |       |        |       |          |
| ADNr 5,8S                    | +*          |        | +     |       |        |       |          |
| ADNr 26S                     | +*          |        | +     |       |        |       |          |
| ITS                          | +*          |        | +*    |       |        |       |          |
| a-tub.                       | +           |        | +     |       |        |       |          |
| b-tub.                       | +           |        | +     |       |        |       |          |
| gpA/MSG                      | +*          |        | +     | +     |        |       |          |
| <i>arom</i>                  | +           |        |       | +*    |        |       |          |
| TS                           | +           | +      | +     |       |        | +     |          |

musarai. = musaraigne; (\*) = des différences de séquences sont décrites dans des isolats parasitaires récoltés au sein d'une même espèce hôte.

**mt ADNr** : gène de l'ARNr de la grande sous-unité ribosomale mitochondriale (Sinclair *et al.*, 1991; Wakefield *et al.*, 1992 et 1994a; Lee *et al.*, 1993; De Luca *et al.*, 1994; Peters *et al.*, 1994a et b); **ADNr 16S** : gène de l'ARNr 16S de la petite sous-unité ribosomale (Edman *et al.*, 1988; Sogin *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992 et 1993; Stringer *et al.*, 1993b; Ortiz-Rivera *et al.*, 1994); **ADNr 5S** : gène de l'ARNr 5S de la grande sous-unité ribosomale (Watanabe *et al.*, 1989; Kitada *et al.*, 1991; De Luca *et al.*, 1994); **ADN 5,8S** : gène de l'ARNr 5,8S de la grande sous-unité ribosomale (Liu *et al.*, 1992 et 1993; Ortiz-Rivera *et al.*, 1994 et 1995); **ADN 26S** : gène de l'ARNr 26S de la grande sous-unité ribosomale (Liu *et al.*, 1992 et 1993; Ortiz-Rivera *et al.*, 1994 et 1995). **ITS** : espaceurs dans l'opéron ARNr (Liu *et al.*, 1992 et 1993; Lu *et al.*, 1994 a et b; Ortiz-Rivera *et al.*, 1995). **a-tub** : a-tubuline (Zhang *et al.*, 1993; Stringer *et al.*, 1993b). **b-tub** : b-tubuline (Dyer *et al.*, 1992; Edlind *et al.*, 1992). **gpA/MSG** : glycoprotéine majeure de surface (Haidaris *et al.*, 1992; Kovacs *et al.*, 1993; Wada *et al.*, 1993; Stringer *et al.*, 1993a; Sunkin *et al.*, 1994; Underwood *et al.*, 1994). ***arom*** : gène *arom* codant pour un polypeptide qui catalyse 5 étapes consécutives de la voie pré-chorismatique dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques (Banerji *et al.*, 1993 et 1994). **TS** : gène de la thymidylate synthétase (Edman *et al.*, 1989 ; Mazars *et al.*, 1995).

pneumocystose humaine ont été rapportés sur tous les continents (Hughes, 1987). Aux USA, plus de 70% des patients sidéens, non soumis à chimioprophylaxie, développent une PPC (Hughes, 1991a). Cette affection reste la principale cause de décès attribuée aux maladies infectieuses, chez ces patients (Hughes, 1991a). Parmi les enfants nés de femmes VIH+, 2,4% contractent une pneumocystose, soit environ 65% des enfants diagnostiqués VIH+ dans la première année de vie (Simonds *et al.*, 1995). La pneumocystose ne présente pas la même fréquence en Afrique. Elle touche environ 20% des patients sidéens au Zimbabwe et seulement 11% de ces mêmes malades en Centre Afrique (McLeod *et al.*, 1988 ; Carme *et al.*, 1991). De plus, la PPC n'a été détectée ni chez des patients sidéens en Uganda ou en Zambie (Lucas *et al.*, 1989 ; Elvin *et al.*, 1989), ni chez des patients VIH négatifs au Kenya (Griffin et Lucas, 1982). Il est intéressant de noter que des patients africains vivant en Europe développent une pneumocystose plus fréquemment que ceux vivant en Afrique (Blaser et Cohn, 1984 ; Clumeck *et al.*, 1984).

### 2-3-2 Transmission

Le seul mode de transmission bien établi est le passage d'un animal infesté à un autre animal (Hendley et Weller, 1971 ; Walzer *et al.*, 1977 ; Hughes, 1982a). La transmission interhumaine en milieu hospitalier a été fortement suspectée (Santiago-Delpin *et al.*, 1988 ; Chave *et al.*, 1991). La voie aérienne est le mode de transmission généralement admis (Hughes, 1987).

Cependant, la constatation d'une infection à *P. carinii* chez de très jeunes lapereaux dont la mère est peu parasitée (Soulez *et al.*, 1989) évoque la voie transplacentaire comme une voie supplémentaire d'infection (Dei-Cas *et al.*, 1990). De plus, cette hypothèse semble être confortée par une étude récente qui rapporte un passage materno-foetal de *P. carinii* chez des lapines gestantes (Céré *et al.*, 1995). L'existence de pneumocystoses chez des enfants prématurés est un troisième argument en faveur de la transmission materno-foetal de *P. carinii* (Gajusek, 1957).

La forme infectante de *P. carinii* demeure encore inconnue. Certains auteurs ont suggéré l'existence d'une forme parasitaire environnementale (Wakefield *et al.*, 1992 ; Dei-Cas *et al.*, 1992 et 1995). Tout récemment, des observations ont été décrites étayant cette dernière hypothèse ; des traces d'ADN de *P. carinii* ont été détectées par PCR dans l'air

ambient d'un laboratoire où sont maintenus des rats parasités (Bartlett *et al.*, 1994), dans la chambre d'un patient infecté (Bartlett *et al.*, 1994) ou en pleine campagne anglaise (Wakefield, 1994b). Les séquences révélées dans ces études correspondent à celles de *P. carinii* de rat, de *P. carinii* d'homme ou à des séquences présentant 1 à 4 mutations par rapport aux précédentes. Néanmoins, une mise en évidence de séquences d'ADN identiques à celles de *P. carinii* n'implique pas obligatoirement la mise en évidence d'une forme infectante. De plus, la morphologie de cette forme aérienne potentielle n'est pas connue. Ainsi, en l'état actuel des connaissances, on ne peut encore clairement définir la source de l'agent de la PPC humaine.

Bien qu'il n'existe aucune preuve définitive, on admet que l'homme s'infecte tôt dans sa vie. En effet, plusieurs études rapportent l'apparition d'anticorps anti-*P. carinii* chez des enfants, entre deux et quatre ans, ne présentant ni de PPC apparente, ni de syndrome d'immunodépression détectable, que ces enfants soient américains (Pifer *et al.*, 1978), européens (Meuwissen *et al.*, 1977) ou africains (Wakefield *et al.*, 1990a). De plus la majorité des adultes, en dehors de toute infection à *P. carinii* cliniquement déclarée, a des immunoglobulines G (IgG) dirigées contre le parasite (Meuwissen *et al.*, 1977 ; Kovacs *et al.*, 1988a).

Actuellement, 2 hypothèses ont été formulées pour expliquer l'apparition d'une pneumocystose chez un sujet débilité. La première hypothèse postule que la pneumocystose résulte d'une réactivation de *P. carinii*, naturellement présent à l'état latent dans les poumons de l'homme sain, lors de la survenue d'un état d'immunodépression (Hughes, 1987). C'est lors de la petite enfance que *P. carinii*, présent dans l'air, serait inhalé. Alors responsable d'une infection subclinique régressant normalement chez les individus immunocompétents, il resterait ensuite dans les poumons sous une forme latente. Plusieurs arguments sont en faveur de ce premier postulat : (i) les patients ou les animaux de laboratoire ne développent une pneumocystose que lors d'un état d'immunodépression important et prolongé, (ii) une infection latente est détectée par PCR chez des souris (Kitada *et al.*, 1991). La deuxième hypothèse, émise récemment, propose l'existence d'une forme environnementale, peut être tellurique, de *P. carinii*, et la pneumocystose résulterait d'une infection nouvelle contractée par inhalation de parasites (Wakefield *et al.*, 1992). Plusieurs observations étayent cette deuxième hypothèse et sont défavorables au premier postulat : (i) de l'ADN identique à celui de *P. carinii* est détecté dans l'air ambient (Bartlett *et al.*, 1994 ; Wakefield, 1994b), (ii) bien que

profondément immunodéprimés certains animaux ne contractent pas spontanément une pneumocystose (Soulez *et al.*, 1991b), (iii) aucune trace d'ADN parasitaire n'est détectée par PCR dans des LBA de patients immunocompétents (Wakefield *et al.*, 1990c ; Leigh *et al.*, 1993), dans des LBA de patients immunodéprimés (Oka *et al.*, 1993 ; Tamburini *et al.*, 1993), ni dans des biopsies pulmonaires post-mortem (Peters *et al.*, 1992).

### 2-3-3 Présentation clinique

Le début de la pneumocystose est en général insidieux. La fièvre (<40°C) est inconstante. En général, les patients présentent une toux sèche, une tachypnée, une dyspnée progressive et une cyanose, associées à peu de signes auscultatoires. Chez le patient sidéen, l'installation de la symptomatologie est progressive (plusieurs semaines), associant perte de poids, malaise, fièvre discrète et diarrhée (Dei-Cas *et al.*, 1993). Ainsi, la pneumocystose peut évoluer de façon insidieuse. Six à 23% des patients n'ont aucune traduction radiologique à la phase initiale (Meduri et Stein, 1992). La PPC présente une évolution plus aiguë chez les patients non VIH+.

Des cas de localisations extrapulmonaires sont décrits chez l'homme et des animaux de laboratoire (Pomerantz, 1989 ; Cohen et Stoeckle, 1991 ; Hermant et Lamouret, 1992 ; Reddy *et al.*, 1992). De 1954 à 1990, 50 cas de pneumocystose extrapulmonaire humaine ont été répertoriés, dont 16 cas ont été rapportés avant 1985 chez des patients non infectés par le VIH (Raviglione, 1990). Les 34 autres cas signalés touchent des patients VIH+ L'utilisation de pentamidine sous forme aérosol semblerait favoriser l'apparition de localisations extrapulmonaires (Abd *et al.*, 1988 ; Pomerantz, 1989 ; Raviglione, 1990 ; Dembinski *et al.*, 1991). La mauvaise diffusion particulière des aérosols serait ainsi responsable de la persistance de foyers de *P. carinii* inaccessibles car trop distaux ou entourés d'une barrière fibro-inflammatoire. Dans les cas de PPC sévères, la barrière capillaire alvéolaire serait suffisamment perturbée pour permettre la dissémination et l'invasion d'autres tissus par le parasite (Murry et Schmidt, 1992).

Ainsi, bien que *P. carinii* présente un tropisme pulmonaire, de nombreux organes peuvent être infectés par cet organisme. Dans l'ordre décroissant de fréquence sont atteints les ganglions lymphatiques, puis la rate (Raviglione, 1990), la moelle osseuse et le foie (Poblete *et al.*, 1989). Des cas ont été répertoriés aussi au niveau de l'oeil (Rao *et al.*, 1989), du tractus

intestinal (Carter *et al.*, 1988), de la thyroïde, de l'oreille moyenne et de la peau (Coulman *et al.*, 1987). Chaque organe peut être envahi isolément ou en association avec d'autres.

#### 2-3-4 Réponse immune

Face à l'agression parasitaire, l'hôte met en place des réponses spécifique et non spécifique. Plusieurs évidences indiquent que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont essentiels à la défense de l'hôte contre *P. carinii* (Harmsen et Stankiewicz, 1990 ; Roths et Sidman, 1992). Des antigènes de *P. carinii* induisent une prolifération des lymphocytes T (Fisher *et al.*, 1991). Au cours du SIDA, un taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> inférieur à 200/mm<sup>3</sup> est considéré comme un facteur de risque de pneumocystose chez l'adulte (Masur *et al.*, 1989b), bien que l'enfant infecté par le VIH ou les patients atteints par un autre déficit immunitaire peuvent contracter une PPC, avec un taux de cellules CD4 supérieur (Leibowitz *et al.*, 1990).

Des souris BALB/c, porteuses ou inoculées avec *P. carinii*, déplétées en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par administration chronique d'anticorps anti- $\alpha$ CD4, développent une PPC (Shellito *et al.*, 1990). Dans le même sens, lorsque des souris reçoivent par injection sous-cutanée un hybridome produisant des anticorps anti-CD4<sup>+</sup>, elles développent une PPC (McFadden *et al.*, 1994). Chez la souris SCID reconstituée, une déplétion sélective en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, par injection d'anticorps monoclonaux anti-CD4, permet d'obtenir une PPC après inoculation trachéale de *P. carinii*. Le transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> entraîne la clairance de *P. carinii* (Shellito *et al.*, 1990 ; Smulian et Theus, 1994 ; Akono et Palluault, 1994). Par contre, la pneumocystose n'est pas modifiée après un transfert de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Smulian et Theus, 1994). L'ensemble de ces observations confirme bien le rôle prépondérant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans les mécanismes assurant la défense de l'hôte contre *P. carinii*.

Des anticorps sériques anti-*P. carinii* sont fréquemment retrouvés chez des individus sains (Meuwissen *et al.*, 1977 ; Kovacs *et al.*, 1988a). Leur taux diminue au cours de la pneumocystose (Burns *et al.*, 1990 ; Dei-Cas *et al.*, 1990). Les anticorps spécifiques sont détectés à la surface du parasite (Hughes, 1987 ; Soulez *et al.*, 1988 ; Blumenfeld *et al.*, 1990). Chez des furets infectés, le transfert passif d'un anticorps monoclonal anti-*P. carinii* ralentit l'évolution de l'infection (Gigliotti et Hughes, 1988b). Les souris athymiques porteuses de *P. carinii* ne synthétisent pas d'anticorps anti-*P. carinii*. Ces animaux sont partiellement

protégés par le transfert passif de lymphocytes T qui réactivent alors la production d'Ig G anti-*P. carinii* (Furuta *et al.*, 1984). La réponse humorale intervient donc aussi dans la protection contre le parasite.

Plusieurs observations illustrent l'importance des mécanismes non spécifiques dans la défense de l'hôte vis-à-vis du parasite : la présence d'un infiltrat macrophagique dans les poumons infectés, la phagocytose des parasites observée *in vivo* et *in vitro* et la supériorité des corticoïdes sur la cyclosporine pour induire une pneumocystose chez le rat (Hughes, 1982b ; Dei-Cas *et al.*, 1990). La cyclosporine, en agissant principalement sur les lymphocytes T CD4, n'inhibe pas la phagocytose de *P. carinii* par les macrophages, alors que les corticoïdes, en inhibant de manière globale les systèmes non-spécifique de défense, rendent possible la prolifération active des parasites. De nombreux travaux décrivent les différentes interactions entre les macrophages alvéolaires et *P. carinii* ; elles seront décrites ultérieurement (chapitres 2-4-1-3 et 2-4-1-4).

*P. carinii* induit la production et la libération de cytokines par les cellules phagocytaires. *In vitro*, le parasite induit la synthèse et la sécrétion du Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) par les monocytes et les macrophages (Tamburrini *et al.*, 1991). La sécrétion de TNF- $\alpha$  est amplifiée lorsque les macrophages sont pré-incubés avec de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Corsini *et al.*, 1992). Toutefois, un effet toxique direct du TNF- $\alpha$  sur *P. carinii* et la présence d'un récepteur parasitaire pour cette cytokine n'ont toujours pas été mis en évidence (Su et Martin, 1994). D'autres cytokines seraient induites au cours de la PPC telles que l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-2, l'IL-6, l'IFN- $\gamma$ , le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*), le G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) et les eicosanoïdes (Su et Martin, 1994).

Des facteurs non immunitaires, comme la composition du surfactant, ou la présence intercurrente d'autres agents infectieux, favoriseraient l'expression de la virulence de *P. carinii*. Des variations dans la composition et la quantité de surfactant influenceraient la prolifération du parasite (Phelps et Rose, 1991 ; Rice *et al.*, 1993 ; Su et Martin, 1994) (voir chapitre 5-2). La concomitance fréquente du parasitisme par *P. carinii* et de l'infection par *Cytomegalovirus* évoque des interactions possibles entre ces deux micro-organismes (Ernst *et*

*al.*, 1983).

### 2-3-5 Traitement

Deux médicaments principaux sont à disposition pour un traitement préventif ou curatif de la pneumocystose (Kovacs et Masur, 1989a ; Walker et Masur, 1994). Le cotrimoxazole commercialisé sous les noms de Bactrim<sup>®</sup>, Eusaprim<sup>®</sup>, est l'association d'une diaminopyrimidine, le triméthoprime, et d'un sulfamide, le sulfaméthoxazole. La pentamidine est une diamidine aromatique commercialisée sous les noms de Pentacarinat<sup>®</sup> et de Lomidine<sup>®</sup>.

L'efficacité thérapeutique du cotrimoxazole (triméthoprime+sulfaméthoxazole) a été démontrée en premier lieu chez le rat (Hughes *et al.*, 1974). Selon une étude réalisée chez des enfants, le traitement par le cotrimoxazole est aussi efficace que la pentamidine, tout en présentant moins d'effets secondaires (Hughes *et al.*, 1978). Le cotrimoxazole agit sur le métabolisme des folates et, en particulier, sur la synthèse de la thymidine des organismes susceptibles (Rubin *et al.*, 1980). Le taux de guérison est généralement compris entre 60 et 90% (Hughes *et al.*, 1978 ; Conte *et al.*, 1987 ; Sattler *et al.*, 1988), sauf chez les patients sidéens chez qui ce taux peut être inférieur (Drake *et al.*, 1985). Récemment, des auteurs ont montré l'efficacité supérieure du cotrimoxazole sur la pentamidine en prophylaxie secondaire chez les patients sidéens (Hardy *et al.*, 1992). Actuellement, ce médicament est probablement le plus prescrit dans un cadre prophylactique (Walker *et al.*, 1994).

La pentamidine possède un large spectre d'action sur les protozoaires. Son efficacité pour traiter la pneumocystose a été démontré dans les années 50. Cependant, son mécanisme d'action n'est pas encore établi. Plusieurs hypothèses existent : interférence sur la glycolyse aérobie et anaérobie (Lowrie et Yorke, 1939 ; Goodman et Gilman, 1973), inhibition de la phosphorylation oxydative et de la synthèse des acides nucléiques (Borstein et Yarbo, 1970 ; Gutteridge, 1967), inhibition de la dihydrofolate réductase (Robbins, 1967 ; Waalkes et Maluku, 1976). La pentamidine peut entraîner de nombreux effets secondaires : hypotension, tachycardie, nausée, vomissements, nécrose au point d'injection, rash cutané, anémie, thrombopénie, etc. Les aérosols de pentamidine constituent une thérapie préventive très utilisées (Bernard *et al.*, 1987 et 1988 ; Conte *et al.*, 1987 ; Farinotti et Girard, 1989). Ce mode d'administration évite les réactions systémiques potentiellement graves de la pentamidine et les interactions médicamenteuses (Golden *et al.*, 1989). Cependant, l'incidence de la



pneumocystose extrapulmonaire augmenterait chez les patients bénéficiant de cette prophylaxie (Raviglione, 1990 ; Noskin et Murphy, 1991). Cette incidence serait de 2,5 % à 5 % (Radin *et al.*, 1990 ; Telzak *et al.*, 1990).

Bien que le cotrimoxazole et la pentamidine constituent les thérapeutiques majeures de la pneumocytose, ces molécules peuvent induire des effets secondaires non négligeables. De plus, jusqu'à 28% des patients recevant une prophylaxie anti-*P. carinii* contractent une PPC (Hoover *et al.*, 1993). Enfin, sous prophylaxie anti-*P. carinii*, 4 affections voient leur fréquence augmentée ; il s'agit des atteintes à *Cytomegalovirus* et à *Mycobacterium avium*, de la candidose oesophagienne et du "Wasting" syndrome (Hoover *et al.*, 1993).

Il existe d'autres médicaments utilisables en deuxième intention ou en cours d'évaluation, atovaquone, dapsonne, difluorométhylornithine (DFMO), pyriméthamine, clindamycine-primaquine. Il reste cependant à découvrir un traitement ne présentant pas d'effet secondaire majeur et entraînant la guérison dans 100% des cas.

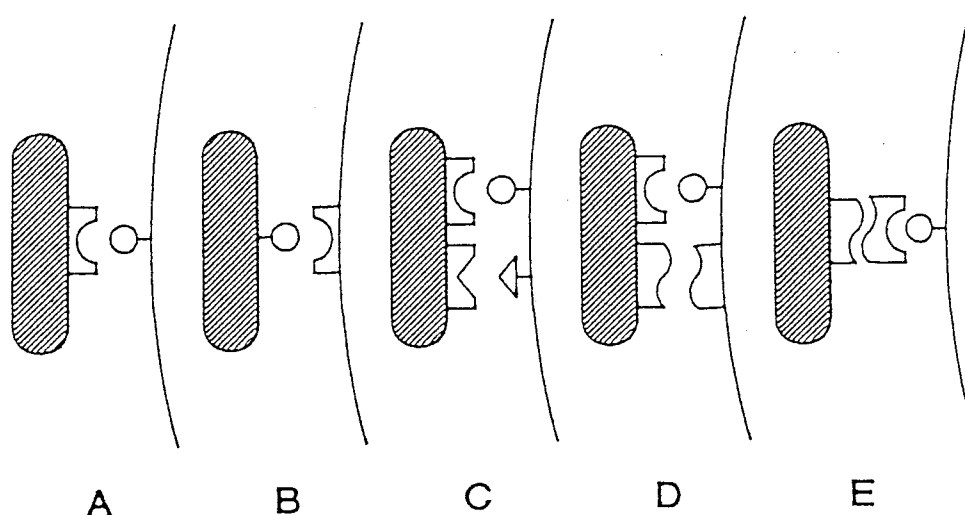
## 2-4 Relation hôte-parasite

### 2-4-1 Mécanismes d'attachement de *P. carinii* aux cellules pulmonaires

#### 2-4-1-1 Mécanismes d'attachement des micro-organismes pathogènes

L'attachement des micro-organismes pathogènes à divers récepteurs de la membrane plasmique des cellules hôtes ou aux composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène, laminine, vitronectine, etc.) est souvent une phase critique au démarrage de l'infection. Ainsi, l'attachement des micro-organismes pathogènes aux cellules ou tissus de l'hôte est généralement considéré comme un important facteur de virulence pour les agents pathogènes viraux, bactériens, fongiques et protozoaires (Manocha et Chen, 1990 ; Roberts, 1990 ; Tronchin *et al.*, 1991 ; Hoepelman et Tuomanen, 1992). Les mécanismes moléculaires de l'adhésion des micro-organismes pathogènes sont nombreux. Ils sont figurés ci-dessous (selon Roberts, 1990). La reconnaissance peut se faire *via* (A) un récepteur présent à la surface du parasite ; (B) un récepteur présent à la surface de la cellule hôte ; (C) par une liaison simultanée de récepteurs parasitaires discrets avec deux ligands ; (D) par la combinaison d'une interaction protéine-protéine et protéine-carbohydate ; (E) par l'intermédiaire d'une molécule sécrétée et reconnue à la fois par le récepteur parasitaire et celui de la cellule hôte, servant ainsi de pont entre les deux "partenaires". Les mécanismes d'adhésion les plus fréquents, font

appel aux intégrines et aux lectines.



De très nombreuses protéines de la matrice extracellulaire ont été isolées et caractérisées. La plus abondante et la plus étudiée est la fibronectine (Fn), protéine dimérique glycosylée de 500 KDa, présente à la surface de très nombreuses cellules animales. Elle est liée à la cellule par un récepteur transmembranaire présent à la surface de la plupart des cellules, notamment épithéliales, endothéliales, macrophages, lymphocytes et granulocytes neutrophiles (Pottratz et Martin, 1994). Ce récepteur fait partie de la famille des intégrines, impliquée dans de multiples processus physiologiques ou pathologiques tels que la migration des cellules, le développement embryonnaire, le contrôle de la croissance cellulaire, le cancer, l'hémostase, etc. (Hynes, 1987 ; Ruoslahti, 1991). Toutes les intégrines sont des hétérodimères. Les deux sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ) sont liées de façon non covalente et présentent chacune un court domaine C-terminal cytoplasmique, une partie transmembranaire et un grand domaine N-terminal extra-cellulaire. A ce jour, 8 sous-unités  $\beta$  et 14 sous-unités  $\alpha$  ont été identifiées et forment, par leur association, au moins 15 récepteurs de spécificités différentes. Le récepteur pour la Fn contient très souvent la sous-unité  $\beta_1$  associée soit à la sous-unité  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  ou  $\alpha_v$  (Ruoslahti, 1991). Le domaine majeur de la Fn, reconnu par le récepteur, correspond à une séquence conservée d'adhésion cellulaire Arg-Gly-Asp (RGD) (Albelda et Buck, 1990; Roman et McDonald, 1991). La distribution ubiquitaire de la Fn et de son récepteur fait que ces molécules sont des cibles optimales pour l'adhésion des micro-organismes pathogènes.

La Fn comme moyen d'adhésion aux cellules ou tissus hôtes a été mise en évidence et

souvent caractérisée pour une très grande variété de micro-organismes, tels que *Staphylococcus aureus* (Proctor *et al.*, 1982), *Streptococcus sp* (Simpson et Beachey, 1983), *Candida albicans* (Klotz et Smith, 1991), *Plasmodium falciparum* (Ouaissi *et al.*, 1985), *Trypanosoma cruzi* (Ouaissi *et al.*, 1984 ; Ouaissi, 1989) et *Leishmania sp* (Wyller *et al.*, 1985 ; Ouaissi, 1989).

Les lectines fournissent aux parasites un second mécanisme pour adhérer à la surface des cellules hôtes. Les lectines sont des protéines ayant une affinité, dépendante du calcium, pour des motifs oligosaccharidiques (Nicholson, 1974). L'interaction hôte-parasite *via* les lectines peut se faire de différentes manières. Les lectines peuvent se trouver à la surface des parasites, des cellules hôtes, ou des deux à la fois.

L'utilisation des lectines comme moyen d'adhésion, a été mise en évidence surtout chez les bactéries. Ces lectines sont souvent présentes sur les fimbriae (pili), structures filamenteuses spécialisées présentes à la surface d'un grand nombre de bactéries pathogènes. La plus caractérisée est une lectine, spécifique des résidus mannoses, présente sur les pili de type I d'*Escherichia coli* et sur d'autres bactéries Gram-négatives (Eshdat *et al.*, 1981). L'utilisation des lectines comme moyen d'adhésion aux cellules ou tissus hôtes a également été caractérisée chez des micro-organismes pathogènes eucaryotes tels que des levures comme *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Cryptococcus neoformans* (Jimenez-Lucho *et al.*, 1990), et des protozoaires comme *Giardia lamblia* (Farthing *et al.*, 1986) et *Entamoeba histolytica* (Ravdin et Guerrant, 1981). Dans ce dernier cas, l'inhibition de l'attachement du parasite *via* une lectine, spécifique des résidus galactoses, neutralise *in vitro* l'effet cytotoxique d'*Entamoeba histolytica* sur des cellules épithéliales de l'intestin. Ces observations permettent d'espérer le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre l'amibiase.

Certaines cellules immunitaires utilisent des lectines pour induire une phagocytose des micro-organismes pathogènes, sans opsonisation préalable (fixation directe). En effet, des récepteurs spécifiques des résidus mannose (*lectin-like receptors* ou *Macrophage Mannose Receptors* : MMR) ont été caractérisés chez les macrophages alvéolaires et péritonéaux (Inber *et al.*, 1982 ; Stahl *et al.*, 1978 ; Stahl, 1990). Ces récepteurs jouent un rôle clé dans la première ligne de défense contre des micro-organismes pathogènes dont la surface est riche en résidus mannose, comme par exemple les micro-champignons pathogènes.

#### 2-4-1-2 Attachement de *P. carinii*

*P. carinii* s'attache spécifiquement et intimement aux pneumocytes de type I. Ce sont des études en microscopie électronique à transmission qui ont mis en évidence une étroite relation entre *P. carinii* et les cellules épithéliales alvéolaires (Sueishi *et al.*, 1977 ; Yoneda et Walzer, 1983 ; Long *et al.*, 1984 ; Itatani et Marshall, 1988). Les trophozoïtes s'attachent de manière complexe en développant des prolongements filopodiaux qui s'ancrent dans le cytoplasme des pneumocytes de type I (Dei-Cas *et al.*, 1991). De plus, la présence de nombreuses vésicules de pinocytose s'accumulant dans le cytoplasme du pneumocyte de type I au niveau de la zone de contact, a été soulignée (Nielsen *et al.*, 1991 ; Dei-Cas *et al.*, 1991).

Des études ultrastructurales ont montré, chez *P. carinii*, la présence de structures microtubulaires qui s'étendent jusqu'au filopodes (Itatani et Marshall, 1988). Lorsque l'on altère les structures cytosquelettiques du parasite, notamment par la cytochalasine B, l'attachement de *P. carinii in vitro* est inhibé (Limper et Martin, 1990 ; Aliouat *et al.*, 1993a). Ceci suggère que l'attachement de *P. carinii* sur les cellules épithéliales alvéolaires requiert l'intégrité structurale et fonctionnelle du cytosquelette.

Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que l'attachement de *P. carinii* avait un effet cytopathologique direct (Limper et Martin, 1990). Ainsi, l'attachement de *P. carinii* inhibe la prolifération des cellules A549 (cellules épithéliales alvéolaires humaines). Cet effet disparaît si l'on bloque l'attachement des parasites, notamment par l'inhibition des fonctions cytosquelettiques (Limper et Martin, 1990).

L'attachement de *P. carinii* aux cellules épithéliales alvéolaires de type I semble jouer un rôle important dans le développement du parasite et dans la physiopathologie de la pneumocystose. Ainsi, la caractérisation précise des mécanismes d'attachement de *P. carinii* et le développement des moyens pour l'inhiber, permettrait de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans les chapitres suivants, les mécanismes d'attachement de *P. carinii*, décrits jusqu'à aujourd'hui, sont analysés.

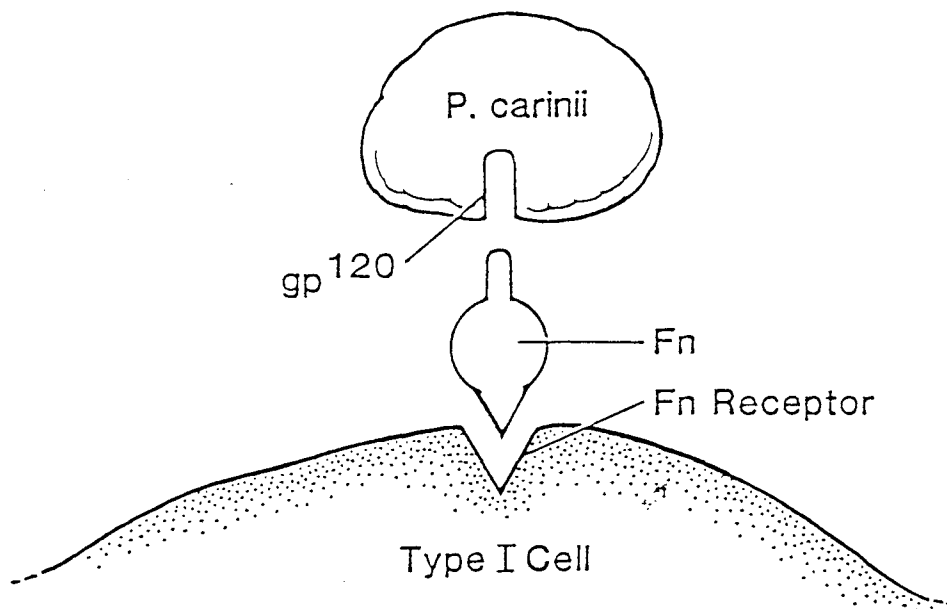
#### 2-4-1-3 Interaction de *P. carinii* avec la matrice extracellulaire

L'attachement de *P. carinii* à la matrice extracellulaire de Fn a été exploré pour la première fois en 1990 et depuis de nombreux travaux ont été publiés (Pottratz et Martin, 1990a et 1991 ; Pottratz *et al.* 1991 ; Aliouat *et al.* 1993a ; Pottratz *et al.*, 1993 ; Limper, 1995).

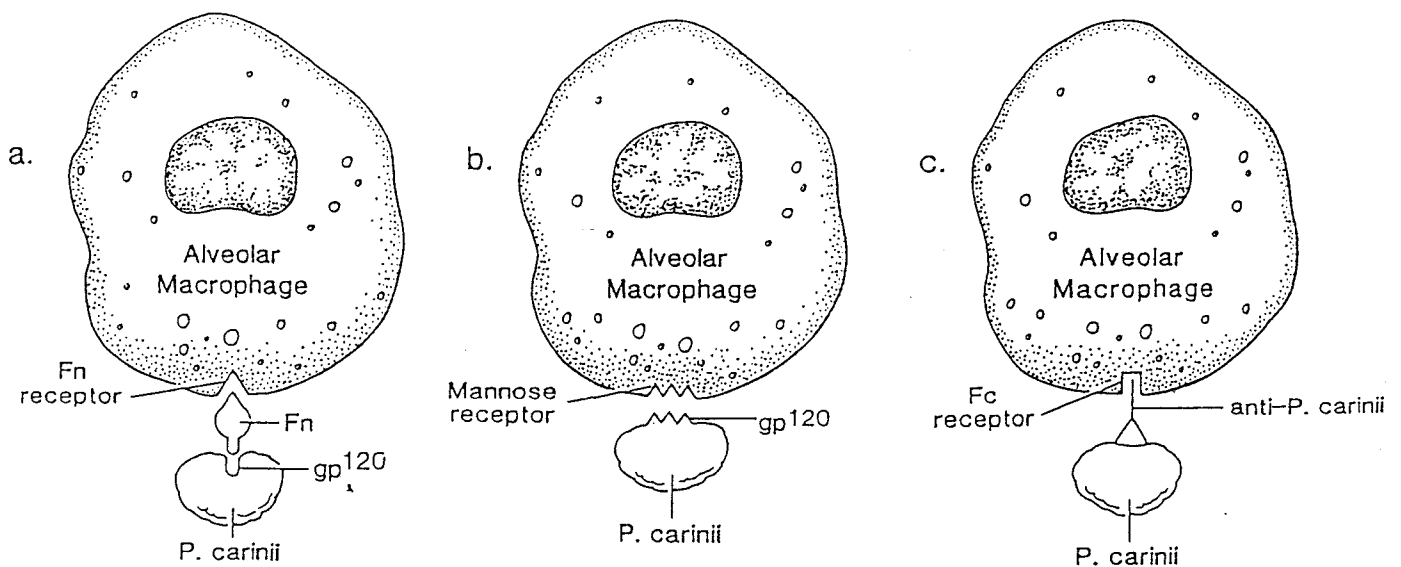
Ces études ont montré le rôle crucial de la Fn dans l'attachement de *P. carinii* aux cellules hôtes. En effet, la  $^{125}\text{I}$ -Fn se fixe spécifiquement à la surface des parasites ; cette fixation est inhibée par la séquence aminée RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) mais aucune compétition n'est observée avec la séquence RGES (Arg-Gly-Glu-Ser). Par une analyse Scatchard, Pottratz *et al.* (1991) ont pu déterminer le nombre de récepteurs pour la Fn présents sur le parasite ( $6,4 \cdot 10^5$  récepteurs/parasite), ainsi que sa constante de dissociation ( $K_d : 1,2 \cdot 10^{-8}\text{M}$ ). Ces valeurs correspondent à celles trouvées chez *S. aureus* et *C. albicans* (Proctor *et al.*, 1982 ; Klotz et Smith, 1991). Ainsi, *P. carinii* aurait à sa surface des récepteurs spécifiques de la séquence RGD de la Fn. D'autres expériences ont montré que *P. carinii* ne se fixait pas à la laminine ou à l'albumine adsorbée sur des microplaques de culture (Pottratz et Martin, 1991).

Un des composés antigéniques majeurs de *P. carinii* est une protéine pariétal glycosylée, de masse moléculaire apparente comprise entre 95 et 140 kDa. Cette molécule a reçu diverses appellations : glycoprotéine majeure de surface (MSG), antigène majeur de surface (MSA), glycoprotéine variable de surface, glycoprotéine 120 (gp120), glycoprotéine A (gpA), glycoprotéine 116 (gp116) ou glycoprotéine 115 (gp115) selon les auteurs (Graves *et al.*, 1986b ; Gigliotti *et al.*, 1988a ; Kovacs *et al.*, 1988a ; Linke *et al.*, 1989 ; Radding *et al.*, 1989 ; Tanabe *et al.*, 1989 ; Haidaris *et al.*, 1992). L'appellation la plus utilisée à l'heure actuelle, est la MSG. Cette glycoprotéine est fréquemment reconnue par des anticorps présents dans le sérum d'hôtes infectés (Walzer *et al.*, 1987a ; Lundgren *et al.*, 1991). Elle induit une réponse des lymphocytes T, après immunisation ou infection naturelle (Fisher *et al.*, 1991) et des anticorps dirigés contre cette glycoprotéine confèrent une immunoprophylaxie passive (Gigliotti *et al.*, 1988b). Sa relative abondance à la surface parasitaire en fait un candidat de choix en tant que facteur d'attachement.

En effet, la MSG (incubée avec les cellules) ou un anticorps polyclonal anti-MSG (incubé avec le parasite) inhibent l'attachement de *P. carinii* de rat aux cellules A549 (Pottratz *et al.*, 1991 ; Pottratz *et al.*, 1993). De plus, la MSG se lie de façon spécifique à la Fn et au peptide RGDS. Enfin, un anticorps polyclonal anti sous-unité  $\beta_1$  des intégrines, reconnaît la MSG en Western blot (Pottratz *et al.*, 1991). Ainsi, cette glycoprotéine parasitaire serait un récepteur de surface spécifique de la Fn, permettant à *P. carinii* de s'attacher aux cellules épithéliales alvéolaires de type I (Pottratz *et al.*, 1993 ; Limper, 1995) (Figure 4).



**Figure 4 .** Rôle de la fibronectine (Fn) dans l'attachement de *P. carinii* aux cellules épithéliales alvéolaires de type I. La Fn jouerait un rôle de pont entre la MSG (gp120) de *P. carinii* et le récepteur pour la Fn présent à la surface des pneumocytes de type I (selon Pottratz et Martin, 1994).



**Figure 5.** Mécanismes proposés pour expliquer l'attachement de *P. carinii* aux macrophages alvéolaires. (a) Attachement *via* la Fn, sans activation du macrophage. (b) Les résidus mannose de la MSG de *P. carinii* seraient reconnus par les récepteurs mannose présents à la surface du macrophage. (c) Reconnaissance des Ig spécifiques présents à la surface de *P. carinii* (opsonisation), par le récepteur Fc des macrophages. Cette fixation induirait l'activation des macrophages et la phagocytose des parasites, comme en (b) (selon Pottratz et Martin, 1994).

Une étude récente a montré que des anticorps anti sous-unités  $\alpha_5$  et  $\alpha_v$  des intégrines (chapitre 2-4-1-1), incubés avec des cellules A549, inhibent partiellement l'attachement de *P. carinii* *in vitro* (Pottratz *et al.*, 1994). De plus, l'expression de la sous-unité  $\alpha_5$  chez la cellule hôte, augmente d'un facteur 3 à 10 lorsque les cellules sont incubées avec *P. carinii*. Par contre, aucune modification de l'expression de la sous-unité  $\alpha_v$  n'a été observée. L'effet de *P. carinii* sur l'expression de la sous-unité  $\alpha_5$  des cellules A549 est atténué lorsque l'attachement des parasites est bloqué avec un anticorps anti-MSG (Pottratz *et al.*, 1994). Ces résultats montrent que *P. carinii* influence directement l'expression du récepteur de la Fn à la surface de la cellule cible. L'attachement de *P. carinii* n'est donc pas un phénomène passif. Dans ce sens, la viabilité de la cellule parasitaire et l'intégrité de la cellule cible sont essentielles (Aliouat *et al.*, 1993a). De plus, la confrontation avec les cellules cibles déclenche chez *P. carinii* une intense activité filopodiale (Dei-Cas *et al.*, 1991 ; Aliouat *et al.*, 1993a et 1995).

Les études ont été étendues pour évaluer le rôle possible de la Fn dans l'interaction de *P. carinii* avec les macrophages alvéolaires. Les premières études ont montré que *P. carinii* se fixait sur les macrophages alvéolaires *in vitro*, mais que la phagocytose n'était induite que si les parasites étaient opsonisés par des anticorps spécifiques anti-*Pneumocystis* (Masur et Jones, 1978 ; Von Beren et Pesanti, 1978). En effet, un des mécanismes de reconnaissance de *P. carinii* par les macrophages alvéolaires impliquerait une participation du récepteur Fc des Ig macrophagiques (Figure 5c). La présence d'IgG fixées à la surface de *P. carinii* humain a été montrée (Blumenfield *et al.*, 1990). L'attachement de *P. carinii* aux macrophages alvéolaires est fortement inhibé par l'addition d'un anticorps anti-Fn ou par le peptide RGDS (Pottratz et Martin, 1990b). Toutefois, cet attachement de *P. carinii* aux macrophages alvéolaires n'active pas la phagocytose et n'induit pas d'altérations chez les parasites (Figure 5a) (Pottratz et Martin, 1990b).

L'attachement de *P. carinii* aux cellules épithéliales alvéolaires se ferait également par l'intermédiaire de la vitronectine (Vn) (Wisniowski et Martin, 1994 ; Limper *et al.*, 1993 ; Limper, 1995), qui, comme la Fn, est une glycoprotéine multifonctionnelle trouvée dans le plasma et la matrice extracellulaire. La Vn est une molécule monomérique de 75 KDa, parfois colocalisée avec la Fn (Yamada, 1991). Cette glycoprotéine possède également une séquence

conservée d'adhésion cellulaire RGD et dans sa région C-terminal, un domaine cryptique liant l'héparine (*heparin-binding domain*). La Vn peut, dans certaines conditions, neutraliser l'activité anti-coagulante de l'héparine (Yamada, 1991). Wisniowski et Martin (1994) ont montré la fixation de la  $^{125}\text{I}$ -Vn à la surface de *P. carinii*. Cette fixation n'est pas affectée par le peptide RGDS, mais inhibée par l'héparine. De plus la MSG ne reconnaît pas la Vn. Ainsi, la présence d'un récepteur spécifique de la région *heparine-binding* de la Vn, à la surface de *P. carinii* semble probable (Wisniowski et Martin, 1994 ; Limper, 1995).

Dans toutes les expériences concernant l'interaction de *P. carinii* avec la matrice extracellulaire, l'inhibition de l'attachement ne dépasse guère 50% (Pottratz *et al.*, 1991 ; Aliouat *et al.*, 1993a), ce qui suggère que *P. carinii* pourrait utiliser d'autres mécanismes pour adhérer aux pneumocytes de type I.

#### 2-4-1-4 Rôle des lectines cellulaires et parasitaires

*P. carinii* possède à sa surface des quantités importantes de résidus mannose, galactose et de la N-acétylglucosamine. Les premiers sont essentiellement apportés par la MSG (Cushion *et al.*, 1988 ; Linke *et al.*, 1989).

Un troisième mécanisme d'interaction entre *P. carinii* et les macrophages alvéolaires a été suggéré (Figure 5b) (Ezekowitz *et al.*, 1991 ; O'riordan *et al.*, 1995).

L'attachement de *P. carinii* aux macrophages alvéolaires se ferait par la fixation des MMR (*Macrophage Mannose Receptors*) aux résidus mannose présents à la surface des parasites. Contrairement à l'interaction Fn-dépendante, cette fixation active le macrophage qui produit des radicaux oxygénés et phagocyte les parasites (Ezekowitz *et al.*, 1991). Une étude récente confirme le travail de Ezekowitz *et al.* (1991) et montre que les MMR réagissent directement avec la MSG de *P. carinii* (Figure 5b) (O'riordan *et al.*, 1995). Ainsi, au cours de la pneumocystose, l'attachement aux macrophages alvéolaires semble être un mécanisme important de défense contre *P. carinii*.

D'autres études ont montré la présence de lectines parasitaires jouant un rôle dans l'attachement de *P. carinii* aux cellules épithéliales alvéolaires (Vierbuchen *et al.*, 1990 ; Ortega-Barria et Pereira, 1992). Ces lectines parasitaires auraient surtout une forte spécificité pour les résidus  $\beta$ -D-galactoside et D-mannoside présents à la surface des cellules hôtes



(Vierbuchen *et al.*, 1990).

#### 2-4-2 Intéractions de *P. carinii* avec le surfactant pulmonaire

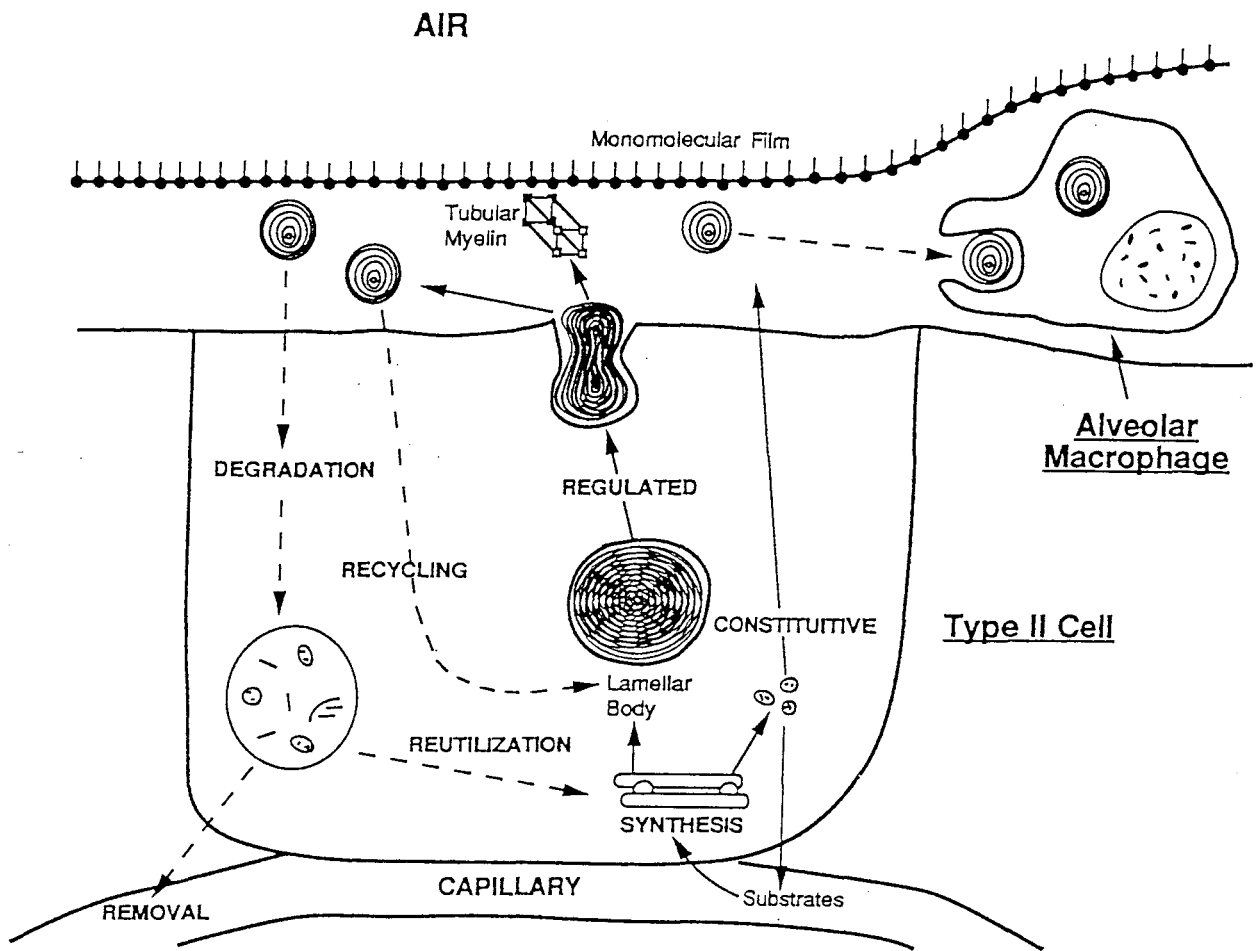
##### 2-4-2-1 Le surfactant

Le surfactant est une émulsion complexe de phospholipides et d'apoprotéines qui permet de diminuer la tension d'interface eau/air au niveau des alvéoles pulmonaires, empêchant ainsi leur collapsus lors de l'expiration, et d'améliorer l'ensemble de la mécanique respiratoire.

Les composants du surfactant sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique des pneumocytes de type II, puis stockés dans des corps lamellaires arrondis d'environ 1 micromètre de diamètre. Ces structures, délimitées par une membrane, sont constituées par une accumulation en strates lamellaires plus ou moins denses, de membranes osmiophiles (Figure 6). Elles correspondent à la superposition de couches phospholipidiques. Après une stimulation appropriée, le contenu des corps lamellaires est sécrété directement dans l'espace alvéolaire. Les corps lamellaires prennent ensuite une structure unique en forme de "grillage" appelé myéline tubulaire. Enfin, ces corps grillagés forment un film phospholipidique monomoléculaire, à la surface de l'épithélium alvéolaire (Figure 6) (Morgenroth, 1988 ; Wright et Dobbs, 1991 ; Rooney *et al.*, 1994 ; van Golge *et al.*, 1994). L'espace hydrophile compris entre l'épithélium alvéolaire et le film phospholipidique que forme le surfactant, s'appelle l'hypophase (Wirtz et Schmidt, 1992 ; Rooney *et al.*, 1994). Ainsi, grâce à sa pression d'étalement, le surfactant produit par les pneumocytes de type II s'étale à la surface de l'hypophase comme une goutte d'huile à la surface de l'eau. La clairance du surfactant (dégradation/recyclage) est essentiellement réalisée par les pneumocytes de type II. Les macrophages alvéolaires participent à l'élimination de matériel surfactant excédentaire (Figure 6) (Morgenroth, 1988 ; Wright et Dobbs, 1991).

La composition du surfactant est extrêmement complexe, comme le montre le tableau 5, sur lequel figure la composition moyenne actuellement admise (Denizot *et al.*, 1991; Rooney *et al.*, 1994).

Les composants du surfactant sont constitués à 90% de lipides et 10% de protéines. Les phosphatidylcholines (PC), saturées ou insaturées, entrent pour plus de 65% dans la constitution des lipides. Parmi les PC, le composant actif essentiel est la



**Figure 6.** Schéma expliquant le métabolisme du surfactant pulmonaire. Les composants du surfactant sont synthétisés par les pneumocytes de type II et stockés dans des corps lamellaires arrondis. Le contenu de ces corps est libéré directement dans l'espace alvéolaire. Le surfactant prend une structure en myéline tubulaire et forme ensuite, un film phospholipidique monomoléculaire à la surface de l'épithélium alvéolaire. L'espace hydrophile compris entre l'épithélium alvéolaire et le film phospholipidique, s'appelle l'hypophase. Les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires participent à la clairance du surfactant (dégradation et/ou recyclage). Selon Wright et Dobbs, 1991.

Tableau 5. Composition chimique du surfactant pulmonaire (en % de poids). Selon Denizot *et al.*, 1991.

| Composants du surfactant              | % de poids |
|---------------------------------------|------------|
| <b>Phospholipides</b>                 | <b>85</b>  |
| Phosphatidylcholines saturées         | 50         |
| Phosphatidylcholines insaturées       | 18         |
| Phosphatidylglycérol                  | 8          |
| Phosphatidylinositol                  | 2          |
| Phosphatidyléthanolamine              | 4          |
| Sphingomyéline                        | 1          |
| Autres                                | 2          |
| <b>Lipides neutres et cholestérol</b> | <b>5</b>   |
| <b>Protéines</b>                      | <b>10</b>  |
| Protéines "sériques" : albumine ...   | 7          |
| SP-A et SP-D (protéines hydrophiles)  | 2          |
| SP-B et SP-C (protéines hydrophobes)  | 1          |

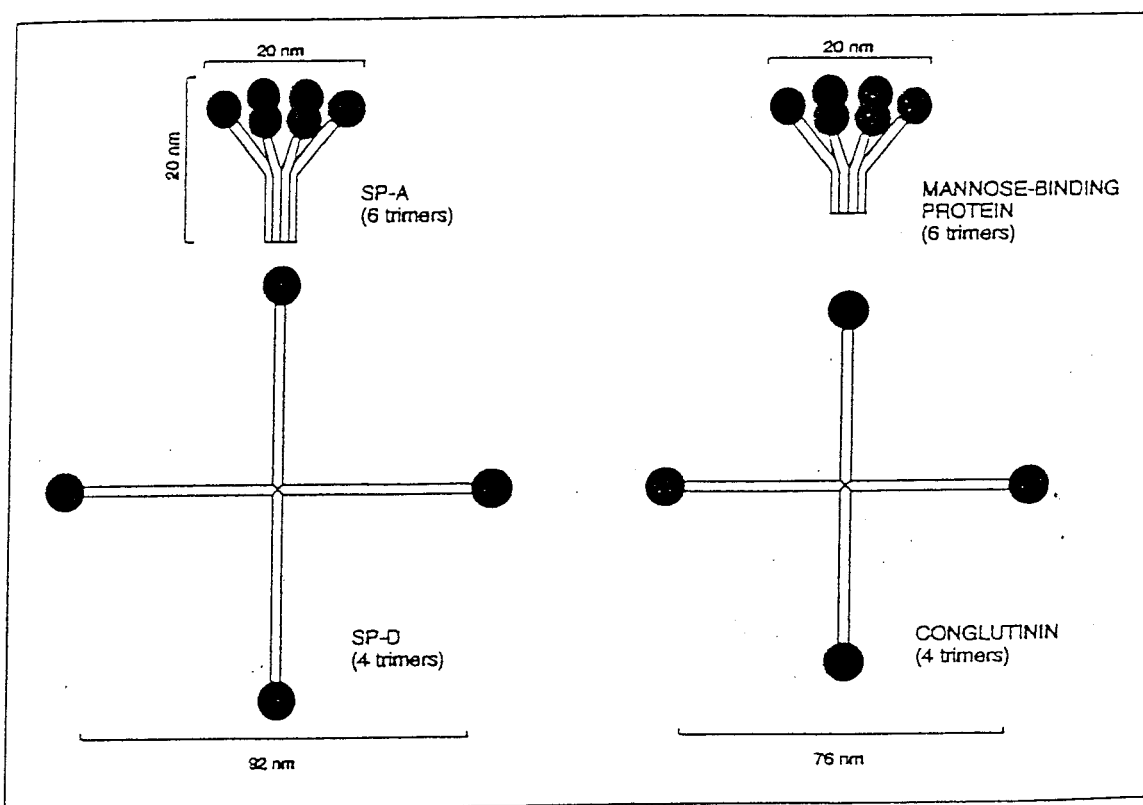


Figure 7. Schémas des structures quaternaires des deux protéines hydrophiles du surfactant (SP-A et SP-D) comparées à d'autres collectines rencontrées dans la circulation sanguine (*Mannose-Binding Protéin* et *conglutinine*). Les cercles noirs correspondent aux domaines de reconnaissance des résidus carbohydrates (*lectines-like*). Selon van Golde, 1995.

dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, saturée) qui constitue 50% de la composition totale du surfactant. On remarque la pauvreté en phospholipides habituellement trouvés dans les membranes cellulaires (phosphatidyléthanolamine, sphingomyéline, phosphatidylsérine) et la présence du phosphatidylglycérol (PG) (environ 8%). Ce dernier est un phospholipide anionique très commun chez les bactéries mais il est spécifique du surfactant pulmonaire chez les mammifères (Denizot *et al.*, 1991 ; Rooney *et al.*, 1994).

Quatre apoprotéines majeures associées au surfactant pulmonaire ont été décrites : SP-A (SP : *Surfactant Protein*), SP-B, SP-C et SP-D (Singh et Katyal, 1991 ; Johansson *et al.*, 1994). Toutes ces protéines sont synthétisées par les pneumocytes de type II.

La SP-A est une glycoprotéine hydrophile multimérique de 700 kDa constitué de 18 polypeptides de 26-38 kDa (6 trimères). Elle comporte une extrémité glycosylée et un domaine collagénique. La SP-A est partiellement liée à la portion lipidique du surfactant, l'insertion dans la couche lipidique se faisant par l'extrémité non glycosylée. Les conséquences de cette interaction SPA-phospholipides sont importantes : agrégation des phospholipides en présence de calcium et, surtout, formation de la myéline tubulaire en coopération avec la SP-B et en présence de calcium (Denizot *et al.*, 1991 ; Johansson *et al.*, 1994 ; Hawgood *et al.*, 1994). La SP-A joue un rôle de premier plan dans la régulation de la biosynthèse du surfactant. En effet, elle rétro-contrôle négativement la sécrétion des corps lamellaires et stimule le recyclage du surfactant (van Golde *et al.*, 1994). La SP-A jouerait un rôle important dans les mécanismes de défense non spécifiques du poumon vis-à-vis des micro-organismes pathogènes et des virus (van Golde, 1995 ; Lacaze-Masmonteil, 1992 ; Dowing *et al.*, 1995). En effet, la région C-terminale de la SP-A est un domaine de reconnaissance des carbohydrates et présente une remarquable homologie de structure et de fonction avec les lectines de type C (collectines) tels que le facteur du complément C1q, la CRP (*C-reactive Protein*), les MBP (*Mannose Binding Proteins*), la conglutinine et la SP-D (Figure 7) (van Golde *et al.*, 1994). Ainsi, la phagocytose de bactéries telles que *Staphylococcus aureus* ou *Mycobacterium tuberculosis* par les macrophages alvéolaires, est augmentée lorsque ces micro-organismes sont opsonisés par la SP-A (Ohmer-Schröck *et al.*, 1993 ; Dowing *et al.*, 1995). Les macrophages auraient des récepteurs spécifiques pour la SP-A, mais la région reconnue par ces récepteurs n'est pas encore définie (Ohmer-Schröck *et al.*, 1993 ; van Golde, 1995). De plus, la SP-A stimulerait la migration des macrophages (van Golde, 1995).

La SP-D est une protéine hydrophile de 43 kDa qui présente des homologies de structure et de fonction avec la SP-A. Sa structure native est constituée de 4 trimères semblables de 43 kDa. De plus, la SP-D possède également, dans sa région C-terminale, des domaines lectiniques proches des collectines. Par conséquent, les propriétés biologiques de la SP-D sont proches de celles de la SP-A (Figure 7) (Van Golde *et al.*, 1994).

Les SP-B et SP-C sont les seules protéines hydrophobes du surfactant. Leur poids moléculaire est respectivement de 6-8 kDa et 5 kDa. Elles jouent un rôle important dans la formation de la structure myéline tubulaire du surfactant (Van Golde *et al.*, 1994 ; Johansson *et al.*, 1994). De plus, elles influencent l'état d'agrégation des phospholipides, permettent l'adsorption rapide, l'étalement et le réétalement du surfactant au cours des cycles respiratoires (King, 1985). Elles sont également impliquées dans le recyclage des phospholipides par les pneumocytes de type II (Claypool *et al.*, 1984).

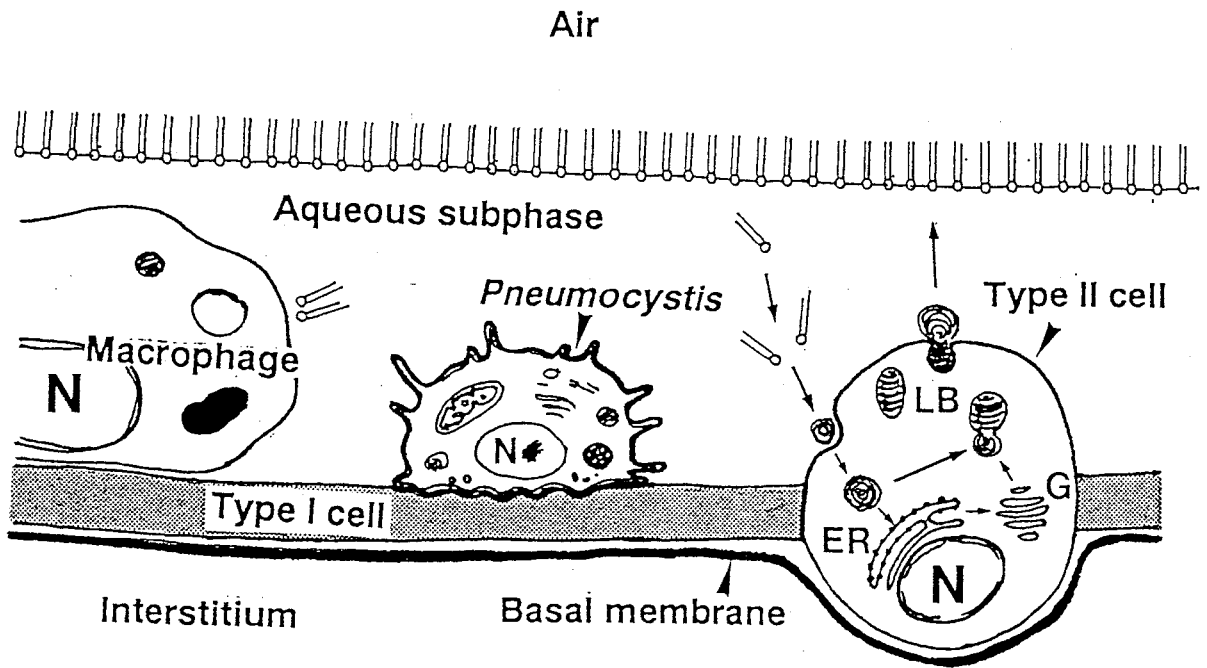
Il existe également des protéines non spécifiques du surfactant. Ce sont essentiellement l'albumine, des Igs, le fibrinogène et d'autres protéines plasmatiques. Leur présence dans l'hypophase serait due à une transsudation à travers la paroi alvéolaire (Tableau 6) (Lacaze-Masmonteil, 1992).

Ce bref aperçu de l'environnement complexe que représente le poumon, montre que le surfactant y prend une place prépondérante sur le plan de la mécanique respiratoire, des échanges gazeux, mais aussi de la défense du poumon vis-à-vis de nombreux micro-organismes pathogènes.

#### 2-4-2-2 Interactions de *P. carinii* avec le surfactant

*P. carinii* s'attache spécifiquement et intimement aux pneumocytes de type I. Les parasites ne sont pas directement en contact avec l'air alvéolaire mais sont présents dans l'hypophase (Figure 8). *P. carinii* est donc directement ou indirectement en contact avec l'ensemble des acteurs présents dans le micro-environnement alvéolaire : les pneumocytes de type II, les macrophages alvéolaires, les composants du surfactant et l'air alvéolaire. *P. carinii* va ainsi établir volontairement ou non, de multiples interactions qui pourront lui être favorables ou fatales.

Les taux de plusieurs composants du surfactant sont modifiés lors de la pneumocystose



**Figure 8.** Un trophozoïte de *P. carinii* dans son microenvironnement alvéolaire. Les trophozoïtes s'attachent spécifiquement et intimement aux pneumocytes de type I. Les parasites ne sont pas directement en contact avec l'air alvéolaire mais sont présents dans l'hypophase qui est délimitée par l'épithélium alvéolaire et le film phospholipidique formé par le surfactant. On retrouve les partenaires alvéolaires du parasite, déjà montrés dans la Figure 6. Dessin schématique librement inspiré de Wirtz et Smith, 1992.

(Su et Martin, 1994). Ainsi, le taux de phospholipides dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA), diminue au cours de la PPC (Kernbaum *et al.*, 1983 ; Sheehan *et al.*, 1986 ; Hoffman *et al.*, 1992 ; Escamilla *et al.*, 1992 et 1993 ; Rose *et al.*, 1994). De plus, Escamilla *et al.* (1992 et 1993) montrent que les perturbations du surfactant, chez des patients VIH+, sont déjà présentes avant même le développement de la PPC et que la maladie aggrave ces perturbations. Les phospholipides les plus touchés sont d'une part la phosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol dont les taux diminuent et d'autre part la sphingomyéline et la lysophosphatidylcholine dont les taux augmentent (Escamilla *et al.*, 1992 ; Hoffman *et al.*, 1992 ; Su *et al.*, 1993). De plus, *P. carinii* inhiberait directement la sécrétion de la phosphatidylcholine par les pneumocytes de type II (Rice *et al.*, 1993). Eijking *et al.* (1991) montrent que l'instillation de surfactant d'origine bovine chez un rat avec PPC, réduit fortement l'hypoxie en améliorant les échanges gazeux. En effet, des observations histologiques montrent que les alvéoles de rats (avec PPC), n'ayant pas reçu de surfactant exogène, sont remplies d'exsudats ; à l'inverse, après instillation de surfactant exogène, les alvéoles semblent moins affectées et plus aérées (Eijking *et al.*, 1991). Cette étude suggère qu'une thérapeutique substitutive à l'aide de surfactant exogène pourrait compenser la diminution des échanges gazeux au cours de la PPC (Eijking *et al.*, 1991 ; Su et Martin, 1994).

Les apoprotéines, en particulier la SP-A, sont également affectées au cours de la PPC (Phelps et Rose, 1991 ; Sternberg *et al.*, 1995). En effet, la concentration de SP-A, est détectée dans le LBA à des taux élevés en cas de PPC (Phelps et Rose, 1991). Sternberg *et al.* (1995) ont trouvé une corrélation significative entre le taux de SP-A et la quantité de *P. carinii* présent dans le LBA de patients VIH+. Des études récentes ont montré une interaction directe entre les apoprotéines hydrophiles SP-A, SP-D et *P. carinii* (Zimmerman *et al.*, 1992 ; O'Riordan *et al.*, 1995). Les résidus mannose de la MSG de *P. carinii* sont reconnus par la SP-A avec une forte affinité ( $K_d : 8.10^{-9}$  M) et on estime à  $8,4.10^6$ , le nombre de sites de fixation pour la SP-A à la surface de *P. carinii* (Zimmerman *et al.*, 1992). De plus, la SP-A fixée à la surface de *P. carinii*, ne semble pas être dégradée ou internalisée par le parasite. Les suites de cette interaction n'ont pas été définies, mais on peut imaginer qu'il s'agit d'un mécanisme d'opsonisation du parasite, permettant son élimination plus rapide par les macrophages alvéolaires. En effet, un travail récent confirme cette hypothèse (O'Riordan *et*

*al.*, 1995). La SP-D, aux propriétés biologiques proches de la SP-A, reconnaît également les résidus mannose de la MSG de *P. carinii*. Cette interaction permet l'attachement de *P. carinii* aux macrophages alvéolaires (O'Riordan *et al.*, 1995). Ainsi, l'interaction entre les protéines hydrophiles A et D du surfactant, et la MSG de *P. carinii*, serait un quatrième mécanisme permettant la reconnaissance du parasite par les macrophages alvéolaires (voir chapitre 2-4-1-3 et 2-4-1-4). Toutefois, on ne sait toujours pas si cette interaction déclenche ou non la phagocytose des parasites. En effet, certains auteurs suggèrent plutôt que l'interaction de *P. carinii* avec les SP-A et SP-D serait un moyen d'échapper aux défenses de l'hôte (Su et Martin, 1994 ; Zimmerman *et al.*, 1992).

Au cours de son développement, *P. carinii* provoque ainsi de nombreuses perturbations structurales et fonctionnelles du surfactant pulmonaire. Le parasite pourrait également utiliser les composants phospholipidiques du surfactant comme substrat (Palluault *et al.*, 1993 ; Guo et Kaneshiro, 1995). Ainsi, 50% de la paroi cellulaire de *P. carinii* est composé de lipides proches de ceux présents dans le surfactant pulmonaire tels que la PC, PE, PI et Sph (DeStephano *et al.*, 1990a ; Guo et Kaneshiro, 1995). De plus, *P. carinii* incorpore rapidement *in vitro* de nombreux acides gras tels que l'acide oléique, l'acide palmitique, et dans une moindre mesure l'acide stéarique et l'acide linoléique (Paulsrud et Queener, 1994).



## **3- MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### 3- MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 3-1 Sources de *P. carinii*

La souris, le rat et le lapin ont été utilisés comme hôtes expérimentaux de *Pneumocystis carinii*. Des souris blanches (souche sauvage porteuse de *P. carinii* élevée dans notre laboratoire) reçoivent du métrasulfobenzoate de prednisolone (Houdé, Puteaux, France), à raison de 40 mg/l dans l'eau de boisson. Des rats Wistar (IFFA-CREDO, Lyon, France) reçoivent de la dexaméthasone (Merk Sharp & Dohme Chibret, Paris) à une concentration de 2mg/l dans l'eau de boisson (Schmatz *et al.*, 1990). Rats et souris sous corticoïdes développent une PPC intense après 3 mois de traitement. Le modèle lapin se caractérise par le développement d'une pneumocystose spontanée au moment du sevrage, et ceci en l'absence d'immunodépression induite (Soulez *et al.*, 1989). Les lapereaux utilisés dans cette étude sont des hybrides Néo-zélandais/Californiens achetés à un éleveur pratiquant la production industrielle de lapins de chair (Vasseur, Prouzel, France). Tous les animaux sont alimentés normalement (UAR, France) avec boisson à volonté.

#### 3-2 Obtention de *P. carinii*

##### 3-2-1 Méthode d'extraction par agitation-filtration

Après sacrifice des animaux infectés, leurs poumons sont prélevés stérilement et mis dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(Bio-Whittaker, France) sans sérum et contenant des antibiotiques (pénicilline 100 UI/ml, streptomycine 100 µg/ml, Eurobio, France). Ils sont ensuite découpés en petits morceaux et mis sous agitation (barreau magnétique) à 4°C pendant 90 min dans le même milieu. Après filtration sur gaze, l'homogénat est centrifugé 10 min à 2900g. Le culot est repris dans un tampon d'hémolyse (NH<sub>4</sub>Cl 0,15 M: 9 volumes ; Tris/HCl 20 mM pH 7,4: 1 volume), incubé 10 min à 4°C et centrifugé. Le culot est repris avec du DMEM et filtré successivement sur tamis métalliques de 250 µm, 63 µm puis sur filtres en polycarbonate de 10 µm et 8 µm (Nuclepore, Costar, France). Après centrifugation 10 min à 2900g le culot est resuspendu dans un volume défini de DMEM.

### 3-2-2 Méthode de quantification de *P. carinii*

Pour déterminer le nombre de parasites, des gouttes calibrées de 2 $\mu$ l sont déposées sur des lames microscopiques, puis séchées à température ambiante. Des lames sont colorées au bleu d'ortotoluidine (BTO) (Chalvardjian et Grawe, 1963) et d'autres au RAL-555 (Société RAL, Paris, France) (Soulez *et al.*, 1988), deux colorations complémentaires (Soulez *et al.*, 1988 ; Soulez *et al.*, 1991a).

Le BTO permet d'établir le nombre absolu de formes à paroi épaisse (prékystes intermédiaires, tardifs et kystes matures) qui prennent par métachromatie une coloration violette. Le nombre de formes à paroi présentes dans la suspension est déterminé par la formule suivante (Soulez *et al.* 1991a ; Aliouat *et al.* 1993a) :

$$N = n \times S2/S1 \times R$$

- **N** : nombre total de formes à paroi épaisses présentes dans la suspension ;
- **n** : nombre moyen de formes à paroi épaisses par champ (moyenne obtenue sur au moins 10 champs dans trois gouttes différentes) ;
- **S1** : surface du champ objectif x50 à immersion (oculaire x15) = 0,053 mm<sup>2</sup> ;
- **S2** : surface de la goutte de 2 $\mu$ l (variable selon la fluidité de la suspension) ;
- **R** : volume total de la suspension / volume de la goutte calibrée.

Le RAL-555 est une coloration panoptique similaire au méthanol-Giemsa (Soulez *et al.*, 1991a), qui met en évidence tous les stades parasitaires. Cette coloration permet de réaliser une "formule" parasitaire évaluant le pourcentage de formes à paroi mince (trophozoïtes et prékystes précoces) et celui de formes à paroi épaisse (prékystes et kystes matures). Le nombre total de parasites dans la suspension parasitaire est calculé en appliquant la formule suivante:

$$\text{Nombre total de parasites} = N / \%N$$

- **N** : nombre total de formes à paroi épaisse ;
- **%N** : % de formes à paroi épaisse.

Ces deux colorations complémentaires, BTO et RAL-555, permettent de vérifier l'absence d'autres microorganismes dans le prélèvement traité.

### 3-3 Systèmes expérimentaux *in vitro*

#### 3-3-1 Lignées cellulaires

*In vitro*, les études de l'attachement et du développement de *P. carinii* ont été réalisées en co-culture en utilisant des lignées cellulaires continues : (i) L2 (ATCC N° CCL149), cellules épithéliales alvéolaires de rat ; (ii) LA-4 (ATCC N° CCL196) cellules épithéliales alvéolaires de souris ; (iii) WI38VA13 sous-lignée 2RA (ATCC CCL75.1) cellules épithéliales alvéolaires de poumon embryonnaire humain ; (iv) A549 (ATCC CCL185) cellules épithéliales alvéolaires de poumon adulte humain. Cette dernière lignée se rapproche fortement des pneumocytes de type II, car elle synthétise la phosphatidylcholine, phospholipide majeur du surfactant pulmonaire, en quantité importante. Les cellules A549 présentent de nombreuses inclusions lamellaires typiques des pneumocytes de type II (Zach *et al.*, 1992). La lignée L2 est celle qui s'en éloigne le plus, car elle synthétise peu de phosphatidylcholine et les inclusions lamellaires typiques ne sont pas observées en ultrastructure. De ce point de vue, les lignées LA-4 et WI38VA13 sous-lignée 2RA sont intermédiaires entre les lignées A549 et L2.

Les cellules s'entretiennent facilement dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF (Dutscher, France) à 37°C, en atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>. Le repiquage s'effectue deux fois par semaine à l'aide d'une solution de trypsine 0,05% - EDTA 0,02% préparée dans du PBS sans calcium ni magnésium.

#### 3-3-2 Attachement et développement de *P. carinii in vitro*

Les cinétiques de l'attachement et du développement *in vitro* de *P. carinii* de rat et de souris, ont été établies pour les différentes lignées cellulaires utilisées. Dans tous les cas, les cellules sont dissociées par action enzymatique (trypsine 0,05%-EDTA 0,02%) et déposées dans des plaques de 4 puits (Costar, France) contenant une lamelle en verre de 12 mm de diamètre. Trois millions de parasites, en suspension dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF (Cushion et Walzer, 1984), sont déposés sur le tapis cellulaire de chacun des puits et incubés pendant des temps variables compris entre 2 et 96 heures. Les plaques sont incubées le temps de l'expérience à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>.

En fin d'incubation, les lamelles sont lavées trois fois avec 1 ml de PBS Dulbecco (Eurobio, France) à 37°C, afin d'éliminer les débris cellulaires et les parasites non attachés. Elles sont ensuite colorées au méthanol-Giemsa et montées sur lame à l'aide d'une résine synthétique (Eukitt, Labonord, France).

Le nombre de parasites attachés aux tapis cellulaire est déterminé suivant la formule:

$$\text{Parasites attachés} = n \times Sp / So$$

- **n** : nombre moyen de parasites par champ microscopique (objectif x50, oculaire x15);
- **Sp** : surface du puits de culture ;
- **So** : surface du champ microscopique.

### 3-3-3 Mise en évidence de la matrice de fibronectine

Pour mettre en évidence la fibronectine (Fn), molécule impliquée dans l'attachement de *P. carinii* (Pottraz et Martin, 1990a ; Pottratz *et al.*, 1991 ; Aliouat *et al.*, 1993), à la surface des cellules cultivées, un anticorps polyclonal de lapin anti-Fn humaine (F(ab)'<sub>2</sub>; 84FMS10, aimablement cédé par le Dr M.A. Ouaisi de l'Institut Pasteur, Lille, France) marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine est mis en contact du tapis cellulaire recouvrant la lamelle. L'anticorps dilué au 1/800<sup>ème</sup> est incubé pendant 30 min à 37°C en chambre humide. Après un lavage de 10 min dans du PBS, les préparations sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss, Axiophot).

### 3-3-4 Culture *in vitro* de *P. carinii* de rat

#### 3-3-4-1 Suivi de la culture

Les cellules L2, cultivées jusqu'à confluence dans des boîtes de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Costar, France), sont divisées au 1/4 (trypsine 0,05% - EDTA 0,02%). Après 12 à 24 heures d'incubation, les boîtes de culture sont inoculées avec 15.10<sup>6</sup> *P. carinii* de rat. Cellules L2 et parasites sont ensuite incubés dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF, à 37°C et en atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>. Les parasites contenus dans chaque boîte de culture sont quantifiés quotidiennement pendant 4 jours. La technique consiste à détacher les parasites du tapis cellulaire par agitation mécanique manuelle suivie de 5 à 6 lavages du tapis cellulaire

avec du milieu de culture DMEM. La suspension parasitaire ainsi obtenue est centrifugée 10 min à 2900g et le culot est resuspendu dans un volume défini de DMEM. Les parasites sont quantifiés après coloration au RAL-555.

Le tapis cellulaire devient confluent après 4 jours de co-culture. Les cellules L2 ainsi que les parasites attachés, sont dissociées par l'action de la trypsine-EDTA et divisées au 1/3 (passage 1) (Aliouat *et al.*, 1995). La quantification quotidienne des parasites s'effectue comme nous l'avons cité précédemment. Quatre jours plus tard, un dernier repiquage (passage 2) est effectué et les cultures sont suivies une nouvelle fois pendant 4 jours.

#### 3-3-4-2 Production en masse de parasites *in vitro*

Des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> contenant des cellules L2, repiquées au 1/4 la veille, sont inoculées avec 50.10<sup>6</sup> *P. carinii* de rat. Après 3 à 4 jours de culture, les boîtes sont repiquées au 1/3. Lorsque les cellules sont à nouveau confluentes, les parasites sont détachés du tapis cellulaire par agitation mécanique suivie de 5 à 6 lavages avec du milieu de culture. La suspension parasitaire ainsi récupérée est centrifugée 10 min à 2900g et le culot est repris dans un volume défini de DMEM. Les parasites sont quantifiés après coloration au RAL-555 (Figure 9).

#### 3-3-5 Étude en microscopie électronique à transmission et à balayage

Afin d'étudier l'intégrité morphologique de *P. carinii*, les relations hôte-parasite et parasite-parasite *in vitro*, deux techniques d'observations fines et complémentaires ont été employées : la microscopie électronique à transmission (MET) et la microscopie électronique à balayage (MEB).

##### 3-3-5-1 Microscopie électronique à transmission

Des parasites de rat ou de souris sont maintenus (2 heures à 96 heures) en co-culture, sur chacune des lignées cellulaires, dans des plaques de cultures 6 puits (Costar, France). Il a été montré dans notre laboratoire, qu'une pression osmotique élevée durant la fixation préservait l'ultrastructure de *P. carinii* (Palluault *et al.*, 1992a et 1992b). En effet, les organites et le cytosol sont correctement préservés pour des pressions osmotiques comprises entre 850 et 1300 mOsm.

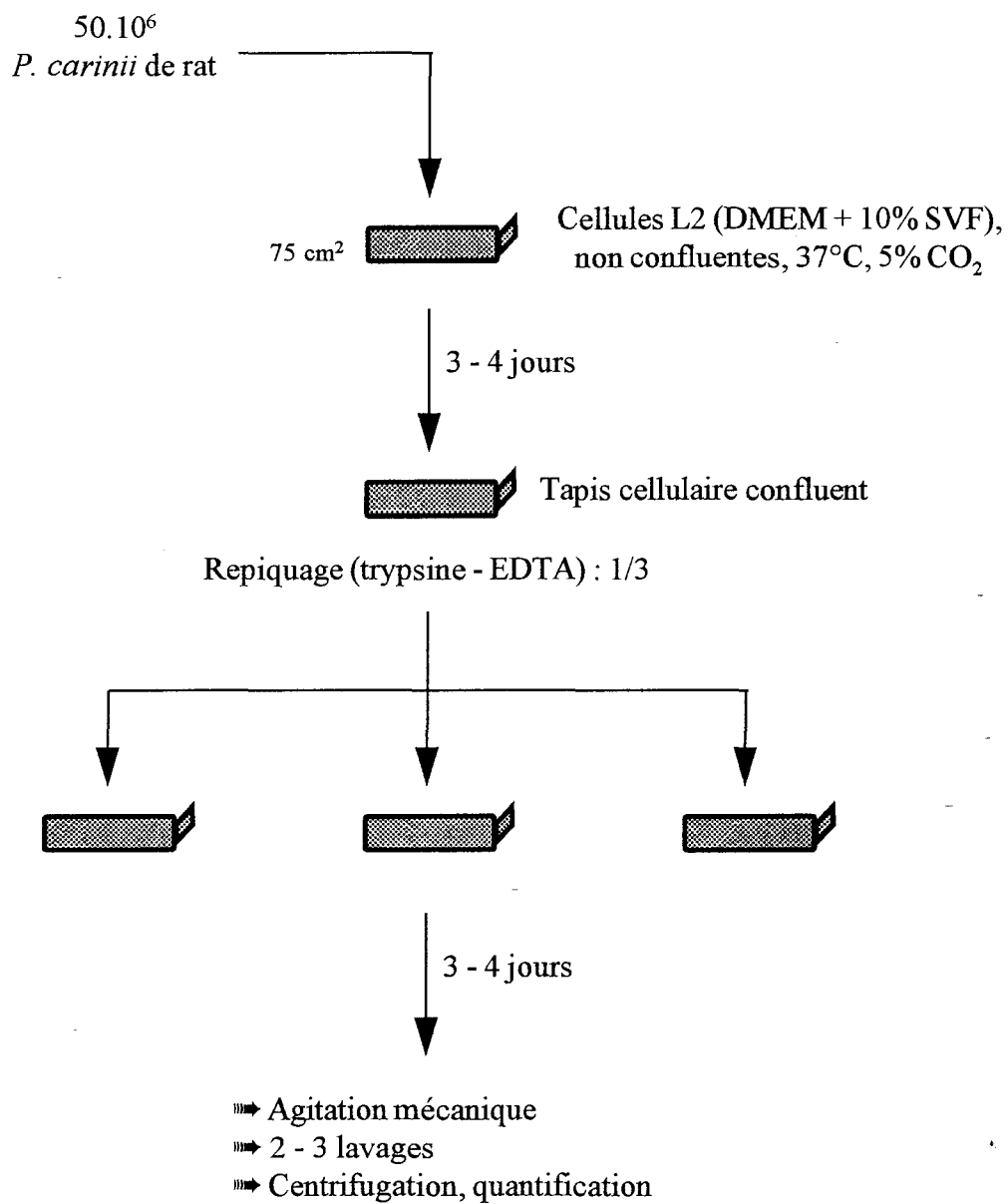


Figure 9 . Co-culture de *P. carinii* de rat sur cellules épithéliales alvéolaires L2.

Ainsi, les cultures sont fixées 1 heure à température ambiante dans du tampon phosphate (0,1M, pH 7,5) contenant 2,5% de glutaraldéhyde et ajusté à une pression osmotique de 850 mOsm par addition de NaCl (0,188M). Après trois lavages de 20 min dans du tampon phosphate (0,1M, pH 7,5 ; NaCl 0,412M) à température ambiante, les tapis cellulaires sont post-fixés 1 heure dans le même tampon contenant du tétraxide d'osmium (1% final). Les cellules et les parasites, ainsi fixés dans les puits de culture, subissent une déshydratation à l'éthanol (70°, 95°, absolu).

L'addition de 1 à 2 ml d'oxyde de propylène suffit à décoller rapidement le tapis cellulaire du support plastique. Le tapis est alors immédiatement transféré dans un tube Ependorf contenant le même solvant (Dr J.F. Dubremetz, communication personnelle). L'imprégnation des cellules par la résine hydrophobe (Epon) est initiée dans un mélange oxyde de propylène-Epon (volume à volume) durant 12 heures à température ambiante, puis suivie de deux incubations de 3 heures en résine pure à 37°C. La polymérisation a lieu dans un dernier bain de résine pendant 3 jours à 60°C. Des coupes semi-fines, colorées au bleu Azur (1:1000), et ultrafines sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert-Jung). Ces dernières, recueillies sur grille à 1 trou membrannée (Formvar), subissent une double coloration avec de l'acétate d'uranyle 2% et du citrate de plomb. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi H-600 sous une tension de 75 KV.

Le même protocole de fixation-inclusion a été utilisé pour les isolats parasitaires obtenus directement chez l'animal ou pour des suspensions parasitaires obtenues *in vitro* en détachant mécaniquement *P. carinii* des cellules support (chapitres 3-2-1 et 3-3-4).

### 3-3-5-2 Microscopie électronique à balayage

La cinétique de l'attachement et du développement de *P. carinii* de rat *in vitro*, sur des cellules L2, a été étudiée en MEB. Les cellules sont déposées dans des plaques de culture 4 puits contenant une lamelle en verre de 12 mm de diamètre. Les parasites sont inoculés et les cultures sont incubées pendant des temps variables compris entre 24 et 96 heures. En fin d'incubation, les lamelles sont lavées trois fois avec 1 ml de PBS Dulbecco (Eurobio, France) à 37°C, puis les cellules et les parasites sont fixés 2 heures dans du glutaraldéhyde 2,5%, lavés et post-fixés 2 heures au tétraxide d'osmium 1% final, suivant un protocole identique à celui de la MET. Les lamelles sont ensuite déshydratées à l'éthanol (40°, 50°, 70°, 80°, 95°,



absolu) puis soumises à 2 bains d'acétate d'isoamyle. La dessiccation finale des échantillons s'effectue selon la technique du point critique à l'aide de l'Emscope CPD 750 (Goldstein *et al.*, 1981). Les échantillons sont métallisés avec le mélange or-palladium (Polaron E5100) puis observés au microscope électronique à balayage JEOL 35 CF (I.N.R.A., Villeneuve d'Ascq) sous une tension de 15 KV.

### 3-4 Modèles *in vivo*

#### 3-4-1 Hôtes expérimentaux

Des souris SCID (aimablement données par le Dr J.Y. Cesbron et P. Decavel de l'Institut Pasteur, Lille ; IFFA-CREDO, Lyon, France), des rats athymiques Fisher-344 nu/nu (rats nude) (aimablement donnés par P. Billaut et E. Fleurbaix de l'Institut Pasteur, Lille) âgés d'environ 8 à 12 semaines ont été utilisés comme hôtes expérimentaux pour l'étude de l'infectivité de *P. carinii*. Les souris SCID (Soulez *et al.*, 1991b), et les rats nude sont des animaux contrôlés par nous-mêmes, non porteurs latents de *P. carinii*. En effet, avec ou sans corticothérapie aggravante, ces souris et ces rats ne développent pas de pneumocystose.

Les souris SCID présentent une sévère déficience congénitale en lymphocytes T et B et présentent généralement une lymphopénie, une agammaglobulinémie et une tolérance aux allogreffes et aux tumeurs. Ces souris sont très susceptibles aux infections bactériennes, virales et à de nombreux microorganismes opportunistes (Bosma *et al.*, 1983 ; Deschryver-Kecskemeti *et al.*, 1988). Par contre, les granulocytes, les macrophages et les cellules NK ("natural killer") sont présentes en proportion normale dans le sang. Les rats nude présentent une aplasie congénitale du thymus et par conséquent une sévère déficience en lymphocytes T fonctionnels. Toutefois, par un phénomène compensatoire, les granulocytes neutrophiles, éosinophilès et les monocytes sont présents dans le sang en quantité 2 à 10 fois plus importante que chez les rats hétérozygotes (Vos *et al.*, 1980).

Durant toutes les expériences, les animaux sont installés dans une enceinte autonome d'animalerie (FLUFRANCE, Wissous, France) qui permet de maintenir une atmosphère stérile (Filtre absolu 0,2  $\mu$ m). Les cages, la nourriture, l'eau de boisson et la literie sont systématiquement stérilisés par autoclavage. Cette enceinte possède 4 compartiments indépendants qui sont désinfectés entre chaque nouvelle expérience.

### 3-4-2 Méthodes d'inoculation

#### 3-4-2-1 Inoculation nasale de *P. carinii* chez la souris SCID

##### 3-4-2-1-1 Technique

Afin d'établir si *P. carinii* instillé par voie nasale atteint réellement le poumon, une expérience préliminaire a été réalisée. Deux lots de souris SCID ont été constitués. Le premier comportait des souris anesthésiées par voie intrapéritonéale avec un "cocktail " de drogue composé d'hydrochlorure de kétamine (100 mg/kg ; Imalgène<sup>®</sup>, Rhône Mérieux, France), de diazépam (1,5 mg/kg ; Valium<sup>®</sup>, Roche, France) et d'atropine (0,5 mg/kg ; Atropine<sup>®</sup>, Aguettant, France). Le deuxième lot comportait des souris non anesthésiées. L'instillation nasale des souris des deux lots fut réalisée à l'aide d'un "pipetman" (P200, Gilson) (Figure 21A). L'inoculum contenait  $40.10^6$  parasites suspendus dans 30  $\mu$ l de DMEM sans sérum. Pour pouvoir suivre le devenir des parasites, l'inoculum a été coloré au bleu Trypan (0,1-0,2% final) (BioWittaker, France). Les animaux ont été sacrifiés 10 à 15 min après l'inoculation et un examen macroscopique des poumons et de l'estomac a été réalisé.

##### 3-4-2-1-2 Cinétique d'infection

Des lots de trois souris SCID anesthésiées sont inoculés par voie nasale avec  $40.10^6$  parasites de souris fraîchement extrait et suspendus dans 30  $\mu$ l de DMEM sans sérum. Les souris sont sacrifiées à différents temps après inoculation (0-60 jours) et une extraction parasitaire est réalisée. La méthode d'extraction de *P. carinii* est différente de celle employée précédemment. En effet l'agitation-filtration (chapitre 3-2-1) est une méthode longue avec un rendement moyen, mais qui permet d'obtenir des parasites viables et relativement pur (Soulez *et al.*, 1991a). Dans le cas présent, le but est d'extraire un maximum de parasites de façon reproductible. C'est pourquoi nous avons préféré la méthode au Stomacher.

Ainsi, après sacrifice des souris SCID, les poumons sont prélevés stérilement et mis dans du milieu de Hanks sans  $Ca^{++}$  ni  $Mg^{++}$ . Ils sont ensuite découpés en petits morceaux et homogénéisés dans le même milieu à l'aide d'un Stomacher (Lab-blender 80, Prolabo, France) pendant 7 min. Après filtration sur gaze, le filtrat est centrifugé 10 min à 2900g et le culot est resuspendu dans un volume défini de tampon. Les parasites sont alors colorés et quantifiés selon la méthode décrite précédemment (chapitre 3-2-2).

L'étude cinétique de l'infectivité de *P. carinii* de souris chez la souris SCID est réalisée

2 fois à trois mois d'intervalle pour évaluer la reproductibilité du modèle.

#### 3-4-2-2 Inoculation trachéale de *P. carinii* chez le rat nude

Les rats nude sont anesthésiés par voie intrapéritonéale avec un "cocktail" composé d'hydrochlorure de kétamine (45 mg/kg ; Imalgène<sup>®</sup>, Rhône Mérieux, France), de diazépam (0,7 mg/kg ; Valium<sup>®</sup>, Roche, France) et d'atropine (0,25 mg/kg ; Atropine<sup>®</sup>, Aguettant, France). Dans toutes les expériences, les rats sont inoculés par voie trachéale (Bartlett *et al.*, 1988). La trachée est dégagée par une incision d'environ 1 cm dans la région cervicale antérieure de l'animal (Figure 21D). L'inoculum parasitaire, suspendu dans 100  $\mu$ l de DMEM sans sérum, est directement injecté avec 0,3 ml d'air à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille (0,45x12mm, Terumo, France). L'air placé derrière l'inoculum permet de chasser complètement les parasites dans les poumons. Pour limiter tout risque d'infection, quelques gouttes d'antibiotiques (pénicilline 10.000 UI/ml - streptomycine 10.000  $\mu$ g/ml, Eurobio, France) sont déposées dans la région opérée et la plaie est refermée par deux points de sutures non résorbables (3/8 Seracap, France). Toutes les étapes sont réalisées dans des conditions de stérilité rigoureuses et sous hotte à flux laminaire.

Trois lots de rats nude sont constitués pour mettre au point le modèle d'infection : (i) rats nude immunodéprimés avec de la dexaméthasone (1mg/l, eau de boisson) à partir du jour de l'inoculation des parasites. (ii) rats nude immunodéprimés 15 jours avant l'inoculation et tout au long de l'expérience. (iii) rats nude non immunodéprimés. Tous les rats ont été inoculés par voie trachéales avec  $100 \cdot 10^6$  *P. carinii* de rat fraîchement extraits et sacrifiés 40 jours après l'inoculation. L'extraction au Stomacher et la quantification des parasites ont été réalisées comme précédemment.

#### 3-5 Evaluation de l'infectivité de *P. carinii* provenant de cultures *in vitro*

Les rats nude ont été utilisés pour évaluer l'infectivité de *P. carinii* provenant de rats Wistar sous corticoïdes ou de cultures de *P. carinii* de rat sur des cellules L2. Deux lots de rats nude sont alors constitués. Le premier comprend des rats inoculés par voie trachéale avec  $100 \cdot 10^6$  parasites fraîchement extraits. Le second comprend des rats inoculés avec  $100 \cdot 10^6$  parasites provenant d'une culture de 7 jours de *P. carinii* de rat sur cellules L2. L'administration de corticoïde (dexaméthasone, 1mg/l, eau de boisson), pour ces deux lots

d'animaux, est initiée le jour de l'inoculation ou 15 jours avant. Les rats nude sont sacrifiés 40 jours après l'inoculation des parasites. L'extraction au Stomacher et la quantification de *P. carinii* est alors réalisées.

### 3-6 Etudes sur l'infectivité de *P. carinii* en fonction de l'espèce de l'hôte

L'infectivité de *P. carinii* en fonction de l'espèce de l'hôte a été évaluée en utilisant des souris SCID inoculées par voie nasale et des rats nude inoculés par voie trachéale.

En générale, dans les différentes expériences, les souris SCID et les rats nude ont été divisés en 5 groupes :

Groupe 1 : souris SCID ou rats nude inoculés avec *P. carinii* de souris.

Groupe 2 : souris SCID ou rats nude inoculés avec *P. carinii* de rat

Groupe 3 : souris SCID ou rats nude inoculés avec *P. carinii* de lapin.

Groupe 4 : souris SCID inoculées avec *P. carinii* de rat provenant de culture (chapitre : 3-3-4-2).

Groupe 5 : souris SCID ou rats nude inoculés avec du milieu de culture stérile (groupe témoin).

Les souris SCID sont instillées avec un inoculum fraîchement extrait (ou provenant de culture), contenant  $30 \cdot 10^6$  parasites suspendus dans  $30 \mu\text{l}$  de milieu de culture sans sérum. Les rats nude sont inoculés avec  $100 \cdot 10^6$  parasites suspendus dans  $100 \mu\text{l}$  du même milieu. Les animaux sont sacrifiés 40, 70 ou 90 jours après l'inoculation. Les parasites sont extraits au Stomacher et quantifiés.

Enfin, une étude cinétique de l'infectivité de *P. carinii* de rat chez la souris SCID à aussi été réalisée. Elle suit le même protocole expérimental que l'étude de l'infectivité de *P. carinii* de souris chez la souris SCID (chapitre : 3-4-2-1-2).

### 3-7 Suivi ultrastructural des premières phases de l'infection

Pour étudier les phases précoces de l'infection, nous avons utilisé la MET. Des souris SCID ont été instillées avec  $200 \cdot 10^6$  parasites de rat ou de souris. Les animaux ont été sacrifiés après 6, 24, 48 ou 72 heures après l'inoculation des parasites. De petits morceaux de poumons ( $1-2 \text{ mm}^3$ ) ont été rapidement prélevés et fixés 3 h à température ambiante par immersion dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon phosphate (0,1M, pH 7,5) à une

pression osmotique de 850 mOsm . Après trois lavages de 20 min dans du tampon phosphate (0,1M, pH 7,5 ; NaCl 0,412M) à température ambiante, les pièces sont post-fixées pendant 1 heure au tétroxyde d'osmium 1% final dans du tampon de lavage et déshydratées à l'éthanol. La suite du protocole correspond à ce qui a été décrit dans le chapitre 3-3-5-1.

### 3-8 Expérience de co-infection

La spécificité parasitaire de *P. carinii* a également été abordée dans des expériences de co-infection où des animaux sont inoculés simultanément avec des parasites provenant d'hôtes spécifique et non spécifique.

Dans ces expériences, deux lots de souris SCID sont constitués. Dans le premier lot, les souris sont instillées avec  $30 \cdot 10^6$  *P. carinii* de souris suspendus dans 30  $\mu$ l de DMEM. Le second lot est constitué de souris SCID instillées avec un inoculum contenant à la fois  $30 \cdot 10^6$  parasites de souris et  $30 \cdot 10^6$  parasites de rat dans un volume total de 30  $\mu$ l de DMEM. Les animaux sont sacrifiés 40 jours après l'inoculation des parasites. L' extraction au Stomacher et la quantification des parasites ainsi que l'identification des populations parasitaires (rat ou souris) à l'aide de sondes spécifiques sont réalisées (voir chapitre 3-9).

### 3-9 Analyse nucléique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et hybridation

Lors des expériences de cinétique d'infection, d'infection croisée et de co-infection, *P. carinii* a été détecté et caractérisé en fonction du polymorphisme du gène de la TS parasitaire (Mazars *et al.*, 1995). La démarche adoptée a été l'amplification génique par PCR suivie d'un Southern blot (transfert de l'ADN amplifié sur membrane), puis d'une hybridation à l'aide de sondes spécifiques de *P. carinii* de rat, de souris et de lapin (Mazars *et al.*; 1995). Les étapes sont décrites successivement.

#### 3-9-1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN à partir d'homogénats de poumon de rat ou de souris, parasités ou non par *P. carinii*, est réalisée selon le protocole de Maniatis *et al.* (1989). La digestion des cellules est menée en tampon STE en présence de 0,2 mg/ml de protéinase K (Boehringer Mannheim, France) et de 1% de SDS, pendant une nuit à 50°C sous agitation douce. Le SDS est un puissant détergent qui casse les membranes cellulaires et dénature les protéines en les

chargeant négativement. La protéinase K est une protéase aspécifique capable de digérer notamment les endonucléases libérées dans le milieu, susceptibles de dégrader l'ADN.

L'ADN est ensuite purifié par plusieurs cycles de phénol et/ou chloroforme-alcool isoamylique. Chaque cycle comprend une agitation douce de 15 min, pendant laquelle se mélange la phase aqueuse protéique et la phase organique; l'agitation est suivie d'une centrifugation de 10 min à 2900g; le cycle s'achève par le transfert de la phase supérieure aqueuse dans un tube stérile. Ces cycles sont répétés jusqu'à disparition du dépôt blanchâtre protéique visible au niveau de l'interphase organique-aqueuse. Dans ce protocole, le phénol et le chloroforme servent à extraire les protéines. De plus, le chloroforme élimine les traces de phénol de la phase aqueuse.

L'ADN de la phase aqueuse est précipité en présence d'acétate de sodium 0,2M par 2 volumes d'éthanol absolu, à -20°C pendant 12 heures. Le précipité, récolté par centrifugation, est lavé à l'éthanol 70° afin d'éliminer les sels. Séché quelques minutes sous vide, l'ADN est redissous en tampon TE, puis stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

### 3-9-2 Amplification génique par polymérisation en chaîne

La PCR est une méthode d'amplification enzymatique par réaction en chaîne *in vitro* d'un segment d'ADN (Saiki *et al.*, 1985; Mullis et Faloona, 1987). Dans le cas présent, l'ADN amplifié correspond à un fragment d'environ 400 pb du gène de la thymidylate synthétase (TS) de *P. carinii* (Edman *et al.*, 1989b; Mazars *et al.*, 1995).

Les deux amorces utilisées dans ce travail sont les suivantes :

amorce A : 5' - ATTTATGGGTTTCAATGG - 3'

amorce B : 5' - TGCAATATTAAGGGAAC - 3'

Ces oligonucléotides correspondent à des séquences conservées du gène de la TS de *P. carinii* de rat (Edman *et al.*, 1989b) et permettent une amplification spécifique de *P. carinii* de rat, de souris, de lapin et d'homme (Mazars *et al.*, 1995).

Le mélange réactionnel renferme les 2 amorces à une concentration de 1µM chacune, les dNTP (Boehringer Mannheim, France) à une concentration de 200µM chacun, 25mM Tris-HCl à pH8, 60mM KCL, 0,1% de Sérum Albumine Bovine (SAB), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5

unités de Taq polymérase (Boehringer Mannheim, France). La quantité d'ADN introduite, entre 400 et 700 ng, est dissoute dans 20 $\mu$ l de tampon TE. Le volume total aqueux de 50 $\mu$ l est recouvert de 50 $\mu$ l d'huile minérale (Sigma, France) pour éviter l'évaporation.

La technique PCR nécessite de prendre de nombreuses précautions afin d'éviter toute contamination. Parmi les précautions prises : un jeu de "pipetmans" est uniquement réservé à la manipulation pré-PCR, les étapes pré- et post-amplification sont réalisées dans des pièces différentes. De plus pour vérifier l'absence de contamination externe (ADN introduit accidentellement), un contrôle avec tous les réactifs, mais sans ADN, est systématiquement réalisé.

Les variations cycliques de température sont pratiquées avec un thermocycleur automatique (Mini-cycler, Prolabo, France). Le programme comprend 5 min de dénaturation à 94°C, suivi de 36 cycles comprenant chacun une dénaturation à 94°C de 30 sec, un temps d'hybridation de 25 sec à 50°C, et un temps d'extension par la Taq polymérase de 60 sec à 70°C. Le programme se termine par 5 min à 72°C.

Pour visualiser le fragment d'ADN amplifié, une électrophorèse est réalisée dans un gel d'agarose à 1,5%, en tampon TBE (90 mM tris-borate, 2 mM EDTA), contenant 0,5  $\mu$ g/ml de BET, sous voltage constant (100 volts). Ensuite, le gel est exposé brièvement sous UV pour visualiser les produits amplifiés. Nous avons utilisé comme témoin de poids moléculaire le plasmide pBR322 digéré par MspI (pBR322/MspI, Biolabs, France).

### 3-9-3 Hybridation

#### 3-9-3-1 Transfert de l'ADN sur membrane

Suite à l'électrophorèse, le gel d'agarose est placé 10 min sous agitation douce en tampon alcalin (0,5M NaOH, 1,5M NaCl). Cette étape assure la dénaturation de l'ADN qui est ensuite transféré du gel d'agarose sur une membrane selon la méthode de Southern (Southern, 1975). Un flux liquide transversal ascendant créé par capillarité traverse le gel et entraîne les molécules d'ADN qui vont s'adsorber à une membrane (type PVDF, Immobilon P, Millipore, France). Avant le transfert par capillarité, la membrane est humidifiée quelques secondes dans du méthanol puis lavée 5 min en tampon alcalin. Dans notre protocole l'ADN est transféré en tampon alcalin (0,5M NaOH, 1,5M NaCl) pendant au moins 4 heures. On contrôle le bon transfert de l'ADN sur la membrane par l'absence de bandes visibles aux UV

dans le gel. La membrane est lavée puis l'ADN est fixé irréversiblement sur ce filtre par cuisson à 120°C pendant 30 min.

### 3-9-3-2 Préparation des sondes

Dans un premier temps, la sonde sélectionnée est radiomarquée par le phosphore 32 (<sup>32</sup>P) puis l'excès d'isotope radioactif non incorporé est éliminé selon les protocoles suivants.

#### 3-9-3-2-1 Marquage radioactif

Les 3 oligonucléotides sélectionnés comme sondes (Tableau 6) sont marqués à leur extrémité 5' par le <sup>32</sup>P. La T4 polynucléotide kinase (Boehringer Mannheim, France) catalyse le transfert du  $\gamma$ -<sup>32</sup>P de l'ATP (Isotopchim, France) sur l'extrémité 5' hydroxylée de l'oligonucléotide (Berkner et Folk, 1977). La réaction a lieu 30 min à 37°C. Le mélange réactionnel renferme le tampon de l'enzyme, 30  $\mu$ curies de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 10 unités de polynucléotide kinase, 30 pmol de sonde. Le volume est complété à 10  $\mu$ l avec de l'eau stérile.

#### 3-9-3-2-2 Purification de la sonde marquée

La sonde marquée est purifiée par passage sur une colonne Quick Spin G-25 Sephadex (Boehringer Mannheim, France). Cette chromatographie de type gel-filtration permet d'éliminer le ribonucléotide triphosphate radioactif et le ribonucléotide biphosphate. La radioactivité de la sonde est estimée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Beckman).

### 3-9-3-3 L'hybridation

Nous avons utilisé dans ce travail 3 sondes nucléiques spécifiques respectivement de *P. carinii* de rat, de souris ou de lapin (Tableau 6) (Mazars *et al.*, 1995). Ces sondes reconnaissent le fragment amplifié d'environ 400 pb du gène de la TS de *P. carinii*.

L'hybridation et la préhybridation sont réalisées dans un four (Mini hybridisation oven, Appligene). La composition de chacun des tampons utilisés ci-dessous est décrite dans "Molecular Cloning : A Laboratory Manual" (Maniatis *et al.*, 1989).

#### 3-9-3-3-1 La préhybridation

La membrane est placée dans un grand tube en verre dans lequel sont introduits 5 ml



**Tableau 6.** Sondes spécifiques de *P. carinii* de rat, de souris et de lapin et conditions d'hybridation.

| Sondes                  |             | Températures (°C) : |       |             |        |
|-------------------------|-------------|---------------------|-------|-------------|--------|
| séquences               | spécificité | N                   | G + C | hybridation | lavage |
| TCGAATAACCCACCGACCTG    | rat         | 19                  | 53    | 58          | 60     |
| CCATCGAATAGCCACCGACC    | souris      | 20                  | 60    | 60          | 63     |
| GTACCATCGGATGGTCGTCAACG | lapin       | 23                  | 56    | 59          | 62     |

N : nombre de nucléotides ; G + C : pourcentage de guanine et de cytosine dans la séquence.

ou 10 ml de tampon de préhybridation (SSPE 5X, solution de Denhardt 5X, SDS 0,5%, ARN de transfert d'*Escherichia coli* 1mg/ml) suivant la surface de la membrane. Le tube est mis à incuber sous agitation à la même température que celle utilisée pour l'hybridation pendant une à deux heures (Tableau 6). Cette étape assure la saturation des sites de fixation non spécifiques sur la membrane. Ainsi seules les séquences d'ADN transférées sont accessibles à la sonde.

#### 3-9-3-3-2 Conditions d'hybridation

La solution de préhybridation est remplacée par 5 ml de tampon d'hybridation : SSPE 5X, solution de Denhardt 5X, SDS 0,5% et une quantité de sonde radiomarquée équivalente à une activité radioactive d'environ un million de coups par minute. L'hybridation est conduite toute la nuit sous agitation dans le four à la température définie suivant la sonde (Tableau 6). Une fois la solution d'hybridation radioactive retirée, le filtre est lavé en tampon SSC 2X à différentes températures selon l'expérience. Le lavage est réalisé par 2 passages successifs de 1 heure chacun dans des solutions nouvelles de SSC 2X. Les conditions d'hybridation et de lavage déterminent les conditions de stringence de l'hybridation ; en augmentant la température et/ou en diminuant la force ionique (concentration en sels), les conditions de stringence de l'hybridation deviennent plus rigoureuses. Une forte stringence permet de réduire les hybridations non spécifiques.

#### 3-9-3-3-3 Révélation autoradiographique

L'hybridation de la sonde radiomarquée est révélée par autoradiographie. Pour ce faire, la membrane est mise en contact avec un film sensible aux rayonnements radioactifs (films Kodak X OMAT AR) en présence d'écrans pendant quelques heures. Le film est ensuite révélé.

### 3-10 Influence du surfactant sur le développement de *P. carinii in vitro*

L'effet de deux surfactants artificiels, Surfexo<sup>®</sup> (Wellcome, France) ou semi-naturel, Curosurf<sup>®</sup> (Chiesi, Italie) a été évalué sur le développement *in vitro* de *P. carinii* de rat sur cellules L2. La composition de ces deux surfactants est présentée ci-dessous :

**Composition du Surfexo® :**

-Lyophilisat :

- Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) : 108 mg
- Excipients qsp 1 flacon : tyloxapol (détergent non ionique) : 8 mg, alcool cétylique et chlorure de sodium.

- Solvant : eau pour préparations injectables : 8 ml

**Composition du Curosurf® :**

-Principe actif : fraction phospholipidique extraite du poumon de porc et renfermant 1% de protéines hydrophobes de bas poids moléculaire SP-B et SP-C : 120 mg

- Excipient qsp 1 flacon :

- Chlorure de sodium : 13,5 mg
- eau pour préparations injectables : 1,5 ml

Les essais ont été réalisés en plaques de culture 24 puits (Costar, France) selon le protocole décrit dans le chapitre 3-3-2. Des inoculums de  $3 \cdot 10^6$  parasites ont été incubés avec le tapis cellulaire dans du DMEM + 10% SVF, contenant des concentrations variées de Surfexo® (100 à 800mg/l), de tyloxapol (détergent présent dans le Surfexo®) (7 à 60mg/l) ou de Curosurf® (50 à 500mg/l). Après 48 heures d'incubation, les lamelles sont lavées trois fois avec 1ml de PBS Dulbecco à 37°C, colorées au méthanol-Giemsa et montées sur lame à l'aide d'une résine synthétique (Eukitt). Le développement parasitaire a été quantifié et comparé à celui des cultures témoins en absence de surfactant.

**3-11 Exploration de l'implication du Surfactant dans le développement de la pneumocystose**

Deux modèles animaux ont été utilisés pour cette étude : le lapin non immunodéprimé et la souris SCID instillée avec *P. carinii* de souris.

**3-11-1 La pneumocystose spontanée du lapin****3-11-1-1 Obtention du liquide de lavage broncho-alvéolaire**

Pour l'étude cinétique de la pneumocystose spontanée des lapereaux et de la

composition du surfactant pulmonaire, nous avons utilisé 77 lapins hybrides Néozélandais/Californiens (Vasseur, Somme, France), âgés de 1 à 70 jours.

Dès leur arrivés au laboratoire, les lapins sont irréversiblement anesthésiés (pentobarbital sodique, Sanofi, France) et un lavage broncho-alvéolaire (LBA) est pratiqué pour obtenir le surfactant pulmonaire. Après incision dans la région cervicale antérieure, la trachée est dégagée puis canulée à l'aide d'un cathéter (Critikon 20G, Jelco, France). Deux à trois lavages de la totalité du poumon sont réalisés avec 10 à 15 ml de Hanks sans  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$ . Les poumons sont ensuite prélevés pour l'extraction au Stomacher et la quantification des parasites.

Le LBA est rapidement centrifugé 15 min à 1000g et le surnageant est congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour les traitements ultérieurs : dosage des protéines et des phospholipides totaux. Le culot est repris par un volume connu de tampon et une quantification des parasites est alors réalisée. Le nombre total de parasites présents dans les poumons des lapins est donc la somme des parasites présents dans le LBA et dans les poumons (après LBA).

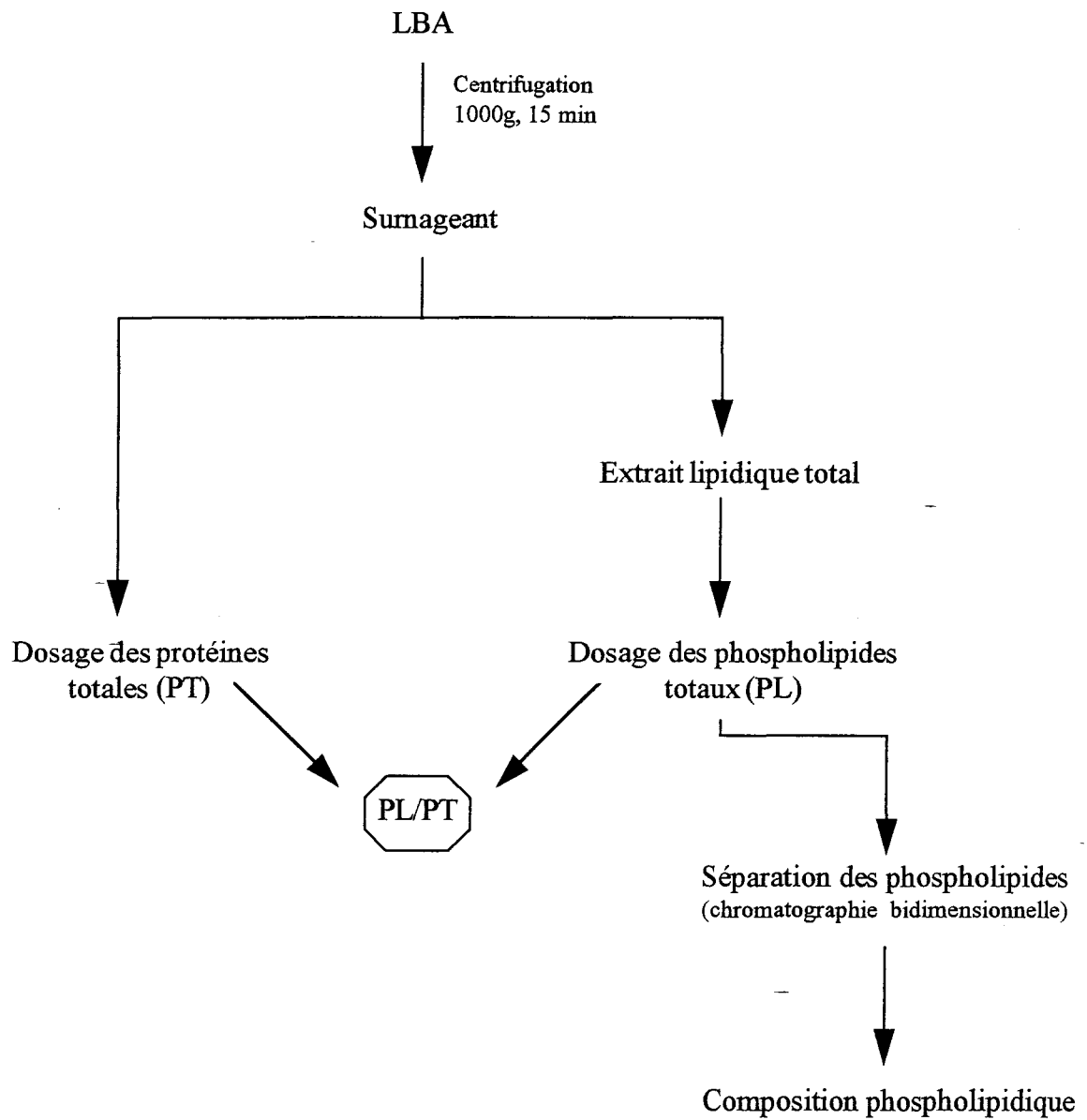
#### 3-11-1-2 Dosage des protéine totales

Le dosage des protéines totales du LBA est réalisé par colorimétrie selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) en présence de SDS. Le résultat est exprimé en mg de protéines pour 100 ml de LBA (Figure 10).

#### 3-11-1-3 Etude quantitative et qualitative des lipides totaux

Les lipides sont extraits du LBA selon la technique de Bligh et Dyer (1959). L'extrait lipidique est mis à sec, puis repris par 1 ml du mélange chloroforme/méthanol, 1/1, volume/volume (V/V). Sur cet extrait, un dosage des phospholipides totaux est effectué : après minéralisation, le phosphore est dosé en présence de 0,1 ml d'acide perchlorique (2h à  $180^{\circ}\text{C}$ ), selon la technique de Böttcher (1961). Le résultat est exprimé en mg de phospholipides pour 100 ml de LBA.

Les différents phospholipides sont également séparés par chromatographie bidimensionnelle ascendante : 300 à 400 nmoles de phospholipides sont déposées sur des plaques HPTLC (0,2x10x10cm, Merk, France). Pour la première dimension, le solvant utilisé est un mélange de chloroforme/méthanol/acide acétique dans la proportion 65/25/10, V/V/V.



**Figure 10 .** Etude biochimique du liquide de lavage broncho-alvéolaire.

Pour la seconde dimension, le solvant est un mélange de chloroforme/méthanol/acide formique (65/25/10, V/V/V). Cette chromatographie bidimensionnelle permet de fractionner les principaux phospholipides : lysoPC, Sph, PC, PI, PS, PE, PG, PA, et CL ; ainsi que des phospholipides moins polaires qui atteignent le haut de la plaque lors des deux migrations. Les phospholipides sont visualisés sous forme de spots par la ninhydrine, l'iode et le réactif de Zinzadze (Böttcher *et al.*, 1961), puis identifiés par comparaison avec des standards individuels purifiés.

Chaque spot présent sur la plaque chromatographique est ensuite gratté et déposé dans des tubes à hémolyse. Après minéralisation, le phosphore de chaque phospholipide est dosé selon la méthode de Böttcher (Figure 10). -

Le rapport phospholipides totaux/protéines totales (PL/PT) est calculé. La concentration en protéines et en lipides du LBA est variable en fonction du volume total recueilli. L'étude du rapport PL/PT a permis d'éliminer ce facteur de dilution et d'évaluer à la fois les phénomènes inflammatoires locaux, grâce au taux de protéines, et l'altération du surfactant par le taux de phospholipides, composants majeurs du surfactant. Chez l'homme, la diminution de ce rapport témoigne d'une pathologie touchant l'alvéole pulmonaire.

### 3-11-2 Cinétique de l'infectivité expérimentale chez la souris SCID

Cette étude a été réalisée avec le modèle SCID pour deux raisons essentielles. D'une part, ces animaux non porteurs latents de *P. carinii* peuvent être infectés par voie nasale et développent une pneumocystose que l'on peut suivre dans le temps. D'autre part, l'administration de corticoïdes, molécules qui influencent la composition du surfactant (Young et Silbajoris, 1991 ; Deterding *et al.*, 1994 ; Kari *et al.*, 1994), n'est pas nécessaire au développement de la pneumocystose expérimentale.

Ainsi, une étude cinétique de l'infection à *P. carinii* de souris chez la souris SCID a été réalisée. Des lots de 3 souris SCID instillées par voie nasale avec  $40 \cdot 10^6$  parasites de souris fraîchement extraits, sont sacrifiés à différents intervalles de temps après l'inoculation (1-60 jours). A chaque temps, les souris sont irréversiblement anesthésiées (pentobarbital sodique, Sanofi, France) et un LBA est pratiqué pour obtenir le surfactant pulmonaire. La trachée est canulée avec un cathéter (Critikon 22 G, Jelco, France). Cinq à 6 lavages de la totalité du

---

poumon sont réalisés avec 0,5 à 0,8 ml de Hanks sans  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$ . Une étude biochimique du surfactant pulmonaire est alors réalisée de la même manière que celle effectuée pour les LBA des lapins (Chapitre : 3-11-1-2 et 3-11-1-3).

## **4- RÉSULTATS**



## 4- RÉSULTATS

Dans un premier temps seront exposées les observations effectuées *in vitro* avec *P. carinii* de rat et de souris, puis les résultats des études sur l'infectivité de *P. carinii in vivo*, pour des hôtes spécifiques et non spécifiques, et enfin, ceux de l'exploration du rôle, sur l'infectivité de *P. carinii*, de différents facteurs liés au micro-environnement alvéolaire, notamment du surfactant.

### 4-1 Comportement *in vitro* d'isolats de *P. carinii* provenant du rat et de la souris

L'étude du comportement *in vitro* d'isolats de *P. carinii* de rat et de souris a consisté à évaluer comparativement l'attachement des parasites aux cellules cultivées, leur développement *in vitro* et le pouvoir infectieux des formes obtenues en culture.

#### 4-1-1 Evaluation de l'attachement - développement de *P. carinii* de rat et de souris

L'évaluation quantitative de l'attachement *in vitro* de *P. carinii* de rat et de souris a été réalisée sur 4 lignées cellulaires correspondant toutes à des cellules épithéliales alvéolaires. L'étude cinétique révèle, pour les 4 lignées cellulaires, une phase rapide d'attachement, d'allure semblable chez *P. carinii* de rat et souris, au moins durant les 8 premières heures d'incubation (Figure 11A et 11B). Puis des différences nettes s'établissent entre les *P. carinii* provenant de ces deux mammifères. Elles seront examinées séparément.

##### 4-1-1-1 *P. carinii* de rat *in vitro*

Après 12 heures de culture, l'attachement de *P. carinii* de rat aux cellules LA4 et WI38VA13 diminue légèrement puis se stabilise (Figure 11A). Par contre, l'attachement de *P. carinii* de rat aux cellules A549 diminue sensiblement et continuellement à partir de la 12<sup>ème</sup> heure. Seules les cellules épithéliales alvéolaires L2, de rat, permettent la poursuite du développement parasitaire. Ainsi, après 96 heures d'incubation, le nombre de parasites attachés est au moins deux fois supérieur à celui observé avec les autres lignées cellulaires (Figure 11 A).

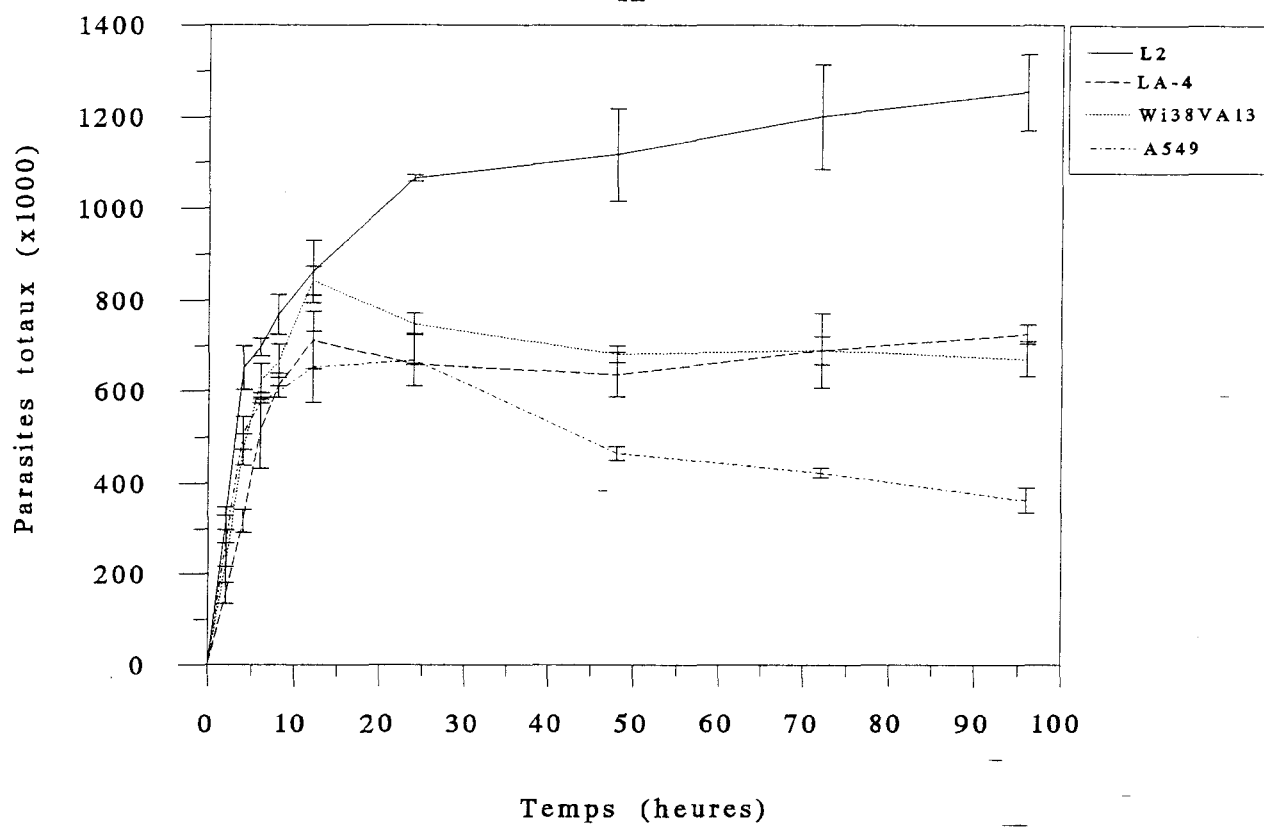
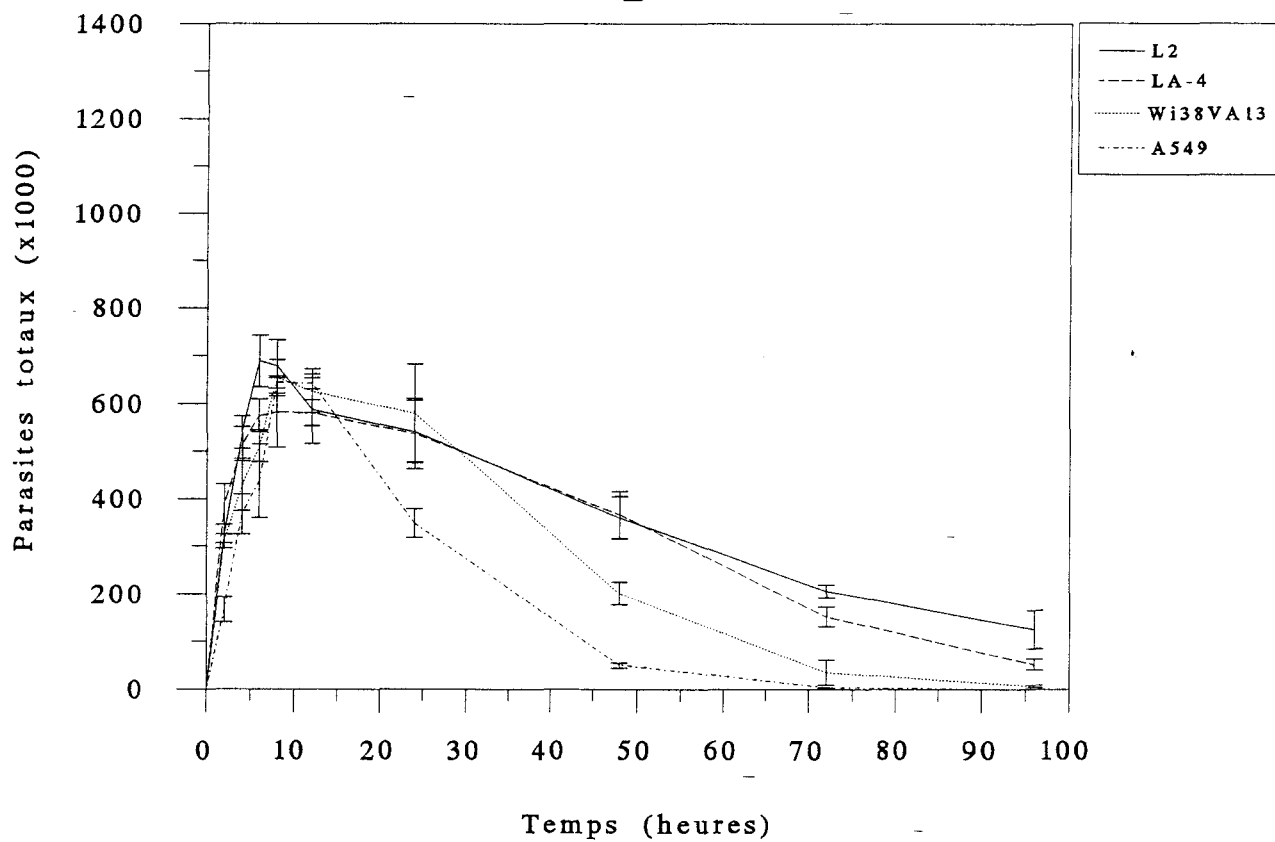
Les préparations colorées au méthanol-Giemsa ont permis de suivre l'évolution de la

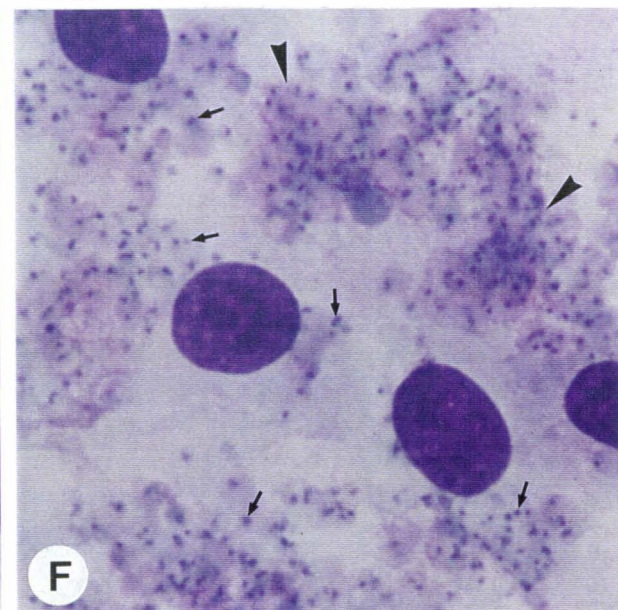
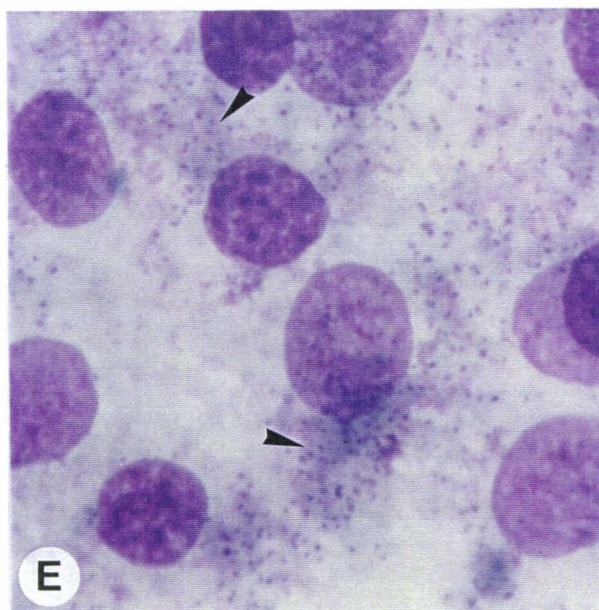
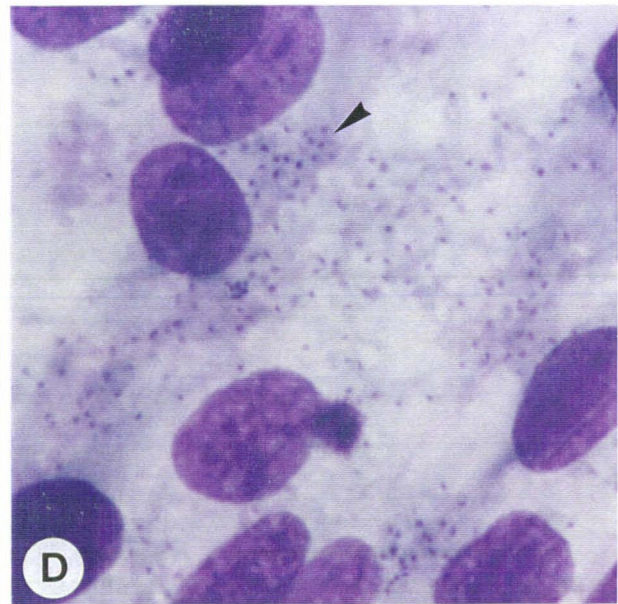
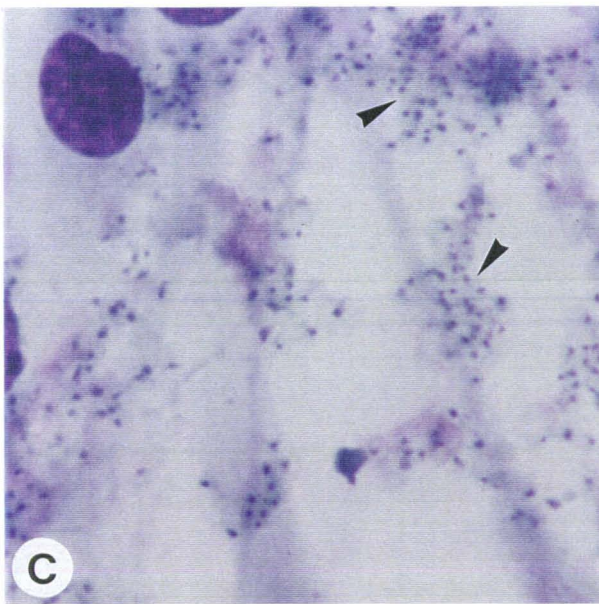
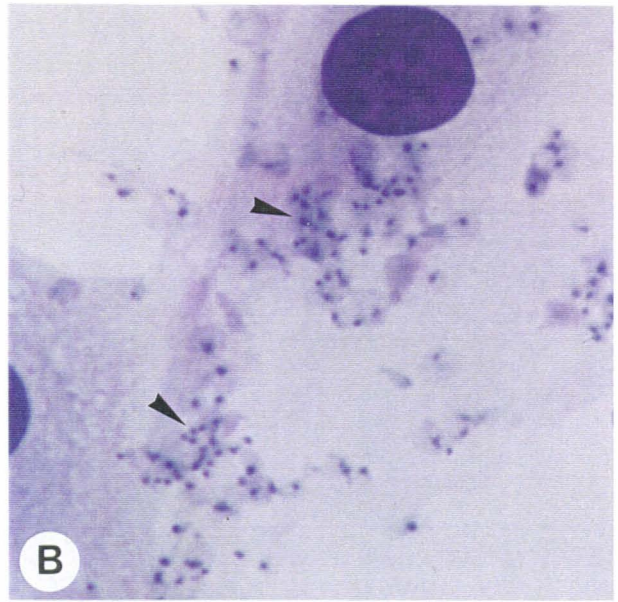
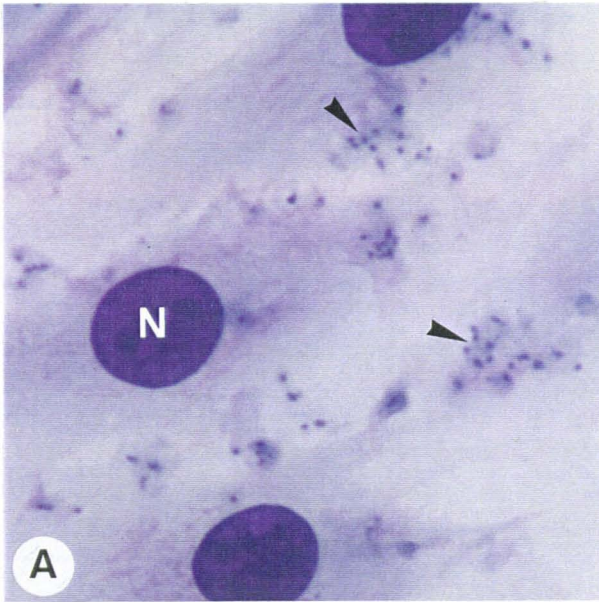
**Figure 11.** Cinétique de l'attachement et du développement de *P. carinii* de rat (A) et de souris (B) *in vitro* sur cellules épithéliales alvéolaires de rat (L2), de souris (LA-4) et de poumon humain, foetal (WI38VA13) ou adulte (A549). Les parasites sont incubés ( $3 \cdot 10^6$  parasites/puit) avec les différents tapis cellulaires durant 2 à 96 heures. La quantification des parasites est réalisée après coloration au méthanol-Giemsa.

**Page ci-contre.**

**Figure 12.** Cinétique de l'attachement et du développement de *P. carinii* de rat cultivé sur cellules L2 (cellules épithéliales alvéolaires de rat). Les préparations sont colorées au méthanol-Giemsa après 4 (A), 12 (B), 24 (C), 48 (D), 72 (E) et 96 heures d'incubation (F). A partir de 48 heures d'incubation, a lieu la formation de nuages parasitaires (pointes de flèches) plus riches en parasites, composés presque exclusivement de trophozoïtes et pouvant contenir jusqu'à 100 à 200 formes. Leurs noyaux présentent des variations dans la taille, la forme et la texture, suggérant une activité mitotique (F, flèches). Coloration : méthanol-Giemsa; N : noyau d'une cellule L2; grossissement : x 1100.

**Page suivante.**

**A****B**



culture. Entre la 2<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> heure d'incubation, les parasites attachés aux cellules L2 sont isolés ou forment de petits groupes contenant moins d'une quinzaine de parasites (Figures 12A-C). A partir de 48 heures d'incubation, a lieu la formation d'amas de parasites composés presque exclusivement de trophozoïtes et pouvant contenir de 100 à 200 formes. Leurs noyaux présentent des variations en taille, forme et texture, suggérant une activité mitotique (Figure 12D-F).

#### 4-1-1-2 *P. carinii* de souris *in vitro*

Lorsque *P. carinii* de souris est mis en présence des cellules L2, LA-4, WI38VA13 et A549, une diminution importante du nombre de parasites attachés est constatée après 8 heures d'incubation (Figure 11B). Leur nombre devient pratiquement nul après 72 heures d'incubation et aucun développement n'est observé dans le surnageant.

#### 4-1-2 Mise en évidence de la fibronectine dans la matrice extracellulaire des cellules cultivées

Les cellules L2 présentent à leur surface une matrice très riche en fibronectine (Fn) détectée ici par immunofluorescence directe. Les cellules LA-4 et WI38VA13 sont recouvertes d'une matrice plus pauvre en Fn ; pour les cellules A549, la Fn n'est que peu ou pas présente et le marquage est intracytoplasmique (Figure 13).

#### 4-1-3 Analyse de l'attachement de *P. carinii* en microscopie électronique à transmission et à balayage

##### 4-1-3-1 *In vivo*

Dans les poumons de rat ou souris parasités, l'attachement de *P. carinii* a été observé seulement au niveau des cellules épithéliales alvéolaires de type I (Figure 14). Les trophozoïtes sont les formes les plus fréquemment attachées. Ils tapissent l'épithélium, parfois sur tout le contour de l'alvéole (Figure 14A). Pour les trophozoïtes de petite taille, pauvres en filopodes, la surface de contact avec les pneumocytes de type I est nette et régulière. L'attachement des formes végétatives de grande taille se révèle plus complexe. En effet, la surface de contact présente des replis marqués de la membrane, ainsi que des prolongements filopodiaux qui ancrent le parasite à l'épithélium (Figure 14B). De plus, des vésicules de pinocytose sont

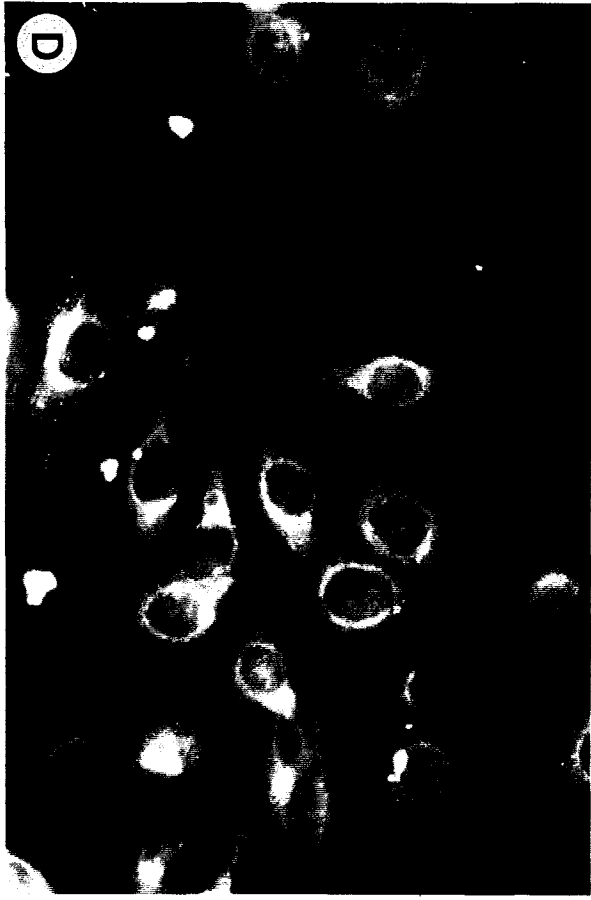
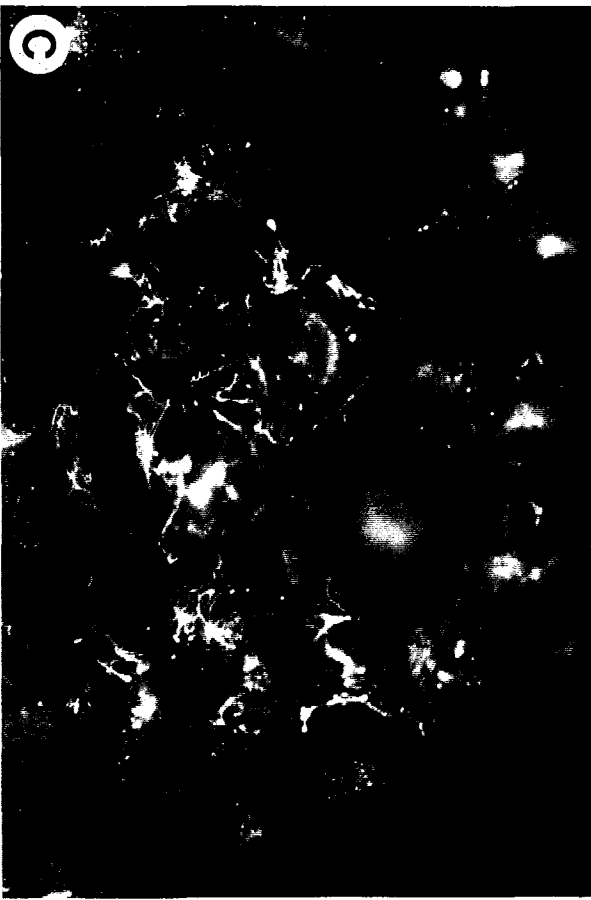
**Figure 13.** Production de fibronectine à la surface de cellules épithéliales alvéolaires L2 (A), LA4 (B), WI38VA13 (C) et A549 (D). La fibronectine a été mise en évidence avec un anticorps spécifique marqué à la fluorescéine. La lignée cellulaire L2 est celle qui présente la matrice extracellulaire la plus riche en fibronectine. Grossissement: x 500.

**Page ci-contre.**

**Figure 14.** Attachement de *P. carinii* de souris (A) et de rat (B) *in vivo*. Microscopie électronique à transmission. A: de nombreux trophozoïtes riches en prolongements filopodiaux (pointes de flèche), tapissant l'alvéole pulmonaire. B: Trophozoïtes attachés à des pneumocytes de type I. Filopodes (pointes de flèche) dont quelques uns (grandes flèches) s'enfoncent dans le cytoplasme des pneumocytes de type I. Des vésicules de pinocytose sont visibles dans le cytoplasme de ces dernières cellules (petites flèches). A: alvéole; N: noyau; mi: mitochondrie; P1: pneumocyte de type I; T: trophozoïte. Barre = 1  $\mu$ m.

**Page suivante.**









souvent présentes dans le cytoplasme du pneumocyte de type I au niveau de la zone d'attachement.

#### 4-1-3-2 *In vitro*

Aucune différence ultrastructurale de l'attachement des parasites, en fonction de la lignée cellulaire, n'a été observée. A partir de 24 heures d'incubation de *P. carinii* de rat, des projections filopodiales élargies distalement s'ancrent, plus ou moins profondément, dans les cellules en culture (Figure 15). Aucune fusion des membranes parasitaires et cellulaires n'a été observée. Au niveau de la zone de contact, on remarque l'absence de vésicules de pinocytose et de zones denses aux électrons autant chez la cellule cible que chez le parasite. Dans les premières 24 heures d'incubation, aucun développement filopodial n'a été observé, mais les trophozoïtes sont déjà attachés aux cellules et la surface de contact apparaît linéaire sur les coupes. Le cytoplasme de la cellule cible émet des prolongements, qui entourent en partie les trophozoïtes attachés (Figure 15C). Toutefois, contrairement à *P. carinii* de rat, aucun développement filopodial n'a été observé chez *P. carinii* de souris.

La MEB a permis d'apprécier la disposition spatiale des parasites mis en culture et d'étudier ainsi, sous un autre aspect, les relations parasite-parasite et parasite-cellule cible. Ces observations ont également permis d'évaluer la richesse ou la pauvreté des prolongements filopodiaux à la surface de *Pneumocystis*; l'activité filopodiale semble être corrélée avec la vitalité des parasites.

Lors de la phase exponentielle de croissance, les trophozoïtes de *P. carinii* de rat, cultivés sur des cellules épithéliales L2, prolifèrent dans les trois dimensions de l'espace en formant de véritables nuages parasitaires dont la taille augmente au cours de la culture (Figure 16A-D). A plus fort grossissement, de nombreux filopodes sont visible à la surface luminale des trophozoïtes. Ils sont souvent courts et fins, mais des filopodes plus longs et épais sont également présents (Figure 17A et 17B). La présence de prolongements cytoplasmiques émis par les cellules cibles, orientés vers les trophozoïtes et interagissant avec eux est couramment observée. Ces prolongements sont parfois volumineux (Figure 17C).

Ces observations en MET et en MEB témoignent du rôle actif des parasites, mais aussi

**Figure 15.** Attachement de *P. carinii* de rat *in vitro* sur des cellules épithéliales alvéolaires L2 (A), A549 (B) et WI38VA13 (C). Microscopie électronique à transmission. Les zones d'attachement (pointes de flèche) sont bien visibles. En C, on peut observer un long filopode pénétrant profondément la cellule (pointe de flèche). Des filopodes coupés transversalement et enfoncés dans le cytoplasme des cellules cibles sont indiqués (petites flèches). On peut remarquer la présence d'excroissances sur la surface des cellules cibles dans les zones de contact avec les parasites (par exemple en C, grande flèche). CE: cellule épithéliale; T: trophozoïte. Barre = 0.5 $\mu$ m

**Page ci-contre.**

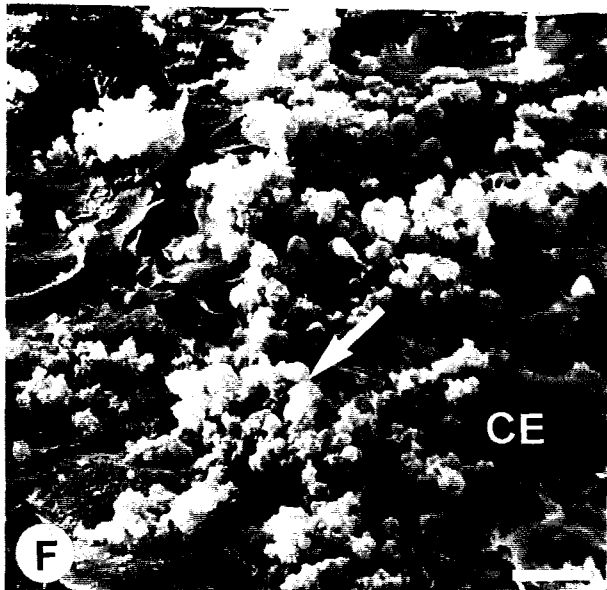
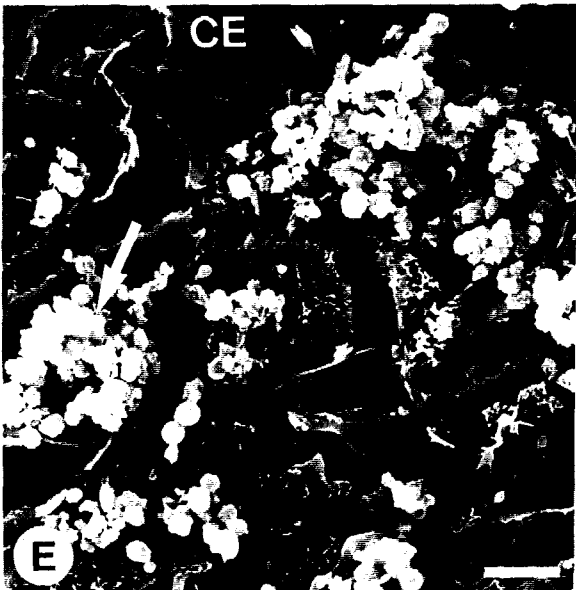
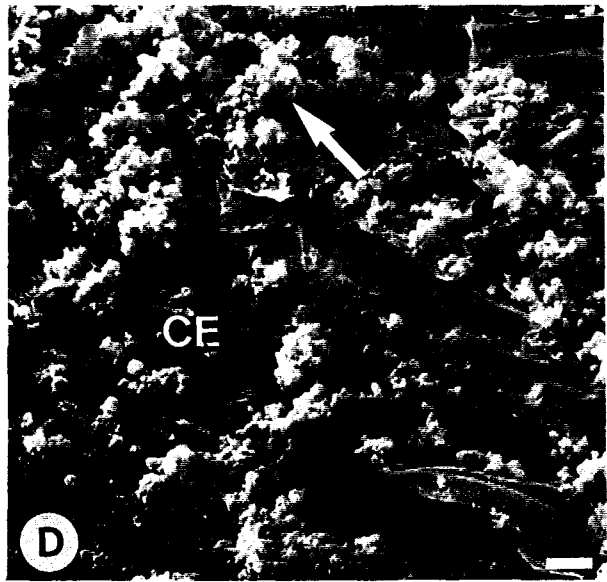
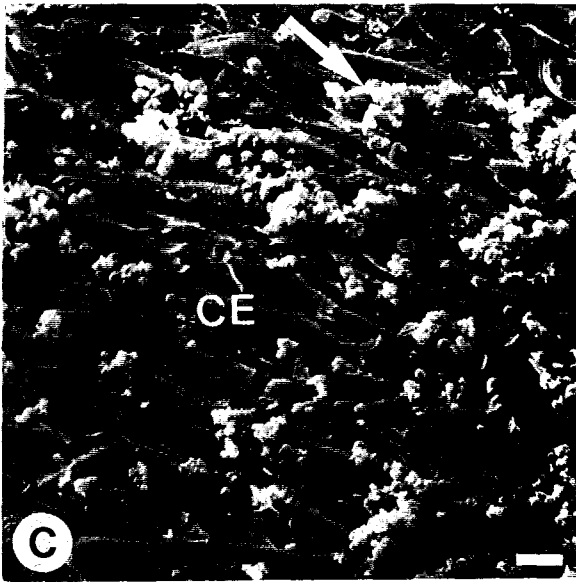
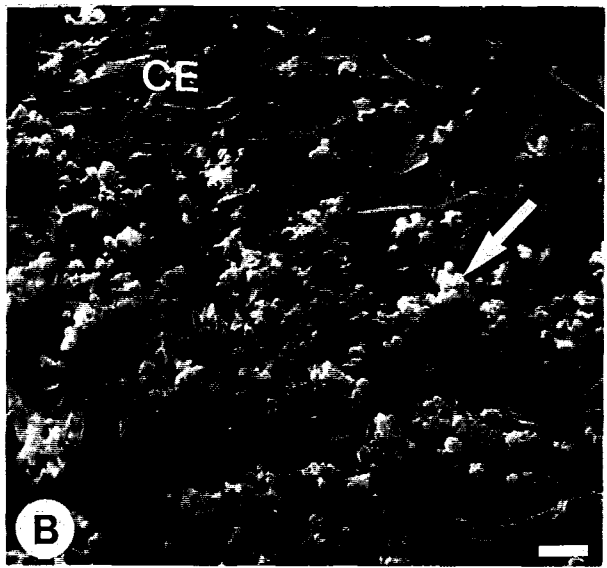
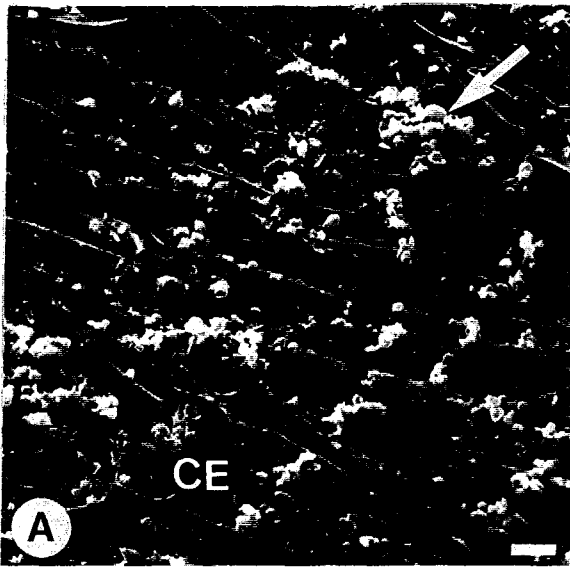
**Figure 16.** Cinétique d'attachement et développement de *P. carinii* de rat *in vitro* sur des cellules épithéliales alvéolaires L2 après 24 (A), 48 (B et E), 72 (C) et 96 heures (D et F) d'incubation. Microscopie électronique à balayage. Les trophozoïtes prolifèrent en formant des nuages parasitaires (flèches) de plus en plus importantes en fonction du temps d'incubation. Les figures E et F montrent des nuages parasitaires à plus fort grossissement. CE : cellule épithéliale. Angle d'observation: 60°. Barre = 10 $\mu$ m

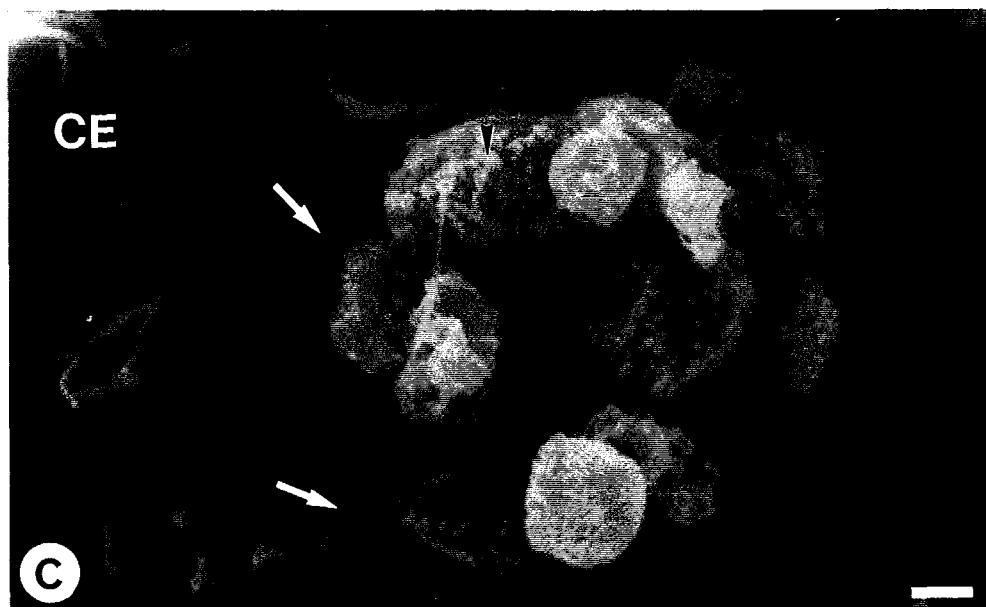
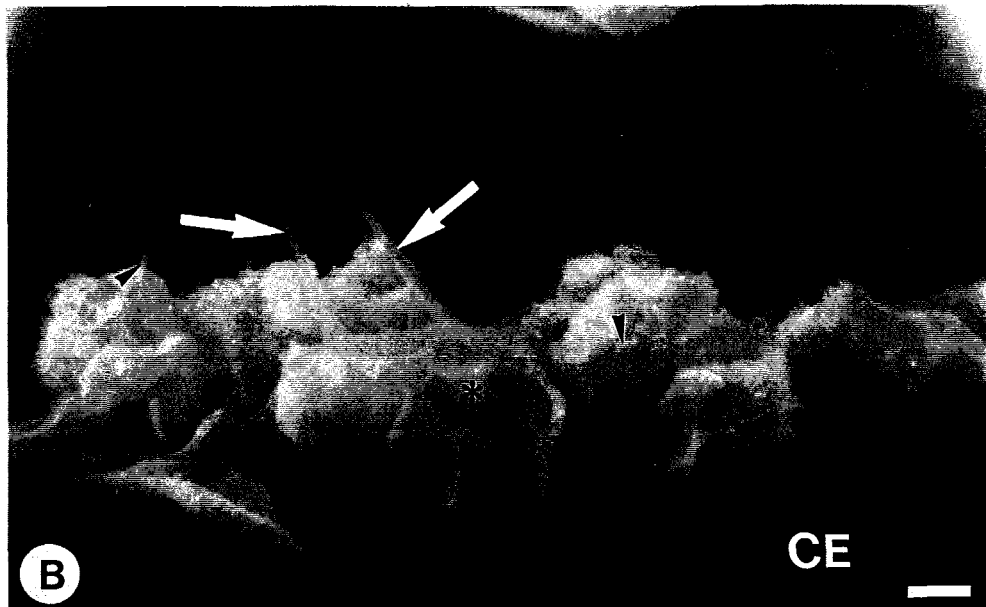
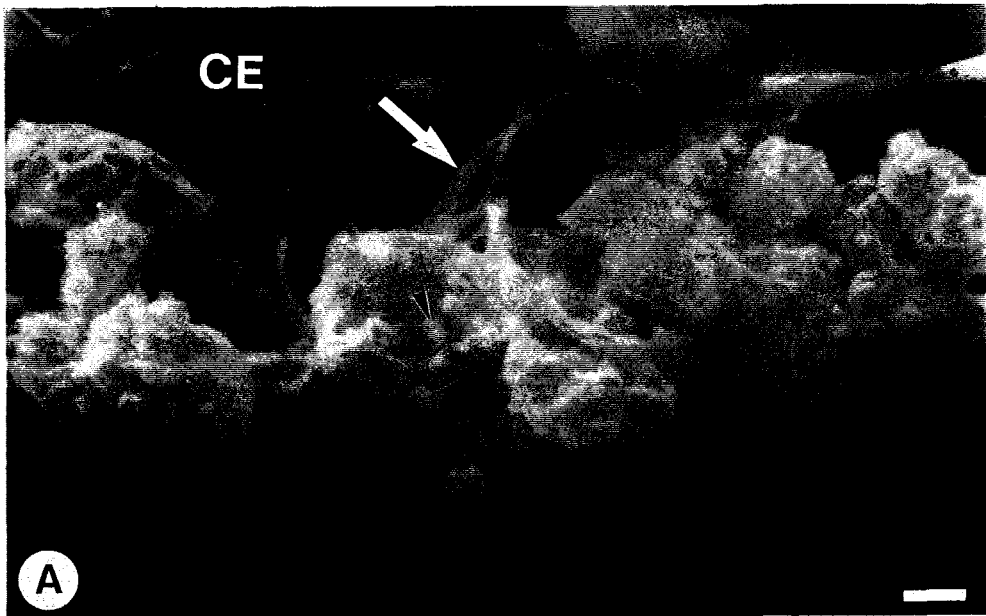
**Page suivante.**

**Figure 17.** Attachement et développement de *P. carinii* de rat *in vitro* sur des cellules épithéliales alvéolaires L2 après 24 (A et B) et 48 heures (C) d'incubation. Microscopie électronique à balayage. A : Nuage de parasites attachés aux cellules L2 montrant des longs filopodes (flèche) dans la surface luminale des trophozoïtes et des filopodes de plus petite taille (pointes de flèche) plus nombreux. B : de longs (flèches) et de courts (pointes de flèche) filopodes présent à la surface des parasites; l'astérisque indique un kyste apparemment vide; C : groupe de trophozoïtes. Les flèches indiquent ici des longs prolongements cytoplasmiques émis par les cellules L2. Les trophozoïtes sont riches en filopodes courts (pointes de flèche). CE : cellule épithéliale. Angle d'observation: 60°. Barre = 1 $\mu$ m

**Page suivante de la Figure 16.**







des cellules cibles lorsqu'elles sont confrontées *in vitro* avec *P. carinii*.

#### 4-1-4 Développement *in vitro* de *P. carinii* de rat

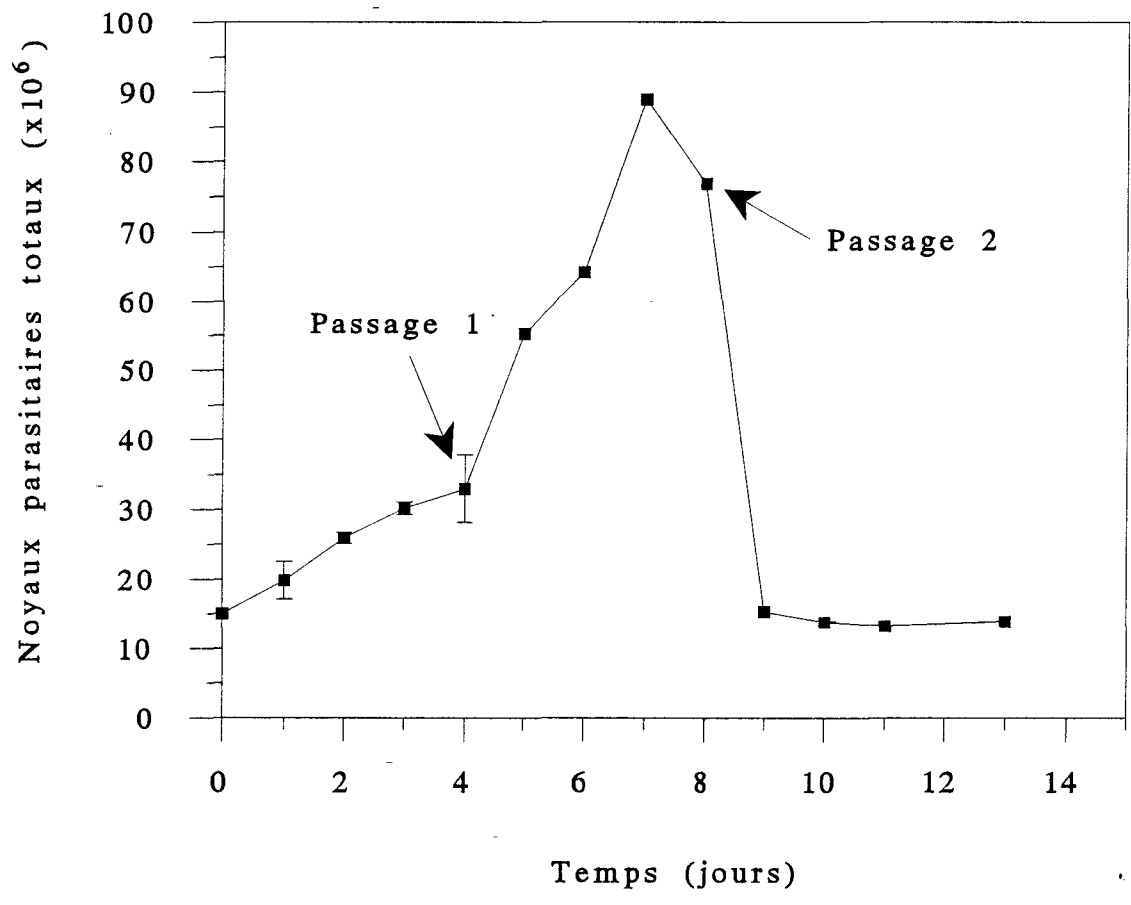
Les études exposées précédemment ont permis de sélectionner une lignée cellulaire, la lignée L2, pour la culture de *P. carinii*. Elles ont montré que les parasites provenant du rat développent une croissance significative sur cette lignée cellulaire. Par conséquent, le système *P. carinii* de rat - cellules L2 a été utilisé pour mener des études plus approfondies sur le parasite *in vitro*. La compréhension de l'évolution des parasites de rat *in vitro* devrait faciliter l'adaptation à la culture de souches de *P. carinii* provenant d'autres mammifères. Car le système de culture utilisé dans ce travail possède un intérêt évident dans l'évaluation comparative de l'attachement, de la croissance et d'autres propriétés biologiques d'isolats de *P. carinii* d'origine humaine ou animale.

##### 4-1-4-1 Croissance

La quantification des parasites en culture a été réalisée sur les préparations colorées au méthanol-Giemsa. Pour apprécier la croissance de *P. carinii*, nous avons choisi de compter le nombre total de noyaux parasitaires. Le BTO, souvent utilisé comme complément au Giemsa dans le calcul du nombre total de parasites, n'a pas été employé dans cette étude car les kystes vides, dont la proportion n'est pas négligeable, prennent également le colorant. Par conséquent, l'utilisation du BTO dans ce cas précis, entraînerait une sur-estimation du nombre total de parasites. De plus, le méthanol-Giemsa permet d'identifier tous les stades parasitaires pulmonaires de *P. carinii* (Dei-Cas *et al.*, 1990; Soulez *et al.*, 1991) et, ainsi d'étudier leur évolution en culture.

La cinétique du développement de *P. carinii* de rat cultivé sur cellules épithéliales alvéolaires L2 est présenté sur la Figure 18. Une croissance significative est observée avant le premier passage (jour 4). Mais le développement le plus marqué a lieu entre le 4<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour de culture. En général, le nombre de parasites augmente d'environ 6 fois. Après le deuxième passage (jour 8), le nombre de parasites diminue rapidement et aucune reprise du développement parasitaire n'est observée.

**Figure 18.** Développement *in vitro* de *P. carinii* de rat sur lignée cellulaire L2. Cultures en boîte de 25cm<sup>2</sup> dans du DMEM (+10% SVF), air + 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Chaque point correspond aux résultats de 3 boîtes de culture. Les passages 1 et 2 consistent à trypsiner les cellules avec les parasites attachés et à repiquer l'ensemble au 1/3 dans du milieu neuf.





#### 4-1-4-2 Intégrité morphologique

En microscopie photonique ou électronique à transmission, *P. carinii* de rat cultivé *in vitro* sur cellules L2 montre la même morphologie et la même ultrastructure que lorsqu'il est observé dans le poumon de l'hôte (Figures 19 et 20). De plus, ce système de culture à un repiquage permet d'obtenir des suspensions parasitaires pratiquement dépourvues de débris cellulaires de l'hôte.

#### 4-1-4-3 Pouvoir infectieux

L'infectivité de *P. carinii* de rat obtenu dans la culture a été testée et comparée avec celle des parasites de rat fraîchement extraits. Le pouvoir infectieux des parasites a été évalué par inoculation trachéale chez le rat nude homozygote immunodéprimé par la dexaméthasone. Ce modèle est décrit en détail dans le sous-chapitre 4-2-2.

Les résultats révèlent que les formes de *P. carinii* obtenues en culture ont été environ 2 à 6 fois plus infectantes pour le rat athymique que les parasites de rat inoculés immédiatement après extraction (Tableau 7). La différence est plus marquée quand les rats nude utilisés comme hôtes expérimentaux ne reçoivent pas de dexaméthasone avant d'être inoculés (Tableau 7). Ceci s'explique par le fait que l'administration de corticoïdes, permet d'obtenir des taux de parasitisme plus élevés chez les animaux inoculés avec des parasites fraîchement extraits (voir sous-chapitre 4-2-2).

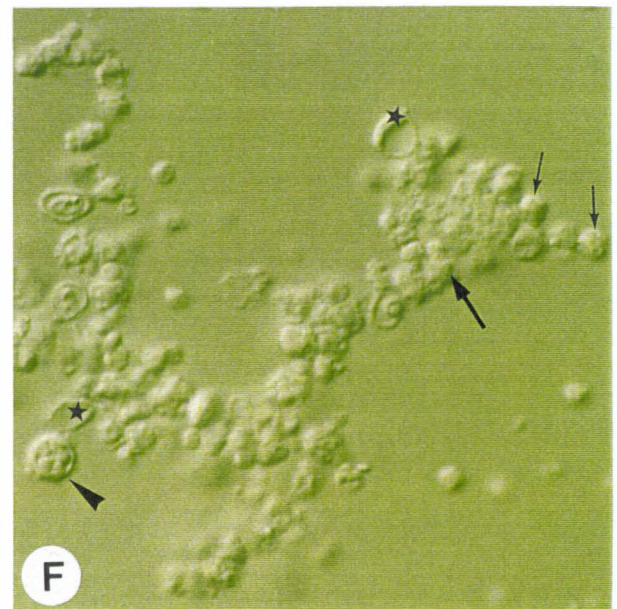
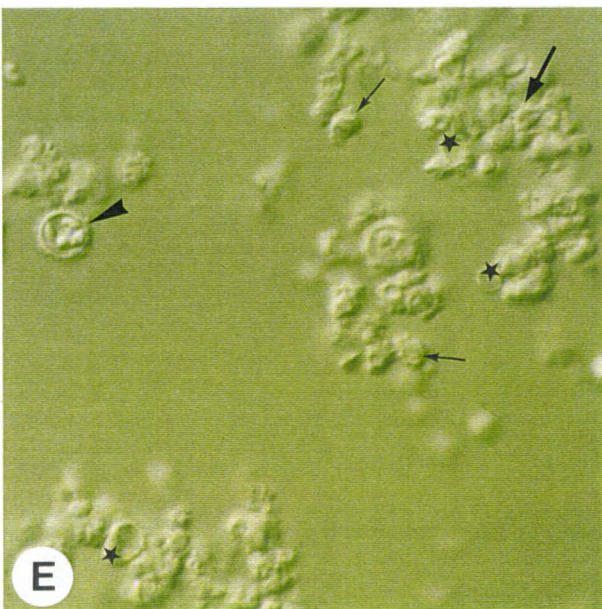
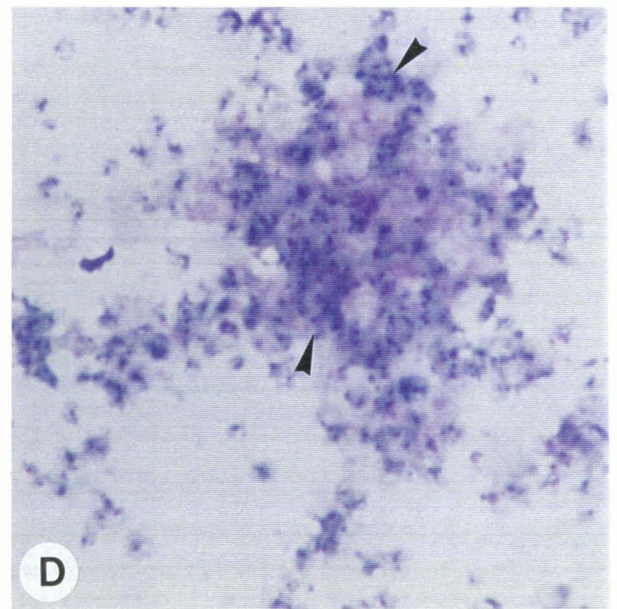
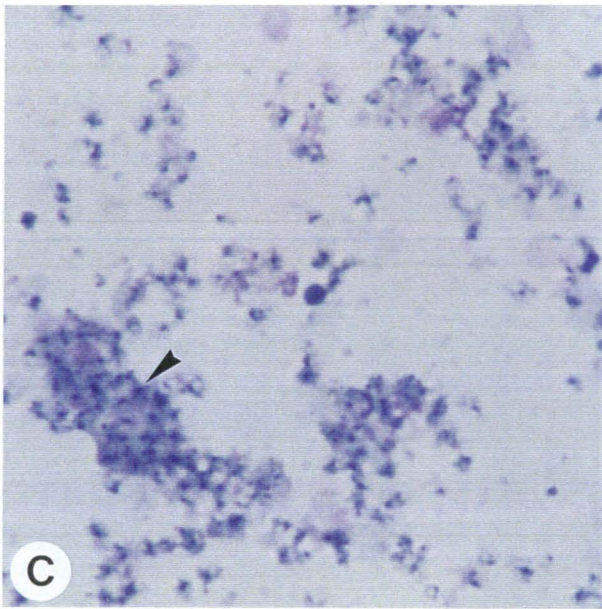
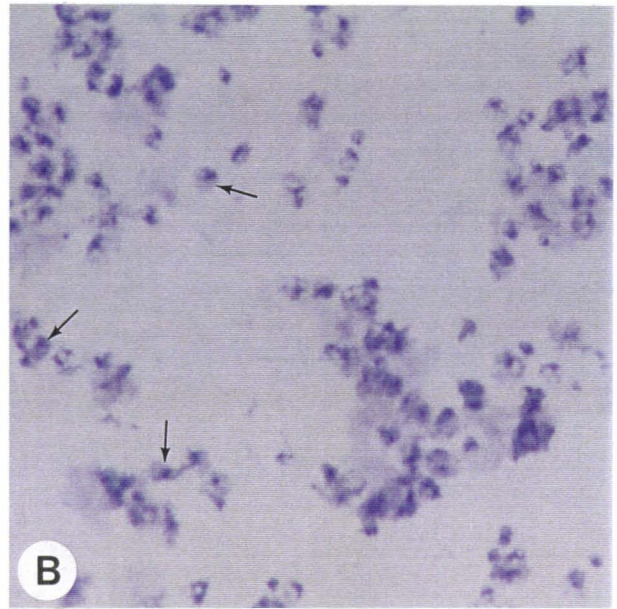
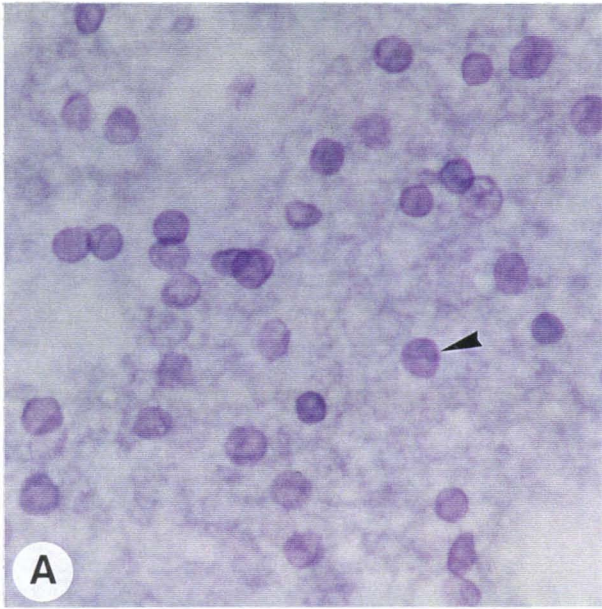
Ce système de culture (avec un seul passage) est utilisé dans notre laboratoire depuis presque deux ans pour produire des parasites viables, purs et infectieux. Il est pratiqué dans des boîtes de 75cm<sup>2</sup> lorsqu'on souhaite obtenir des quantités importantes de parasites (Figure 9).

**Figure 19.** Cultures de *P. carinii* de rat sur lignée cellulaire L2 après 7 jours d'incubation (repiquage au 4ème jour) développées dans les conditions indiquées dans la Figure 18. Au 7ème jour les parasites ont été détachés du tapis cellulaire pour être ensuite observés. On peut apprécier l'absence de débris cellulaires. **A** : formes prékystiques et kystiques (pointe de flèche) colorées au bleu de toluidine O; **B**, **C** et **D** : trophozoïtes (petites flèches) parfois formant des nuages parasitaires volumineux (pointes de flèche). Coloration : méthanol-Giemsa; **E** et **F**: formes végétatives (petites flèches), prékystiques et kystiques (pointes de flèche). Les grandes flèches montrent des nuages parasitaires. Kystes vides (étoiles). Microscopie interférentielle. Grossissement : x 1100.

**Page ci-contre.**

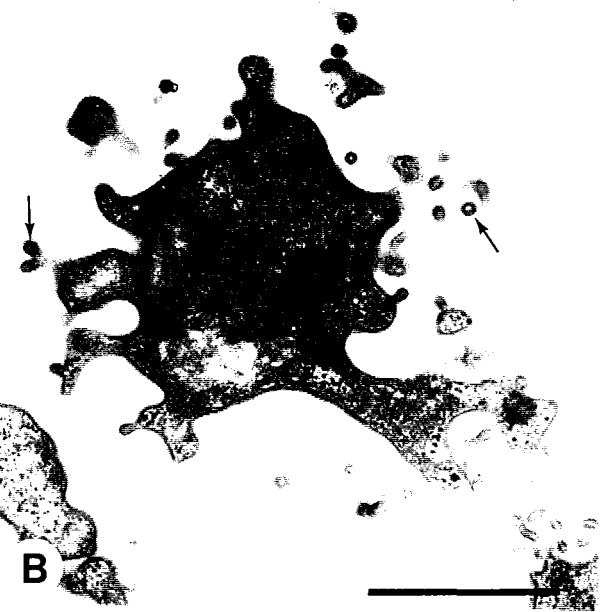
**Figure 20.** Cultures de *P. carinii* de rat sur lignée cellulaire L2 après 7 jours d'incubation (repiquage au 4ème jour) développées dans les conditions indiquées dans la Figure 18. Au 7ème jour les parasites ont été détachés du tapis cellulaire pour être ensuite observés. Microscopie électronique à transmission. On peut apprécier l'intégrité ultrastructurale des parasites obtenus dans la culture. **A** : prékyste intermédiaire ; **B** : trophozoïte ; **C** et **D**: nuages de trophozoïtes riches en filopodes. Filopodes (flèches). **N** : noyau ; **Nu** : nucléole. Barre = 1µm.

**Page suivante.**

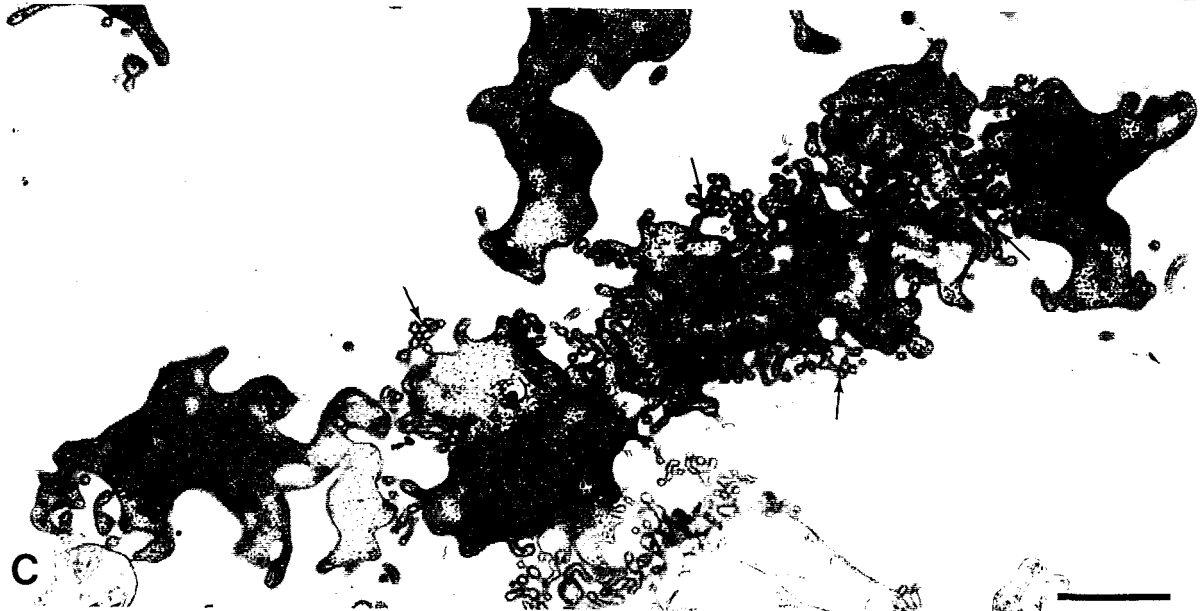




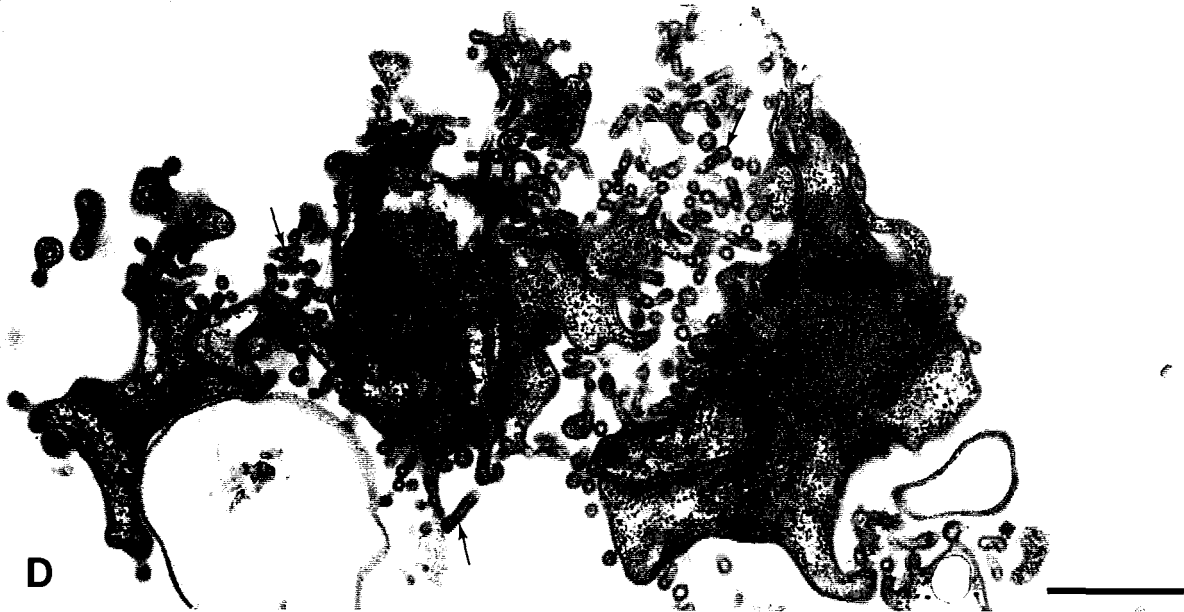
A



B



C



D



**Tableau 7.** Pneumocystose chez des rats nude inoculés avec *P. carinii* de rat cultivé sur cellules L2 épithéliales alvéolaires.

| Inoculum  | Jours a.i. <sup>1</sup> | Parasites totaux<br>(x 10 <sup>6</sup> ) <sup>2</sup> | Rats infectés/total |
|---|-------------------------|---|---------------------|
| <b>Dexaméthasone (1mg/l) à partir de l'inoculation</b>                          |                         |   |                     |
| <i>P. carinii</i><br>pulmonaire <sup>3</sup>                                    | 40                      | 160 ± 4   | 3/3                 |
| <i>P. carinii</i> de<br>culture <sup>4</sup>                                    | 40                      | 1160 ± 130  | 3/3                 |
| <b>Dexaméthasone (1mg/l) commencée 15 jours avant l'inoculation<sup>5</sup></b> |                         |   |                     |
| <i>P. carinii</i><br>pulmonaire   | 40                      | 704 ± 168   | 3/3                 |
| <i>P. carinii</i> de culture  | 40                      | 1080 ± 250  | 3/3                 |

<sup>1</sup> Nombre de jours après l'inoculation (a.i.) trachéale des parasites.

<sup>2</sup> Nombre total de parasites (x 10<sup>6</sup>) par animal.

<sup>3</sup> Parasites fraîchement extraits des poumons de rats infectés

<sup>4</sup> Parasites cultivés pendant 7 jours sur cellules L2 épithéliales alvéolaires de rat.

<sup>5</sup> L'administration de dexaméthasone commence 15 jours avant l'inoculation des parasites et est poursuivie jusqu'au 40<sup>ème</sup> jour.

## 4-2 Comportement *in vivo* d'isolats de *P. carinii* provenant de souris et de rat

L'étude comparative du comportement *in vivo* d'isolats de *P. carinii* de rat et de souris a consisté à apprécier l'évolution du parasite lors d'infections expérimentales obtenues par voie nasale ou trachéale chez des hôtes non porteurs latents de *P. carinii*. Ces recherches ont nécessité l'établissement de deux modèles de pneumocystose par inoculation : la souris SCID et le rat nude homozygote. Ces mises au point ont précédé les études sur la spécificité parasitaire, développées lors d'infections croisées et qui seront analysées dans le chapitre 4-2-3.

### 4-2-1 Instillation nasale de la souris SCID avec *P. carinii*

#### 4-2-1-1 Etablissement du modèle

Lorsque des souris SCID non anesthésiées sont inoculées par voie nasale avec un inoculum parasitaire coloré au bleu trypan, l'inoculum est retrouvée dans l'estomac de l'animal. A l'inverse, lorsque les souris SCID sont anesthésiées, l'inoculum coloré au bleu trypan parvient aux poumons (Figures 21B et 21C). Sur le plan quantitatif, quand les souris SCID sont anesthésiées, instillées avec environ  $40 \cdot 10^6$  parasites et sacrifiées 10 à 15 min après l'inoculation, l'inoculum ( $45 \cdot 10^6 \pm 6,7 \cdot 10^6$  parasites;  $n=3$ ) est retrouvé dans les poumons. Ainsi, l'anesthésie, en inhibant le reflexe de déglutition, permet à l'inoculum d'atteindre l'organe cible (Figure 21B).

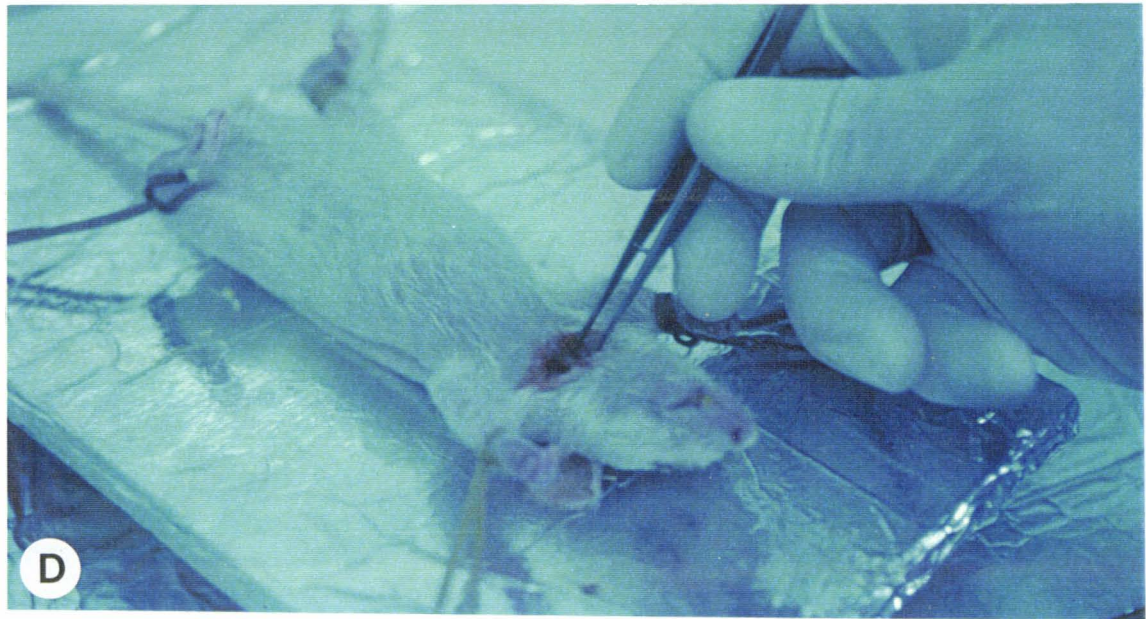
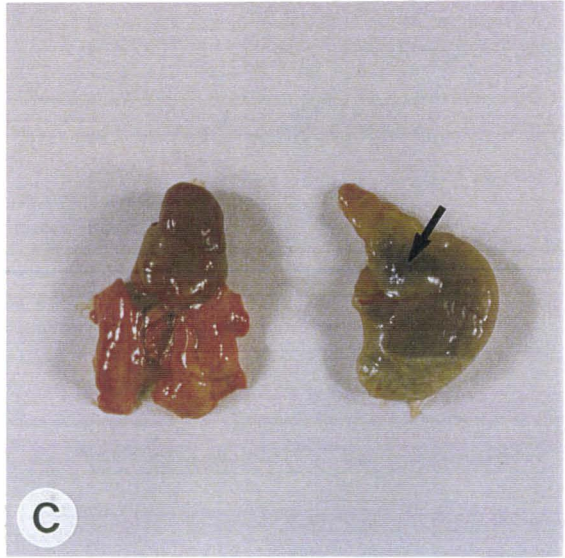
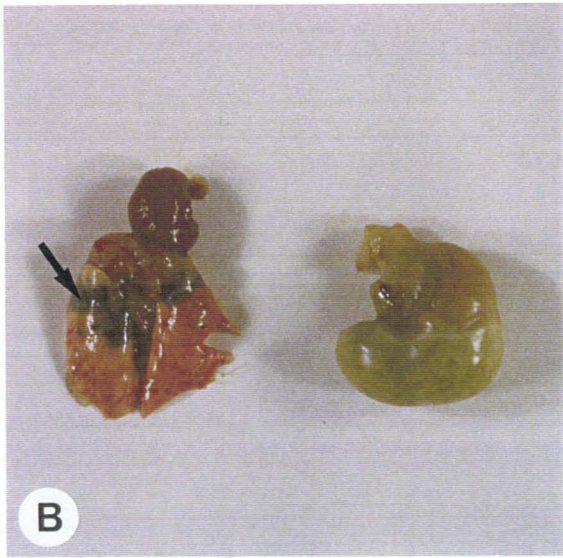
#### 4-2-1-2 Cinétique de l'infection

La cinétique de l'infection expérimentale avec *P. carinii* de souris chez la souris SCID, présente 4 phases principales nommées A, B, C et D sur la Figure 22. Pendant les 3 premiers jours suivant l'inoculation (phase A), le nombre de parasites diminue rapidement pour descendre en dessous du seuil de détection de notre méthode d'extraction-quantification (estimé à 500 kystes/ml ou  $10^4$  parasites totaux/ml). *P. carinii* reste encore indétectable jusqu'au huitième jour après l'inoculation (phase B). C'est à partir du huitième jour, que la pneumocystose s'installe (phase C). En effet, le nombre de parasites augmente sensiblement jusqu'au 22<sup>ème</sup> jour. Enfin, la biomasse parasitaire s'accroît très rapidement jusqu'au 60ème jour (phase D).

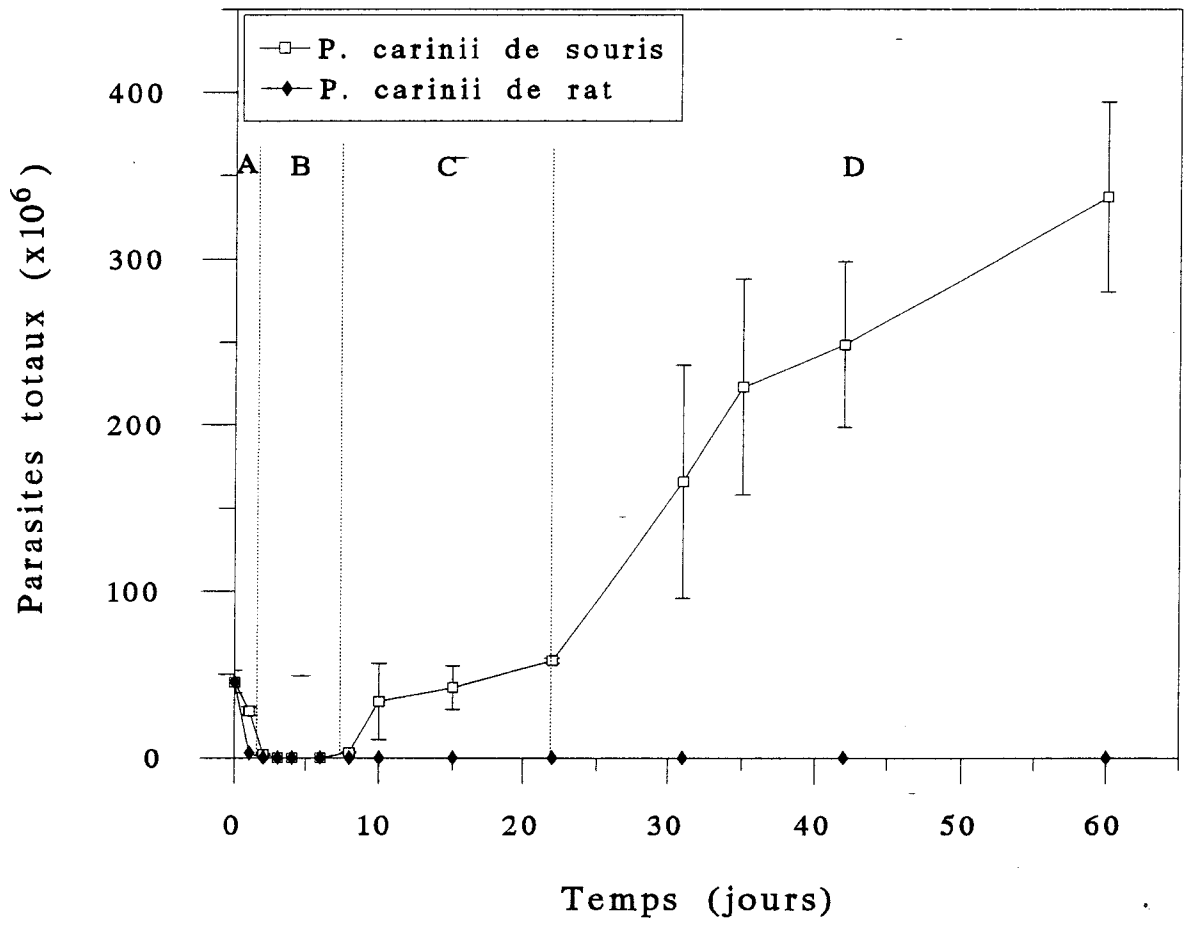
Ce modèle est utilisé depuis plusieurs années au laboratoire et permet d'obtenir des

**Figure 21.** Modèles de pneumocystose par inoculation nasale (souris SCID, **A**) ou trachéale (rat nude, **D**). **A** : instillation nasale d'une suspension parasitaire ; **B** : poumon (à gauche) et estomac (à droite) d'une souris SCID anesthésiée et inoculée par voie nasale avec un inoculum marqué au bleu trypan. L'inoculum est visible uniquement dans le poumon (flèche) ; **C** : poumon (à gauche) et estomac (à droite) d'une souris SCID non anesthésiée et inoculée par voie nasale avec un inoculum marqué au bleu trypan. L'inoculum est visible uniquement dans l'estomac (flèche) ; **D** : inoculation trachéale du rat nude. La figure montre la trachée dénudée.  
**Page ci-contre.**

**Figure 22.** Cinétique de l'infection par *P. carinii* de souris ou de rat inoculé par voie nasale chez la souris SCID. Seuls les parasites de souris se développent. Quatre phases (A, B, C et D) sont distinguées dans la cinétique (voir chapitre 4-2-1-2 des 'Résultats').  
**Page suivante.**







infections intenses et reproductibles.

#### 4-2-1-3 Etude ultrastructurale de la phase A

Afin de comprendre la décroissance rapide des parasites durant la phase A, une étude en MET a été réalisée (Figure 23). Une activité phagocytaire intense vis-à-vis de *P. carinii* de souris, inoculés par voie nasale chez la souris SCID, est alors observée (Figure 23B et 23D). Des parasites de tous les stades de *P. carinii* (trophozoïtes, prékystes et kystes matures) sont activement phagocytés par des macrophages alvéolaires et par des granulocytes neutrophiles (Figure 23B). Ces dernières cellules, les plus nombreuses dans les coupes, montrent un cytoplasme dense avec de rares granulations typiques.

#### 4-2-2 Inoculation trachéale du rat nude avec *P. carinii*

Les résultats obtenus en inoculant par voie nasale la souris SCID, ont tout naturellement conduit à inoculer par cette voie *P. carinii* de rat chez le rat nude. Quarante jours après l'instillation, aucun parasite n'a été détecté dans les poumons de ces animaux. La mise au point d'un modèle d'infection par inoculation trachéale des rats nude s'est alors avérée nécessaire.

Le rat nude non immunodéprimé et inoculé par voie trachéale avec *P. carinii* de rat présente des taux de parasitisme très faibles (Tableau 8). L'administration de dexaméthasone juste après l'inoculation et pendant toute la durée de l'expérience, permet d'augmenter d'un facteur 3 à 6 le nombre de parasites (Tableau 8).

Récemment ce modèle d'infection a été amélioré en administrant la dexaméthasone 15 jours avant l'inoculation des parasites et en maintenant la pression des corticoïdes jusqu'au sacrifice de l'animal. Ce protocole permet d'obtenir des infections environ 12 fois plus importantes que celles obtenues sans dexaméthasone (Tableau 8).

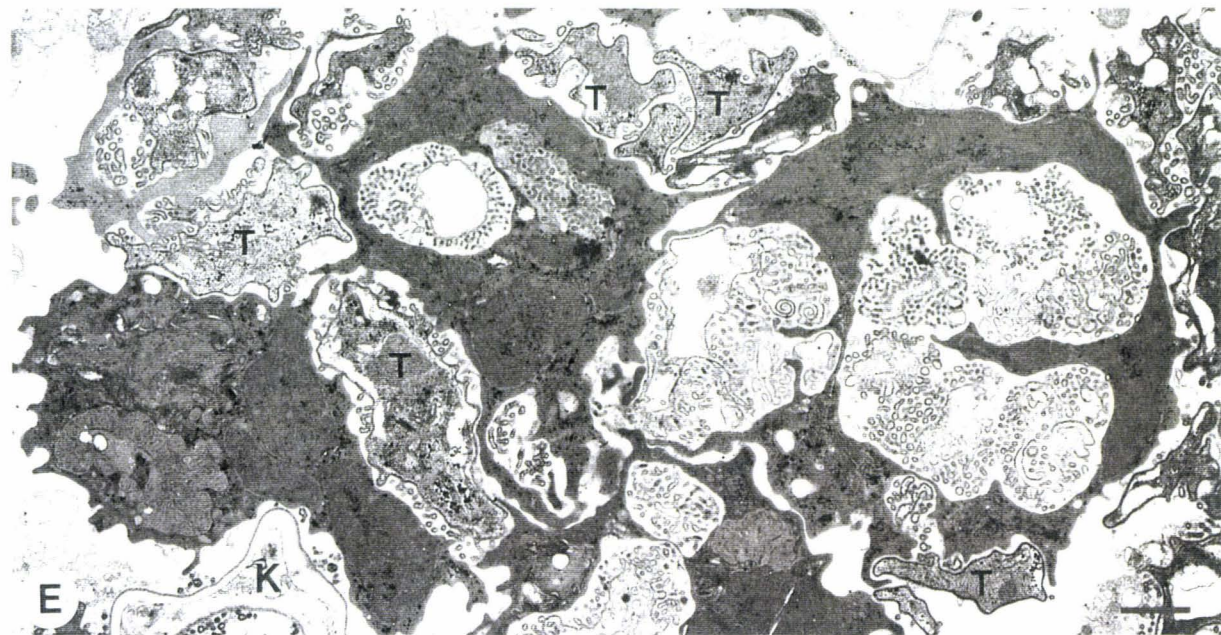
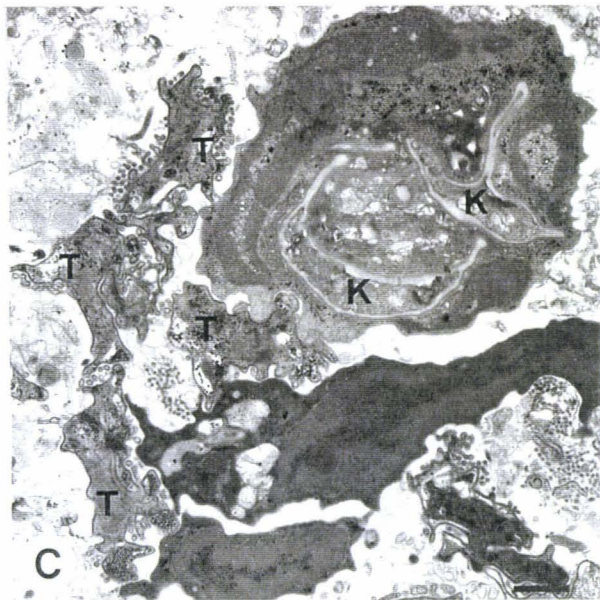
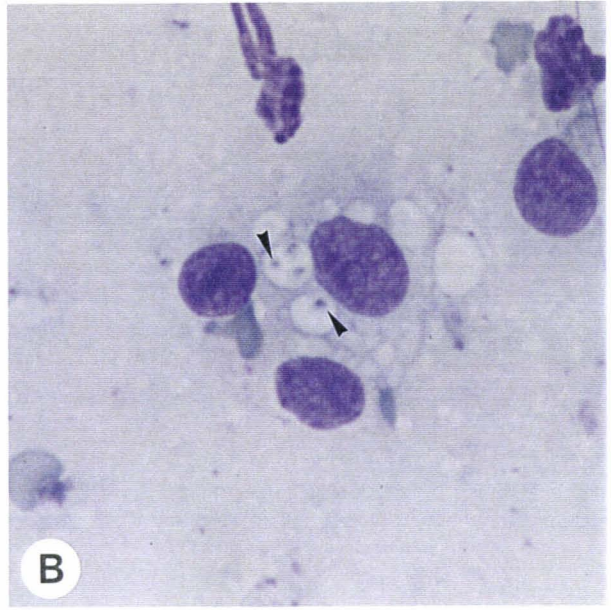
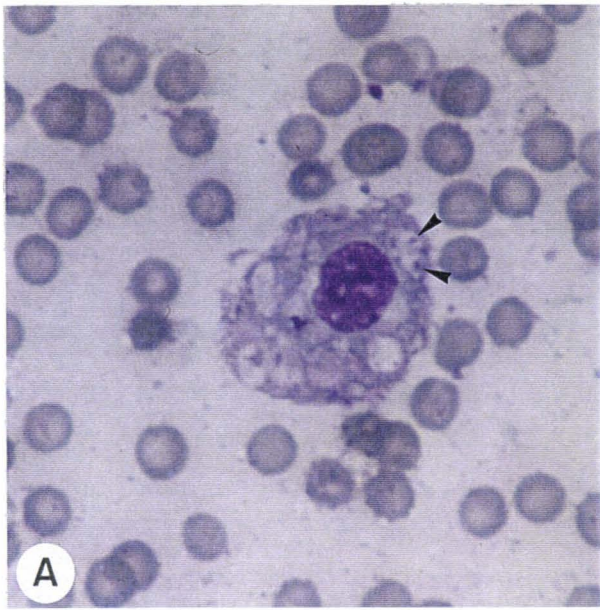
#### 4-2-3 Spécificité parasitaire

Dans ce chapitre, est explorée la capacité de *P. carinii* d'une espèce hôte donnée, à infecter un hôte d'une autre espèce.

##### 4-2-3-1 Infections croisées

Le pouvoir infectieux de *P. carinii* de souris, de rat et de lapin pour la souris SCID

**Figure 23.** Phases précoces de l'infection par *P. carinii* chez un hôte spécifique et non spécifique. Etude en microscopie photonique et électronique à transmission de la phase A de la Figure 22. Toutes les observations montrées sur cette planche ont été réalisées 24 heures après l'inoculation des parasites. **A** : phagocytose de *P. carinii* de rat (pointes de flèche) par un macrophage de souris SCID. Frottis pulmonaire par apposition coloré au RAL-555. Grossissement : x 1100 ; **B** : phagocytose de *P. carinii* de souris (pointes de flèche) par un macrophage de souris SCID. Frottis pulmonaire par apposition coloré au RAL-555. Grossissement : x 1100 ; **C** et **E** : phagocytose très active de trophozoïtes et de formes à paroi épaisse de *P. carinii* de rat, par des granulocytes neutrophiles de souris SCID ; **D** : phagocytose d'un kysté de *P. carinii* de souris, par des granulocytes neutrophiles de souris SCID. Les granulocytes montrés dans les figures **C**, **D** et **E**, présentent un cytoplasme dense avec de rares granulations typiques. K : forme kystique ; T : trophozoïte. Barre = 1 $\mu$ m





**Tableau 8.** Développement de la pneumocystose chez des rats nude inoculés par voie trachéale avec *P. carinii* de rat. Effet de l'immunodépression (dexaméthasone 1mg/l d'eau de boisson).

| Expérience<br>N°  | Jours a.i. <sup>1</sup> | Parasites totaux<br>(x 10 <sup>6</sup> ) <sup>2</sup> | Rats infectés/total |
|---|-------------------------|---|---------------------|
| <b>Aucune immunodépression</b>  |                         |   |                     |
| 1   | 40                      | 56.5 ± 10,6   | 3/3                 |
| <b>Dexaméthasone (1mg/l) à partir de l'inoculation</b>                          |                         |   |                     |
| 2   | 40                      | 137,0 ± 19,7  | 3/3                 |
| 3   | 40                      | 160,0 ± 4,0   | 3/3                 |
| 4   | 40                      | 227,7 ± 20,1  | 4/4                 |
| 5   | 40                      | 160,0 ± 36,0  | 3/3                 |
| 6   | 40                      | 334,9 ± 25,3  | 4/4                 |
| 7   | 40                      | 355,6 ± 68,7  | 4/4                 |
| 8   | 40                      | 234,0 ± 67,0  | 3/3                 |
| <b>Dexaméthasone (1mg/l) commencée 15 jours avant l'inoculation<sup>3</sup></b> |                         |   |                     |
| 9   | 40                      | 628,2 ± 155   | 4/4                 |
| 10  | 40                      | 704,0 ± 168,0   | 3/3                 |

<sup>1</sup> Nombre de jours après l'inoculation (a.i.) trachéale des parasites.

<sup>2</sup> Nombre total de parasites (x 10<sup>6</sup>) par animal.

<sup>3</sup> L'administration de dexaméthasone commence 15 jours avant l'inoculation des parasites et est poursuivie jusqu'au 40<sup>ème</sup> jour.

et le rat nude est évalué. Les résultats de ces expériences d'infection croisée, développées sur plus de deux ans, sont présentés dans le Tableau 9.

Toutes les souris SCID instillées avec *P. carinii* de souris ont développé une pneumocystose. L'infection était plus importante 90 jours après l'inoculation nasale des parasites. Par contre, aucun parasite n'a été détecté chez les souris SCID instillées avec *P. carinii* de rat ou de lapin, et sacrifiées 40 et 90 jours après l'instillation. De même, les souris SCID instillées avec *P. carinii* de rat cultivés sur cellules L2 ne développent pas de pneumocystose. Les souris témoins, instillées avec du DMEM stérile, sont également indemnes de *P. carinii*.

De la même manière, tous les rats nude inoculés par voie trachéale avec *P. carinii* de rat ont développé une pneumocystose (Tableau 9). L'infection s'aggrave de façon importante 70 et 90 jours après l'inoculation. Par contre, chez les rats nude inoculés avec des parasites de souris ou de lapin et sacrifiés 40, 70 ou 90 jours après inoculation, aucun parasite n'a été décelé. Les rats témoins, inoculés avec du DMEM stérile, ne développent pas de pneumocystose.

#### 4-2-3-2 Analyse par PCR et hybridation de sondes spécifiques

La PCR suivie d'une hybridation a permis d'augmenter la sensibilité de détection par rapport aux techniques classiques de coloration. L'amplification attendue du fragment de 400pb du gène de la TS de *P. carinii* a été obtenue, d'une part, lorsque les souris SCID sont instillées avec *P. carinii* de souris (Figure 24A), et d'autre part, lorsque les rats nude sont inoculés avec *P. carinii* de rat (Figure 25A). Au contraire, aucune amplification n'a été observée lorsque les souris SCID sont instillées avec *P. carinii* de rat ou de lapin (Figure 24A), ou lorsque les rats nude sont inoculés avec *P. carinii* de souris ou de lapin (Figure 25A).

Suite à la PCR, l'hybridation à l'aide de sondes spécifiques de *P. carinii* de souris, de rat et de lapin a permis un gain dans la sensibilité de détection mais a aussi, assuré l'identification des parasites de chaque espèce hôte (Dei-Cas *et al.*, 1994 ; Mazars *et al* 1994 et 1995). Ainsi, l'absence d'amplification observée dans les infections croisées est confirmée par la non hybridation des sondes spécifiques (Figure 24B et 24D). Par ailleurs, les produits amplifiés obtenus précédemment sont reconnus par les sondes spécifiques de *P. carinii* de souris et de rat respectivement (Figure 24C et 25B).

**Tableau 9.** Inoculation de souris SCID et de rats nude avec *P. carinii* provenant de souris, de rat ou de lapin. Nombre total de parasites ( $\times 10^6$ ) suivi du nombre d'animaux infectés/total d'animaux inoculés.

| Animaux<br>receveurs | Jours a.i. <sup>1</sup> | Témoins <sup>2</sup> | <i>Pneumocystis</i> provenant de : |                     |         |
|----------------------|-------------------------|----------------------|------------------------------------|---------------------|---------|
|                      |                         |                      | Souris                             | Rat                 | Lapin   |
| Souris<br>SCID       | 40                      | 0 (0/3)              | 127 ± 40<br>(9/9)                  | 0 (0/18)            | 0 (0/7) |
| Souris<br>SCID       | 90                      | 0 (0/3)              | 230 ± 82<br>(7/7)                  | 0 (0/5)             | 0 (0/3) |
| Rats nude            | 40                      | 0 (0/3)              | 0 (0/3)                            | 160 ± 36<br>(3/3)   | 0 (0/5) |
| Rats nude            | 70                      | 0 (0/3)              | 0 (0/3)                            | 838 ± 41<br>(4/4)   | 0 (0/4) |
| Rats nude            | 90                      | 0 (0/3)              | 0 (0/3)                            | 1800 ± 240<br>(3/3) | 0 (0/3) |

<sup>1</sup> Nombre de jours après l'inoculation (a.i.) des parasites.

<sup>2</sup> Animaux inoculés avec du milieu de culture stérile.

**Figure 24.** Analyse par PCR et hybridations des expériences d'infection croisée chez la souris SCID. Isolats pulmonaires de souris SCID 40 jours après l'instillation nasale de : *P. carinii* de souris (dépôts 2 à 5), *P. carinii* de lapin (dépôts 6 à 10), *P. carinii* de rat (dépôts 11 à 14). Les contrôles d'amplification et d'hybridation sont représentés par des isolats de *P. carinii* de souris (dépot 16), de *P. carinii* de lapin (dépot 17) et de *P. carinii* de rat (dépot 18). Le marqueur de poids moléculaire est pBR322/MspI (dépôts 1, 15 et 19). Les tailles de poids moléculaire sont indiquées en paires de bases à droite. **A.** Visualisation des produits de la réaction PCR, en gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Seules les souris SCID instillées avec des parasites de souris présentent un produit amplifié d'un fragment de 400 pb du gène de la TS de *P. carinii*. **B.** Autoradiographie après hybridation avec une sonde spécifique du gène de la TS de *P. carinii* de rat. Seul, le contrôle d'amplification de *P. carinii* de rat est hybridé à la sonde (pointe de flèche). **C.** Autoradiographie après hybridation avec une sonde spécifique de *P. carinii* de souris. Les produits amplifiés, obtenus à partir des souris SCID inoculées avec *P. carinii* de souris, et le contrôle d'amplification de *P. carinii* de souris, sont hybridés à la sonde (pointe de flèche). **D.** Autoradiographie après hybridation avec une sonde spécifique de *P. carinii* de lapin. Seul, le contrôle d'amplification de *P. carinii* de lapin est hybridé à la sonde (pointe de flèche).

**Page ci-contre.**

**Figure 25.** Analyse par PCR et hybridation des expériences d'infection croisée chez le rat nude. Isolats pulmonaires de rats nude 40 jours après l'inoculation trachéale de : *P. carinii* de souris (dépôts 2 à 5), *P. carinii* de lapin (dépôts 6 à 8), milieu DMEM stérile (dépôts 9 à 12), *P. carinii* de rat (dépôts 13 à 16). Le marqueur de poids moléculaire est pBR322/MspI (dépôts 1 et 17). Les tailles de poids moléculaire sont indiquées en paires de bases à droite. **A.** Visualisation des produits de la réaction PCR, en gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Seuls les rats nude inoculés avec des parasites de rat présentent un produit amplifié d'un fragment de 400 pb du gène de la TS de *P. carinii*. **B.** Autoradiographie après hybridation avec une sonde spécifique du gène de la TS de *P. carinii* de rat. Les produits amplifiés, obtenus à partir des rats nude inoculés avec *P. carinii* de rat, sont hybridés à la sonde (pointe de flèche).

**Page suivante.**



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

**A)**



◀ 622  
◀ 404  
◀ 240

**B)**



**C)**



**D)**



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

A)

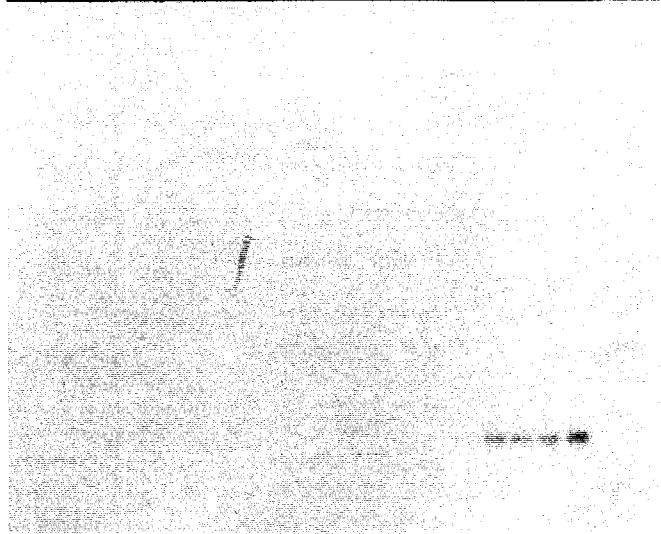


◀ 622

◀ 404

◀ 240

B)



▶

### 4-3 Exploration du rôle des facteurs liés au micro-environnement alvéolaire sur l'infectivité de *P. carinii* et sur la spécificité parasitaire

Dans ce chapitre, l'implication de quelques facteurs liés au micro-environnement alvéolaire sur le pouvoir infectieux de *P. carinii* et sur la spécificité parasitaire est examinées. Les phases précoces de l'infection, la cinétique d'élimination des parasites provenant d'un hôte non spécifique, l'évolution de la co-infection avec des inoculums spécifiques et non spécifiques et l'incidence de la composition du surfactant sur l'infectivité de *P. carinii* sont explorées.

#### 4-3-1 Les phases précoces de l'infection par *P. carinii* chez des hôtes spécifiques et non spécifiques : rôle de l'attachement, aux cellules alvéolaires, dans la spécificité parasitaire

Pour explorer le rôle de l'attachement de *P. carinii* aux cellules alvéolaires dans la spécificité parasitaire, les phases précoces de l'infection ont été analysées en MET. Le modèle retenu a été la souris SCID inoculée par voie nasale soit avec *P. carinii* de souris, soit avec *P. carinii* de rat. Les résultats sont exposés sur la Figure 26.

Les trophozoïtes de *P. carinii* de souris s'attachent aux pneumocytes de type I durant les premières 24 heures suivant l'instillation. La surface de contact apparaît linéaire sur les coupes (Figure 26A). A partir de 48 heures, les trophozoïtes émettent des projections filopodiales élargies distalement qui s'ancrent, plus ou moins profondément, dans les cellules alvéolaires de type I (Figure 26B et 26C).

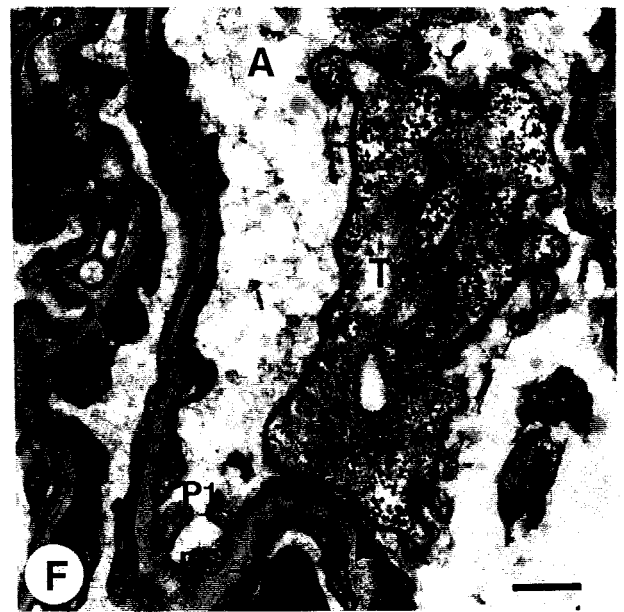
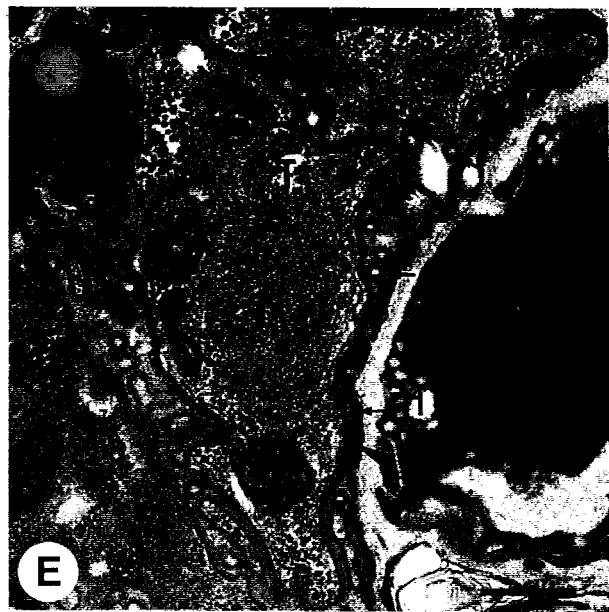
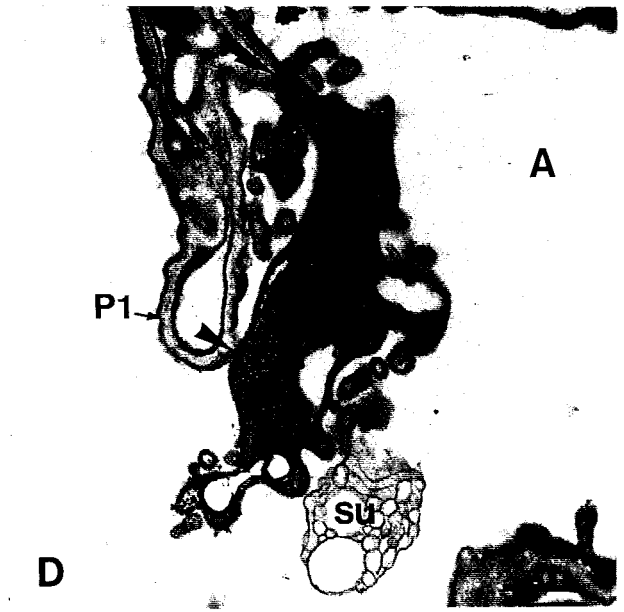
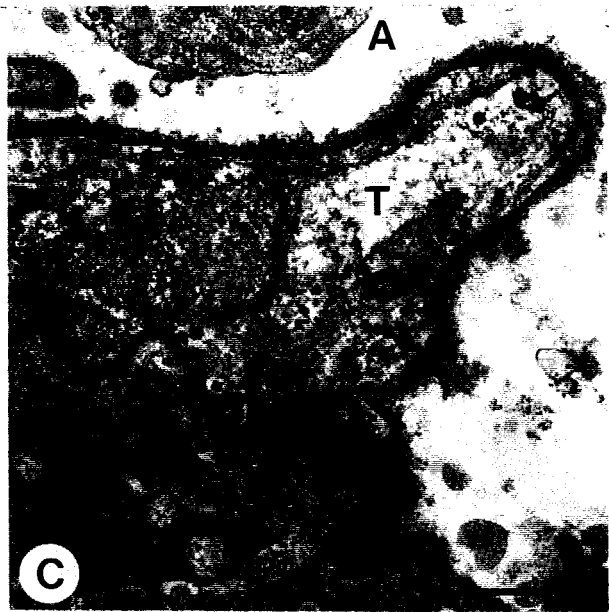
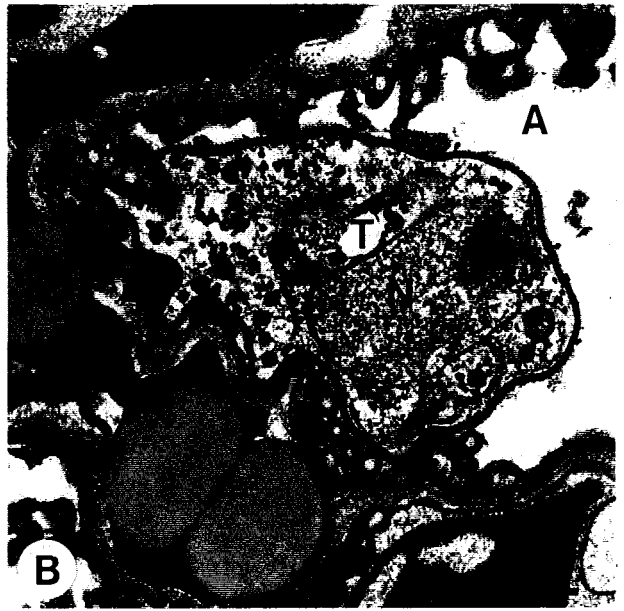
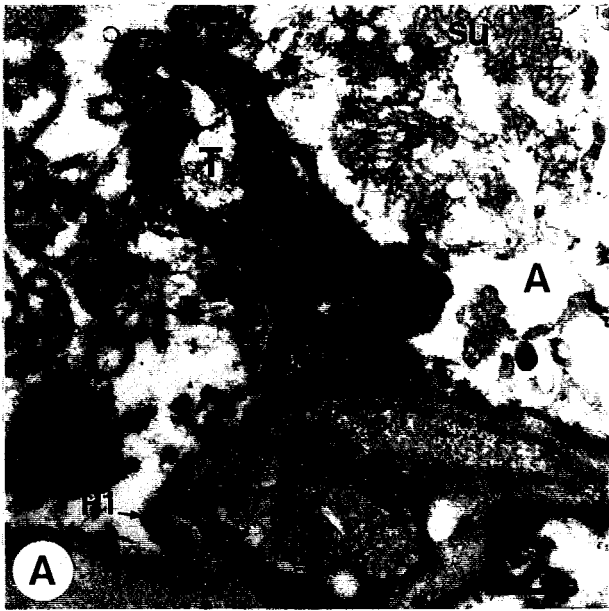
Les trophozoïtes de *P. carinii* de rat s'attachent aussi à la surface des pneumocytes de type I pendant les premières 24 heures (Figure 26). Toutefois, 48 et 72 heures après l'instillation, les relations entre *P. carinii* de rat et les cellules alvéolaires de la souris SCID n'évoluent pas et l'émission de filopodes pénétrant le cytoplasme des cellules pulmonaires n'a pas été observée (Figure 26F).

#### 4-3-2 L'élimination des parasites chez l'hôte non spécifique

Compte tenu des résultats exposés dans le sous-chapitre précédent (4-3-1) et de l'absence d'infectivité de *P. carinii* pour un hôte non spécifique (4-2-3), les mécanismes d'éradication du parasite par cet hôte ont été abordés. Le modèle choisi a été la souris SCID inoculée par voie nasale avec *P. carinii* de rat. Les résultats sont montrés sur la Figure 22.

Pendant les 3 premiers jours suivant l'inoculation (correspondant à la phase A), le

**Figure 26.** Phases précoces de l'infection par *P. carinii* chez un hôte spécifique et non spécifique. Etude en microscopie électronique à transmission de la phase A de la Figure 22. **A, B et C** : *P. carinii* de souris observé 20 (**A**), 48 (**B**) et 72 heures (**C**) après instillation nasale des souris SCID. L'attachement (pointes de flèche), d'abord en surface (20 heures), devient plus intriqué et complexe, grâce au développement filopodial, à 48 et 72 heures. Dans les figures **B** et **C** les filopodes ont pénétré en profondeur les pneumocytes de type I et on peut les observer coupé transversalement (flèches). **D, E et F** : *P. carinii* de rat observé 5 (**D**), 20 (**E**) et 48 heures (**F**) après instillation nasale des souris SCID. L'attachement (pointes de flèche) ne se réalise qu'en surface, même 48 heures après inoculation. Les flèches montrent des filopodes coupés transversalement. A : alvéole pulmonaire ; EC : endothélium des capillaires ; H : hématie; mi : mitochondrie ; N : noyau parasitaire ; Nu : nucléole ; P1: pneumocyte de type I ; su : surfactant (structure en myéline tubulaire) ; T : trophozoïte. Barre = 0.5 $\mu$ m



nombre de parasites de rat diminue rapidement devenant non détectable dès le 2<sup>ème</sup> jour.

La PCR est positive (amplification du fragment de 400 pb du gène de la TS de *P. carinii*) jusqu'au 2<sup>ème</sup> jour après l'inoculation des souris SCID avec *P. carinii* de rat (Figure 27A). Puis, aucune amplification n'est obtenue. L'hybridation avec la sonde spécifique de *P. carinii* de rat est aussi observée seulement jusqu'au 2<sup>ème</sup> jour (Figure 27C).

Comme pour *P. carinii* de souris, une activité phagocytaire intense vis-à-vis de *P. carinii* de rat est observé (Figure 23A, 23C et 23E). Les différents stades parasitaires de *P. carinii* de rat sont phagocytés par des macrophages alvéolaires et par des granulocytes neutrophiles.

En résumé, lorsque *P. carinii* de rat est inoculé chez la souris SCID, les parasites n'établissent pas de relation intime avec les pneumocytes de type I, sont activement phagocytés et complètement éradiqués du poumon de cet hôte non spécifique en moins de 3 jours (Figure 22, 23 et 27).

#### 4-3-3 Influence de la co-infection sur la spécificité parasitaire de *P. carinii*

Le développement de *P. carinii* chez l'hôte spécifique pourrait influencer sa susceptibilité vis-à-vis de l'infection simultanée (co-infection) avec *P. carinii* provenant d'un hôte non spécifique. Il s'agit donc de savoir si la co-infection influence la spécificité parasitaire.

—Pour aborder cette problématique, des souris SCID ont été simultanément inoculées avec *P. carinii* de souris et *P. carinii* de rat. Les résultats sont montrés dans le Tableau 10.

Tout comme les souris SCID témoins (instillées avec *P. carinii* de souris), celles instillées avec *P. carinii* de rat et de souris développent une pneumocystose 40 jours après l'inoculation. Les deux lots de souris présentent des taux de parasitisme semblables.

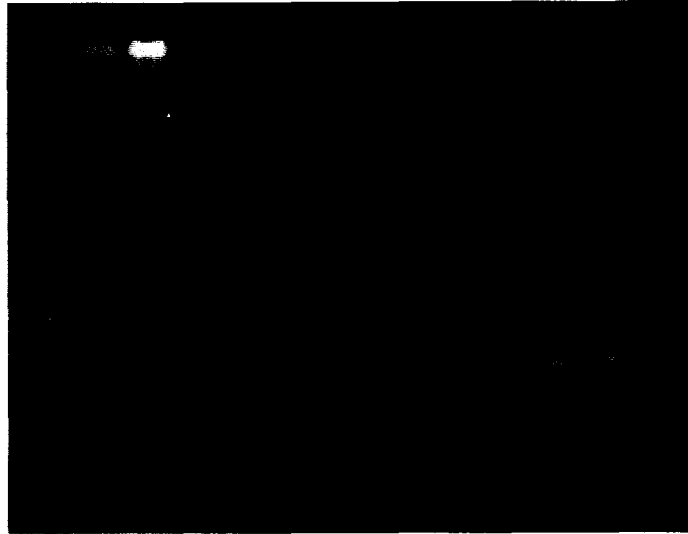
Afin de savoir si les souris SCID co-infectées, le sont par une seule population parasitaire ou par les deux, une analyse par PCR suivie d'hybridation avec les sondes spécifiques de *P. carinii* de souris et de rat a été réalisée (Figure 28). Les résultats montrent que la sonde spécifique de *P. carinii* de souris s'hybride avec tous les produits amplifiés (Figure 28A et 28B). A l'inverse, la sonde spécifique de *P. carinii* de rat ne s'hybride avec aucun des produits amplifiés mais seulement avec le témoin, correspondant à un fragment amplifié du gène de la TS de *P. carinii* de rat (Figure 28C).

**Figure 27.** Analyse par PCR et hybridations, des expériences sur la clairance de *P. carinii* de rat chez la souris SCID. Isolats pulmonaires de souris SCID instillées par voie nasale avec *P. carinii* de rat respectivement 1 (dépot 2), 2 (dépot 3), 3 (dépot 4), 4 (dépot 5), 10 (dépot 6), 15 (dépot 7), 20 (dépot 8), 40 (dépot 9) et 60 jours (dépot 10) après l'inoculation des parasites. Les contrôles d'amplification et d'hybridations sont représentés par des isolats de *P. carinii* de rat (dépot 12), de *P. carinii* de souris (dépot 13) et de *P. carinii* de lapin (dépot 14). Le marqueur de poids moléculaire est pBR322/MspI (dépôts 1 et 11). Les tailles de poids moléculaire sont indiquées en paires de bases à gauche. **A.** Visualisation des produits de la réaction PCR, en gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Jusqu'au 2<sup>ème</sup> jour après l'inoculation des souris SCID avec *P. carinii* de rat, un produit amplifié d'un fragment de 400 pb du gène de la TS de *P. carinii* est détecté. Puis, aucune amplification n'est obtenue. **B.** Autoradiographie après hybridation avec une sonde spécifique du gène de la TS de *P. carinii* de souris. Seul, le contrôle d'amplification de *P. carinii* de souris est hybridé à la sonde (pointe de flèche). **C.** Autoradiographie après hybridation avec une sonde spécifique de *P. carinii* de rat. Les produits amplifiés obtenus jusqu'au 2<sup>ème</sup> jour après inoculation de *P. carinii* de rat chez la souris SCID, et le contrôle d'amplification de *P. carinii* de rat, sont hybridés à la sonde (pointe de flèche).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

**A)**

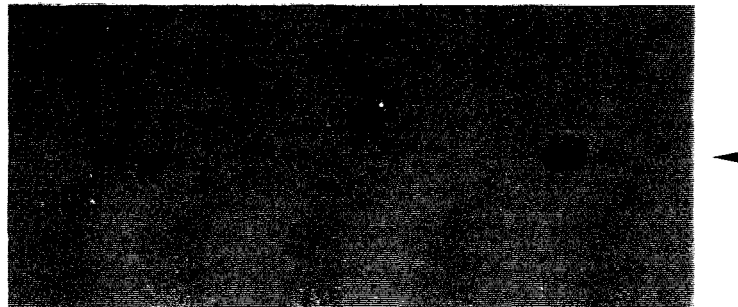
622 ▶  
404 ▶  
240 ▶



**B)**



**C)**





**Tableau 10.** Etude de l'influence de la co-infection sur la spécificité parasitaire de *P. carinii*. Le modèle utilisé est la souris SCID co-infectée avec *P. carinii* de souris et de rat.

| Inoculum                                      | Jours a.i. <sup>1</sup> | Parasites totaux (x 10 <sup>6</sup> ) <sup>2</sup> | Hybridation <sup>3</sup> avec sondes spécifiques : |                  | Souris infectées/total |
|---|-------------------------|--|--|------------------|------------------------|
|   |                         |  | <i>P. c. souris</i>                                | <i>P. c. rat</i> |                        |
| <i>P. c.</i> de souris <sup>4</sup>           | 40                      | 109,2 ± 27   | +  | -                | 6/6                    |
| <i>P. c.</i> de souris et de rat <sup>5</sup> | 40                      | 99,6 ± 13,6  | +  | -                | 12/12                  |

<sup>1</sup> Nombre de jours après l'inoculation (a.i.) nasale des souris SCID.

<sup>2</sup> Nombre total de parasites (x 10<sup>6</sup>) par animal.

<sup>3</sup> Les sondes spécifiques de *P. carinii* (*P. c.*) de souris et *P. carinii* de rat ont été définies dans un fragment de 400pb du gène de la thymidylate synthétase (Mazars *et al.*, 1995; voir Matériels et Méthodes).

<sup>4</sup> Souris SCID inoculées avec 30.10<sup>6</sup> *P. carinii* de souris.

<sup>5</sup> Souris SCID inoculées avec 30.10<sup>6</sup> *P. carinii* de souris et 30.10<sup>6</sup> *P. carinii* de rat.

**Figure 28.** Analyse par PCR et hybridations des expériences de co-infection de *P. carinii* de souris et de rat chez la souris SCID. Isolats pulmonaires de souris SCID 40 jours après l'instillation simultanée de *P. carinii* de rat et de souris (dépôts 2 à 9). Les contrôles d'amplification et d'hybridations sont représentés par des isolats de *P. carinii* de rat (dépôt 11), de *P. carinii* de souris (dépôt 12) et de *P. carinii* de lapin (dépôt 13). Le marqueur de poids moléculaire est pBR322/MspI (dépôts 1 et 10). Les tailles de poids moléculaire sont indiquées en paires de bases à gauche. **A.** Visualisation des produits de la réaction PCR, en gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Toutes les souris SCID co-instillées présentent un produit amplifié d'un fragment de 400 pb du gène de la TS de *P. carinii*. **B.** Autoradiographie après hybridation avec une sonde spécifique de *P. carinii* de souris. Les produits amplifiés obtenus à partir de chacune des souris SCID co-instillée, et le contrôle d'amplification de *P. carinii* de souris, sont hybridés à la sonde (pointe de flèche). **C.** Autoradiographie après hybridation avec une sonde spécifique de *P. carinii* de rat. Seul, le contrôle d'amplification de *P. carinii* de rat est hybridé à la sonde (pointe de flèche).

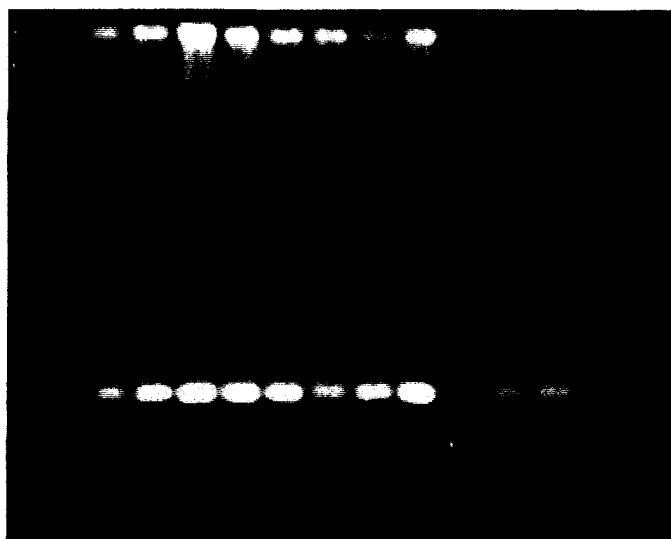
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

A)

622 ▶

404 ▶

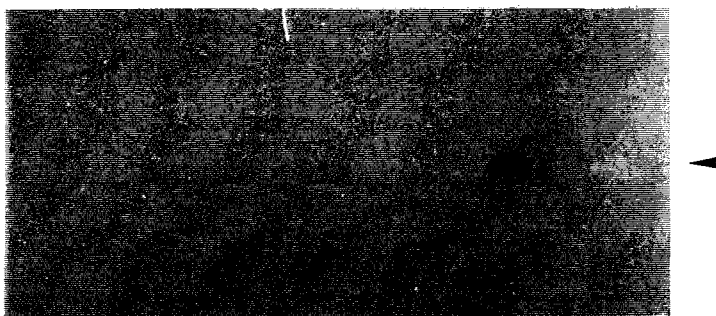
240 ▶



B)



C)



#### 4-3-4 Incidence de la composition du surfactant sur l'infectivité de *P. carinii*

Le but ultime de cette partie de notre étude était d'explorer le rôle du surfactant dans la spécificité parasitaire de *P. carinii*. Cette recherche nécessitait d'une part de connaître l'implication du surfactant dans l'infection par *P. carinii* chez l'hôte spécifique et d'autre part de mettre au point un modèle dans lequel des modifications du surfactant peuvent être induites. Ces études ont été réalisées en utilisant notre système *in vitro* et les modèles lapin (Soulez *et al.*, 1989) et souris SCID.

##### 4-3-4-1 Influence du surfactant sur le développement de *P. carinii in vitro*

Deux surfactants l'un artificiel, Surfexo<sup>®</sup> l'autre semi-naturel, Curosurf<sup>®</sup> ont été utilisés pour évaluer leur effet sur le développement de *P. carinii* de rat cultivé sur cellules L2 (Figure 29). Les deux surfactants inhibent nettement le développement *in vitro* de *P. carinii*. La croissance des parasites est inhibée d'environ 50% avec une concentration de 100mg/l de Curosurf<sup>®</sup> (Figure 29C). Une concentration deux fois plus importante est nécessaire pour avoir le même effet avec le Surfexo<sup>®</sup> (Figure 29A). Le tyloxapol (détergent non ionique) présent dans le Surfexo<sup>®</sup>, ne modifie pas, aux doses équivalentes, le développement *in vitro* de *P. carinii* (Figure 29B).

##### 4-3-4-2 Le surfactant au cours de la pneumocystose spontanée du lapereau au sevrage (pneumocystose naturelle)

Les taux de parasitisme par *P. carinii* en fonction de l'âge des lapins élevés dans des conditions conventionnelles, apparaissent sur la Figure 30A. Au début du sevrage (environ 21 jours après la naissance), on assiste à une ascension fulgurante du taux de parasitisme pulmonaire par *P. carinii* qui atteint un maximum au 30<sup>ème</sup> jour, puis diminue rapidement pour tendre à s'annuler après le 42<sup>ème</sup> jour (Figure 30A). Cette pneumocystose spontanée du lapereau a été mise en évidence par notre groupe en 1989 (Soulez *et al.*, 1989) et depuis, plus de 2200 lapins nous ont permis de confirmer ce phénomène au cours de multiples travaux de recherche. Il a été retrouvée par d'autres auteurs et étudiée dans une perspective immunologique (Akono et Palluault, 1994).

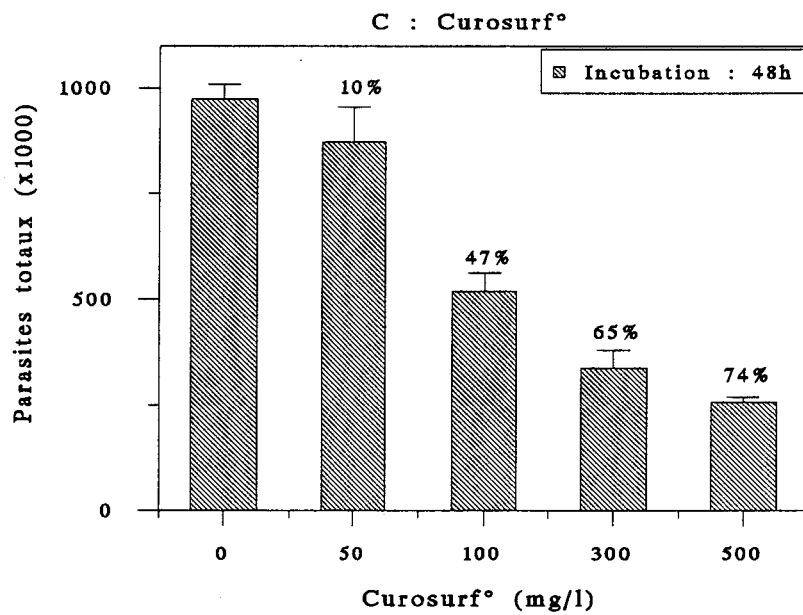
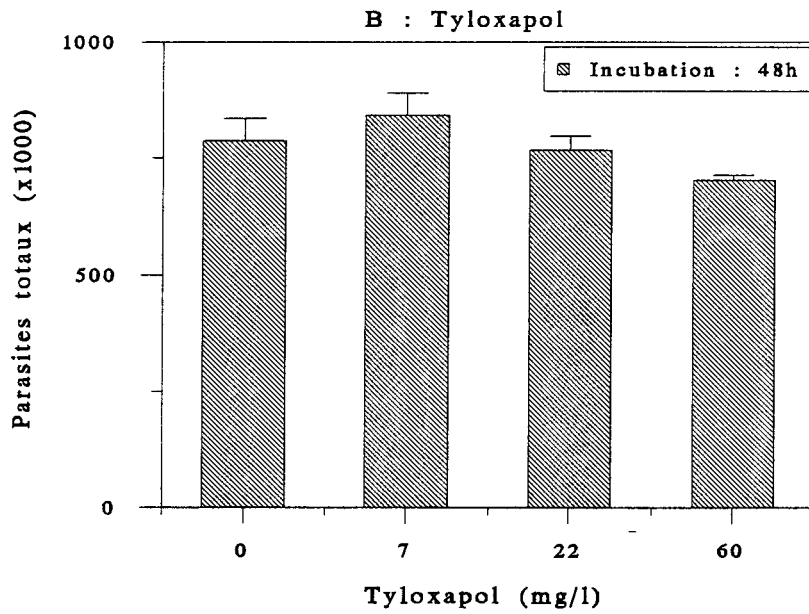
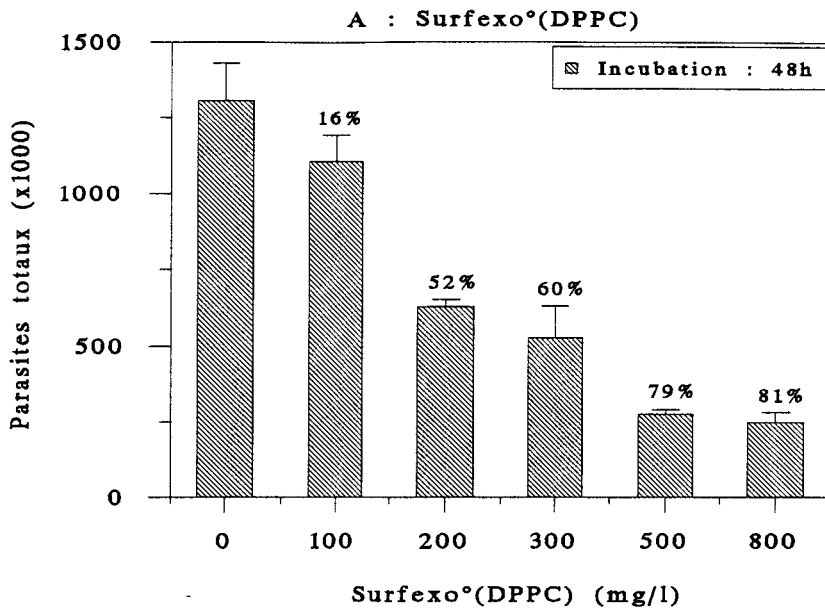
Le rapport PL/PT a été déterminé dans le LBA des lapereaux en fonction de leur âge. Il augmente légèrement jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour après la naissance (non significatif), puis chute

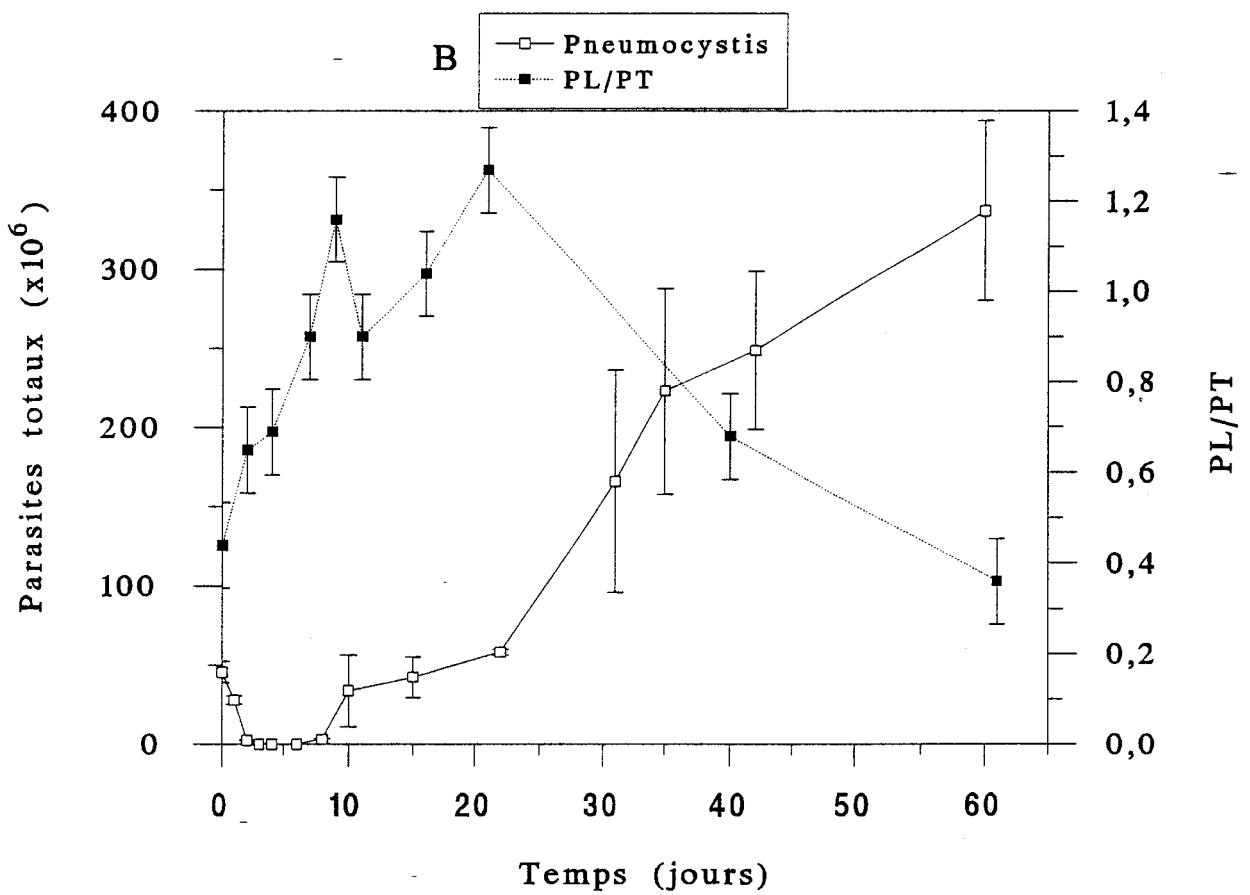
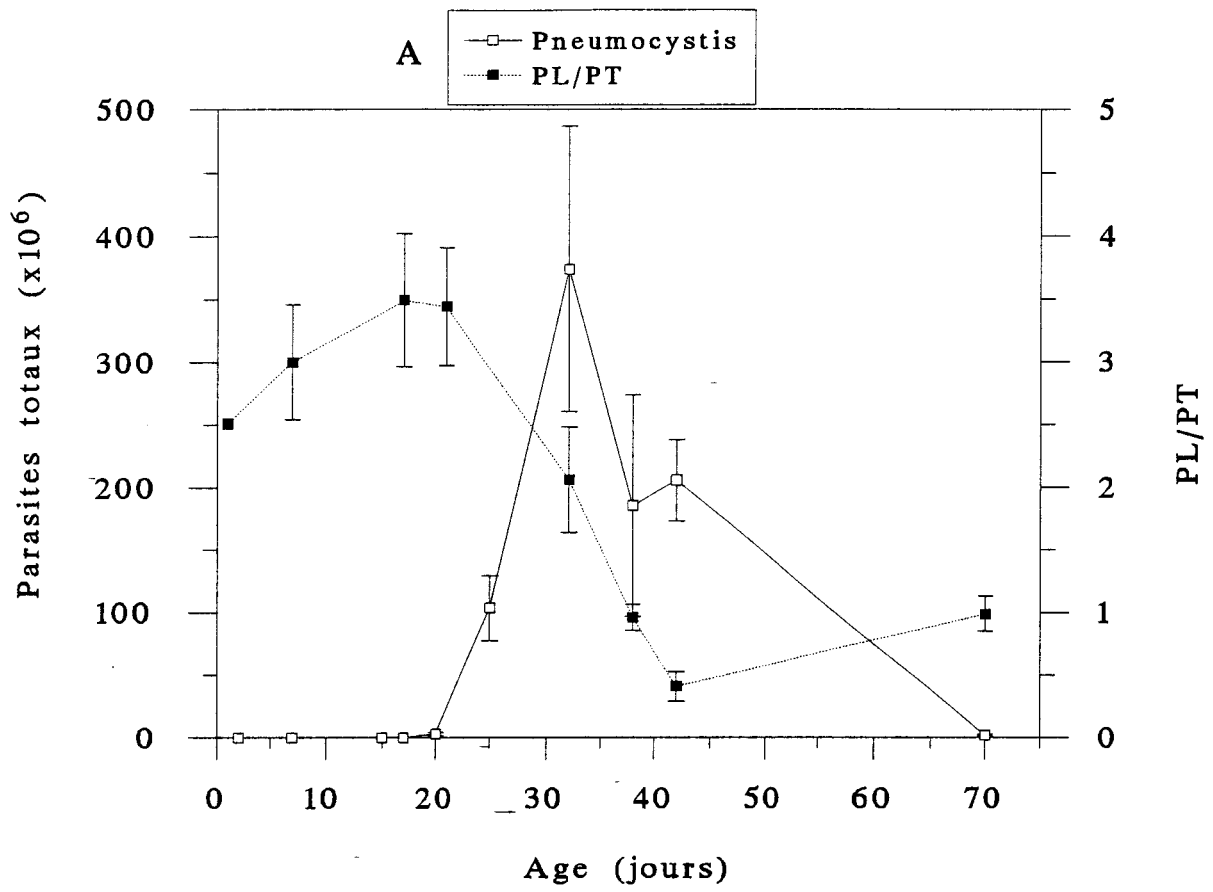
**Figure 29.** Effet du surfactant sur le développement de *P. carinii* de rat sur lignée cellulaire L2. Toutes les expériences ont été réalisées en incubant les cultures et les parasites pendant 48 heures. Deux types de surfactant ont été testés: Surfexo° (surfactant artificiel) (A) et Curosurf° (surfactant semi-naturel) (C). L'effet du tyloxapol, détergent associé au Surfexo° a aussi été testé (B). Les deux surfactants ont eu un effet inhibiteur sur la croissance *in vitro* de *P. carinii*. Les chiffres marqués sur les histogrammes correspondent au pourcentage d'inhibition du développement parasitaire comparé au témoin.

**Page ci-contre.**

**Figure 30.** Variations du rapport PL/PT au cours de la pneumocystose spontanée du lapin (A) et au cours de la pneumocystose expérimentale de la souris SCID (B). **A** : chez le lapin, la pneumocystose spontanée se développe après le 21<sup>ème</sup> jour d'âge, atteint son maximum vers la fin du premier mois et guérit spontanément en 4 à 6 semaines. Le rapport PL/PT a été déterminé dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire des lapereaux en fonction de leur âge. Il augmente légèrement jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour après la naissance (non significatif), puis chute brutalement jusqu'au 42<sup>ème</sup> jour. Ensuite, le rapport PL/PT tend sensiblement à se normaliser; **B** : chez la souris SCID, *P. carinii* se développe lentement jusqu'à environ 20 jours après l'inoculation des parasites. Puis, le taux de parasitisme augmente rapidement. Le rapport PL/PT augmente durant les phases précoces de l'infection puis diminue lors de la phase de développement rapide de *P. carinii*.

**Page suivante.**





brutalement jusqu'au 42<sup>ème</sup> jour. Ensuite, le rapport PL/PT tend sensiblement à se normaliser (Figure 30A). L'évolution des PT et des PL totaux est présentée dans le Tableau 11. Deux phénomènes importants sont observés :

- l'augmentation discrète du rapport PL/PT, avant la pneumocystose, est due à une chute des deux composants, plus importante chez les protéines totales (environ 63 %) que chez les phospholipides (environ 47 %);
- la chute brutale du rapport PL/PT, lors du développement de la PPC, est due essentiellement à une augmentation des protéines (environ 400%). Les phospholipides restent sensiblement inchangés.

Une étude détaillée de la composition du surfactant en relation avec l'installation et la guérison spontanée de la pneumocystose des lapereaux a été réalisée. Elle n'a pas permis de mettre en évidence des variations significatives de chaque phospholipide pris séparément.

Malheureusement, nous n'avons pas pu étudier le surfactant de lapins de mêmes âges mais sans pneumocystose, car les lapins de toutes les colonies que nous avons testées depuis 1987 développent une PPC spontanée au sevrage.

#### 4-3-4-3 Le surfactant au cours de la pneumocystose expérimentale de la souris SCID

Le surfactant a également été étudié dans le modèle d'infection par instillation de la souris SCID avec *P. carinii* de souris. Les résultats sont présentés sur la Figure 30B et le Tableau 12.

Le rapport PL/PT augmente durant les phases A, B et C (chapitre 4-2-1-2, Figure 22), qui correspondent aux phases d'installation de la pneumocystose et de prolifération lente du parasite. Lors de la phase de développement rapide de *P. carinii* (phase D), le rapport PL/PT s'effondre. L'analyse du rapport PL/PT met en évidence deux phénomènes importants (Tableau 12) :

- l'augmentation marquée du rapport PL/PT pendant les phases précoces de l'infection est due à une légère augmentation des phospholipides (environ 22 %) et à une chute importante des protéines totales (environ 56 %);
- la chute brutale du rapport PL/PT, lors de la phase de prolifération importante des parasites, est due essentiellement à une augmentation des phospholipides (environ 37%) et à une



**Tableau 11.** Pneumocystose spontanée du lapin : protéines et phospholipides totaux dans le LBA en fonction de l'âge.

| Age (jours) | Phospholipides totaux<br>(mg/100ml) | Protéines totales<br>(mg/100ml) |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1           | 20,18 ± 4,97                        | 8,87 ± 3,14                     |
| 7           | 13,21 ± 5,15                        | 4,62 ± 1,34                     |
| 17          | 7,13 ± 0,80                         | 2,27 ± 0,80                     |
| 21          | 10,62 ± 2,60                        | 3,21 ± 0,63                     |
| 32          | 7,13 ± 2,58                         | 3,58 ± 0,69                     |
| 38          | 12,19 ± 6,00                        | 12,12 ± 3,58                    |
| 42          | 9,18 ± 6,00                         | 19,25 ± 8,10                    |
| 70          | 10,9 ± 2,20                         | 11,7 ± 2,46                     |

**Tableau 12.** Pneumocystose chez la souris SCID inoculée par voie nasale avec *P. carinii* de souris : protéines et phospholipides totaux dans le LBA.

| Jours a.i. <sup>1</sup> | Phospholipides totaux<br>(mg/100ml) | Protéines totales<br>(mg/100ml) |
|-------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 0 <sup>2</sup>          | 4,87 ± 0,75                         | 11,02 ± 0,99                    |
| 2                       | 6,37 ± 0,73                         | 10,03 ± 1,59                    |
| 4                       | 5,10 ± 0,78                         | 7,96 ± 2,32                     |
| 7                       | 7,40 ± 0,77                         | 8,86 ± 2,74                     |
| 9                       | 8,28 ± 0,89                         | 7,18 ± 0,85                     |
| 11                      | 6,53 ± 0,81                         | 7,28 ± 0,17                     |
| 16                      | 6,75 ± 0,63                         | 6,56 ± 0,70                     |
| 21                      | 6,21 ± 0,66                         | 4,88 ± 0,17                     |
| 40                      | 7,51 ± 0,48                         | 11,42 ± 2,00                    |
| 61                      | 9,86 ± 0,90                         | 28,96 ± 7,68                    |

<sup>1</sup> Nombre de jours après l'inoculation (a.i.) nasale.

<sup>2</sup> Souris SCID non instillées (témoins).

---

augmentation très marquée des protéines (environ 500%).

Aucune modification significative du rapport PL/PT n'a été observée en absence de PPC chez des souris SCID ayant entre 8 et 16 semaines d'âge (comme celles utilisées dans ce travail).

## **5- DISCUSSION**

## 5- DISCUSSION

Ces dernières années, des notions importantes ont été acquises dans le domaine de la biodiversité génétique de *P. carinii*. En effet, des différences antigéniques (Walzer *et al.*, 1987a ; Kovacs *et al.*, 1989b ; Gigliotti, 1992), caryotypiques (Hong *et al.*, 1990 ; Weinberg *et al.*, 1991 ; Stringer *et al.*, 1993b ; Weinberg *et al.*, 1994a), génomiques (Sinclair *et al.*, 1991 ; Wakefield *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1993 ; Stringer *et al.*, 1993a ; Peters *et al.*, 1994a ; Weinberg *et al.*, 1994c ; Ortiz Rivera *et al.*, 1995 ; Mazars *et al.*, 1995) et isoenzymatiques (Mazars *et al.*, 1994), ont été rapportées chez des isolats de *P. carinii* provenant d'hôtes d'espèces différentes.

Ces différences sont importantes sur les plans taxonomique et épidémiologique. Sur le plan taxonomique, nous devons nous interroger sur la distance génétique existante entre les populations parasitaires inféodées à chaque espèce de mammifère, sur les échanges génétiques entre elles ou sur le problème de l'existence de plusieurs espèces à l'intérieur des populations naturelles de *P. carinii*. Sur le plan épidémiologique, la diversité génétique de *P. carinii* en fonction de l'espèce de l'hôte, suggère l'existence d'une spécificité parasitaire étroite et par conséquent, d'une transmission de l'infection, possible uniquement entre hôtes de la même espèce. Cette problématique, d'un intérêt pratique indéniable car la source de l'infection et le réservoir de l'agent de la pneumocystose humaine n'ont pas été définis (Dei-Cas *et al.*, 1992, 1995), bouleverse la notion de la pneumocystose comme zoonose.

Devant ces questions, il nous a donc semblé essentiel d'explorer l'expression phénotypique de la diversité génétique de *P. carinii*, notamment les conséquences de cette dernière sur le pouvoir infectieux du parasite. Pour cela, il nous a fallu mettre au point des modèles fiables d'infection expérimentale, puis dans ces systèmes *in vivo* et *in vitro* originaux, étudier en détail comment le parasite s'installe et prolifère dans l'alvéole pulmonaire et enfin, aborder l'étude de l'influence de divers facteurs sur l'infectivité de *P. carinii* et la spécificité parasitaire.

### 5-1 Modèles de pneumocystose : la souris SCID et le rat nude

Le rat et la souris soumis à une administration prolongée de corticoïdes développent une pneumocystose en trois mois. Etant naturellement infectés par *P. carinii*, l'inoculation

n'est pas nécessaire mais les infections sont souvent peu reproductibles. En effet, la pneumocystose de la souris est souvent peu intense et également très variable d'un animal à l'autre. Les études d'infection croisée, de co-infection, des différents facteurs susceptibles d'influencer l'infectivité de *P. carinii* ont nécessité la construction de modèles expérimentaux permettant d'obtenir, dans des délais plus courts, des infections intenses et reproductibles. Deux modèles d'infection par inoculation ont été développés : la souris SCID et le rat nude.

Pour le premier modèle, des souris SCID ont été instillées par voie nasale avec une suspension de parasites viables de souris. L'anesthésie, en inhibant le réflexe de déglutition, permet à la totalité des parasites d'atteindre les poumons (Figure 21). La cinétique de l'infection de *P. carinii* chez la souris SCID a été déterminée à plusieurs reprises. La fiabilité et la reproductibilité de ce modèle, qui permet d'obtenir des infections intenses 40 jours après inoculation, sont appréciables (Figure 22).

Pour le second modèle, des rats nude ont été inoculés avec *P. carinii* de rat. Les résultats obtenus en inoculant par voie nasale la souris SCID, ont tout naturellement conduit à inoculer par cette voie *P. carinii* chez le rat nude. Malheureusement, aucun des rats inoculés par voie nasale n'a développé de pneumocystose. Ceci s'expliquerait par le fait que l'anatomie des voies aériennes supérieures du rat est très différente de celle de la souris et ne permettrait pas ou très difficilement, à une suspension parasitaire d'atteindre les poumons de l'animal. C'est pourquoi, nous avons entrepris d'inoculer les parasites directement par voie trachéale. Le rat nude non immunodéprimé et inoculé par cette voie avec *P. carinii* de rat, présente des taux de parasitisme très faibles (Tableau 8). Les granulocytes neutrophiles, éosinophiles et les monocytes sont présents dans le sang de ces rats, en quantité 2 à 10 fois plus importante que chez les rats nude hétérozygotes (Vos *et al.*, 1980). Ces défenses cellulaires renforcées, expliqueraient la difficulté pour *P. carinii* à proliférer dans le poumon de l'animal. Afin de les atténuer, nous avons administré des corticoïdes aux rats. L'administration de dexaméthasone juste après l'inoculation et pendant toute la durée de l'expérience, permet d'augmenter d'un facteur 3 à 6 le nombre de parasites (Tableau 8). Récemment ce modèle d'infection a été amélioré en administrant la dexaméthasone 15 jours avant l'inoculation des parasites et en maintenant la pression de la drogue jusqu'au sacrifice de l'animal. Ce protocole permet d'obtenir des infections environ 12 fois plus importantes que celles obtenues sans dexaméthasone (Tableau 8).

## 5-2 Spécificité parasitaire de *P. carinii*

### 5-2-1 *In vivo*

Les résultats des expériences d'infection croisée montrent que seules les souris SCID inoculées avec *P. carinii* de souris ou les rats nude inoculés avec *P. carinii* de rat, développent une PPC. A l'inverse, lorsque les souris SCID ou les rats nude sont inoculés avec des parasites provenant d'hôtes non spécifiques, aucun développement parasitaire n'est observé (Tableau 9). La présence ou l'absence de parasites dans ces expériences d'infection croisée ont, dans un premier temps, été constatées par l'examen microscopique des extraits pulmonaires. Le seuil de sensibilité de ce dernier est voisin de  $10^4$  parasites totaux. Par conséquent, ces méthodes de détection ne permettent pas d'affirmer l'absence totale de parasites chez les hôtes non spécifiques. La PCR, suivie d'une hybridation à l'aide de sondes spécifiques de *P. carinii* de rat, de souris ou de lapin (Figure 24 et 25), nous a permis d'une part, d'augmenter considérablement notre seuil de détection et, d'autre part, de typer les isolats parasitaires obtenus (Mazars *et al.*, 1995). La PCR permet de détecter un seul parasite par réaction (Mazars E., communication personnelle). Ainsi, l'absence d'amplification et d'hybridation, observée lors des inoculations des hôtes non spécifiques, a confirmé l'absence de parasites.

L'ensemble des résultats des expériences d'infection croisée, indique qu'il existe une forte spécificité parasitaire chez *P. carinii*, c'est à dire qu'il est un parasite sténoxène. La transmission du parasite d'une espèce de mammifère à une autre ne serait pas possible et chaque lignée parasitaire serait ainsi inféodée à une espèce d'hôte (Aliouat *et al.*, 1993a et 1994).

D'autres travaux confortent ces résultats (Gigliotti *et al.*, 1993 ; Furuta *et al.*, 1993). Furuta *et al.* (1993) ont inoculé par voie nasale des souris SCID et des rats nude sous corticoïdes, avec  $10^4$  kystes de *P. carinii* de singe rhésus. Aucun *P. carinii* n'a été retrouvé à l'examen microscopique, respectivement 4 et 2 mois après l'inoculation. Les auteurs suggèrent l'existence d'une forte spécificité chez *P. carinii* de singe. Cependant, l'inoculation nasale des rats nude a pu constituer un facteur limitant puisque dans nos expériences ces animaux inoculés par voie nasale avec *P. carinii* de rat, ne développent pas de pneumocystose. Gigliotti *et al.* (1993) ont inoculé par voie trachéale des souris SCID, non-porteuses latentes de *P. carinii*, avec des parasites provenant de furets ou de souris. Seules les souris SCID inoculées avec *P. carinii* de souris ont développé une pneumocystose. L'absence de parasites

chez les souris SCID inoculées avec *P. carinii* de furet, a été contrôlée par PCR. Les auteurs suggèrent que *P. carinii* n'est pas transmissible d'une espèce à une autre.

Au vu de ces résultats, nous nous sommes interrogés sur les mécanismes de la spécificité parasitaire de *P. carinii*. D'abord, il nous est apparu intéressant d'étudier l'éradication du parasite chez un hôte non spécifique. Le modèle choisi a été la souris SCID inoculée par voie nasale avec *P. carinii* de rat. Les parasites sont éradiqués des poumons dès le 3<sup>ème</sup> jour après inoculation (Figure 27). Cette clairance parasitaire, qui survient aussi rapidement, confirme l'extrême spécificité d'hôte de *P. carinii*. Au cours des 3 premiers jours, *P. carinii* de rat est activement phagocyté par les macrophages alvéolaires et les granulocytes neutrophiles de la souris SCID (Figure 23). Toutefois, dans la même période, une activité phagocytaire d'intensité apparemment similaire, est également observée chez des souris SCID inoculées avec *P. carinii* de souris. Cependant, elle ne parvient pas à empêcher l'installation et plus tard la prolifération de *P. carinii* chez son hôte spécifique (Figure 22 et 23). Selon ces résultats, cette activité phagocytaire pulmonaire ne constituerait donc pas le mécanisme permettant d'expliquer la spécificité parasitaire. En effet, chez son hôte spécifique, *P. carinii* établit certainement des relations privilégiées avec le tissu pulmonaire, lui permettant ainsi d'échapper aux défenses de l'hôte et ensuite de proliférer.

#### 5-2-2 *In vitro*

Nous avons exploré la capacité de *P. carinii* de rat et de souris à se développer sur des lignées cellulaires épithéliales alvéolaires de rat (L2), de souris (LA-4) et d'homme (WI38VA13 et A549).

Les premiers résultats ont très vite montré que la spécificité parasitaire ne s'exprimait pas *in vitro* dans le système utilisé. En effet, l'attachement de *P. carinii* de rat et de souris est similaire dans les 8 premières heures d'incubation (Figure 11). Cependant, seul *P. carinii* de rat se développe sur les lignées cellulaires murines et humaines testées. Après 24 heures d'incubation, un événement important s'ajoute à l'interaction cellule cible-parasite : seuls les parasites de rat développent des projections filopodiales qui s'ancrent dans les cellules en culture (Figure 26). Deux conclusions fondamentales sont à dégager de ces études *in vitro* :

-le comportement très différent *in vitro* de *P. carinii* de rat et de souris, conforte

l'hypothèse de l'existence d'une hétérogénéité dans les populations parasites de *P. carinii*, en fonction de l'espèce de l'hôte ;

- bien que *P. carinii* de rat et de souris s'attachent de façon similaire au cours des 8 premières heures de culture, seul *P. carinii* de rat parvient à se développer. En fait, dans l'interaction entre *P. carinii* et la cellule cible, il faut distinguer 2 phases. La première phase, correspondant à la reconnaissance et au contact avec la cellule cible, fait certainement appel à des couples récepteur-ligand tels que MSG-Fn. Cette étape est nécessaire mais non suffisante au développement parasite. La deuxième phase correspond au développement d'une interaction plus complexe avec la cellule cible *via* les filopodes. Elle conditionne la prolifération du parasite dans la culture. Nous reviendrons plus loin sur ces 2 niveaux d'interaction en abordant les expériences *in vivo*.

La spécificité parasite de *P. carinii*, telle qu'elle est observée chez l'animal, ne s'est pas manifestée dans les systèmes que nous avons utilisé *in vitro*. Par conséquent, nous nous sommes interrogés sur l'incidence des types cellulaires sélectionnés pour cette étude. En effet, *P. carinii* s'attache *in vivo* spécifiquement aux pneumocytes de type I. Des études d'immunodétection ultrastructurale sur des coupes de poumon de rat à différents âges (de l'état embryonnaire à l'âge adulte), montrent que seules les cellules épithéliales pré-type I et type I présentent à leur surface une matrice riche en Fn. A l'inverse, les cellules épithéliales pré-type II et type II ne présentent pas de Fn à leur surface (Rosenkrans *et al.*, 1983). Nous avons donc évalué la richesse en Fn à la surface de nos 4 lignées cellulaires épithéliales alvéolaires, d'une part pour estimer leur rapprochement avec les pneumocytes de type I, et d'autre part parce que la Fn est le ligand essentiel dans l'attachement de *P. carinii* (Pottratz *et al.*, 1991; Aliouat *et al.*, 1993b). La lignée cellulaire la plus riche en Fn est la lignée L2 qui serait par conséquent la plus proche des pneumocytes de type I et celle qui supporte le mieux la croissance des parasites de rat. Les autres lignées, plus proches des pneumocytes de type II, étant donné leur pauvreté relative en Fn, ne semblent pas adaptées pour étudier *in vitro* la spécificité parasite. Un type cellulaire épithélial pulmonaire de souris, lapin ou homme, possédant une matrice riche en Fn, permettrait peut être d'étudier comparativement le développement des parasites provenant de ces hôtes. En fait, l'idéal serait d'établir des cultures de pneumocytes de type I, ce qui est actuellement presque impossible en pratique, étant



donnée la tendance de ces cellules à se différencier rapidement *in vitro*.

Toutefois, ce travail nous a permis de développer un modèle original de culture (à un passage) de *P. carinii* sur cellules L2 qui s'est avéré intéressant pour produire des quantités importantes de parasites viables, purs et infectieux (Aliouat *et al.*, 1995). Ce système est actuellement utilisé en routine dans notre laboratoire et a permis de développer des collaborations scientifiques dans le cadre de l'Action Concertée Européenne de recherches sur *Pneumocystis* (Biomed-1 CT94 PL1118).

Pourquoi les parasites de culture se révèlent-ils plus infectieux pour le rat nude que ceux fraîchement extraits de l'animal ? Ces derniers sont couverts par des protéines de l'hôte (Blumenfeld *et al.*, 1990 ; Wisniewski et Martin, 1994), ce qui pourrait les rendre plus facilement reconnaissables par les phagocytes de l'hôte. De plus, ils montrent souvent des altérations ultrastructurales liées aux méthodes d'extractions (Soulez *et al.*, 1991) et sont associés à des débris tissulaires pulmonaires, qui pourraient contribuer à l'activation du système phagocytaire alvéolaire. En revanche, les parasites de culture sont dépourvus de débris cellulaires, ont vraisemblablement perdu les molécules de l'hôte adsorbées à leur surface et leur ultrastructure est en général normale (Figure 20). Ils interagissent probablement plus aisément avec l'épithélium alvéolaire, échappent plus efficacement aux défenses de l'hôte, et développent activement leur attachement, pour ensuite initier leur prolifération. Ces parasites de rat, obtenus en culture, ne sont pas infectieux pour la souris SCID. Ce résultat marquant confirme la forte spécificité parasitaire de *P. carinii* et consolide les résultats des expériences d'infection croisée. En effet, l'éradication des parasites par l'hôte non spécifique ne serait pas influencée par la présence de molécules de l'hôte d'origine, adsorbées à la surface des parasites inoculés.

### 5-3 Impact de la spécificité parasitaire de *P. carinii*

Ainsi, les différences génétiques de *P. carinii*, préalablement rapportées par notre groupe et par d'autres auteurs, peuvent être corrélées aux observations biologiques décrites dans ce travail. L'hétérogénéité génétique entraîne une capacité infectieuse parasitaire et un comportement *in vitro* variable en fonction de l'espèce hôte. L'ensemble de ces données

indique que les populations de *P. carinii* constitueraient pour le moins des "souches" parasitaires différentes, telles que les définissent Thompson *et al.* (1990). Ces derniers considèrent qu'une souche est décrite par la combinaison de caractéristiques génétiques et biologiques. *P. carinii* serait constitué de "souches" inféodées chacune à une espèce hôte. L'impact épidémiologique est donc considérable, puisque les animaux ne constitueraient pas un réservoir pour l'agent de la pneumocystose humaine. En conséquence, cette dernière ne devrait plus être considérée comme une zoonose mais bien comme une anthroponose.

*P. carinii* apparaît donc comme un microorganisme unicellulaire eucaryote qui présente des différences génétiques traduisant des spécificités parasitaires étroites. Ces observations soulèvent évidemment une interrogation d'ordre taxonomique : l'entité "*P. carinii*" représente-t-elle une ou plusieurs espèces ? Cette question n'est pas sans retombées d'ordre épidémiologique, diagnostique voire prophylactique. Selon Mayr (1942), le concept d'espèce repose sur la notion d'échanges génétiques entre des populations naturelles, qui sont isolées reproductivement d'autres populations semblables. Cependant, chez les organismes dont le mode de reproduction n'est pas connu, les espèces pourraient être définies sur la base de distances génétiques et de relations phylogénétiques (Lymbery, 1992). En ce qui concerne *P. carinii*, le mode de reproduction (à prédominance sexuée ou clonale) reste à identifier et l'existence de plusieurs espèces (bien que ce dernier concept soit en général admis) n'a pas encore donné lieu à des descriptions. Chez *P. carinii*, les typages effectués jusqu'à présent apparaissent insuffisants pour déterminer s'il existe ou non des échanges génétiques entre les "souches" de *P. carinii* (The *Pneumocystis* Workshop, Cleveland, 1994). Seule, la description de la structure génétique des populations naturelles de *P. carinii* permettra de répondre à cette interrogation (Tibayrenc *et al.*, 1990, 1991).

En dépit des incertitudes sur le mode de reproduction de *P. carinii*, de nombreuses observations suggèrent l'existence d'un processus de spéciation qui serait fonction de l'espèce hôte : (i) les expériences d'infection croisée, signes d'une spécificité parasitaire étroite, rapportées dans ce travail (Aliouat *et al.*, 1993a et 1994) et par d'autres auteurs (Furuta *et al.*, 1993, Gigliotti *et al.*, 1993), (ii) les différences antigéniques (Gill *et al.*, 1987 ; Graves, 1989; Kovacs *et al.*, 1989b ; Gigliotti, 1992), caryotypiques (Tableau 3) et nucléiques (Tableau 4) en fonction de l'espèce hôte. Or, -exceptée la description initiale de l'espèce *Pneumocystis*

*carinii* faite par Delanoë et Delanoë en 1912 chez le rat, seul Frenkel (1976) proposa la description d'une 2<sup>ème</sup> espèce, *Pneumocystis jiroveci* n. sp., sur des arguments morphologiques, biologiques et physiologiques. De plus, il s'interroge déjà en 1976 sur l'existence de formes distinctes du parasite chez les autres espèces hôtes.

Sans répondre à la question d'une ou plusieurs espèces, mais plutôt avec un souci de standardiser la désignation des différents "types" ou "formes" de *P. carinii*, une proposition récente de nomenclature trinomique a été proposée lors du dernier Workshop sur *Pneumocystis* (Cleveland, 1994) et attribuée respectivement, à *P. carinii* infectant l'homme, le furet, le cheval, la souris, le cochon et le lapin, les dénominations modifiées suivantes : *P. carinii* sp.f. *hominis*, *P. carinii* sp.f. *mustelae*, *P. carinii* sp.f. *equi*, *P. carinii* sp.f. *muris*, *P. carinii* sp.f. *suis*, *P. carinii* sp.f. *oryctolagi*. Pour les 2 formes de *P. carinii* isolées du rat et identifiées par électrophorèse en champ pulsé, le *Pneumocystis* Workshop (1994) a proposé les dénominations suivantes : un prototype dénommé *P. carinii* sp.f. *carinii* et un variant dénommé *P. carinii* sp.f. *rattus*. L'application effective des 2 dernières appellations imposerait à tout chercheur travaillant sur *P. carinii* de rat d'avoir à disposition une technologie d'électrophorèse en champ pulsé pour typer les isolats et les désigner dans les termes de cette nomenclature. Cette obligation implicite apparaît peut être un peu prématurée, alors que le prototype et le variant de *P. carinii* de rat ne se différencient par aucun comportement épidémiologique, infectieux ou autre. Toutefois, si nous adoptons la nomenclature proposée, nous sommes en mesure de signaler que notre étude a porté sur des isolats de *P. carinii* sp.f. *muris* et *P. carinii* sp.f. *oryctolagi*. Par contre, en l'état actuel de notre travail, aucune des dénominations trinomiales proposées ne peut être attribuée, en rigueur, aux isolats de *P. carinii* de rat. Ceci explique, malgré l'intérêt pratique de cette nomenclature, qu'elle n'ait pas été employée dans notre étude.

#### **5-4 Exploration des mécanismes de la spécificité parasitaire de *P. carinii***

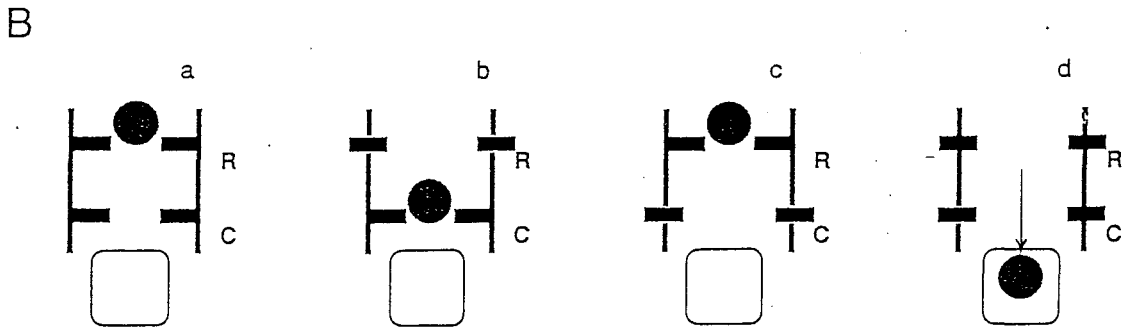
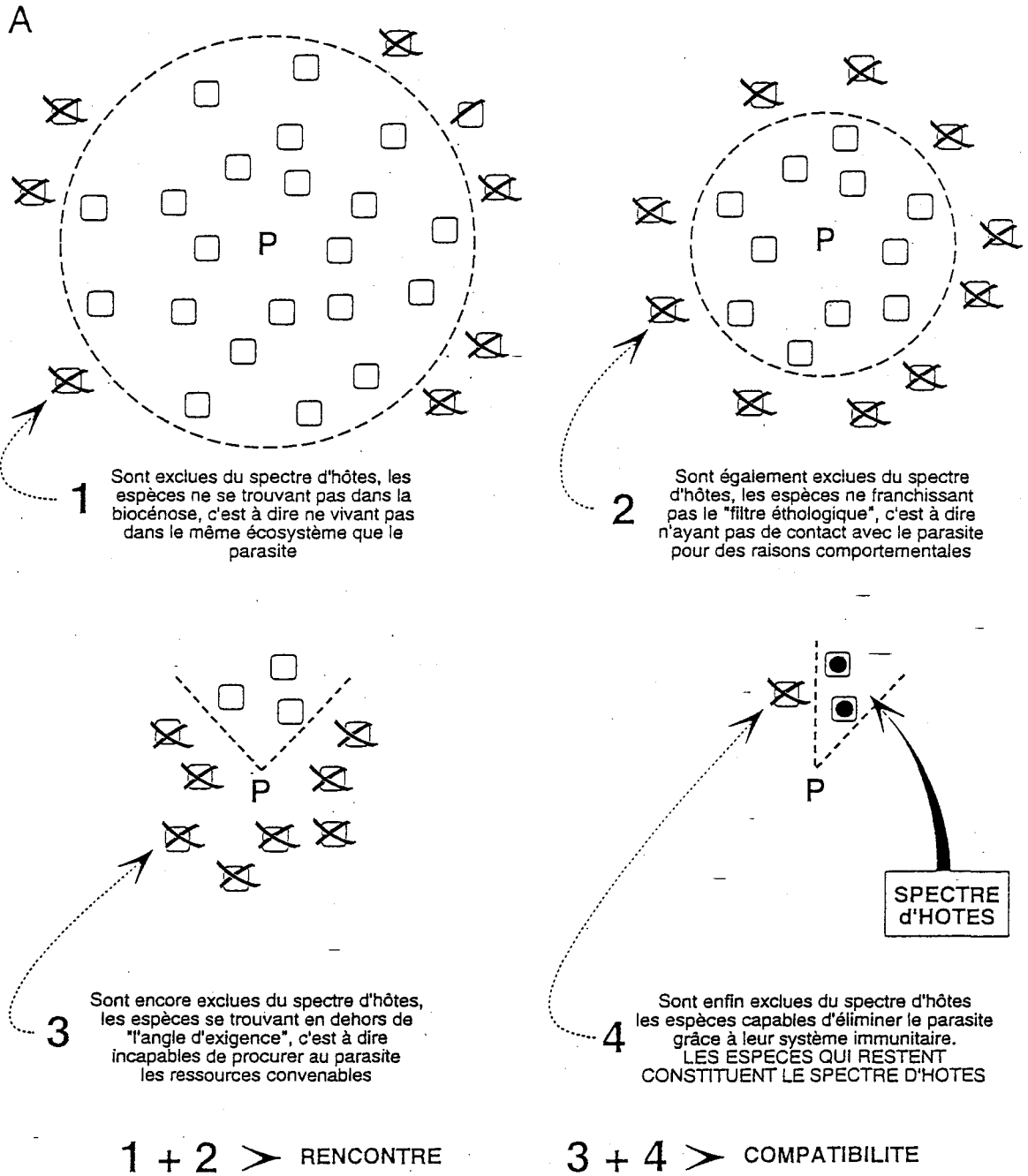
##### **5-4-1 Rôle de l'attachement dans la spécificité parasitaire**

L'attachement de *P. carinii* aux pneumocytes de type I semble être une phase essentielle au développement du parasite (Itatani et Marshall, 1988 ; Limper et Martin, 1990, Aliouat *et al.*, 1993b). Dans ce sens, nous nous sommes demandés si l'attachement des parasites à leur cellule cible conditionnait la spécificité parasitaire. Comme l'élimination des

parasites chez l'hôte non spécifique a lieu au bout de trois jours après l'inoculation, nous nous sommes intéressés aux phases précoces de l'infection. Ces dernières n'avaient jamais été étudiées chez *P. carinii*.

Nos résultats montrent que lorsque *P. carinii* est inoculé chez un hôte spécifique il établit des relations avec le pneumocyte de type I qui évoluent en deux temps : (i) d'abord *P. carinii* s'attache à la surface du pneumocyte de type I, grâce en partie à l'interaction privilégié MSG-Fn; (ii) il renforce ensuite son attachement en développant des filopodes qui pénètrent la cellule hôte en augmentant ainsi la surface de contact. Chez l'hôte spécifique ce dernier niveau d'interaction permettrait aux parasites d'établir des échanges nutritifs avec le pneumocyte de type I, ce qui conditionnerait sa prolifération ultérieure. A l'inverse, lorsque *P. carinii* est inoculé chez un hôte non spécifique, seul le premier temps de l'interaction a lieu. Par conséquent, l'impossibilité pour le parasite d'établir des échanges efficaces avec la cellule hôte, l'empêcherait de s'installer durablement dans le poumon et de s'y développer. De nouvelles expériences utilisant d'autres hôtes receveurs et d'autres souches de *P. carinii* permettraient d'élargir nos observations. En somme, nos résultats montrent que l'attachement de *P. carinii* au pneumocyte de type I est impliqué, au moins en partie, dans la spécificité parasitaire.

Etant donnée que des formes infectantes de *P. carinii* seraient présentes dans l'air (Wakefield, 1994; Barttlet *et al.*, 1994) les mammifères seraient largement exposés à l'infection par le parasite. Cependant, l'interaction durable entre l'hôte et *P. carinii* est conditionnée par l'état immunitaire du premier (Chen *et al.*, 1993), et par la spécificité parasitaire. Cette situation peut être exprimée, selon Combes (1994), en termes de filtres de "rencontre" et de "compatibilité". En effet, Euzet et Combes en 1980 ont proposé de symboliser par des filtres les mécanismes responsables de la spécificité parasitaire, c'est à dire, de la restriction du spectre d'hôtes (Figure 31A, empruntée à l'ouvrage de Combes, 1994). Ils distinguent 4 obstacles devant être franchis pour qu'un parasite vive dans une espèce-hôte: cohabiter (dimension écologique), rencontrer (dimension éthologique), accepter (dimension métabolique) et se faire accepter (dimension immunologique). Les deux premiers conditionnent la rencontre entre un "candidat-parasite" et un "candidat-hôte"; les deux derniers conditionnent la compatibilité entre ces deux partenaires potentiels. Il existe au total 4 combinaisons de filtres de rencontre (FR) et de compatibilité (FC). Elles apparaissent sur la



**Figure 31. A.** De l'écosystème au spectre d'hôte. **B.** Les 4 combinaisons fermeture/ouverture des filtres de rencontre (R) et de compatibilité (C) (R = filtre de rencontre ; C = filtre de compatibilité).

Figure 31B.

La rencontre entre *P. carinii* et ses hôtes potentiels est sûrement fréquente car le parasite semble présent dans l'air d'environnements très variés et la transmission est aérienne (FR ouvert). Cependant, chez l'hôte non spécifique le parasite ne parvient pas à se développer, à cause, au moins en partie, d'une interaction imparfaite avec l'épithélium alvéolaire. En effet, la deuxième phase de l'attachement n'a pas lieu (FC fermé). Cette phase semble ainsi critique à l'établissement d'une interaction durable entre *Pneumocystis* et son hôte et conditionne sûrement des échanges métaboliques essentiels au développement parasitaire.

#### 5-4-2 Spécificité parasitaire et co-infection

Dans un travail récent, Sethi (1992) inocule *P. carinii* d'origine humaine chez des souris SCID spontanément parasitées par *P. carinii* de souris et rapporte la prolifération du parasite humain. Soixante cinq jours après l'inoculation, il identifie à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de *P. carinii* de souris et d'homme, les populations parasitaires obtenues. Ces mêmes souris SCID développent simultanément une intense pneumocystose due à la réactivation de *P. carinii* de souris, présent avant l'inoculation des parasites humains. L'auteur propose la souris SCID comme un moyen pour isoler et entretenir *P. carinii* d'homme.

Ces résultats, apparemment contradictoires avec l'idée d'une forte spécificité parasitaire chez *P. carinii*, pourraient s'expliquer de la manière suivante : la prolifération de *P. carinii* de souris a pu provoquer des changements importants dans l'environnement pulmonaire, rendant l'hôte susceptible à une souche de *P. carinii* provenant d'un hôte non spécifique. Pour confirmer le résultat obtenu par Sethi (1992), nous avons entrepris la co-infection de souris SCID non-porteuses latentes de *P. carinii*, avec une suspension parasitaire contenant à la fois des parasites de rat et de souris. Toutes les souris SCID, celles inoculées avec *P. carinii* de souris ou avec *P. carinii* de souris et de rat, ont développé une pneumocystose d'intensité semblable. De plus, en utilisant nos sondes nucléiques spécifiques de *P. carinii* de rat et de souris, nous avons constaté que les souris co-infectées hébergeaient une population parasitaire homogène, en l'occurrence *P. carinii* de souris. Des travaux récents viennent conforter nos observations. Gigliotti *et al.* (1993) ont inoculé *P. carinii* de furet chez la souris SCID ayant déjà une pneumocystose évolutive. Aucun parasite de furet n'a été détecté 60 jours après

l'inoculation. Les auteurs ont utilisé deux moyens pour identifier chaque population parasitaire: (i) des anticorps monoclonaux spécifiques de *P. carinii* de souris et de furet ; (ii) une amplification par PCR d'un fragment du gène codant la MSG de *P. carinii* de furet (Gigliotti *et al.*, 1993). Ainsi, contrairement aux travaux de Sethi (1992), ces résultats indiquent que le développement de *P. carinii* chez un hôte spécifique ne rend pas possible la prolifération de parasites provenant d'un hôte non spécifique. Ceci confirme le sténoxénisme de *P. carinii*.

Bien entendu, l'hypothèse alternative pour expliquer les résultats rapportés par Sethi (1992) serait de soutenir que *P. carinii* d'origine humaine, contrairement aux parasites de rat et de furet, est euryxène. Pour tester cette hypothèse, il faut développer des expériences d'infection croisée en inoculant des parasites d'origine humaine chez des hôtes expérimentaux, tels que la souris SCID et le rat nude, non porteurs latents de *P. carinii*. Ces expériences apporteraient aussi des informations sur l'hypothèse encore controversée de l'existence d'un réservoir animal pour l'agent de la pneumocytose humaine.

#### 5-4-3 Rôle du surfactant dans l'infection de *P. carinii*

L'habitat de *P. carinii* est l'alvéole pulmonaire où il se trouve dans l'épaisseur de la couche de surfactant, plus précisément dans l'hypophase. De ce fait, de multiples interactions se sont développées entre le parasite et les composants du surfactant. Elles ont été analysées dans le chapitre 2-4-2-2. La pneumocystose humaine chez le patient VIH+ est précédée par des changements dans la composition du surfactant, notamment une chute du rapport PL/PT (Escamilla *et al.*, 1992). Elle s'aggrave au cours de la PPC. Cet effondrement du rapport PL/PT est dû à une diminution de la concentration en phospholipides et à une augmentation marquée de celle des protéines. Ces observations suggèrent que la composition du surfactant puisse être impliquée dans l'installation de *P. carinii* dans l'alvéole et dans son développement. Dans ce sens, nous avons voulu voir en utilisant nos modèles animaux si le surfactant avait une influence sur l'infectivité de *P. carinii*, ce qui laisserait présager une possible implication de ce milieu dans le phénomène de la spécificité parasitaire.

Nous avons suivi les modifications du surfactant dans deux modèles expérimentaux très différents de pneumocystose : l'un, le lapin, qui développe naturellement et spontanément une PPC au sevrage (Soulez *et al.*, 1989) ; l'autre, la souris SCID, qui développe une PPC après inoculation nasale de *P. carinii* (Aliouat *et al.*, 1993b). Dans ces deux modèles reproductibles,

l'évolution de la PPC a été bien caractérisée dans notre laboratoire et surtout, la prolifération parasitaire ne nécessite pas l'administration de corticoïdes. Ce dernier aspect est particulièrement important car les corticoïdes ont une influence marquée sur la composition du surfactant (Sheehan *et al.*, 1986; Deterding *et al.*, 1994 ; Kari *et al.*, 1994; Guo et Kaneshiro, 1995).

Chez le lapin, la pneumocystose spontanée se développe après le 21<sup>ème</sup> jour d'âge, atteint son maximum vers la fin du premier mois et guérit spontanément en 4 à 6 semaines (Figure 30). L'analyse des variations du rapport PL/PT, a montré que la pneumocystose spontanée du lapin est précédée d'une chute des deux composants, plus importante chez les protéines totales (environ 63%) que chez les phospholipides (environ 47%). Ces perturbations ont lieu avec un taux de parasitisme très faible, ce qui suggère l'existence d'une influence subtile et précoce de *P. carinii* sur la biosynthèse et la sécrétion du surfactant. L'analyse qualitative n'a pas décelé des variations significatives d'un phospholipide particulier, suggérant que les changements observés concernent les étapes précoces de la biosynthèse du surfactant. Puis, au cours de la PPC, les phospholipides restent sensiblement inchangés mais les protéines augmentent considérablement (environ 400%). L'augmentation de la concentration protéique est vraisemblablement associée à la progression du processus inflammatoire et à l'augmentation consécutive de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire (Walzer, 1994).

Chez la souris SCID, *P. carinii* se développe lentement jusqu'à environ 20 jours après l'inoculation des parasites. Puis, le taux de parasitisme augmente rapidement (Figure 30B). L'analyse du rapport PL/PT (Tableau 12) a montré que pendant les phases de développement lent du parasite, il existe une légère augmentation des phospholipides (environ 22%) associée à une chute importante des protéines totales (environ 56%). Puis, lors de la phase de prolifération rapide de *P. carinii*, a lieu une augmentation des phospholipides (environ 37%) associée à une augmentation très marquée des protéines (environ 500%). Comme au cours de la pneumocystose spontanée du lapin, les changements observés pendant les phases précoces de l'infection seraient dus à une influence du parasite sur la production du surfactant. L'augmentation marquée de la concentration en protéines observée plus tard serait liée au processus inflammatoire.

Chez l'homme et dans les 2 modèles animaux étudiés, la PPC est associée à des changements marqués du rapport PL/PT du surfactant. Dans les 3 cas, ces modifications



précèdent la survenue de la PPC. Puis, au cours de la pneumocystose des modifications plus drastiques du rapport sont observées. Les résultats de l'analyse du rapport PL/PT montrent cependant que les variations de ce dernier ne sont pas dues aux mêmes causes chez les 3 hôtes. Ainsi, chez l'homme et chez le lapin les phospholipides du surfactant ont tendance à diminuer dès la phase précoce de la pneumocystose. En revanche, chez la souris SCID, nous avons observé une augmentation de la concentration phospholipidique, qui est légère en début d'infection et qui devient significative dans la phase de prolifération rapide du parasite.

En somme, d'un point de vue physiopathologique, ce qui nous semble le plus intéressant dans ces observations est le fait que des perturbations importantes du surfactant ont lieu avant l'installation de la pneumocystose. Ce fait, suggère que la composition du surfactant joue un rôle déterminant dans la biologie de *P. carinii*. De plus, les modifications du surfactant sont importantes sur le plan pathogénique au point que la restauration de ses propriétés normales par l'administration de surfactant exogène, constituerait un traitement efficace contre les perturbations de la fonction respiratoire associées à la PPC (Eijking *et al.*, 1991).

Nous nous sommes, enfin, interrogés sur l'influence directe du surfactant sur le parasite. Dans les études réalisées *in vitro*, une inhibition marquée du développement parasitaire a été observée en présence de deux surfactants, artificiel (Surfexo<sup>o</sup>) et semi-naturel (Curosurf<sup>o</sup>) (Figure 29). Ces résultats doivent être interprétés avec prudence compte tenu des différences de microenvironnement imposées par le système de culture. Cependant ils pourraient suggérer que le développement parasitaire est inhibé en présence de surfactant fonctionnel et que la prolifération intense de *P. carinii* nécessite un surfactant modifié. De plus, les résultats obtenus *in vitro* seraient en accord avec deux observations. D'une part, la lenteur relative de *P. carinii* pour se développer chez la souris SCID (Figure 22), un hôte fortement immunodéprimé. Elle suggère que le premier objectif du parasite est de transformer le microenvironnement alvéolaire, notamment le surfactant, pour l'adapter à ses propres besoins. D'autre part, les résultats rapportés par Eijking *et al.* (1991), que nous venons de citer, pourraient également s'expliquer par un effet anti-*Pneumocystis* du surfactant.

Nos travaux ont montré l'importance des variations de la composition du surfactant au cours de la pneumocystose. Le surfactant est-il concerné dans la spécificité parasitaire ? La réponse à cette question nécessite encore de nouveaux modèles permettant d'induire des altérations durables de la composition du surfactant chez un hôte non spécifique. La clairance

parasitaire ou l'éventuel développement du parasite pourraient alors être étudiés dans ce microenvironnement alvéolaire modifié.

### 5-5 Conclusion

Dans ce travail nous apportons des évidences indéniables indiquant que la biodiversité génomique et isoenzymatique de *Pneumocystis* s'exprime sur la plan de l'infectivité et de la spécificité parasitaire. Nos résultats montrent que la variabilité génétique mise en évidence dans notre laboratoire et dans d'autres centres est en grande partie fonction de l'espèce de l'hôte et témoigne de l'existence de souches parasitaires très inféodées aux espèces-hôtes et d'une spécificité parasitaire étroite.

Pour parvenir à ces résultats nous avons développé des modèles *in vitro* et *in vivo* originaux qui se sont avérés utiles pour d'autres programmes de recherche de notre groupe mais aussi pour d'autres équipes européennes. Nous avons développé des modèles *in vitro*, lors de notre travail de DEA, pour étudier en détail l'attachement du parasite. Ces modèles ont été améliorés considérablement lors de notre travail de thèse en utilisant des cellules épithéliales alvéolaires, qui nous ont permis d'une part d'étudier l'attachement parasitaire dans de meilleures conditions et d'autre part de construire un modèle de culture permettant de produire en quantités importantes des parasites purs, viables et infectieux. Les modèles *in vivo*, la souris SCID instillée par voie nasale et le rat nude inoculé par voie trachéale, nous permettent d'obtenir dans des délais relativement courts des infections intenses et reproductibles. Ces modèles, se sont avérés bien adaptés aux expériences d'infection croisée, qui ont été essentielles pour montrer que *P. carinii* est un parasite sténoxène. Ces observations ont un impact considérable sur la taxonomie de *P. carinii* et sur l'épidémiologie de la pneumocystose.

Dans la dernière partie de notre travail nous nous sommes interrogés sur les mécanismes de la spécificité parasitaire de *Pneumocystis*. L'absence de développement de *P. carinii* chez l'hôte non spécifique serait liée à son incapacité à s'attacher durablement aux pneumocytes de type I et à établir des échanges métaboliques efficaces avec l'épithélium alvéolaire. Dans nos conditions de travail, la co-infection avec deux souches de *P. carinii*, ne permet pas au parasite de s'installer chez un hôte non spécifique. Enfin, la composition du surfactant subit des variations marquées au cours de la pneumocystose. Elles surviennent dans

---

les phases précoces du développement de l'infection et pourraient affecter l'infectivité du parasite et jouer un rôle dans la spécificité parasitaire.

## **6- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## 6- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abd A.G., Nierman D.M., Ilowite J.S., Pierson R.N., Loomis A.L. 1988. Bilateral upper lobe *Pneumocystis carinii* pneumonia in a patient receiving inhaled pentamidine prophylaxis. *Chest*. 94 : 329-331.

Akono Z., Palluault F. 1994. *Pneumocystis carinii* Delanoë et Delanoë, 1912 agent d'une maladie en extension : la pneumocystose. *L'Année Biologique* 33 : 81-111.

Albelda S.M., Buck C.A. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules; *FASEB J.* 4 : 2868-2880.

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

Aliouat E.M., Dei-Cas E., Ouaisi A., Palluault F., Soulez B., Camus D. 1993b. *In vitro* attachment of *Pneumocystis carinii* from mouse and rat origin. *Biol. Cell.* 77 : 209-217.

Aliouat E.M., Mazars E., Dei-Cas E., Delcourt P., Billault P., Camus D. 1994. *Pneumocystis* Cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient hosts, showed strong host-species specificity. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 71S.

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

Andrews R.P., Theus S.A., Cushion M.T., Walzer P.D. 1994. Comparison of the antigenic recognition of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* isolated from different rat strains. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 72S.

Armstrong M., Richard F.F. 1989. Propagation and purification of rat *Pneumocystis carinii* in short-term cell culture. *J. Protozool.* 36 : 24S-27S.

Armstrong M., Smith A.L., Richards F.F. 1991. Common viral infections may modify the development of *Pneumocystis carinii* in the rat model. *J. Protozool.* 38 : 136S-137S.

Armstrong M., Cushion M.T. 1994a. in : *Pneumocystis carinii* pneumonia. ed. Walzer P.D. Dekker Inc, New York.

Armstrong M., Cushion M.T. 1994b. *In vitro* cultivation. In *Pneumocystis carinii* pneumonia. Second Edition, Revised and Expanded, Lung Biology in Health and Disease, Walzer P.D. 69 : 3-24.

Atzori C., Bruno A., Chichino G., Gatti S., Scaglia M. 1993. *Pneumocystis carinii* pneumonia and tuberculosis in Tanzanian patients infected with HIV. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87 : 55-56.

Bartlett M.S., Fishman J.A., Queener S.F., Durkin M.M., Jay M.A., Smith W. 1988. New rat model of *Pneumocystis* infection. *Journal of Clinical Microbiology* 26 : 1100-1102.

Bartlett M.S., Lee C., Lu J., Bauer N., Bettz J.F., McLaughlin G.L., Smith J.W. 1994. *Pneumocystis carinii* detected in air. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 75S.

Bauch R., Ladstätter L. 1953. *Pneumocystis carinii* und interstitielle plasma cellulär pneumonie der frühgeburten. *Klin. Wchnschr.* 31 : 900-902.

Bauer N.L., Paulsrud J.R., Bartlett M.S., Smith J.W., Wilde C.E. 1993. *Pneumocystis carinii* organisms obtained from rats, ferrets and mice are antigenically different. *Infect. Immun.* 61 : 1315-1319.

Bennet C.L., Gertler P., Guze P.A., Garfinkle J.B., Kanouse D.E., Greefield S. 1990. The relation between resource use and in-hospital mortality for patients with acquired immunodeficiency syndrome-related *Pneumocystis*



*carinii* pneumonia. Arch. Intern. Med. 150 : 1447-1453.

**Berkner K.L.**, Folk W.R. 1977. Polynucleotide kinase exchange reaction. Quantitative assay for restriction endonuclease-generated 5'-phosphoryl termini in DNAs. J. Biol. Chem. 252 : 3176.

**Bernard E.M.**, Pagel L., Schmitt H.J. 1987. Clinical trials with aerosol pentamidine for prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Clin. Res. 35 : 468A.

**Bernard E.M.**, Schmitt H.J., Lifton. A. 1988. Prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia with aerosol pentamidine. IV International Conference on AIDS. Stockholm 1 : 420.

**Biermengrader A.** 1953. Beitrag zur enzephalitis bei fruhkindlicher interstitieller pneumonie. Zentralbl. Allg. Pathol. 89 : 287-288.

**Bille-Hansen V.**, Jorsal S.E., Henriksen S.A., Settnes O.P. 1990. *Pneumocystis carinii* pneumoniae in Danish piglets. Vet. Rec. 127 : 407-408.

**Blaser M.G.**, Cohn D.L. 1984. Opportunistic infections in patients with AIDS : clues to the epidemiology of AIDS and the relative virulence of pathogens. Rev. Infect. Dis. 8 : 21-30.

**Bligh E.G.**, Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37 : 911-7.

**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.** 1966. *Pneumocystis carinii* in plasma-cell pneumonia. Pediatr. Dig. 4 : 71.

**Bornstein R.**, Yarbo J.N. 1970. An evaluation of the mechanism of action of pentamidine isethionate. J. Surg. Oncol. 2 : 393-398.

**Bosma G.C.**, Custer R.P., Bosma M.J. 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature 301.

**Böttcher C.J.F.**, van Gent C.M., Pries C. 1961. A rapid and sensitive submicro phosphorus determination. Annal. Chim. Acta., 24 : 203-204.

**Burns S.M.**, Read J.A., Yap P.L., Brettle R.P. 1990. Reduced concentrations of IgG antibodies to *Pneumocystis carinii* in HIV-infected patients during active *Pneumocystis carinii* infection and the possibility of passive immunisation. J. Infect. 20 : 33-39.

**Chagas C.** 1909. Nova tripanomiazaea humana. Ueber eine neue trypanosomiasis de menschen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1 : 159.

**Chave J.P.**, David S., Wauters J.P., Van Melle G., Francioli P. 1991. Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients : a cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. AIDS. 5 : 927-932.

**Chalvardjian A.M.**, Grawe L.A. 1963. A new procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cysts in tissue sections and smears. J. Clin. Pathol. 16 : 383-384.

**Campbell W.** 1972. Ultrastructure of *Pneumocystis carinii* in human lung : life cycle in human pneumocystosis. Arch. Pathol. 93 : 312-324.

**Carini A.** 1910. Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisii*. Arch. Soc. Med. Ci. Sao Paulo. August 16.



- Carme B.**, Mboussa J., Andzin M., Mbouni E., Mpele P., Datry A. 1991. *Pneumocystis carinii* is rare in AIDS in Central Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85 : 80.
- Carter T.R.**, Cooper P.H., Petri W.A., Kim C.K., Walzer P.D., Guerrant R.L. 1988. *Pneumocystis carinii* infection of the small intestine in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *AJCP.* 89 : 679-683.
- Céré N.**, Drouet-Viard F., Dei-Cas E., Aliouat E.M., Chanteloup N., Mazars E., Coudert P. 1995. Studies of spontaneous *Pneumocystis carinii* primary infection of the rabbit : congenital transmission. *J. Infect. Dis.* 171 : 100-104.
- Chen W.**, Gigliotti F., Harmsen A. 1993. Latency is not inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* 61 : 5406-5409.
- Claypool W.**, Wang D., Chander A., Fisher A. 1984. "Hydrophobic" surfactant apoproteins and augmentation of phospholipid recycling. *Exp. Lung Res.* 6 : 215-222.
- Clumeck N.**, Sonnet G., Taelman H., Mascart-Lemon F., De Bruyere M., Vandepierre P., Dasnoy G., Margelis L., Lamy M., Jonas C., Eyckmans L., Noel H., Vanhaeverbeek M., Butzler J.P. 1984. Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. *New Engl. Med. J.* 310 : 492-497.
- Cohen O.J.**, Stoeckle M.Y. 1991. Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Intern. Med.* 151 : 1205-1214.
- Combes C.** 1995. Interactions durables. Ecologie et évolution du parasitisme. Masson, collection écologie, 26, chapitre 2.
- Conte J.E.**, Hollander H., Golden J.A. 1987. Inhaled or reduced-dose intravenous pentamidine for *Pneumocystis carinii* pneumonia. A pilot study. *Ann. Intern. Med.* 107 : 495-498.
- Corsini E.**, Dyskstra C., Craig W.A., Tidwell R.R., Rosenthal G.J. 1992. *Pneumocystis carinii* induction of tumor necrosis factor-alpha by alveolar macrophages : modulation by pentamidine isethionate. *Immunol. Lett.* 34 : 303-308.
- Coulman C.U.**, Greene I., Archibald W.R. 1987. Cutaneous pneumocystosis. *Ann. Intern. Med.* 106 : 396-398.
- Csillag A.**, Brandstein L. 1954. The role of *Blastomyces* species in the etiology of interstitial plasmocytic pneumonia of the premature infant. *Acta Microb. Hung.* 1 : 179-190.
- Csillag A.** 1955. Contribution to the taxonomical classification of the so-called *Pneumocystis carinii*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 1 : 1-8.
- Cushion M.T.**, Walzer P.D. 1984. Growth and serial passage of *Pneumocystis carinii* in the A549 cell line. *Infect. Immun.* 44 : 245-251.
- Cushion M.T.**, Ruffolo J.J., Linke M.J., Walzer P.D. 1985. *Pneumocystis carinii* : growth variables and estimates in the A549 and WI-38VA13 human cell lines. *Exp. Parasitol.* 60 : 43-54.
- Cushion M.T.**, DeStefano J.A., Walzer P.D. 1988. *Pneumocystis carinii* : surface reactive carbohydrates detected by lectine probes. *Exp. Parasitol.* 67 : 137-147.
- Cushion M.T.** 1989. *In vitro* studies of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* 36: 45-52.
- Cushion M.T.**, Ebbets D. 1990. Growth and metabolism of *Pneumocystis carinii* in axenic culture. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 1385-1394.
- Cushion M.T.**, Zhang J., Kaselis M., Giuntoli D., Stringer S.L., Stronger J.R. 1993a. Evidence of two genetic variants of *Pneumocystis carinii* coinfecting laboratory rats. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 1217-1223.



- Cushion M.T.**, Kaselis M., Stringer S.L., Stronger J.R. 1993b. Genetic stability and diversity of *Pneumocystis carinii* infecting rat colonies. *J. Clin. Microbiol.* 61 : 4801-4813.
- Dei-Cas E.**, Soulez B., Camus D. 1989. Ultrastructural study of *Pneumocystis carinii* in explant cultures of rabbit lung and in 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 le biologiste. *m/s* 6 : 517-525.
- Dei-Cas E.**, Jackson H., Palluault F., Aliouat E.M., 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.**, Cailliez J.C., Palluault F., Aliouat E.M., Mazars E., Soulez B., Suppin J., Camus D. 1992. Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent ? *Eur. J. Epidemiol.* 8 : 460-470.
- Dei-Cas E.**, Aliouat E.M., Mazars E., Séguy N., Durand I., Caillez J.C., Camus D. 1993. Les différents stades parasitaires de *Pneumocystis carinii*. The different life cycle parasite stage of *Pneumocystis carinii*. Plaquette pédagogique publiée par Réactifs R.A.L. S.A.
- Dei-Cas E.**, Mazars E., Ödberg-Ferragut C., Durant I., Aliouat E.M., Dridba M., Palluault F., Caillez J.C., Séguy N., Tibayrenc M., Mullet C., Creuzy C., Camus D. 1994. Ultrastructural, genomic, isoenzymatic and biological features make it possible to distinguish rabbit *Pneumocystis* from other mammal *Pneumocystis* strains. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 84S.
- Dei-Cas E.**, Mazars E., Aliouat E.M., Ödberg-Ferragut C., Durand I., Denis C.M., Camus D. 1995. Infectious sources, reservoir and transmission of pneumocystosis. in : *Parasitology for the 21st Century : ICOPA VIII*, Ozel and Alkan (eds), CAB International, Oxford, 175-186.
- Delanoë P.**, Delanoë M. 1912. Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec *Trypanosoma lewisi*. *CR. Acad. Sci. (Paris)*. 155 : 658-660.
- Dembinski A.S.**, Smith D.M., Goldsmith J.C., Woods G.L. 1991. Widespread dissemination of *Pneumocystis carinii* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome receiving long-term treatment with aerosolized pentamidine. *Am. J. Clin. Pathol.* 95 : 96-100.
- Denisot B.A.**, Tchoreloff P.C., Bonanno L.M., Proust J.E., Lindenbaum A., Dehan M., Puisieux F. 1991. Les mécanismes tensio-actifs à la surface des alvéoles pulmonaire. *m/s* 7 : 37-42.
- Deschryver-Kecskemeti**, Bancroft G.J., Bosma G.C., Bosma M.J., Unanue E.R. 1988. Pathology of *Listeria* infection in murine severe combined immunodeficiency. A study by immunohistochemistry and electron microscopy. *Lab. invest.* 58 : 698.
- DeStefano 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.
- DeStefano J.A.**, Cushion M.T., Puvanesarajah V., Walzer P.D. 1990b. Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. II. Sugar composition. *J. Protozool.* 37 : 436-441.
- Deterding R.R.**, Shimizu H., Fisher J.H., Shannon J.M. 1994. Regulation of surfactant protein D expression by glucocorticoids *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 10 : 30-37.
- Dowing J.F.**, Pasula R.P., Wright J.R., Twigg III H.L., Martin II W.J. 1995. Surfactant protein A promotes attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 4848-4852.



- Drake S.**, Lampasona V., Nicks H.L., Schwarzman S.W. 1985. Pentamidine isethionate in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Clin. Pharm. 4 : 507-516.
- Durkin M.M.**, Shaw M.M., Bartlett M.S., Smith J.W. 1991. Culture and filtration methods for obtaining *Pneumocystis carinii* trophozoites and cyst. J. Protozool. 38 : 210S-212S.
- Dyer M.**, Volpe J., Delves C.J., Somia N., Burns S., Scaife J.G. 1992. Cloning and sequence of a B-tubulin cDNA from *Pneumocystis carinii* : possible implications for drug therapy. Mol. Microbiol. 6 : 991-1001.
- Edman J.C.**, Kovacs J.A., Masur H., Santi D.V., Elwood H.J., Sogin M.L. 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature. 334 : 519-522.
- Edman U.**, Edman J.C., Lungren B., Santi D.V. 1989b. Isolation and Expression of the *Pneumocystis carinii* Thymidylate synthase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 86 : 6503-6507.
- Edman J.C.**, Edman U., Cao M., Lundgren B., Kovacs J.A., Santi D.V. 1989c. Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 : 8625-8629.
- Edman J.C.**, Sogin M.L. 1994. in : *Pneumocystis carinii* pneumonia. ed. Walzer P.D. Dekker Inc, New York.
- Eijking E.P.**, van Daal G.J., Tenbrinck R., Luijendijk A., Sluiter J.F., Hannappel E., Lachmann B. 1991. Effect of surfactant replacement on *Pneumocystis carinii* pneumonia in rats. Intensive Care Med. 17 : 475-478.
- Elvin K.M.**, Lumbwe C.M., Luo N.P., Bjorkman A., Kallenius C., Linder E. 1989. *Pneumocystis carinii* is not a major cause of pneumonia in HIV-infected patients in Lusaka, Zambia. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 83 : 553-555.
- 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.
- Eshdat Y.**, Silverblatt F., Sharon N. 1981. Dissociation and reassembly of *Escherichia coli* type I pili. J. Bacteriol. 148 : 308-314.
- Escamilla R.**, Prevost M.C., Hermant C., Caratero A., Cariven C., Krempf M. 1992. Surfactant analysis during *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. Chest. 101 : 1558-1562.
- Escamilla A.**, Prévost M.C., Cariven C., Hermant C., Krempf M., Chap H. 1993. Bronchoalveolar lavage phospholipid abnormalities in HIV-infected patients. Eur. Resp. J. 6 : 1301-1307.
- Euzet L.**, Combes C. 1980. les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. Mémoire de la Société Zoologique de France. 40 : 239-285.
- Ezekovitz R.A.B.**, Williams D.J., Koziel H., Armstrong M.Y.K., Warner A., Richards F.F., Rose R.M. 1991. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. Nature 351 : 155-158.
- Farinotti R.**, Girard P.M. 1989. L'iséthionate de pentamidine : propriétés pharmacocinétiques et utilisation dans le traitement et la prévention de la pneumocystose. J. Pharm. Clin. 8 : 185-198.
- Farthing M.J.G.**, Pereira M.E., Keusch G.T. 1986. Description and characterization of a surface lectin from *Giardia Lamblia*. Infect. Immun. 5 : 661-667.
- Fisher D.J.**, Gigliotti F., Zauderer M., Harmsen A.G. 1991. Specific T-cell response to a *Pneumocystis carinii* surface glycoprotein (gp120) after immunization and natural infection. Infect. Immun. 59 : 3372-3376.
- Fishman J.A.**, Armstrong M.Y., Richards F.F. 1989. Organization of DNA and RNA from rat *Pneumocystis carinii*.



J. Protozool. 36 : 4S-5S.

**Frenkel J.K.**, Good J.T., Schultz J. 1966. Latent *Pneumocystis* infection of rats, relapse and chemotherapy. Lab. Invest. 15 : 1559-1577.

**Frenkel J.K.** 1976. *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from Man : Morphology, Physiology, and Immunology in Relation to Pathology. Natl. Cancer Inst. Monogr. 43 : 13-27.

**Frenkel J.K.**, Bartlett M.S., Smith J.W. 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.

**Furuta T.**, Ueda K. 1987. Intra- and Inter-Species Transmission and Antigenic Difference of *Pneumocystis carinii* Derived from Rat and Mouse. Jpn. J. Exp. Med. 57 : 11-17.

**Furuta T.**, Fujita M., Mukai R., Sakakibara I., Sata T., Miki K., Hayami M., Kojima S., Yoshikawa Y. 1993. Severe pulmonary pneumocystosis in simian acquired immunodeficiency syndrome induced by simian immunodeficiency virus : its characterization by the polymerase-chain-reaction method and failure of experimental transmission to immunodeficient animals. Parasitol. Res. 79 : 624-628.

**Gajdusek D.C.** 1957. *Pneumocystis carinii*-etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of young and premature infants. Pediatrics. 19 : 543.

**Garbe T.R.**, Stringer J.R. 1994. Molecular characterization of clustered variants of genes encoding major surface antigens of human *Pneumocystis carinii*. Infect. Immun. 62 : 3092-3101.

**Garret C.E.**, Coderre J.A., Meek T.D., Garvey E.P., Claman D.M., Beverly S.M., Santi D.V. 1984. A bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. Mol. Biochem. Parasitol. 11 : 257-265.

**Giese W.** 1953. Pathogenese und atologie der interstitiellen plasmagellularen sauglines pneumonie. Centralbl. Allg. Pathol. 90 : 54.

**Gigliotti F.**, Ballou L.R., Hughes W.T., Mosley B.D. 1988a. Purification and characterization of a ferret *Pneumocystis carinii* surface antigen. J. Infect. Dis. 158 : 848-854.

**Gigliotti F.**, Hughes W.T. 1988b. Passive immunoprophylaxis with specific monoclonal antibody confers partial protection against *Pneumocystis carinii* pneumonitis in animal models. J. Clin. Invest. 81 : 1666-1668.

**Gigliotti F.** 1992. Host species-specific antigenic variation of a mannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. J. Infect. Dis. 165 : 329-336.

**Gigliotti F.**, Harsen A.G., Haidaris C.G., Haidaris P. 1993. *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. Infect. Immun. 61 : 2886-2890.

**Golden J.A.**, Chernoff D., Hollander H., Feigal., Conte J.E. 1989. Prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia by inhaled pentamidine. Lancet. 1 : 654-657.

**Goldstein J.L.**, Newbury D.E., Echlin P., Joy D.C., Fiori C., Lifshin E. 1981. Scanning electron microscopy and X-Ray microanalysis. Plenum Press. New York and London., 525-29.

**Goodman L.S.**, Gilman A.G. 1973. The pharmacological basis of therapeutics. 3rd ed., Macmillan, New York.

**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.A., Downs T.D., Ivey M.H. 1986b. Analyses of rat *Pneumocystis carinii* recognized by human and rat antibodies using Western immunoblotting. *Infect. Immun.* 54 : 96-103

**Graves D.** 1989. Immunological studies of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* 36 : 60-69.

**Griffin L.**, Lucas S. 1982. Does *Pneumocystis carinii* exist in Kenya ? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76 : 198-199.

**Guo Z.**, Kaneshiro E.S. 1995. Phospholipid composition of *Pneumocystis carinii* and effects of methylprednisolone immunosuppression on rat lung lipids. *Infect. Immun.* 63 : 1286-1290.

**Gutteridge W.E.** 1967. Further investigations of the mode of action of pentamidine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61 : 136.

**Hagler D.N.** 1987. Kim C.K., Walzer P.D. Feline leukemia virus and *Pneumocystis carinii* infection. *J. Parasitol.* 73 : 1284-1286.

**Haidaris P.J.**, Wright T.W., Gigliotti F., Haidaris C.G. 1992. Expression and characterization of a cDNA clone encoding an immunodominant surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* 166 : 1113-1123.

**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.

**Hardy W.D.**, Feinberg G., Finkelstein D.M. 1992. A controlled trial of trimethoprim-sulfamethoxazole or aerosolized pentamidine for secondary prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 327 : 1842-1848.

**Harmsen A.G.**, Stankiewicz M. 1990. Requirement of CD4+ cells in resistance to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J. Exp. Med.* 172 : 937-945.

**Hawgood S.**, Poulain F., Ogawa A., Yukitake K. 1994. Surfactant protein A : Structure and fonction. *Prog. Respir. Res.* 27 : 1-7.

**Hendley J.O.**, Weller T.H. 1971. Activation and transmission in rats of infection with *Pneumocystis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137 : 1401.

**Hernand N.**, Lamouret M. 1992. Observations sur la pneumocystose murine extrapulmonaire. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Lille.

**Hoepelman A.I.M.**, Tuomanen E.I. 1992. Consequences of microbial attachment : directing host cell functions with adhesins. *Infect. Immun.* 60 : 1729-1733.

**Hoffman A.G.D.**, Marion G., Lawrence M.S., Ognibene F.P., Sffredini A.F., Lipschik G.Y., Kovacs J.A., Masur H., Shelhamer J.H. 1992. Reduction of pulmonary surfactant in patients with human immunodeficiency virus infection and *Pneumocystis carinii* pneumonia. *CHEST* 102 : 1730-1736.

**Hong S.T.**, Steele P.E., Cushion M.T., Walzer P.D., Stringer S.L., Stringer J.R. 1990. *Pneumocystis carinii* Karyotypes. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 1785-1795.

**Hoover D.**, Saah J., Bacellar H., Phair J., Detels R., Anderson R., Kaslow R. 1993. Clinical manifestations of AIDS



in the era of *Pneumocystis* prophylaxis. *New Engl. J. Med.* 329 : 1922-1926.

**Hughes W.T.**, McNabb P.C., Markres T.D. 1974. Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5 : 289.

**Hughes W.T.**, Feldman S., Chaudhary S.C. 1978. Comparison of pentamidine isethionate and trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Pediatr.* 92 : 285-291.

**Hughes W.T.** 1982a. Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. *J. infect. Dis.* 145: 842.

**Hughes W.T.** 1982b. Comparison of cyclosporin and dexamethasone to induce pneumocystosis in rats. *J. Infect. Dis.* 145 : 767.

**Hughes W.T.** 1987. *Pneumocystis carinii* Pneumonitis. CRC Press Inc. Boca Raton.

**Hughes W.T.** 1989a. *Pneumocystis carinii* : taxing taxonomy. *Eur. J. Epidemiol.* 5 : 265-269.

**Hughes W.T.** 1989b. Animal models for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Protozool.* 36 : 41-45.

**Hughes W.T.** 1991a. Closing comments : *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* 38 : 243S.

**Hynes R.O.** 1987. Integrins : a family of cell surface receptors. *Cell.*, 48 : 549-554.

**Inber M.S.**, Pizzo S.V., Johnson W.S., Adams D.O. 1982. Selective diminution of the binding of mannose by murine macrophages in the late stages of activation. *J. Biol. Chem.* 5129-5135.

**Itatani C.A.**, Marshall J. 1988. Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* *in situ* and from bronchoalveolar lavage. *J. Parasit.* 74 : 700-712.

**Ivady G.**, Paldy L. 1958. Ein neues Behandlungsverfahren der interstitiellen plasmazelligen Pneumonie Frühgeborener mit fünfwertigen Stibium und aromatischen Diamidinen. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 106 : 10.

**Ivanetich K.M.**, Santi D.V. 1990. Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase in Protozoa. *Exp. Parasitol.* 70: 367-371.

**Jackson H.**, Colthurst D., Hancock V., Marriot M., Tuite M. 1991a. No detection of characteristic fungal protein elongation factor EF-3 in *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* 163 : 675-677.

**Jimenez-Lucho V.**, Ginsburg V., Krivan H.C. 1990. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal $\beta$ <sub>1</sub> - 4G1c $\beta$ <sub>1</sub>-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts. *Infect. Immun.* 58 : 2085-2090.

**Johanson J.**, Curstedt T., Robertson B. 1994. The proteins of the surfactant system. *Eur. Respir. J.* 7 : 372-391.

**Kaneshiro E.S.**, Ellis J.E., Zhou L.H., Rudney H., Gupta A., Jayasimhulu K., Setchell K.D., Beach D.H. 1994. Isoprenoid Metabolism in *Pneumocystis carinii*. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 93S.

**Kari M.A.**, Raivio K.O., Venge P., Hallman M. 1994. Dexamethasone treatment of infants at risk for chronic lung disease : surfactant components and inflammatory parameters in airway specimen. *Pediatric Research* 36 : 387-393.

**Kernbaum S.**, Masliah J., Alcindor L., Bouton C., Christol D. 1983. Phospholipase activities of bronchoalveolar lavage fluid in rat *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Brit. J. Exp. Pathol.* 64 : 75-80.

**King R.J.** 1985. Composition and metabolism of the apolipoproteins of pulmonary surfactant. *Ann. Rev. Physiol.*



775-788.

**Kitada K.**, Oka S., Kimura S., Shimada K., Serikawa T., Yamada J., Tsunoo H., Egawa K., Nakamura Y. 1991. Detection of *Pneumocystis carinii* Sequences by Polymerase Chain Reaction : Animal Models and Clinical Application to Noninvasive Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1985-1990.

**Klotz S.A.**, Smith R.L. 1991. A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J. I. D.* 163 : 604-610.

**Kovacs J.A.**, Halpern J.L., Swan J.C., Moss J., Parrillo J.E., Masur H. 1988a. Identification of antigens and antibodies specific for *Pneumocystis carinii*. *J. Immun.* 140 : 2023-2031.

**Kovacs J.A.**, Masur H. 1989a. *Pneumocystis carinii* pneumonia : therapy and prophylaxis. *J. Infect. Dis.* 158 : 254-259.

**Kovacs J.A.**, Halpern J.L., Lundgren B., Swan J.C., Parrillo J.E., Masur H. 1989b. Monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii* : Identification of specific antigens and characterization of antigenic differences between rat and human isolates. *J. Infect. Dis.* 159 : 60-70.

**Kovacs J.**, Allegra C., Beaver J., Boarman D., Lewis M., Parrillo J., Chabner B., Masur H. 1989c. Characterization of *de novo* folate synthesis in *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* : Potential for screen therapeutic agents. *J. Infect. Dis.* 160 : 312-320.

**Kovacs J.A.**, Powell F., Edman J.C., Lundgren B., Martinez A., Drew B., Angus C.W. 1993. Multiple genes encode the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J. Biol. Chemis.* 268 : 6034-6040.

**Lacaze-Masmonteil T.** 1992. Le surfactant pulmonaire : relation structure-fonction. *Arch. Fr. Pediatr.* 49 : 227-239.

**Latorre C.R.**, Sulzer A.J., Norman L.G. 1977. Serial propagation of *Pneumocystis carinii* in cell line cultures. *Applied and Environmental Microbiology.* 33 : 1204-1206.

**Lee C.**, Lu J., Bartlett M.S., Durkin M.M., Liu T., Wang J., Jiang B., Smith J.W. 1993. Nucleotide sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 754-757.

**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.

**Leigh T.R.**, Gazzard B.G., Rowbottom A., Collins J.V. 1993. Quantitative and qualitative comparison of DNA amplification by PCR with immunofluorescence staining for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Clin. Pathol.* 46 : 140-144.

**Limper A. H.**, Martin W.J. 1990. *Pneumocystis carinii*: inhibition of lung cell growth mediated by parasite attachment. *J. Clin. Invest.* 85 : 391-396.

**Limper A.H.**, Standing J.E., Hoffman O.A., Castro M., Neese L.W. 1993. Vitronectin binds to *Pneumocystis carinii* and mediates organism attachment to cultured lung epithelial cells. *Infect. Immun.* 61 : 4302-4309.

**Limper A.H.** 1995. Adhesive glycoproteins in the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia : host defense or microbial offense ? *J. Lab. Clin. Med.* 125 : 13-14.

**Linke M.J.**, Cushion M.T., Walzer P.D. 1989. Properties of the Major Antigens of Rat and Human *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* 57 : 1547-1555.

**Liu Y.**, Leibowitz M.J. 1993. Variation and in vitro splicing of group I intron in rRNA genes of *Pneumocystis*



*carinii*. Nucleic Acids Res. 21 : 2415-2421.

Liu Y., Rocourt M., Pan S., Liu C., Leibowitz M.J. 1992. Sequence and variability of the 5.8S and 26SrRNA genes of *Pneumocystis carinii*. Nucleic Acids Res. 20 : 3763-3772.

Long E.G., Smith J.S., Meier J.L. 1984. Attachment of *Pneumocystis carinii* to rat pneumocytes. Lab Invest. 54: 609-615.

Lowrie R., Yorke W. 1939. Studies in chemotherapy XXI. The trypanocidal action of certain aromatic diamidines. Ann. Trop. Med. Parasitol. 33 : 289-304.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Proteine measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-75

Lu J., Bartlett M.S., Shaw M.M., Smith J.W., Lee C. 1994. Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. J. Euk. Microbiol. 41 : 102S.

Luchon L., Couderc L.J., Stern M., Friard S., Caubarrere I. 1994. Pneumocystoses pulmonaires révélant l'infection VIH. Press. Med. 20 : 951.

Lucas S., Goodgame R., Kocjan G., Serwada D. 1989. Absence of pneumocystosis in Ugandan AIDS patients. AIDS. 3 : 47-48.

Lundgren B., Cotton R., Lundgren J.D., Edman J.C., Kovacs J.A. 1990. Identification of *Pneumocystis carinii* Chromosomes and Mapping of Five Genes. Infect. Immun. 58 : 1705-1710.

Lundgren B., Lipschick G.Y., Kovacs J.A. 1991. Purification and characterization of a major human *Pneumocystis carinii* surface antigen. J. Clin. Invest. 87 : 163-170.

Lundgren B., Kovacs J.A., Nelson N.N. 1992. *Pneumocystis carinii* and specific fungi have a common epitope, identified by a monoclonal antibody. J. Clin. Microbiol. 30 : 391-395.

Lymbery A.J. 1992. Interbreeding, Monophyly and the Genetic Yardstick: Species Concepts in Parasites. Parasitol. Today. 8 : 208-211.

Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 3<sup>ème</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab.

Manocha M.S., Chen Y. 1990. Specificity of attachment of fungal parasites to their hosts. Can. J. Microb. 36 : 69-76.

Mazars E., Ödberg-Ferragut C., Durand I., Tibayrenc M., Dei-Cas E., Camus D. 1994. Genomic and isoenzymatic markers of *Pneumocystis* from different host species. J. Euk. Microbiol. 41 : 104S.

Mazars E., Ödberg-Ferragut C., Dei-Cas E., Fourmaux M., Aliouat E.M., Brunc-Pascaud M., Mougeot G., Camus D. 1995. Polymorphism of the thymidylate synthase gene of *Pneumocystis carinii* from different host species. J. Euk. Microbiol. 42 : 26-32.

Masur H., Jones T.C. 1978. The interaction *in vitro* of *Pneumocystis carinii* with macrophages and L cells. J. Exp. Med. 147 : 157-170.

Masur H. 1989a. Clinical studies of *Pneumocystis carinii* and relationships to AIDS. J. Protozool. 36 : 70-74.

Masur H., Ognibene F., Yarchoan R. 1989b. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonia 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 division 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 : 53-54.
- Mayr E.** 1942. Systemics and the origin of species. Columbia University Press.
- McFadden D.C.**, Powles M.A., Smith J.G., Flattery A.M., Bartizal K., Schmatz D.M. 1994. Use of anti-CD4<sup>+</sup> hybridoma cells to induce *Pneumocystis carinii* in mice. *Infect. Immun.* 62 : 4887-4892.
- McLeod D.T.**, Latif A., Neill P., Lucas S. 1988. Pulmonary diseases in AIDS patients in Central Africa. *Am. Rev. Resp. Dis.* 137 : 119.
- Meduri G.U.**, Stein D.S. 1992. Pulmonary manifestations in acquired immunodeficiency syndrom. *Clin. Infect. Dis.* 14 : 98-113.
- Meuwissen J.H.E.**, Tauber I., Leeuwenberg A., Beckers P., Sieben M. 1977. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J. Infect. Dis.* 136 : 43.
- Mirovsky P.**, Fishman J.A. 1993. An improved method for the prolonged maintenance of *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 167 : 1470-1473.
- Morgenroth K.** 1988. Le système surfactant du poumon. Walter de Gruyter, Berlin, New-York.
- Mullis K.B.**, Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed reaction. *Meth. Enzymol.* 255 : 335-350.
- Murray J.F.**, Mills J. 1990. Pulmonary infectious complications of human immunodeficiency virus infection. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141 : 1356-1372.
- Murry C.E.**, Schmidt R.A. 1992. Tissue invasive by *Pneumocystis carinii* : a possible cause of cavitary pneumonia and pneumothorax. *Hum. Pathol.* 23 : 1380-1387.
- Nicholson G.L.** 1974. The interactions of lectins with animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 39 : 89-190.
- Nielsen M.H.** 1991. Settnes O.P. Morphology of *Pneumocystis carinii* and activation of the plasmalemmal vesicular system in alveolar epithelial cells of the host. *APMIS* 99 : 219-225.
- Noskin G.A.**, Murphy R.L. 1991. Extrapulmonary infection with *Pneumocystis carinii* in patients receiving aerosolized pentamidine. *Rev. Infect. Dis.* 13 : 525.
- Ohmer-Schröck D.**, Schlatterer C., Plattner H., Schlepper-Schäfer J. 1993. Interaction of lung surfactant protein A with alveolar macrophages. *Microscopy Research and Technique* 26 : 374-380.
- O'riordan D.M.**, Standing J.E., Limper A.H. 1995. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A Binds macrophage mannose receptors. *Infect. Immun.* 63 : 779-784.
- O'riordan D.M.**, Standing J.E., Kwon K.Y., Chang D., Crouch E.C., Limper A.H. 1995. Surfactant protein D interact with *Pneumocystis carinii* and mediates organism adherence to alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 95 : 2699-2710.
- Oka S.**, Kitada K., Kohjin T., Nakamura Y., Kimura S., Shimada K. 1993. Direct monitoring as well as sensitive



- diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by the polymerase chain reaction on sputum samples. *Molec. Cell. Probes.* 7 : 419-424.
- Ortega-Barria E.**, Pereira M.E.A. 1992. Identification of a lectin activity in *Pneumocystis carinii*. *Trop. Med. Parasitol.* 43 : 186-190.
- Ortiz-Rivera M.**, Liu Y., Felder R., Leibowitz M.J. 1995. Comparison of coding and spacer region sequences of chromosomal rRNA-coding genes of two sequevars of *Pneumocystis carinii*. *J. Euk. Microbiol.* 42 : 44-49.
- Ouaisi M.A.**, Afchain D., Capron A., Grimaud J.A. 1984. Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature* 308 : 380-382.
- Ouaisi M.A.**, Dutoit E., Vernes A., Guerret-Stoker S., Capron A. 1985. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* merozoite invasion by human plasma fibronectin. *Parasitol.* 90 : 227-236.
- Ouaisi M.A.**, Capron A. 1989. Some aspects of protozoan parasite-host cell interactions with special reference to RGD-mediated recognition process. *Microbial Pathogenesis* 6 : 1-5.
- Phelps D.S.**, Rose R.M. 1991. Increased recovery of surfactant protein A in AIDS-related pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143 : 1072-1075.
- Palluault F.**, Soulez B., Slommianny C., Dei-Cas E., Cesbron J.Y., Camus D. 1992b. High osmotic pressure for *Pneumocystis carinii* enables fine immunocytochemistry studies : I. Golgi complex and cell wall synthesis. *Parasitol. Res.* 78 : 482-488.
- Palluault F.**, Slommianny C., Dei-Cas E., Soulez B., Camus D. 1992a. High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embedding. *Parasitol. Res.* 78 : 437-444.
- Palluault F.**, Akono Z. 1993. *Pneumocystis carinii* Delanoë et Delanoë, 1912 agent d'une maladie en extension : la pneumocystose. I. aspects cellulaires. *L'Année Biologique* 33 : 56-80.
- Paulsrud J.R.**, Queener S.F. 1994. Incorporation of fatty acids and amino acids by cultured *Pneumocystis carinii*. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 633-638.
- Peters S.E.**, English K., Laakkonen J., Gurnell J. 1994b. DNA analysis of *Pneumocystis carinii* infecting finnish and english shrews. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 108S.
- Peters S.E.**, Wakefield A.E., Sinclair K., Millard P.R., Hopkin J.M. 1992. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. *J. Pathol.* 166 : 195-198.
- Peters S.E.**, Wakefield A.E., Whitwell K.E., Hopkin J.M. 1994a. *Pneumocystis carinii* pneumonia in thoroughbred foals : identification of a geneticaly distinct organism by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 213.
- Pifer L.L.**, Hughes W.T., Murphy M.J. 1977. Propagation of *Pneumocystis carinii* in vitro. *Pediat. Res.* 11 : 305-316.
- Pifer L.L.**, Hughes W.T., Stagno S., Woods D. 1978. *Pneumocystis carinii* infection : evidence of high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediat.* 61 : 35.
- Pifer L.L.** 1989. A fifteen-years perspective on the *in vitro* culture of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* 36 (Suppl): 23-24.
- Pixley F.**, Wakefield A.E., Banerji S., Hopkin J. 1991. Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. *Mol. Microbiol.* 5 : 1347-1351.



- Poblete R.B.**, Rodrigez K., Foust R.T., Reddy K.R., Saldana M.J. 1989. *Pneumocystis carinii* hepatitis in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) Ann. Int. Med. 110 : 737-738.
- Pomerantz S.** 1989. Disseminated pneumocystosis in a patient with AIDS on prophylaxis. AIDS patient care. 3 : 13-15.
- Pottratz S.T.**, Martin W.J. 1990a. Role of fibronectine in *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells. J. Clin. Invest. 85 : 351-356.
- Pottratz S.T.**, Martin W.J. 1990b. Mechanism of *Pneumocystis carinii* attachment to cultured rat alveolar macrophages. J. Clin. Invest. 86 : 1678-1683.
- Pottratz S.T.**, Martin W.J. 1991. *In vitro* attachment of *Pneumocystis carinii* to fibronectin : a new model for *Pneumocystis* adherence (abstract). Clin. Res. 39 : 217A.
- Pottratz S.T.**, Paulsrud J., Smith J.S., Martin W.J. 1991. *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp120, a fibronectine binding protein. J. Clin. Invest. 88 : 403-407.
- Pottratz S.T.**, Paulsrud J.R., Smith J.S., Martin W.J. 1993. Evidence for *Pneumocystis carinii* binding to a cell-free substrat : role of the adhesive protein fibronectin. J. Lab. Clin. Med. 123 : 273-281.
- Pottratz S.T.**, Weir A.L., Wisniowski P.E. 1994. *Pneumocystis carinii* attachment increases expression of fibronectin-binding integrins on cultured lung cells. Inf. Immun. 62 : 5464-5469.
- Pottratz S.T.**, Martin W.J. 1994. Mechanisms of *Pneumocystis carinii* attachment to lung cells. In *Pneumocystis carinii* pneumonia. Second Edition, Revised and Expanded, Lung Biology in Health and Disease, Walzer P.D. 69: 237-250.
- Proctor R.A.**, Mosher D.F., Olbrantz P.J. 1982. Fibronectin binding to *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 14788-14794.
- Radding G.A.**, Amstrong M.Y., Ullu E., Richards F. 1989. Identification and isolation of major cell surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. Infect. Immun. 2149-2157.
- Radin D.R.**, Baker E.L., Klatt E.C., Balthazar E.J., Jeffrey R.B., Megibow A.J., Ralls P.W. 1990. Visceral and nodal calcification in patients with AIDS-related *Pneumocystis carinii* infection. Am. J. Roentgenol. 154 : 27-31.
- Radvin J.I.**, Guerrant R.L. 1981. Role of adherence in cytopathologic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J. Clin. Invest. 68 : 1305-1313.
- Rao N.A.**, Zimmerman P.L., Boyer D., Biswas J., Causey D., Beniz J., Nichols P.W. 1989. A clinical, histopathologic, and electron microscopic study of *Pneumocystis carinii* choroiditis. Am. J. Ophthalmol. 107 : 218-228.
- Raviglione M.C.** 1990. Extrapulmonary pneumocystosis: the first 50 cases. Rev. Infect. Dis. 12 : 1127-1138.
- Reddy L.V.**, Zammit C., Schuman P., Crane L.R. 1992. Detection of *Pneumocystis carinii* in a rat model of infection by polymerase chain reaction. Molec. Cell. Probes. 6 : 137-143.
- Richter C.B.**, Humason G.L., Godbold J.H. Jr. 1978. Endemic *Pneumocystis carinii* in a marmoset colony. J. Comp. Pathol. 88 : 171-180.
- Rice W.R.**, Singleton F.M., Linke M.J. Walzer P.D. 1993. Control of type II cell function by *Pneumocystis carinii*. Am. Rev. Respir. Dis. 147 : A35.



- Robbins J.B.** 1967. *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Pediatr. Res.* 1 : 151-158.
- Roberts D.D.** 1990. Interaction of respiratory pathogens with host cell surface and extracellular matrix components. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3 : 181-186.
- Roman J., McDonald J.A.** 1991. Fibronectins. In : the lung. R.G. Crystal, J.B. West, Eds, Raven press, Ltd, New York, chapter 3.3.4 : 399-411.
- Rooney S.A., Young S.L., Mendelson C.R.** 1994. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J.* 8 : 957-967.
- Rose R.M., Catalano P.J., Koziel H., Furlong S.T.** 1994. Abnormal lipid composition of bronchoalveolar lavage fluid obtained from individuals with AIDS-related lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149 : 332-338.
- Rosenkrans W.A., Albright Jr J.T., Hausman R.E., Penney D.P.** 1983. Ultrastructural immunocytochemical localization of fibronectin in the developing rat lung. *Cell. Tissue Res.* 234 : 165-177.
- Roths J.B., Marshall J.D., Allen R.D., Carlson G.A., Sidman C.L.** 1990. Spontaneous *Pneumocystis carinii* Pneumonia in immunodeficient mutant SCID mice. *Natural History and Pathobiology. Am. J. Path.* 36 : 1173-1186.
- Roths J.B., Sidman C.L.** 1992. Both immunity and hyperresponsiveness to *Pneumocystis carinii* result from transfert of CD4+ but not CD8+ T cells in severe combined immunodeficient mice. *J. Clin. Invest.* 90 : 673-678.
- Ruoslahti E.** 1991. Integrins. *J. Clin. Invest.* 87 : 1-5.
- Ruskin J., Nomura J.,** 1993. Identifying *Pneumocystis carinii* in pleural effusions. *Am. Colleg. Phys.* 1222.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.** 1985. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230 : 1350.
- Santiago-Delpin E.A., Mora E., Gonzalez Z.A., Morales-Otero L.A., Bermudez R.** 1988. Factors in an outbreak of *Pneumocystis carinii* in a transplant unit. *Transpl. Proc.* 20 : 462-465.
- Sattler F.R., Cowan R., Nielsen D.M., Ruskin J.** 1988. Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with pentamidine for treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome : a prospective, noncrossover study. *Ann. Intern. Med.* 109 : 280-287.
- Schmatz D.M., Romancheck M.A., Pittarelli L.A., Schwartz R.E., Fromtling R.A., Nollstadt K.H., Vanmiddlesworth F.L., Wilson K.E., Turner M.J.** 1990. Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia with 1,3-beta-glucan synthesis inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 87 : 5950-5954.
- Sepkowitz K.A., Brown A.E., Armstrong D.** 1995. *Pneumocystis carinii* pneumonia without acquired immunodeficiency syndrome : more patients, same risk. *Archive of internal Medecine.* 155 : 1125-1128.
- Sethi K.K.** 1992. Multiplication of human-derived *Pneumocystis carinii* in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Experientia.* 48 : 63-67.
- Settnes O.P., Hasselager E.** 1984. Occurrence of *Pneumocystis carinii* Delanoe and Delanoe, 1912 in dogs and cats in Danemark. *Nord. Vet. Med.* 36 : 179-181.
- Settnes O.P., Henriksen S.A.** 1989. *Pneumocystis carinii* in large domestic animals in Denmark. A preliminary report. *Acta Vet. Scand.* 30 : 437-440.
- Settnes O.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 : 3526-3531.
- Shiota T., Shimada Y., Kurimoto H., Oikawa H. 1990. *Pneumocystis carinii* infection in corticosteroid-treated cats. *J. Parasitol.* 76 : 441-445.
- Shively J.N., Dellers R.W., Buergelt C.D., Hsu F.S., Kabelac L.P., Moe K.K. Tennant B., Vaughn J.T. 1973. *Pneumocystis carinii* pneumonia in two foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 162 : 648-652.
- Shellito J., Suzara U.V., Blumefeld W., Beck J.M., Steger H.J., Ermak T.H. 1990. A new model of *Pneumocystis carinii* infection in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 85 : 1686-1693.
- Simonds R.J., Lindegren M.L., Thomas P., Hanson D., Caldwell B., Scott G., Rogers M. 1995. Prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia among children with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection in the United States. *New Engl. J. Med.* 332 : 786-790.
- Simpson W.A., Beachey E.H. 1983. Adherence of group A Streptococci to fibronectin on oral epithelial cells. *Infect. Immun.* 39 : 275-279.
- Sinclair K., Wakefield A.E., Banerji S., Hopkin J.M. 1991. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45 : 183-184.
- Singh G., Katyal S.L. 1991. Pulmonary proteins as cell-specific markers; *Exp. Lung Res.* 17 : 245-253.
- Sloand E., Laughon B., Armstrong M., Bartlett M., Blumenfeld W., Cushion M., Kalica A., Kovacs J.A., Martin W., Pitt E., Pesanti E.L., Richards F., Rose R., Walzer P. 1993. The challenge of *Pneumocystis carinii* culture. *J. Euk. Microbiol.* 40 : 188-195.
- Smulian A.G., Theus S.A. 1994. Cellular immun response in *Pneumocystis carinii* infection. *Parasitology Today* 10 : 229-231.
- 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.Y., Dei-Cas E., Capron A., Camus D. 1991b. Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice. *J. Protozool.* 38 : 123S-125S.
- Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molecul. Biol.* 98 : 503-517.
- Stahl P.D. 1990. The macrophage mannose receptors : current status. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2 : 317-318.
- Stahl P.D., Rodman J.S., Miller M.J., Schlesinger P.H. 1978. Evidence for receptor mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidase by alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 1019-1022.
- Stapka E., Wunderlich C., Carlson S. 1957. Morphologische und kulturelle untersuchungen an pneumocysten in sputum und lungen material. *Z. Kinderheilkd.* 79 : 246-263.
- Sternberg R.I., Whitsett J.A., William M.H., Baughman P. 1995. *Pneumocystis carinii* alters surfactant protein A



concentrations in bronchoalveolar lavage fluid. *J. Lab. Clin. Med.* 125 : 462-469.

**Stokes D.C.**, Gigliotti F., Rehg J.E., Snellgrove N.L., Hughes W.T. 1987. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in the ferret. *Br. J. Exp. Pathol.* 68 : 267-276.

**Stoner G.D.**, Harris C.C., Autrup H., Trump B.F., Kingsbury W.W., Meyers G.A. 1978. Explant culture of human peripheral lung. I. Metabolism of benzo(a)pyrene. *Lab. Invest.* 38 : 685-692.

**Stringer S.L.**, Stringer J.R., Blase M.A., Walzer P.D., Walzer P.D., Cushion M.T. 1989. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with Fungi. *Exp. parasitol.* 68 : 450-461.

**Stringer J.R.**, Edman J.C., Cushion M.T., Richards F.F., Watanabe J. 1992. The fungal nature of *Pneumocystis*. *J. Med. Veter. Mycology.* 30 : 271-278.

**Stringer J.R.** 1994. Molecular genetics of *Pneumocystis carinii*. in *Pneumocystis carinii* pneumonia. P. Walzer, ed. M. Dekker Inc, New York.

**Su T.H.**, Natarajan V., Martin W.J. 1993. Deficiency of pulmonary surfactant in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *FASEB J.* 7 : A499.

**Su T.H.**, Martin W.J. 1994. Pathogenesis and host response in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Annu. Rev. Med.* 45 : 261-272.

**Sueishi K.**, Hisano S., Sumiyoshi A., Tanaka K. 1977. Scanning and transmission electron microscopic study of human pulmonary pneumocystosis. *Chest* 72 : 213-215.

**Sunkin S.M.**, Stringer S.L., Stringer J.R. 1994. A tandem repeat of rat-derived *Pneumocystis carinii* genes encoding the major surface glycoprotein. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 292-300.

**Tamburrini E.**, DeLuca A., Ventura G., Maiuro G., Siracusano A., Ortona E., Antinori A. 1991. *Pneumocystis carinii* stimulates production of tumor necrosis factor-alpha by human macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.* 180: 15-20.

**Tamburini E.**, Mencarini P., De Luca A., Antinori A., Visconti E., Ammassari A., Ortona L., Ortona E., Siracusano A., Vicari G. 1993. Simple and rapid two-step polymerase chain reaction for diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 2788-2789.

**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.

**Tegoshi T.**, Yoshida Y. 1989. New system of *in vitro* cultivation of *Pneumocystis carinii* without feeder cells. *J. Protozool.* 36 (Suppl) : 29-31.

**Telzak E.E.**, Cote R.J., Gold J.W.M., Campbell S.W., Armstrong D. 1990. Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections. *Rev. Infect. Dis.* 12 : 380-386.

**Tibayrenc M.**, Kjellberg F., Ayala F.J. 1990. The clonal theory of parasitic protozoa. A taxonomical proposal applicable to the other clonal organisms. *BioScience.* 41 : 767-774.

**Tibayrenc M.**, Ayala F.J. 1991. Towards a population genetics of microorganisms : the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today.* 7 : 228-232.

**Tollerad D.J.**, Wesseler T.A., Kurtis C.K., Baughman R.P. 1989. Use of rapid differential stain for identifying *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage fluid. *Chest.* 95 : 494-497.



- Thompson R.C.A.**, Lymbery A.J. 1990. Intraspecific Variation in Parasites - What is a Strain? *Parasitol. Today*. 6 : 345-348.
- Tronchin G.**, Bouchara J.P., Annaix V., Robert R., Senet J.M. 1991. Fungal cell adhesion molecules in *Candida albicans*. *Eur. J. Epidemiol.* 7 : 23-33.
- van Golde L.M.G.**, Batenburg J.J., Robertson B. 1994. The pulmonary surfactant system. *NIPS* 9 : 13-20.
- van Golde L.M.G.** 1995. Potential role of surfactant proteins A and B in innate lung defense against pathogens. *Biol. Neonat.* 67 : 2-17.
- Van der Meer G.**, Brug S.L. 1942. Infection par *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 22 : 301.
- Vanek J.** 1951. Atypical interstitial pneumonia of infants produced by *Pneumocystis carinii*. *Cas. Lek. Cesk.* 90 : 1121.
- Vanek J.**, Jirovek O. 1952. Parasitic pneumonia; interstitial plasma cell pneumonia of premature infants caused by *Pneumocystis carinii*. *Zentralbl. Bakteriol.* 120 : 158.
- Vasquez J.**, Smulian A.G., Linke M.J., Cushion M.T. 1994. Antigenic differences among genetically distinct types of rat-derived *Pneumocystis carinii*. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 114S.
- Vavra J.**, Kucera K. 1970. *Pneumocystis carinii*, Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities *J. Protozool.* 17 : 463-483.
- Vierbuchen M.**, Ortmann M., Urlenbruck G. 1990. Endogenous carbohydrate-binding proteins in *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* 58 : 3143-3146.
- Von Beren L.A.**, Pesanti E.L. 1978. Uptake and degradation of *Pneumocystis carinii* by macrophages *in vitro*. *Am. Rev. resp. Dis.* 118 : 1051-1059.
- Vos J.G.**, Kreeftenberg J.G., Kruijt B.C., Kruizinga W., Steerenberg P. 1980. The athymic nude rat. II Immunological characteristics. *Clinical Immunology and Immunopathology* 15 : 229-237.
- 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.
- Waalkes T.P.**, Maluku D.R. 1976. Pharmacologic aspects of pentamidine. *Natl. cancer Inst. Monogr.* 43 : 171.
- Wada M.**, Kitada K., Saito M., Egawa K., Nakamura Y. 1993. cDNA sequence diversity and genomic clusters of major surface glycoprotein genes of *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* 168 : 979-985.
- Wada M.**, Nakamura Y. 1994. Chromosomal organization of MSG antigen genes of rat *Pneumocystis carinii* : tandem repeat and unique 5' UTR sequence encoding intron. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 115S.
- Wakefield A.E.**, Stewart T.J., Moxon E.R., Marsh K., Hopkin J.M. 1990a. Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84 : 800-802.
- Wakefield A.E.**, Pixley F.J., Banerji S., Sinclair K., Miller R.F., Moxon E.R., Hopkin J.M. 1990c. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *The Lancet.* 336 : 451-453.
- Wakefield A.E.**, Peters S.E., Banerji S., Bridge P.D., Hopkin, J.M. 1992. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the Ustomycetous red yeast fungi. *Mol. Microbiol.* 6 : 1903-1911.



- Wakefield A.E.**, Fritscher C.C, Malin A.S., Gwanzura L., Hughes W.T., Miller R.F. 1994a. Genetic diversity in human-derived *Pneumocystis carinii* locations shown by analysis of mitochondrial rRNA gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 2959-2961.
- Wakefield A.E.** 1994b. Detection of DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* in samples of ambient air. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 116S.
- Walker R.E.**, Masur H. 1994. Current regimens of therapy and prophylaxis. in : *Pneumocystis carinii* pneumonia. Walzer P.D. ed. Dekker M. Inc, New York.
- Walzer P.D.**, Perl D.P., Krogstad D.J., Rawson P.G., Schultz M.G. 1974. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. *Ann. Intern. Med.* 80 : 83.
- Walzer P.D.**, Schnelle V., Armstrong D., Rosen P.P. 1977. Nude mouse : a new experimental model for *Pneumocystis carinii* infection. *Science.* 197 : 177.
- Walzer P.D.**, Powell R.D. 1982. Experimental *Pneumocystis carinii* infection in nude and steroid-treated normal mice. 123-132. in : Reed N.D., ed. Proceedings of the third international workshop on nude mice. Gustav Fisher Verlag. New York.
- Walzer P.D.**, Rutledge M.E., Yoneda K. 1983. Experimental *Pneumocystis carinii* in C3H/HeJ and C3HeB/FeJ mice. *J. Reticuloendothel. Soc.* 33 : 1-9.
- Walzer P.D.**, Linke M.J. 1987a. A comparison of the antigenic characteristics of rat and human *Pneumocystis carinii* by immunoblotting. *J. Immunol.* 138 : 2257-2265.
- Walzer P.D.** 1989. Symposium : Historical perspectives on *Pneumocystis carinii*. *J. protozool.* 36 : 39-41.
- Walzer P.D.** 1991a. *Pneumocystis carinii*-New clinical spectrum? *N. Engl. J. Med.* 324 : 263-265.
- Walzer P.D.** 1991b. Overview of Animal Models of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *J. Protozool.* 38 : 122S-123S.
- Walzer P.D.**, 1994. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Second Edition, Revised and Expanded, Lung Biology in Health and Disease, Walzer P.D. 69.
- Weinberg G.A.**, Bartlett M. S. 1991. Comparison of Pulsed Field Gel Electrophoresis Karyotypes of *Pneumocystis carinii* Derived from Rat Lung, Cell Culture, and Ferret Lung. *J. Protozool.* 38 : 64S-65S.
- Weinberg G.A.**, Durant P.J. 1994a. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* Derived from Infected Rats, Mice, Ferrets, and Cell Cultures. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 223-228.
- Weinberg G.A.**, Dykstra C.C., Durant P.J., Cushion M. 1994b. Chromosomal localization of 20 genes to five distinct pulse field gel karyotypic forms of rat *Pneumocystis carinii*. *J. Euk. Microbiol.* 41 : 117S.
- Weller R.** 1955. Zur Erzeugung von Pneumocystosen im Tierversuch. *Z. Kinderheilkd.* 76 : 366.
- Weller R.** 1956. Weitere Untersuchungen über experimentele Rattenpneumocystose in Hinblick, auf die interstitielle Pneumonie der FrÜngeborenen. *Z. Kinderheilkd.* 78 : 166.
- Wisniowski P.**, Martin II W.J. 1994. Interaction of vitronectin with *Pneumocystis carinii* : evidence for binding via the heparin binding domain. *J. Lab. Clin. Med.* 125 : 38-45.
- Wright J.R.**, Dobbs L.G. 1991. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu. Rev. Physiol.* 53 : 395-414.

- Writz H., Schmidt M. 1992. Ventilation and secretion of pulmonary surfactant. *Clin. Investig.* 70 : 3-13.
- Wylter D.J., Sypek J.P., MC Donald J.A. 1985. *In vitro* parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis : possible role of fibronectine in parasite attachment. *Infect. Immun.* 49 : 305-311.
- Yamada K.M. 1991. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In *Cell biology of extracellular matrix*. Edited by Hay E.D., Plenum Press, New York, 2nd edition : 111-139.
- Yonathan T., Lin H., Buck G.A. 1989. An electrophoretic karyotype and assignement of ribosomal genes to resolved chromosomes of *Pneumocystis carinii*. *Mol. Microbiol.* 3 : 1473-1480.
- Yoneda K., Walzer P.D. 1983. Attachment of *Pneumocystis carinii* to type I alveolar cells studied by freeze-fracture electron microscopy. *Infect. Immun.* 40 : 812-815.
- Yoshikawa H., Morioka H., Yoshida Y. 1987. Freeze-fracture localization of filipinsterol complexes in plasma and cytomembranes of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* 34 : 131-137.
- Yoshida Y. 1989. Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.* 36 : 53-60.
- Young S.L., HO Y., Silbajoris R.A. 1991. Surfactant apoprotein in adult rat lung compartments is increase by dexamethasone. *Am. J. Physiol.* 260 : L161-L167.
- Zach T.L., Hill L.D., Herrman V.A., Leuschen M.P., Hostetter M.K. 1992. Effect of glucocorticoids on C3 gene expression by the A549 human pulmonary epithelial cell line. *The journal of immunology* 12 : 3964-3969.
- Zimmerman P.E., Voelker D.R., McCormack F.X., Paulsrud J.R., Martin II W.J. 1992. 120-kD surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* is a ligand for surfactant protein A. *J. Clin. Invest.* 89 : 143-149.



# **PUBLICATIONS**

## *In vitro* attachment of *Pneumocystis carinii* from mouse and rat origin

El Moukhtar Aliouat <sup>a</sup>, Eduardo Dei-Cas <sup>a</sup>, Ali Ouaiissi <sup>b</sup>, François Palluault <sup>a</sup>,  
Benoît Soulez <sup>a</sup>, Daniel Camus <sup>a</sup>

<sup>a</sup>INSERM U42, 369, rue Jules Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq; <sup>b</sup>INSERM U167, CNRS 624, Institut Pasteur de Lille,  
1, rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France

(Received 24 September 1992; accepted 1 February 1993)

**Summary** – The attachment of *Pneumocystis carinii* to lung cells could play a role in the pathophysiology of *P. carinii* pneumonia. The trophozoite attaches to type I alveolar epithelial cells. Physical, chemical, and extracellular matrix factors, involved in the mouse- or rat-derived *P. carinii* attachment to fibroblastic cells in culture, were examined using a new model of *in vitro* adherence. The development of parasite filopodia penetrating deeply the host cell cytoplasm was observed using transmission electronic microscopy. Killed *P. carinii* organisms were unable to attach to cultured cells. Also, parasites were unable to attach to killed target cells. The *P. carinii* *in vitro* attachment was partially inhibited by cytochalasin B. In contrast, the parasite attachment was not affected when the target cell cytoskeleton was altered. In our work conditions, sialic acids were not involved in the attachment process. Present results showed that fibronectin (Fn) plays a role in the parasite attachment, and suggest that a specific Fn-binding receptor is present at the surface of mouse-derived *P. carinii* organisms.

fibronectin / *Pneumocystis carinii* / adherence / ultrastructure

### Introduction

*Pneumocystis carinii* is an important agent of severe pneumonitis in immunosuppressed humans, especially in AIDS patients. *In vivo*, the *P. carinii* trophozoite attaches usually to type I alveolar epithelial flattened cells lining the alveoli [6, 18, 19, 35], but it could occasionally be able to attach to type II alveolar cells [18, 20], which are roughly cuboidal cells with typical multilamellar bodies in their cytoplasm, and short microvilli projecting into the alveolar lumen. Metabolic interactions between the parasite and the type I lung cell have been suggested [14, 21]. The attachment of *P. carinii* to lung cells could play a role in the pathophysiology of *P. carinii* pneumonia (PCP) [14, 17].

Many important questions remain to be answered: how and why *P. carinii* attaches preferentially to type I alveolar cells? What is the nature of the *P. carinii*–alveolar cell relationships?

It has been recently demonstrated, using transmission electronic microscopy (TEM) [2, 7], that rat- or mouse-derived *P. carinii* are able to attach *in vitro* to several original cell lines (Vero, MRC-5, HEL, AKD, WI-38). When the contact of a trophozoite with a target cell takes place, the development of filopodia penetrating deeply the host cell cytoplasm has been observed [7]. Earlier results suggested that the *P. carinii* attachment induces a growth inhibition of the target cells in culture [17].

In earlier studies [17, 25, 26], the parasite attachment has been evaluated by chromium-radiolabeled (Cr<sup>51</sup>) assay, but the morphological assessment of the *P. carinii* adherence has not been performed. Here, it is shown that fibronectin (Fn) plays a role in the parasite attachment, and that a specific Fn-binding receptor is present in the surface of rat-derived *P. carinii* organisms [25]. Later results suggested that the gp120, a major *P. carinii* anti-

gen, would be the Fn-receptor [26]. In addition, the integrity of *P. carinii* cytoskeleton is necessary for the parasite attachment [17].

Most *in vitro* studies were performed with rat-derived *P. carinii*. The source of *P. carinii* may be important as genomic [29], antigenic [10, 16] and morphological [8] differences were reported between *P. carinii* derived from different host species. What's more, morphological differences involve filopodia, which are directly concerned in the *in vitro* attachment [7]. In short, the natural populations of *P. carinii* are genetically heterogeneous and their genetic heterogeneity might involve differences of infectivity or different abilities to attach to host cells.

In this work, physical, chemical, membrane and extracellular matrix factors, involved in the mouse- or rat-derived *P. carinii* attachment to fibroblastic cells in culture, were examined using an original model of *in vitro* adherence.

### Materials and methods

#### *Biological models*

Corticosteroid-treated mice or rats were used as source of *P. carinii* organisms. Male or female outbred white mice (OWM), with naturally acquired latent *P. carinii* infection [31, 32], were administered prednisolone metasulfobenzoate, kindly furnished by Houdé Laboratories (France), in the drinking water (40 mg l<sup>-1</sup>) for 13–14 weeks. Male or female Wistar rats were administered dexamethasone (Merck, Sharp and Dohme Chibret, France) in the drinking water (2 mg l<sup>-1</sup>) for 9–12 weeks [28]. Mice and rats were housed in a conventional room of our laboratory animal facilities and were given standard food (UAR, France) and water *ad libitum*.

Vero cells (CCL No 81 American Type Culture Collection) or MRC-5 cells (CCL No 171 American Type Culture Collection) were used as target cell populations. They were grown in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS on glass coverslips placed in the wells of 24-well flat bottom plates (Costar, France).

#### *Extraction and quantitation of P carinii organisms*

The lungs of infected animals were removed, and light microscopical assessment was carried out on lung impression smears stained with either Toluidine blue O (TBO) [3] and RAL-555 (Soc RAL, France) [30]. Infected lungs were cut into 1-mm<sup>3</sup> pieces in sterile Dulbecco minimum essential medium (DMEM) (F0455-Biochrom KG, Berlin, Germany) and stirred using a magnetic stirrer in an Erlenmeyer flask in DMEM for 1 h at 4°C. The homogenate was poured through gauze and centrifuged at 2900 g for 10 min (4°C). The pellet was resuspended in a buffered hemolytic solution (9:1 solution of 0.15 M NH<sub>4</sub>Cl in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4), incubated for 10 min at 4°C and centrifuged (4°C). The pellet was resuspended in DMEM and filtered successively through 250–63 µm stainless steels to remove large particles. This step made it easier to filter the suspension through 10–8 µm filters (Nuclepore, Serlabo, France). The filtrate was centrifuged, resuspended in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (Biochrom KG, Berlin, Germany). Parasite counts were performed on air dried smears stained with TBO and RAL-555 stain. The nomenclature for the *P carinii* life cycle stages was based on the ultrastructural description reported by Matsumoto and Yoshida [19] correlated with the light microscopic aspect of each stage [6]. 'Walled forms' (intermediate, late precysts and cysts) were counted on TBO homogenate smears. The relative percentage (differential parasite count) of all parasite stages was evaluated on homogenate smears stained with RAL-555 stain [31]. The total parasite number was calculated as follows:

Total number of parasites =  $W + (W \times \% UW / \% W)$ , where  $W$  = walled forms (counted on TBO smears);  $\% W$  = percentage of walled forms (intermediate and late precyst and cyst);  $\% UW$  = percentage of unwalled forms (trophozoite and early precyst).

Parasites suspended in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS were used for the attachment assays.

#### *In vitro P carinii attachment assay*

When Vero or MRC-5 cell monolayer cultures were subconfluent, the medium was removed and 1 ml of the parasite suspension (about 3 10<sup>6</sup> parasites) was added in each well. Plates were incubated 2–48 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and the kinetic patterns of the *in vitro P carinii* attachment to Vero and MRC-5 cells were determined by sampling coverslips at various intervals.

After the incubation, coverslips were washed three times with phosphate buffered saline Dulbecco (PBS) medium (Eurobio, France) at 37°C to eliminate unattached parasites. Attached *P carinii* organisms were microscopically detected using four methods: methanol-Giemsa [31] and TBO stainings, immunofluorescence assay (IFA) and immunoenzymatic (IE, peroxidase revelation) assays using the anti-mouse-derived *P carinii* mAb 4F2 [32]. The number of attached parasites was calculated as follows:

Number of attached parasites =  $n \times Ca / Fa$   
where  $n$ , average parasite counts per oil immersion field;  $Ca$ , coverslip area;  $Fa$ , oil immersion field area.

#### *Viability of Pneumocystis or the target cell and parasite attachment*

In order to determine if the parasite viability or integrity was a critical condition to attachment, freshly extracted *P carinii* samples were frozen at –20°C (without cryoprotectant), thawed to room temperature, or incubated in a 10% formaldehyde solution for 30 min and washed four times in PBS, before attachment

assays or ultrastructural assessment. Control assays were performed with freshly extracted intact parasites.

Also, to determine if the viability of target cells was a critical condition to attachment, untreated freshly extracted *P carinii* samples were deposited on target cells, which were previously fixed in a 10% formaldehyde solution for 30 min and washed four times in PBS. Control assays were carried out with unfixed target cells.

#### *Cryopreservation of P carinii samples*

To evaluate the influence of the cryopreservation on the attachment of *P carinii*, freshly extracted parasite samples, in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS and 10% dimethylsulfoxide (DMSO), were placed in a refrigerator at –70°C for at least 3 h, and then frozen at –180°C in liquid nitrogen for at least 7 days. Samples were thawed rapidly in a 37°C water-bath, and immediately used for attachment assays or ultrastructural assessment. Control assays were performed with freshly extracted intact parasites.

#### *Influence of pentamidine or cytochalasin B on Pneumocystis attachment*

*In vitro* attachment assays were carried out using mouse- or rat-derived *Pneumocystis* organisms and Vero cell monolayer cultures. Various concentrations of pentamidine isethionate (8 10<sup>-6</sup> M to 34 10<sup>-6</sup> M) (Roger Bellon, France) or cytochalasin B (10<sup>-6</sup> M to 10<sup>-7</sup> M) (Aldrich, France) were added to the culture medium. The plates containing cell monolayers and parasites were incubated for 8 h in the presence or absence of the drugs.

In order to establish if the effect of cytochalasin B on the *P carinii* attachment was due to the activity of the drug on the parasite and/or on the target cells, other experiments were performed. Vero cell monolayer cultures were preincubated with cytochalasin B (10<sup>-7</sup> M) for 48 h and washed three times. Then we observed that cytochalasin B induced morphological cell changes. Alterations were still visible even after washing and 3-h incubation in medium without the drug. Only 8 h later Vero cells recovered normal morphology. Therefore, after this preliminary study, a 3-h incubation was chosen to perform the *in vitro* attachment assay. Freshly extracted untreated parasites were incubated for 3 h with the treated cells. For controls, *in vitro Pneumocystis* attachment assays were performed with parasites incubated 3 h with Vero cell monolayer cultures (which were not preincubated with cytochalasin B).

#### *Trypsin or neuraminidase treatment of target cells*

*In vitro P carinii* attachment assays were carried out using cell monolayer cultures pretreated with trypsin (1 mg/ml) (Difco, Osi, France) (without ethylenediaminetetraacetic acid) for 15 min or with neuraminidase (10 IU) (Calbiochem, France) for 1 h. The neuraminidase titer was more than 10-fold higher than that used in our laboratory to remove sialic acids at the erythrocyte surface (red blood cells are rich in sialic acids). Monolayer-changes induced by trypsin were followed microscopically. Monolayer cultures were washed twice, and parasites were added and incubated for 6 h.

#### *Detection of fibronectin (Fn) on monolayer cell cultures*

The detection of Fn on the surface of the cultivated cells was carried out by IFA assay using an anti-human Fn polyclonal antibody (F(ab)'<sub>2</sub>; 84FMS10 Inst Pasteur, Lille, France) labelled with fluorescein isothiocyanate.

#### *Influence of Fn or of GRGDS peptide on the Pneumocystis attachment*

Parasite samples (about 12 10<sup>6</sup> parasites) were preincubated with various concentrations of Fn ( $M_r$ , 440 kDa) (Inst Pasteur, Lille,

France) or the GRGDS peptide (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser;  $M_r \approx 500$  Da) (Inst Pasteur, Lille, France) in 1 ml of DMEM, supplemented with 10% heat-inactivated FCS, for 1 h at 4°C. In order to assess the specificity of the activity of the GRGDS peptide, parasite samples were also preincubated in the same conditions with a modified control peptide. The following three peptides (from Inst Pasteur, Lille, France) were selected and obtained by modification of the RGD sequence: i) RQDS peptide (Arg-Gln-Asp-Ser;  $M_r \approx 500$  Da); ii) RCDS peptide (Arg-Cys-Asp-Ser;  $M_r \approx 500$  Da); and iii) REDS peptide (Arg-Glu-Asp-Ser;  $M_r \approx 500$  Da). The concentrations of the molecules were chosen in relation to molecule/parasite ratios ranging from  $1 \cdot 10^5$  to  $6 \cdot 10^6$ ; this made it possible to compare results. After preincubation, parasites were suspended in 3 ml of medium, and then added to MRC-5 or Vero monolayer cell cultures ( $3 \cdot 10^6$  parasites per well) and incubated for 6 h. Control assays were carried out using parasite samples preincubated (1 h, 4°C) in the same medium without Fn or GRGDS peptide.

#### Influence of an anti-Fn antibody on the *Pneumocystis* attachment

In some experiments cell monolayers were preincubated with various dilutions (1:40–1:320) of a rabbit anti-human Fn polyclonal antibody (F(ab)'<sub>2</sub>) (84FMS10) or with a rabbit serum (1:40) without anti-Fn antibodies (control) for 1 h at 4°C. Then cell monolayers were used *in vitro* for *Pneumocystis* attachment assays.

#### Ultrastructural study

Mouse- or rat-derived *Pneumocystis* were incubated with monolayer cell cultures in 6-well flat bottom plates (Costar, France) for 72 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The fixation procedure was carried out in high osmolarity conditions as previously described [23]. The culture medium was removed and replaced by a phosphate buffered 2.5% glutaraldehyde solution (0.1 M, pH 7.5) adjusted to about 850 mOsm by the addition of 0.188 M NaCl for 1 h at room temperature. Samples were washed three times for 20 min with 0.1 M phosphate buffer plus 0.412 M NaCl (pH 7.5) at room temperature, post-fixed for 1 h in a 1% osmium tetroxide solution in washing phosphate buffer and dehydrated in ethanol. The cell monolayers with the attached *P. carinii* organisms were then rapidly sticking out from the bottom of the plate wells with propylene oxide and embedded in Epon.

## Results

#### Kinetic pattern of the *Pneumocystis* attachment

The kinetic patterns obtained using different methods (methanol-Giemsa, IFA, IE) to evaluate the *Pneumocystis* attachment were similar (figs 8, 10, 11). The attachment curves of *P. carinii* to Vero (fig 1A) or MRC-5 cells (fig 1B) showed a rapid or exponential phase, which occurred within the first 6 h of incubation. The attachment curves of mouse *P. carinii* to MRC-5 cells then showed a stationary phase which was followed by a decrease of the number of attached parasites recorded after a 24-h incubation period. The decreasing phase of the attachment of mouse *P. carinii* to Vero cells was recorded from the 6th hour of incubation onward (fig 1). The number of attached walled forms (intermediate, late precysts and cysts) (fig 9) was lower than that of attached unwalled forms (trophozoites and early precysts) (fig 1). The kinetic pattern of the attachment of rat-derived *P. carinii* to Vero or MRC-5 cells was similar to that of mouse *P. carinii* but the decreasing phase began later (data not shown).

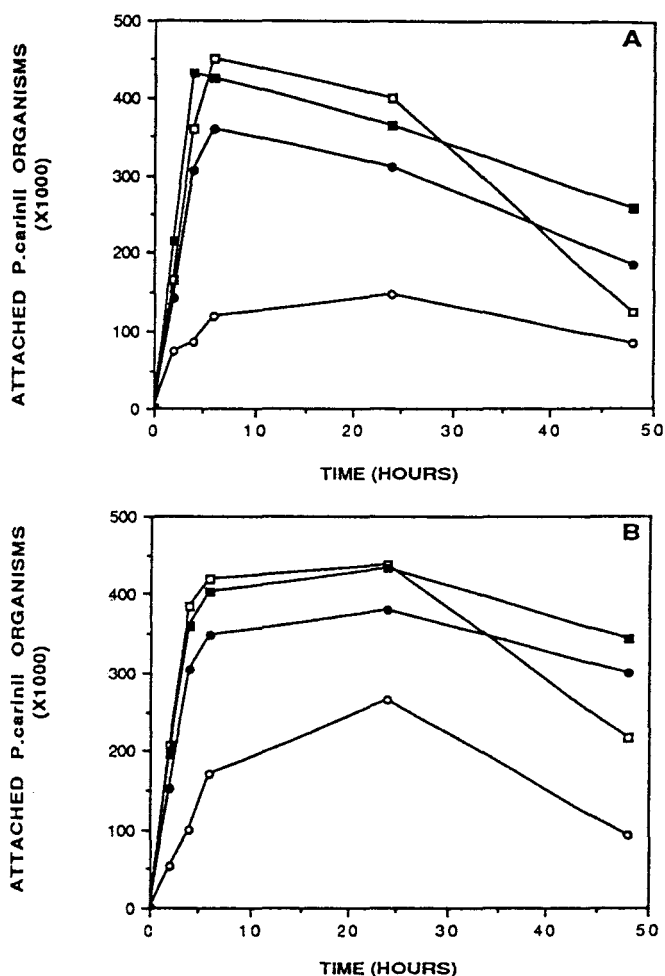


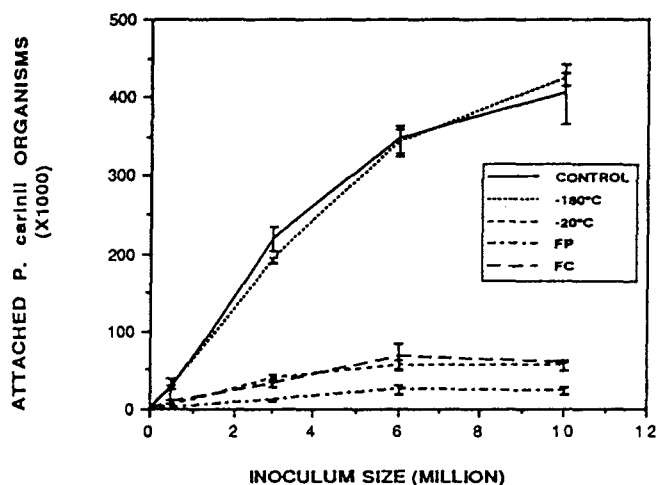
Fig 1. Kinetic of mouse *P. carinii* attachment to Vero cells (A) and MRC-5 cells (B). Parasites ( $3 \cdot 10^6$  organisms/well) were incubated with cell monolayers for 2–48 h. The attached parasite counts were performed using Giemsa (□); Toluidine blue O (○); immunofluorescence (●) and immunoperoxidase stainings (■). For the parasite immunodetection, the anti-mouse derived *P. carinii* mAb 4F2 was used.

#### Ultrastructural analysis of the *Pneumocystis* *in vitro* attachment

After 72 h of culture with MRC-5 cells, the development of trophozoite filopodia which penetrated the target cytoplasm anchoring the parasite to the cell, was observed. The plasmalemma area in contact with the parasite became more electron-dense but no discontinuity was found (figs 13–15). No plasmalemmal vesicles in the underlying cytoplasm, as reported *in vivo* [7, 21], or other target cell changes were seen. No ultrastructural differences were recorded in the *in vitro* attachment of parasites from rat or mouse origin.

#### Influence of the viability of *P. carinii* or of the target cell on the *in vitro* attachment (fig 2)

A 80–94% inhibition of the *Pneumocystis* attachment was observed when *P. carinii* organisms or monolayer culture cells were killed using formaldehyde. About 90% inhibition was also recorded when *P. carinii* samples were frozen at  $-20^\circ\text{C}$  (without cryoprotectant) and thawed to room



**Fig 2.** Influence of parasite freezing and parasite or monolayer (Vero cells) formaldehyde treatment on the mouse *P. carinii* attachment. Parasite counts were performed after 6 h of incubation.  $-180^{\circ}\text{C}$ : parasites were frozen in liquid nitrogen in DMSO and thawed at  $37^{\circ}\text{C}$ ;  $-20^{\circ}\text{C}$ : parasites were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  and thawed at room temperature; FP: parasites were killed with formaldehyde; FC: target cells were killed with formaldehyde. Each data point represents three determinations (mean  $\pm$  standard deviation).

temperature. In contrast, no inhibition of the attachment was recorded in *P. carinii* samples which were frozen at  $-180^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen and thawed rapidly at  $37^{\circ}\text{C}$ . In accordance with these results, whereas parasites frozen-thawed at  $-20^{\circ}\text{C}$  showed marked ultrastructural alterations, those frozen at  $-180^{\circ}\text{C}$  were ultrastructurally normal and indistinguishable from freshly extracted parasites (fig 3).

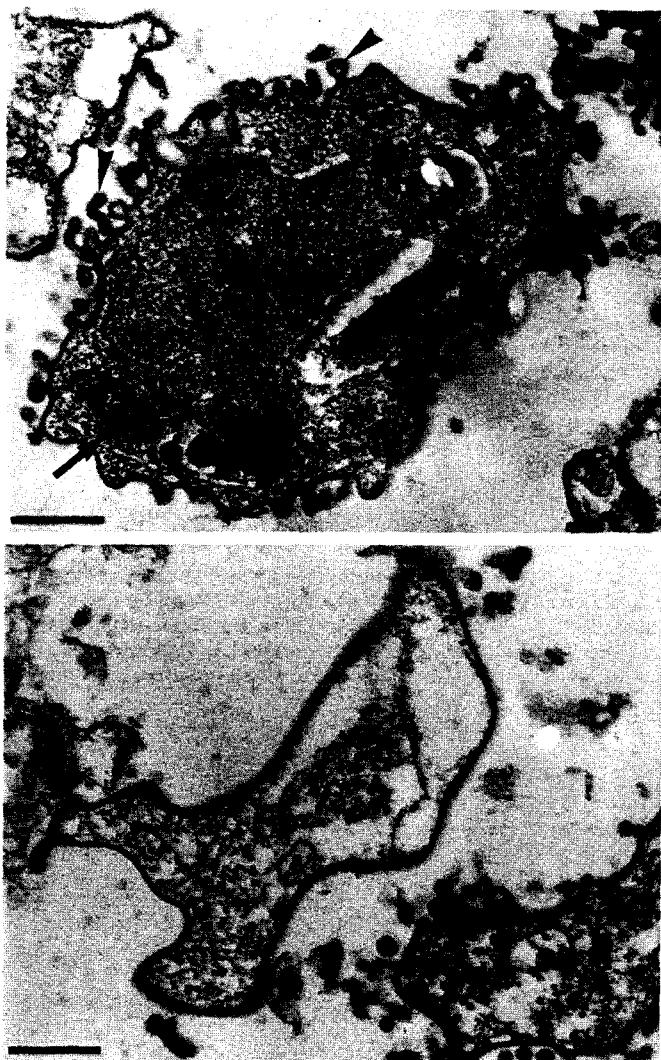
The attachment of mouse- or rabbit-derived *P. carinii* to Vero cells was markedly inhibited when parasite samples were preincubated with pentamidine. An inhibitory effect has been observed for a  $8 \cdot 10^{-6}$  M pentamidine concentration, and increased until 60% inhibition for rat-derived *P. carinii* and 25% inhibition for mouse-derived *P. carinii* in samples which were preincubated with  $17 \cdot 10^{-6}$  M pentamidine (fig 4A).

#### *Influence of the integrity of the P. carinii or target cell cytoskeleton*

The effect of the cytochalasin B, which blocks the actin polymerisation [12], on *P. carinii* attachment to Vero cells has been investigated. *P. carinii* attachment was markedly inhibited (55% for rat-derived *P. carinii* and 30% for mouse-derived *P. carinii*) when parasite samples were preincubated 8 h with cytochalasin B (fig 4B). In contrast, no inhibition of the attachment of untreated *P. carinii* to cytochalasin B-treated Vero cells was observed (data not shown).

#### *The effect of neuraminidase or trypsin treatment of the monolayer target culture cells*

The *P. carinii* attachment to MRC-5 or Vero cells (fig 5) was not influenced by the neuraminidase treatment of the target cells. In contrast, trypsin treatment of these cells induced marked inhibition of the parasite attachment (fig 5).



**Fig 3.** Ultrastructure of *Pneumocystis carinii*. Top. Trophozoite. The parasite sample was freeze-thawed at  $-180^{\circ}\text{C}$ . Bottom. Trophozoite showing marked alterations induced by freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The morphology of parasites frozen at  $-180^{\circ}\text{C}$  was indistinguishable from freshly extracted parasites. Arrow, mitochondria; arrowheads, filopodia; N, nucleus. Bar =  $0.5 \mu\text{m}$ .

#### *Detection of a fibronectin matrix on the target cells*

A fibronectin-rich extracellular matrix was detected by IFA on the surface of MRC-5 cells using an anti-Fn antibody (fig 12). In contrast, the fluorescent labelling was much less intense on Vero cells (data not shown).

#### *Effect of Fn or of the GRGDS peptide on Pneumocystis attachment (fig 6A, B)*

Parasites were preincubated with Fn ( $1-60 \mu\text{g}$ ) or GRGDS peptide ( $1-60 \text{ ng}$ ). An inhibition of the parasite attachment to Vero cells (about 30% inhibition) or MRC-5 cells (about 50% inhibition) has been induced by Fn (fig 6A). The inhibition has already been observed with  $1 \mu\text{g}$  of Fn. A similar inhibitory effect has been obtained using the GRGDS peptide: the peak of inhibitory effect of parasite attachment to both cell lines was reached with 10 ng of peptide (fig 6B). No effect was observed when parasites were preincubated with control peptides (fig 7).

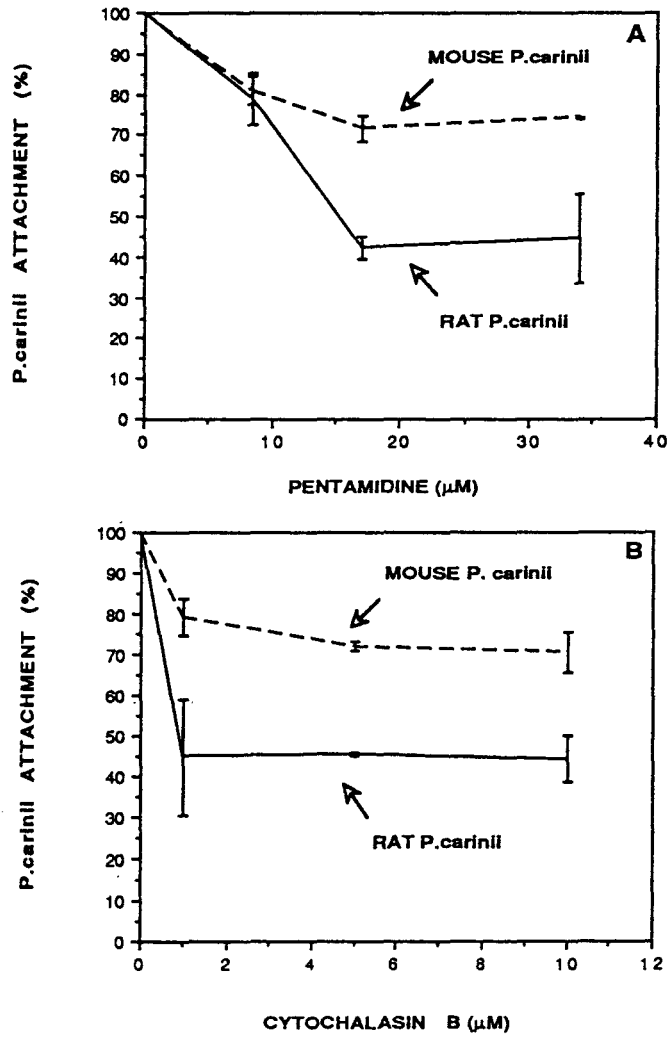


Fig 4. Influence of pentamidine (A) or cytochalasin B (B) on the mouse or rat *P. carinii* attachment to Vero cells. Curves show the percent of attachment in relation to the control sample. Each data point represents three determinations (mean ± standard deviation).

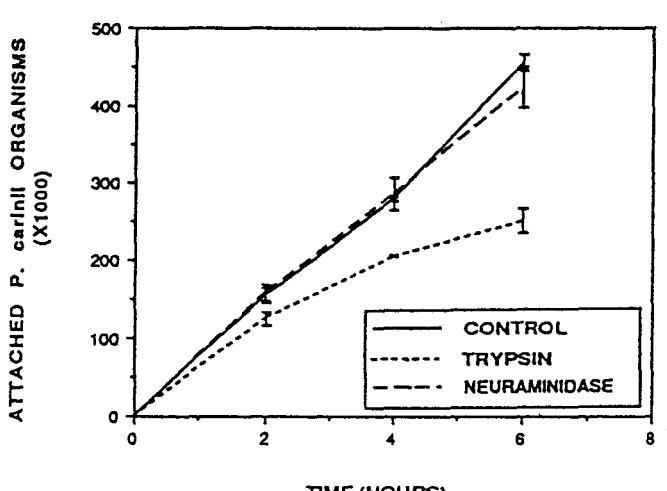


Fig 5. Kinetic of mouse *P. carinii* attachment to neuraminidase (10 mU/ml)- or trypsin (1 mg/ml)-treated Vero cells.

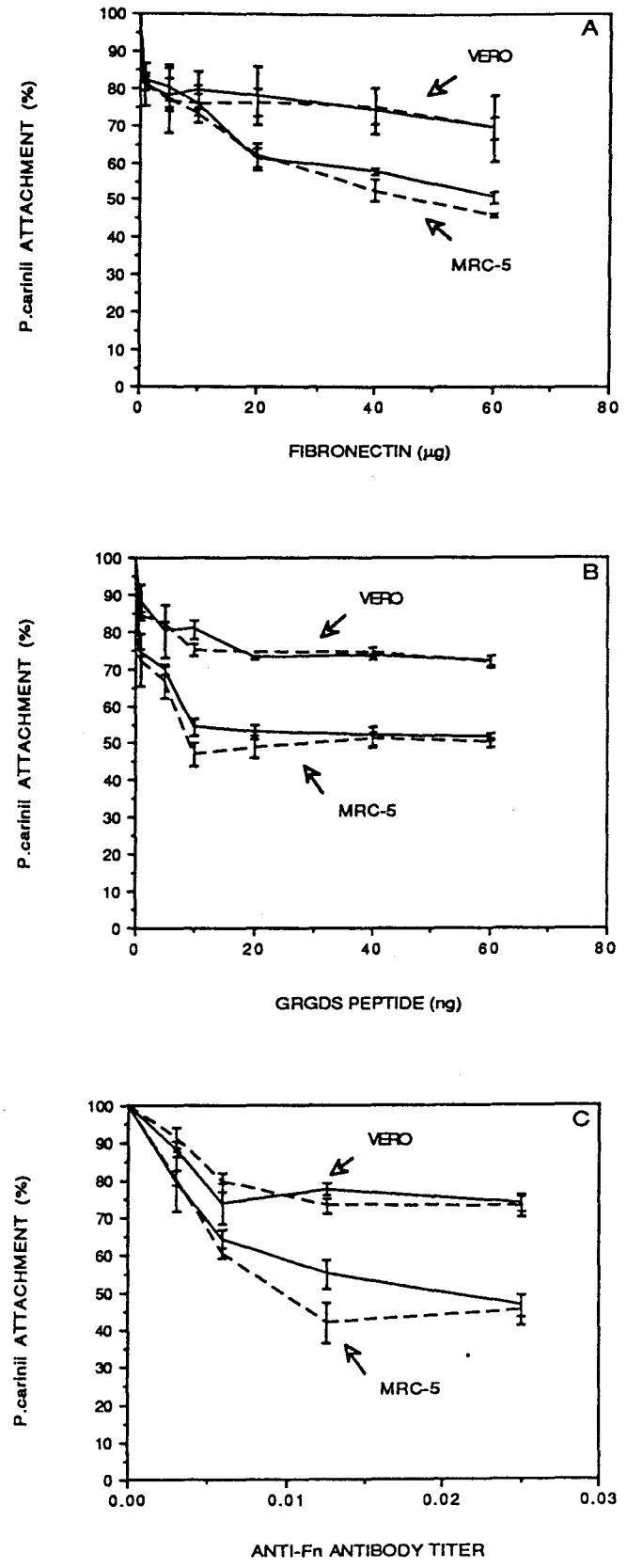


Fig 6. Effect of parasite preincubation with fibronectin (A), GRGDS peptide (B), or cell preincubation with anti-fibronectin antibody (C) on the mouse *P. carinii* attachment to Vero or MRC-5 cells. The parasite counts were made on Giemsa (—) or immunofluorescence staining (---) after 6 h of incubation. Curves show the percent of attachment in relation to the control sample. Each data point represents three determinations (mean ± standard deviation).



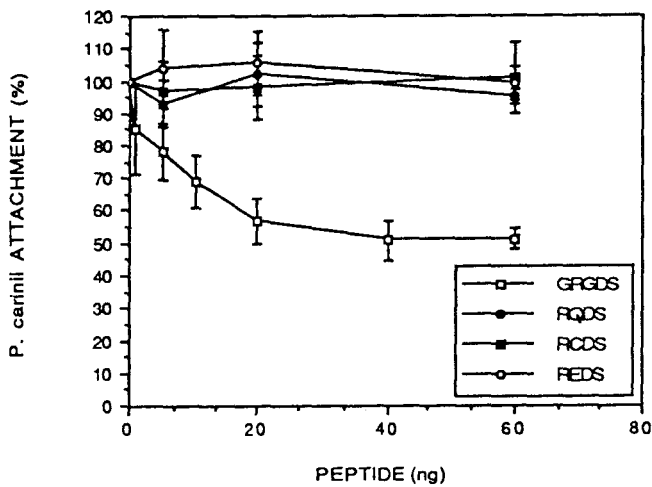


Fig 7. Effect of the parasite preincubation with GRGDS, RQDS, RCDS or REDS peptides on the mouse *P. carinii* attachment to MRC-5 cells. The parasite counts were made on Giemsa after 6 h of incubation. Curves show the percent of attachment in relation to the control sample. Each data point represents three determinations (mean  $\pm$  standard deviation).

#### Effect of an anti-Fn antibody on *Pneumocystis* attachment (fig 6C)

Preincubation of monolayer MRC-5 or Vero cell cultures with a rabbit anti-human Fn polyclonal antibody induced a decrease of *P. carinii* attachment. Highest inhibition (about 30% attachment inhibition to Vero cells and about 55% attachment inhibition to MRC-5 cells) has been observed from a 1:80 titer. No inhibition has been observed when parasites were preincubated with a control rabbit serum.

#### Discussion

Although the presence of the parasite in the alveolar lumen is associated with typical changes (macrophagic infiltrate in the alveolar septa, alveolar type II cell hypertrophy and filling of the alveolar spaces with a foamy eosinophilic exudate) [1, 6, 13, 34], none of them seems to be directly induced by parasite attachment. However, it was suggested that *in vivo* attachment of *P. carinii* to epithelial alveolar cells could be involved in the development of PCP [16, 17]. A direct effect of *P. carinii* on type I pneumocytes or changes in the surfactant layer, secondary to the parasite attachment, might be responsible for the

increased permeability of the alveolar-capillary membrane, which would be the primary injury in PCP [33].

The biological function of the *P. carinii* attachment remains unclear. As it is difficult to study this phenomenon *in vivo*, an *in vitro* model of parasite attachment to monolayer cultures was used in this work. The parasite attachment was evaluated using standardized microscopical methods which are now routinely used in our laboratory to evaluate the ability of *P. carinii* isolates to attach to cultured epithelial or fibroblastic cells. Vero and MRC-5 cell lines were selected to study *P. carinii* attachment in the present work. They were previously used for *P. carinii* cultures [15, 24], and it has been recently shown by TEM [7] that *P. carinii* is able to attach *in vitro* to both fibroblastic lines. Although the *in vitro* *P. carinii* attachment seemed to be similar to that observed *in vivo*, no plasmalemmal vesicles [7, 21] were seen in the underlying cytoplasm of the target cell ([7] and present work).

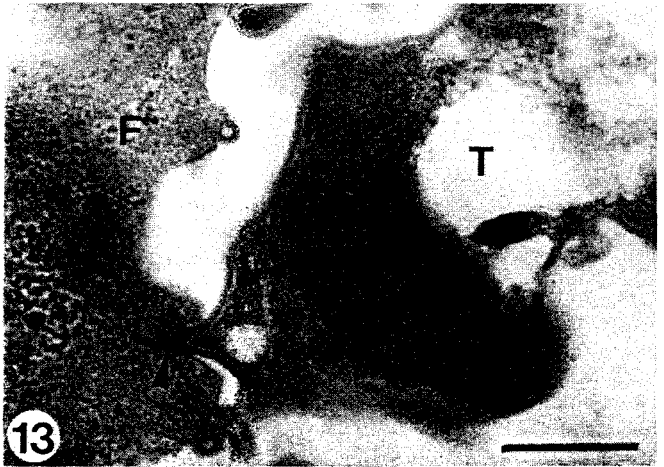
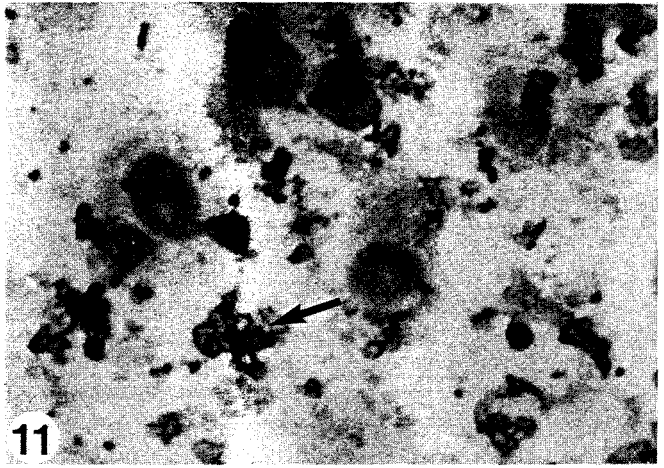
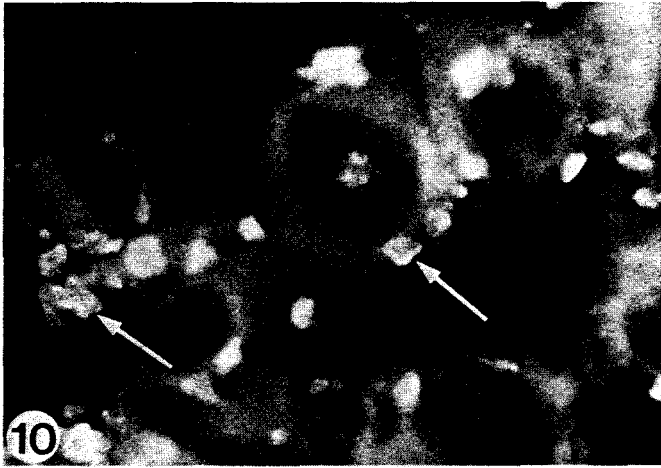
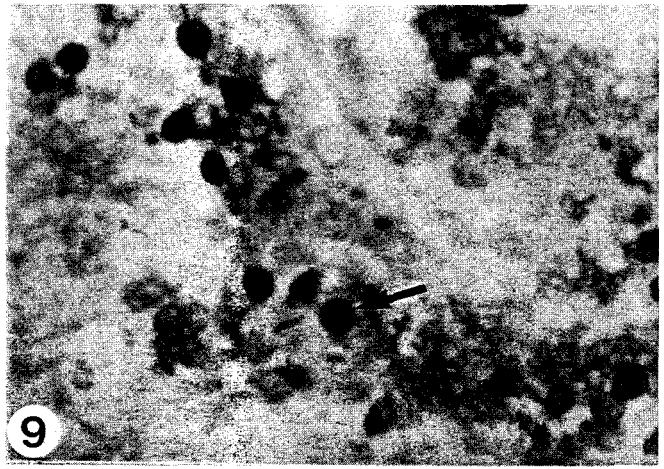
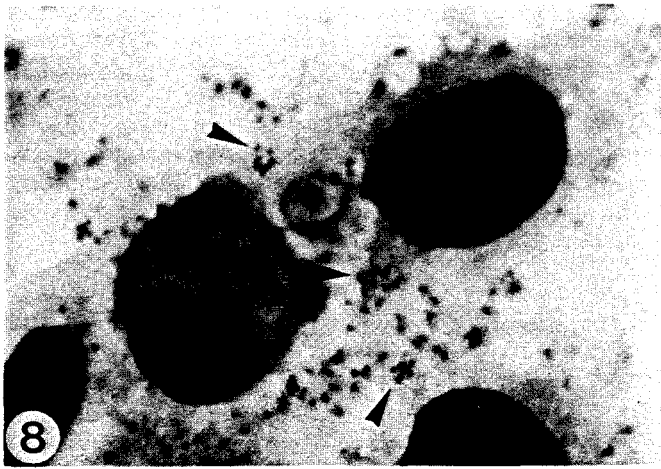
Kinetic experiments (fig 1) showed that the *in vitro* *P. carinii* attachment takes place from the first hours of incubation onwards independently of the *P. carinii* sample origin or of the target cell line. Thus, a 6-h incubation period makes it possible to evaluate accurately the ability of a *P. carinii* isolate to attach to a given cell line, as well as the influence of physical, chemical or other factors on the parasite attachment.

The phase of increasing parasite attachment was followed by a short stationary phase, and then by a more or less rapid decreasing phase (fig 1). The decreasing phase may be due either to *in vitro* death of parasites or to a secondary 'physiological' parasite separation or detaching from target cells, as it has been reported in *Trypanosoma cruzi* [22]. As vital stains give no measure of the *P. carinii* viability or integrity [31], they could not be used to verify the first hypothesis.

In this work it has been established that killed *P. carinii* organisms are unable to attach to cultured cells. Both, formaldehyde treatment or freezing-thawing at  $-20^{\circ}\text{C}$  of *P. carinii* organisms, induced strong inhibition of the parasite attachment (fig 2). Attachment was also inhibited by the formaldehyde treatment of target cells. These results showed that both the viability of the target cell and the parasite are critical conditions for *P. carinii* attachment. Therefore, the attachment test could be useful to test parasite viability, which is still difficult to evaluate [4, 31].

In this work is clearly shown that freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  induced marked ultrastructural alterations (fig 3) in parasites which after thawing were not able to attach to cultured cells. Thus, parasite samples submitted to  $-20^{\circ}\text{C}$  would be non-viable. In contrast, freezing at  $-180^{\circ}\text{C}$  (with a cryoprotective agent) and rapid subsequent thawing induced no inhibition of *P. carinii* attachment and no ultrastructural alterations of parasites. The susceptibility of *P. carinii* to  $-20^{\circ}\text{C}$  freeze stress might be considered

Figs 8–15. *In vitro* attachment of mouse *P. carinii*: light microscopy. 8. Trophozoite clusters (arrow) attached to Vero cells (12-h incubation). Precysts and cysts are also seen (arrowheads). Methanol Giemsa. ( $\times 500$ ). 9. Walled forms attached to MRC-5 cells (arrow) after 4 h of incubation. Toluidine blue O staining. ( $\times 250$ ). 10. Trophozoite clusters (arrows) attached to Vero cells (6-h incubation). Immunofluorescence staining using the mAb 4F2 ( $\times 400$ ). 11. Trophozoite clusters (arrow) attached to Vero cells (4-h incubation). Immunoperoxidase staining using the mAb 4F2 ( $\times 250$ ). Demonstration of fibronectin on cell monolayers. 12. Fibronectin (Fn) matrix on the MRC-5 cell surface detected by using an FITC-labelled anti-Fn polyclonal antibody ( $\times 400$ ). *In vitro* attachment of rat *P. carinii*: transmission electron microscopy. Attachment of *Pneumocystis* trophozoites to Vero cells (13) and MRC-5 cells (14) 72 h post-inoculation. Bulged filopodia (arrowheads) penetrate into the target cell cytoplasm; the host cell plasmalemma shows no discontinuity. 15. Attachment of *Pneumocystis* trophozoites to MRC-5 cells, 72 h post-inoculation. Close apposition (arrowhead) of a trophozoite to MRC-5 cells is observed; F, fibroblasts; T, trophozoite. Bar =  $0.5\ \mu\text{m}$ .



as evidence against fungal nature of the parasite in so far as many fungi resist to freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  and are able to grow after thawing [9, 27].

When pentamidine, an anti-*P. carinii* molecule [11], was present, the rate of parasite attachment was low. It is unclear if the pentamidine effect was due to parasite death. The pentamidine induced inhibition (fig 4A) was lower than that induced by the killing of parasites with formaldehyde or by freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The low inhibitory effect of pentamidine was consistent with the relatively modest inhibition of the parasite *in vitro* growth induced by the drug [5].

Ultrastructural studies showed that microtubules are present in the parasite cytoplasm and filopodia [14]. The *P. carinii* *in vitro* attachment was partially inhibited by cytochalasin B treatment of parasites ([17] present results). In contrast, when the target cell cytoskeleton was impaired with cytochalasin B, the parasite attachment was not affected (present results).

Trypsin treatment of target cells inhibited *P. carinii* attachment, suggesting that either protein molecules are involved in parasite attachment or cell surface structures involved in attachment are carried by proteins. On the contrary, no evidence has been obtained that sialic acids play a role in the attachment phenomenon.

In order to study the role of Fn in *P. carinii* attachment an original approach was used. Preincubation of mouse-derived parasites with Fn or target cells with an anti-Fn antibody inhibited *P. carinii* attachment. Attachment was also inhibited when parasites were preincubated with a GRGDS peptide (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) which carries the cell-adhesion sequence of the Fn molecule. The specificity of the RGDS-induced inhibition of the *in vitro* *P. carinii* attachment was attested by the use of RQDS, RCDS, REDS peptides which differs from the GRGDS peptide by the substitution of a single amino acid. These results suggest that mouse-derived *P. carinii* trophozoites have a specific Fn binding site on their surface which could be involved in the adhesion to the Fn domain containing the RGD sequence or to a Fn-GRGDS-like sequence. Actually, the saturation of the attachment inhibition phenomenon induced by GRGDS was apparent from a  $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  peptide/parasite ratio. This was consistent with observations of Pottratz and Martin [25] who showed, by Scatchard analysis, that the number of Fn molecules bound per rat-derived *P. carinii* trophozoite was about  $6.4 \times 10^5$ .

The present work showed also that MRC-5 cells synthesize and/or release much more Fn than Vero cells. This observation was consistent with the fact that a higher Fn-, anti-Fn antibody- or GRGDS-induced inhibition (50%) of *P. carinii* attachment was recorded when targets were MRC-5 cells (fig 5). These results are in agreement with the observations reported previously by Pottratz *et al* [25, 26] using an anti-Fn antibody and another model.

Although Fn seems to play a role in the *P. carinii* mechanism of attachment, other mechanisms are probably involved. Actually, the Fn-, anti-Fn antibody- or GRGDS-induced inhibition of *P. carinii* attachment was never more than 30% using Vero cells, whereas trypsin treatment of the same target cells induced a decrease of about 50%. Moreover, although Fn is less abundant on Vero cells than on MRC-5 cells (fig 12) the same number of parasites attached to both cell types (fig 1).

In spite of the fact that antigenic [10, 16], genomic [29] and ultrastructural host-species related differences [8] have been reported between *P. carinii* isolates, in the present work only minor differences were recorded in the kinetics

of attachment between mouse- and rat-derived *P. carinii*. However, our results clearly showed that the response of parasites from these two host species to drugs was different (fig 4). This observation suggests that drug susceptibility might differ between isolates from different host-species. This fact may have marked practical consequences, in so far as the *in vivo* or *in vitro* evaluation of the anti-*Pneumocystis* activity of drugs is generally performed using *P. carinii* from rat origin.

### Acknowledgments

This work was supported in part by the French National Agency of Research on AIDS (ANRS) and INSERM. We thank Dr A Achbarou for his advice on some aspects of this work, Mrs Ch Mullet for his valuable technical assistance and Mrs M Brugge for reviewing the English of the text.

### References

- Bartlett MS, Smith JW (1991) *Pneumocystis carinii*, an opportunistic in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 4, 137-149
- Bartlett MS, Goheen MP, Queener SF, Durkin MM, Smith JW (1991) Close association of *Pneumocystis carinii* trophic forms with culture cells as shown by immune specific staining and electron microscopy. Proceedings of the 40th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. *Am J Trop Med Hyg* 45, 233
- Chalvardjian AM, Grawe LA (1963) A new procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cysts in tissue sections and smears. *J Clin Pathol* 16, 383-384
- Cushion MT (1989) *In vitro* studies of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 36, 45-52
- Cushion MT, Stanforth D, Linke MJ, Walzer PD (1985) Method of testing the susceptibility of *Pneumocystis carinii* to antimicrobial agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 28, 796-801
- Dei-Cas E, Soulez B, Palluault F, Charet P, Camus D (1990) *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. *Med Sci* 6, 517-525
- Dei-Cas E, Jackson H, Palluault F, Aliouat EM, Hancock V, Soulez B, Camus D (1991) Ultrastructural observations on the attachment of *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *J Protozool* 38 (Suppl), 205-207
- Dei-Cas E, Cailliez JC, Palluault F, Aliouat EM, Mazars E, Soulez B, Suppin J, Camus D (1992) Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent? *Eur J Epidemiol* 8, 460-470
- Deverall BJ (1965) Psychrophiles. In: *The Fungi. An advanced Treatise, vol III* (Ainsworth GC, Sussman AS, eds) Academic Press, New York, 129-135
- Gigliotti F (1992) Host species-specific antigenic variation of a mannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 165, 329-336
- Goa KL, Campoli-Richards DM (1987) Pentamidine isethionate. A review of its antiprotozoal activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Drugs* 33, 242-258
- Goldman RD (1972) The effects of cytochalasin B on the microfilaments of baby hamster kidney (BHK-21) cells. *J Cell Biol* 52, 246-254
- Hughes WT (1987) *Pneumocystis carinii* Pneumonitis (CRC, eds) CRC Press, Boca Raton
- Itatani CA, Marshall J (1988) Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* *in situ* and from bronchoalveolar lavage. *J Parasitol* 74, 700-712
- Jackson HC, Hancock V, Elahi N (1991) Analysis of the dynamics of *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *J Protozool* 38, 93S-95S

- 16 Kovacs JA, Halpern JL, Lundgren B, Swan JC, Parrillo JE, Masur H (1989) Monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*: identification of specific antigens and characterization of antigenic differences between rat and human isolates. *J Infect Dis* 159, 60–70
- 17 Limper AH, Martin WJ (1990) *Pneumocystis carinii*: inhibition of lung cell growth mediated by parasite attachment. *J Clin Invest* 85, 391–396
- 18 Long EG, Smith JS, Meier JL (1986) Attachment of *Pneumocystis carinii* to rat pneumocytes. *Lab Invest* 54, 609–615
- 19 Matsumoto Y, Yoshida Y (1984) Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in prekysts. *J Protozool* 31, 420–428
- 20 Millard PR, Wakefield AE, Hopkin JM (1990) A sequential ultrastructural study of rat lungs infected with *Pneumocystis carinii* to investigate the appearances of the organism, its relationships and its effect on pneumocytes. *Int J Exp Pathol* 71, 895–904
- 21 Nielsen MH, Settnes OP (1991) Morphology of *Pneumocystis carinii* and activation of the plasmalemmal vesicular system in alveolar epithelial cells of the host. *APMIS* 99, 219–225
- 22 Ouaisi MA, Cornette J, Schöneck R, Plumas-Marty B, Taibi A, Loyens M, Capron A (1992) Fibronectin cleavage fragments provide a growth factor-like activity for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Eur J Cell Biol* 59, 68–79
- 23 Palluault F, Slomianny C, Soulez B, Dei-Cas E, Camus D (1992) High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embedding. *Parasitol Res* 78, 437–444
- 24 Pifer LL, Hughes WT, Murphy MJ (1977) Propagation of *Pneumocystis carinii* in vitro. *Pediatr Res* 11, 305–316
- 25 Pottratz ST, Martin WJ (1990) Role of fibronectin in *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells. *J Clin Invest* 85, 351–356
- 26 Pottratz ST, Paulsrud J, Smith JS, Martin II WJ (1991) *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp 120, a fibronectin binding protein. *J Clin Invest* 88, 403–407
- 27 Raper KB, Fennell DL (1965) *The genus Aspergillus*. Williams & Wilkins Company, Waverly Press, Baltimore, p 58
- 28 Schmatz DM, Romancheck MA, Pittarelli LA, Schwartz RE, Frontling RA, Nolstadt KH, Vanmiddlesworth FL, Turner MJ (1990) Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia with 1,3- $\beta$  glucan synthesis inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5950–5954
- 29 Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM (1991) *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human host are genetically distinct. *Mol Biochem Parasitol* 45, 183–184
- 30 Soulez B, Dei-Cas E, Camus D (1988) Le lapin, hôte expérimental de *Pneumocystis carinii*. *Ann Parasitol Hum Comp* 63, 5–15
- 31 Soulez B, Dei-Cas E, Palluault F, Camus D (1991) Morphological evaluation of *Pneumocystis carinii* after extraction from infected lung. *J Parasitol* 77, 449–453
- 32 Soulez B, Palluault F, Dei-Cas E, Aliouat EM, Camus D (1991) Production of a monoclonal antibody using lymphocytes from *Pneumocystis* infected mice. *J Protozool* 38 (Suppl), 189–190
- 33 Walzer PD (1984) Experimental models of *Pneumocystis carinii* infections. In: *Pneumocystis carinii Pneumonia* (Young LS, ed) Marcel Dekker, Inc, 31–32
- 34 Walzer PD (1991) Immunopathogenesis of *Pneumocystis carinii* infection. *J Lab Clin Med* 118, 206–216
- 35 Yoshida Y (1989) Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 36, 53–60

## Inhibitory effect of a yeast killer toxin to the *in vitro* *Pneumocystis carinii* attachment

E M Aliouat<sup>1</sup>, J C Cailliez<sup>1,2</sup>, N Séguy<sup>1</sup>, E Dei-Cas<sup>1,3</sup>, L Polonelli<sup>4</sup>, M Gerloni<sup>4</sup>, S Conti<sup>4</sup> and D Camus<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>I.N.S.E.R.M. (U. 42), 369, rue Jules Guesde, 59651 Villeneuve d'Ascq; <sup>2</sup>Faculté Libre des Sciences, 13 rue de Toul, 59046 Lille; <sup>3</sup>Centre Hospitalier Régional et Universitaire, 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France; <sup>4</sup>Istituto di Microbiologia, Università Degli Studi di Parma, Via A. Gramsci, 14, 43100 Parma, Italy

### Summary

The effect of a killer toxin produced by the yeast *Pichia anomala* on the *in vitro* attachment of *Pneumocystis carinii* to Vero cells was investigated. The killer toxin induced a marked inhibition of the parasite attachment. This effect was neutralized with a specific anti-toxin monoclonal antibody. The toxin was localized on *P. carinii* trophozoites by immunofluorescence assay, suggesting that specific receptors are present in the life cycle stage involved in the parasite adhesion. The inhibition of the attachment was due either to the death of parasites or to a specific inhibitory effect of the toxin on the adhesion mechanisms of *P. carinii*.

Key words: *Pneumocystis carinii*, *Pichia anomala*, yeast killer toxin, *in vitro* attachment, immunotherapy

### Introduction

*Pneumocystis carinii*, is a widespread eukaryotic microorganism found in the lung of man and mammals. This unicellular parasite is able to proliferate extensively in the alveoli, becoming an important agent of severe pneumonitis in immunosuppressed patients, especially in humans suffering from acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Its taxonomic position is uncertain<sup>1-3</sup>. It has still to be established if *P. carinii* must be classed among the protozoa, the fungi or included in another eukaryotic group. Results of comparative study of nucleic acid sequences suggest that pneumocystis is a fungus<sup>4-8</sup>.

In this work, the effect of a yeast killer toxin on the *in vitro* attachment of *P. carinii* to fibroblasts was investigated. Vero cells were chosen for two main reasons. These fibroblasts have been used extensively in our laboratory to study the attachment of the parasite because of their good adaptation to the *in*

*vitro* culture compared to pneumocytes. Moreover, our previous investigations in electron microscopy have shown a very effective *in vitro* attachment of *P. carinii* trophozoites to Vero cells<sup>9</sup>.

Yeast killer toxins are naturally secreted molecules characterized by a specific antimicrobial activity, directed against a large panel of congeneric and, sometimes, intergeneric species<sup>10</sup>. Three reasons led us to perform this study. First, a susceptibility of *P. carinii* to yeast killer toxins might be quoted as an argument in favour of its fungal nature<sup>11</sup>. Second, killer toxins have previously been used as epidemiological markers for intraspecific differentiation of opportunistic yeasts<sup>12</sup>. Similarly, the yeast killer phenomenon could be useful to characterize *P. carinii* isolates from different hosts and geographic areas. Finally, a new prophylactic and therapeutic antimicrobial strategy, based on the killer phenomenon, was proposed<sup>12,13</sup>. Because *P. carinii* is known to be susceptible to a small number of antimicrobial agents which frequently induce unwanted effects<sup>14</sup>, it could be possible to apply this new strategy to the prevention and treatment of *P. carinii* pneumonia (PCP).

In the present report we studied the effect of a *Pichia anomala* killer toxin, selected for its wide range

Received: 5 January 1993

Accepted: 15 January 1993

Correspondence and reprint requests to: Dr J C Cailliez, I.N.S.E.R.M.

(U. 42), 369 rue Jules Guesde, 59651 Villeneuve d'Ascq, France

© 1993 Butterworth-Heinemann Ltd

0888-0786/93/020102-05

of antimicrobial activity, on the *in vitro* attachment of rat- and mouse-derived *P. carinii* organisms. An anti-killer toxin monoclonal antibody (Mab KT4) was used to attest the specificity of the killer activity and to localize the toxin binding sites at the surface of the parasite.

## Materials and methods

### Sources of *Pneumocystis carinii*

Corticosteroid-treated mice or rats were used as a source of *P. carinii* organisms. Male or female outbred white mice, with naturally acquired latent *P. carinii* infection<sup>15</sup>, were administered prednisolone metasulfobenzate (Houdé Laboratories, France), in the drinking water (40 mg l<sup>-1</sup>) for 9–12 weeks. Female Wistar rats were administered dexamethasone (Merck, Sharp and Dohme Chibret, France) in the drinking water (2 mg l<sup>-1</sup>) for 6–9 weeks<sup>16</sup>. Mice and rats were housed in a conventional room in our laboratory animal facilities and were given standard food (UAR, France) and water ad libitum.

### Extraction and quantitation of *P. carinii* organisms

The lungs of infected animals were removed. Light microscopical assessment was carried out on lung impression smears stained with either toluidine blue O (TBO)<sup>17</sup> and RAL-555, a Giemsa-like staining (Soc. RAL, France)<sup>18</sup>. Infected lungs were cut into 1 mm<sup>3</sup> pieces in sterile Dulbecco minimum essential medium (DMEM) (F0455-Biochrom KG, Berlin) and stirred using a magnetic stirrer in an Erlenmeyer flask in DMEM for 1 h at 4° C. The homogenate was then poured through gauze and centrifuged at 2900 g for 10 min (4° C). The pellet was resuspended in a buffered haemolytic solution (9 : 1 solution of NH<sub>4</sub>Cl 0.15 M in Tris-HCl 20 mM pH 7.4), incubated for 10 min at 4° C and centrifuged (4° C). The pellet was resuspended in DMEM and filtered successively through 250–63 µm stainless steel sieves to remove large particles. This step made it easier to filter the suspension through 10–8 µm filters (Nuclepore, Serlabo, France). The filtrate was centrifuged, resuspended in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (Biochrom KG, Berlin) before use in the *in vitro* attachment assay (see below). Parasite counts were performed on air-dried smears stained with TBO and RAL-555 stain<sup>19</sup>. Intermediate, late precysts and cysts were counted on TBO homogenate smears. The relative percentage (differential parasite count) of all parasite stages was evaluated on homogenate smears stained with RAL-555 stain. The nomenclature for the *P. carinii* life cycle stages was based on the ultrastructural description reported by Matsumoto and Yoshida<sup>20</sup> correlated with the light microscopic aspect of each stage<sup>2</sup>. Parasites suspended in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS were used on the attachment assays.

### *In vitro P. carinii attachment assay*

Vero cells (CCL No. 81 American Type Culture Collection) were used as target cell populations. They were grown in DMEM supplemented with 5% heat-inactivated FCS on glass coverslips placed in the wells of 24-well flat bottom plates (Costar, France). When monolayer cultures were sub-confluent, the medium was removed and 1 ml of the parasite suspension (about 3.10<sup>6</sup> parasites) was added in each well. Plates were incubated at 37° C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, coverslips were washed three times with Dulbecco phosphate buffered saline (DPBS) (Biochrom KG, Berlin) at 37° C to eliminate unattached parasites. Attached *P. carinii* organisms were microscopically detected using methanol-Giemsa<sup>19</sup>. Each experiment was made in triplicate. The number of attached parasites was calculated as follows:

$$\text{Number of attached parasites} = n \times \text{Ca/Fa}$$

n: average parasite counts per oil immersion field (10 fields were counted for each coverslip)  
Ca: coverslip area  
Fa: oil immersion field area

### Production of yeast killer toxin

The *Pichia anomala* UCSC 25F strain was chosen in this study for its recognized killer phenotype<sup>10</sup>. Different media were used comparatively for evaluating yeast killer toxin production according to the following procedure. An inoculum of the *P. anomala* killer strain, grown for 24 h on Sabouraud agar at 25° C, was inoculated into a 100 ml flask of: (i) Sabouraud broth pH 4.6 (Diagnostic Pasteur, France); (ii) DMEM pH 7.4 with 10% FCS; (iii) DMEM pH 7.4 without 10% FCS; (iv) DMEM pH 4.6 with 10% FCS; (v) DMEM pH 4.6 without 10% FCS. After 24 h at 25° C, the yeast suspensions were centrifuged (1500 g, 5 min) to discard the yeast cells. The supernatants were filtered through 0.22 µm filters (Millipore, France) and stored at -70° C before use.

### Evaluation of the yeast killer activity

The potential killer activity of the *P. anomala* UCSC 25F strain was evaluated by using the following procedures. Isolates of *P. anomala* UM3, a recognized sensitive strain, were plated onto the surface of yeast extract peptone dextrose (YEPD) agar (pH 4.6). Then, 5 mm-diameter wells were made in the agar and filled with 100 µl of each supernatant to be tested. The plates were incubated for 24 h at 25° C before reading results. The killer effect was considered positive when a clear zone of inhibition was observed. Boiled supernatants or sterile culture media (Sabouraud or DMEM) were used in negative control tests.

### Assessment of the killer toxin activity on the *in vitro P. carinii attachment*

The *P. anomala* UCSC 25F killer toxin activity on the *P. carinii* attachment was evaluated using the *in vitro*



attachment assay. *P. carinii* samples were preincubated with the killer toxin for 1 h or 2 h at 25° C. Three control assays were carried out as follows. First, parasites were preincubated in different media without killer toxin (DMEM supplemented with 10% FCS pH 4.6, 7.4 or in Sabouraud medium pH 4.6). Second, parasites were preincubated with boiled killer toxin. Third, parasites were preincubated with killer toxin, which was previously incubated (1 h, 25° C) with an anti-*P. anomala* UCSC 25F killer toxin monoclonal antibody (Mab KT4) to neutralize its killer activity<sup>21</sup>. After centrifugation of the experimental and control *P. carinii* samples (2900 g, 5 min), pellets were resuspended in DMEM (fresh medium without toxin) pH 7.4 supplemented with 10% FCS. Each dilution was prepared to obtain a final parasite suspension of 3.10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> *P. carinii* organisms. Parasite samples were then added to Vero monolayer cell cultures (1 ml of the parasite suspension by well) to evaluate the parasite attachment. For each condition, the attachment was evaluated in three coverslips. Data reported in this work resulted from several experiments.

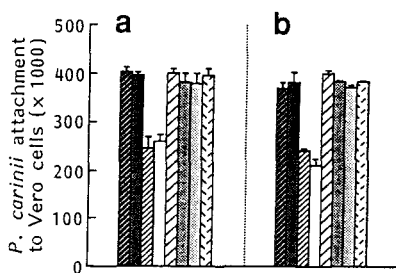
#### Immunofluorescence assay (IFA)

The *P. anomala* killer toxin fixed on *Pneumocystis* organisms was detected by immunofluorescence assay (IFA) on living cells in batches, using the Mab KT4 and a fluorescein-isothiocyanate conjugated (FITC) sheep anti-mouse immunoglobulin (FITC-SAM/IgG, Dako, Denmark) as previously described<sup>22</sup>. Briefly, living parasites were incubated with the killer toxin for 1 h at 25° C. After washing, the cells were incubated for 1 h at 37° C in a DPBS dilution (1/100) of Mab KT4. After washing, a second incubation was performed for 1 h at 37° C in FITC-SAM/IgG diluted 1/50 in DPBS. Negative controls were incubated with the Mab KT4 without previous incubation with the killer toxin.

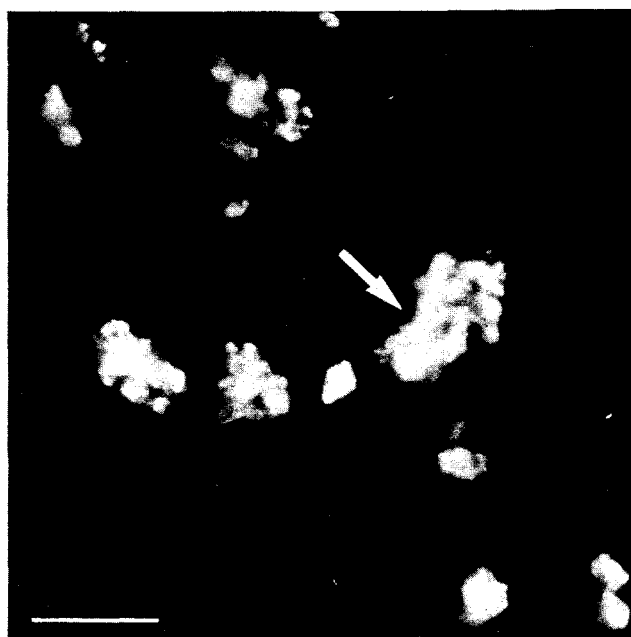
#### Results

The *P. anomala* killer toxin produced in Sabouraud broth, or in DMEM pH 4.6 (with or without 10% FCS), showed a marked killer effect on the *P. anomala* UM3 sensitive strain. This killer effect was not affected by freezing (-70° C). In contrast, the yeast killer toxin produced in DMEM pH 7.4 (with or without 10% FCS) was not active.

The rat-derived *P. carinii* organisms which were preincubated in media at pH 4.6 without killer toxin, with boiled killer toxin, or with Mab KT4-neutralized killer toxin, attached to Vero cells (Figure 1). The same results were obtained by using parasites which were preincubated in DMEM pH 7.4 (Figure 1). In contrast, a marked inhibition (34–45%) of the *P. carinii* attachment to Vero cells was induced by the *P. anomala* killer toxin produced in Sabouraud broth, or in DMEM pH 4.6 (Figure 1). The inhibition of the attachment was not significantly influenced by the time of preincubation (1 h or 2 h) of parasites with the killer



**Figure 1.** Inhibitory effect of the *Pichia anomala* UCSC 25F killer toxin on the attachment of rat-derived *Pneumocystis carinii* to Vero cells. Before the attachment assay (see text) the parasites were preincubated 1 h (a) or 2 h (b) with the killer toxin (KT) either in Dulbecco minimum essential medium pH 4.6 (KT in DMEM pH 4.6) or in Sabouraud medium (KT in Sabouraud). Control samples were preincubated in the same media with or without boiled killer toxin or killer toxin neutralized with the anti-killer toxin monoclonal antibody (MabKT4-KT). Each attachment assay was performed with Vero cells maintained in DMEM pH 7.4 supplemented with 10% FCS. The number of attached parasites is represented in the vertical axis. Each value is the mean of three experiments ( $\pm$ SD). ▨ DMEM pH 4.6; ▤ Sabouraud pH 4.6; ▩ KT in DMEM; □ KT in Sabouraud; ▨ MabKT4-KT in DMEM; ▤ MabKT4-KT in Sabouraud; □ Boiled KT in DMEM; ▩ Boiled KT in Sabouraud.



**Figure 2.** Detection of the *Pichia anomala* UCSC 25F killer toxin on rat-derived *Pneumocystitis carinii* trophozoites by indirect immunofluorescence assay, using the anti-*P. anomala* killer toxin monoclonal antibody (Mab KT4) and FITC-conjugated anti-mouse antibodies. The living parasites were incubated with the killer toxin for 1 h at 25° C. Trophozoite clusters (arrows) are intensively stained. Bar = 5  $\mu$ m.

toxin. No different results were observed when mouse-derived *P. carinii* were used (data not shown).

In order to establish if killer toxin-parasite binding took place, IFA was carried out by using the anti-*P. anomala* killer toxin Mab KT4 and FITC-conjugated anti-mouse antibodies. The killer toxin was then localized on *P. carinii* trophozoites (Figure 2). On the contrary, precystic and cystic forms were not stained, attesting the absence of killer toxin binding. The identification of each parasite stage was simultaneously performed by fluorescence and phase contrast microscopy.

## Discussion

In this work is reported the first occurrence of a yeast killer toxin activity against *P. carinii*. As previously described by Polonelli et al.<sup>10,23</sup>, a crude extract of the *P. anomala* killer strain was used. In order to characterize the specificity of the toxin activity against *P. carinii*, several standard controls were made<sup>10</sup>. As this activity was blocked with the Mab KT4, a specific anti-*P. anomala* killer toxin monoclonal antibody which is able to neutralize the killer effect of the toxin<sup>21</sup>, it is concluded that the inhibition of the parasite attachment was due to the *P. anomala* killer toxin. The same monoclonal antibody has been used in immunoblotting assays to characterize the toxin in the secretion products of the yeast killer strain<sup>21</sup>. Furthermore, this killer toxin was localized on the *P. carinii* trophozoite stage using the same specific Mab. This result suggests that specific cell wall receptors are present in this life cycle stage, which is especially involved in the adhesion of the parasite to the target cell<sup>3,9</sup>. Finally, when the toxin was boiled, a well established way to block the *P. anomala* killer effect on yeasts, the *P. carinii* attachment was not inhibited.

The toxin activity was assessed by using an *in vitro* *P. carinii* attachment assay. Therefore, although it was established that dead *P. carinii* organisms are unable to attach<sup>3</sup>, it is unclear if the inhibition of the attachment reported here was due to the death of parasites or to a specific inhibitory effect of the yeast toxin on the adhesion mechanisms of *P. carinii* organisms.

Killer toxins have been found among several yeast genera such as *Saccharomyces*, *Ustilago*, *Kluyveromyces* or *Pichia* (*Hansenula*)<sup>12,13</sup>. The killer effect was first described as a specific interaction between yeasts leading to the death of a sensitive strain following the fixation and toxic activity of an exogenous (glyco) protein secreted by a killer strain<sup>13</sup>. Later it was established that the yeast killer activity (particularly in *Pichia* spp.) may also occur within unrelated groups of eukaryotic (hyphomycetous fungi, *Prototheca stagnora*) and prokaryotic (bacterial) microorganisms<sup>10</sup>. In so far as there are no reports on the effect of yeast killer toxins on protozoan organisms<sup>13,24</sup>, the susceptibility of *P. carinii* to the *P. anomala* toxin might suggest this parasite is not a protozoan.

Yeast killer toxins are attractive antimicrobial agents

because of their specific fixation at the surface of several pathogenic microorganisms, leading to the death of sensitive cells. Attempts have been made to use yeast killer toxins in the topical treatment of experimental yeast infections<sup>25</sup>. When contemplating this therapeutic use, the main consideration was a limited availability of the effective antifungal properties of natural toxins *in vivo* and the induction of additional pathological effects against the host cells<sup>12</sup>. Yeast killer toxins are not utilized as systemic antibiotics because, as might be expected of large, foreign proteins, they are both toxic and antigenic. Moreover, killer toxins proved to be very labile at physiological temperatures and pH host conditions<sup>26</sup>.

Recently, it has been shown that anti-idiotypic antibodies could be produced against a monoclonal antibody specific of the killer toxin active site (Mab KT4), and mimicked the killer properties of the toxin itself. These anti-idiotypic antibodies, with antibiotic properties similar to those of the toxin, were called antibiobodies<sup>26</sup>. Antibiobodies elicited *in vivo* by immunization with the complementary anti-toxin Mab KT4 (idiotypic vaccination) proved to be protective for mice against lethal inocula of *Candida albicans* cells<sup>12,13</sup>. This effect was based on the existence of specific relations between the variable region of antibiobodies (internal image of the active site of the yeast toxin) and complementary receptors which are present at the cell surface of the target microorganisms. This network system could suggest new immunotherapeutic and vaccination models based on the presence of such toxin receptors at the surface of *P. carinii*. Moreover, it could identify comparatively specific toxin receptors present at the surface of different *P. carinii* life cycle stages or even in other sensitive organisms. Close relationships were already suggested between the toxic effect of different natural antimicrobial products (yeast killer toxins, bacteriocins and ghost bacteriophages) which might be referred to similar molecular models. Most analogies might merely lie in the biochemical nature and functional activity of the specific cell wall receptors<sup>12</sup>.

In the present work, although it is too early to affirm the existence of a real killer effect on *P. carinii*, the parasite appeared clearly sensitive to the *P. anomala* killer strain. Further experiments are being undertaken to characterize the inhibitory effect of the yeast toxin on the parasite *in vivo* attachment to rodent pneumocytes, and its consequences on the infection process.

## Acknowledgements

This work was supported in part by the National Agency for Research on AIDS (ANRS). We thank Mrs Ch. Mullet for her valuable technical assistance and Mr M. Brugge who has reviewed the English text. L. Polonelli is supported in his own work by the National Research Council Targeted Projects Biotechnology and Bioinstrumentation, Prevention and Control of Disease Factors, subproject Etiology of

Infectious Diseases (contract number 91.00121.41/115.15897) and by Ministero della Sanità, Istituto Superiore di Sanità Progetto A.I.D.E. 1000, Rome, Italy.

## References

- 1 Hughes WT. *Pneumocystis carinii*: taxing taxonomy. *Eur J Epidemiol* 1989; 5: 265-9
- 2 Dei-Cas E, Soulez B, Palluault F, Charet P, Camus D. *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. *Médecine/Sciences* 1990; 6: 517-25
- 3 Dei-Cas E, Cailliez JC, Palluault F, Aliouat EM, Mazars E, Soulez B, Suppin J, Camus D. Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent? *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 460-71
- 4 Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 1988; 334: 519-22
- 5 Pixley FJ, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol* 1991; 5: 1347-51
- 6 Stringer SL, Stringer JR, Blase M, Walzer PD, Cushion MT. *Pneumocystis carinii*: Sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp Parasitol* 1989; 68: 450-61
- 7 Stringer JR, Edman JC, Cushion MT, Richards FF, Watanabe J. The fungal nature of *Pneumocystis*. *J Med Vet Mycol* 1992; 30(Suppl. 1): 271-8
- 8 Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, Hopkin MJ. Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 43: 69-76
- 9 Dei-Cas E, Jackson H, Palluault F, Aliouat EM, Hancock V, Soulez B, Camus D. Ultrastructural observations on the attachment of *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *J Protozool* 1991; 38(Suppl.): 205-7
- 10 Polonelli L, Morace G. Re-evaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 866-9
- 11 Wakefield AE, Peters SE, Banerji S, Bridge PD, Hall GS, Hawksworth DL, Guiver LA, Allen AG, Hopkin JM. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. *Mol Microbiol* 1992; 6: 1903-11
- 12 Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Chezzi C. Interfaces of the yeast killer phenomenon. *Crit Rev Microbiol* 1991; 18: 47-87
- 13 Polonelli L, Morace G, Conti S, Gerloni M, Menozzi MG, Cailliez JC. Conceptions et perspectives du phénomène 'killer' chez les levures. *J Mycol Méd* 1991; 1: 284-95
- 14 Bartlett MS, Smith JW. *Pneumocystis carinii*, an opportunist in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(2): 137-49
- 15 Soulez B, Palluault F, Dei-Cas E, Aliouat EM, Camus D. Production of a monoclonal antibody using lymphocytes from *Pneumocystis carinii* infected mice. *J Protozool* 1991; 38(Suppl.): 189-90
- 16 Schmatz D, Romancheck M, Pitarelli L, Schwartz R, Fromtling R, Nollstadt K, Vanmiddlesworth F, Wilson K, Turner M. Treatment of *Pneumocystis carinii* with 1,3- $\beta$ glucan synthesis inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87: 5950-4
- 17 Chalvardjian AM, Grawe LA. A new procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cysts in tissue sections and smears. *J Clin Pathol* 1963; 16: 383-4
- 18 Soulez B, Dei-Cas E, Camus D. Le lapin, hôte expérimental de *Pneumocystis carinii*. *Ann Parasitol Hum Compar* 1988; 63: 5-15
- 19 Soulez B, Dei-Cas E, Palluault F, Camus D. Morphological evaluation of *Pneumocystis carinii* after extraction from infected lung. *J Parasitol* 1991; 77: 449-53
- 20 Matsumoto Y, Yoshida Y. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: Synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J Protozool* 1984; 31: 420-8
- 21 Polonelli L, Morace G. Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 460-2
- 22 Cailliez JC, Gerloni M, Morace G, Conti S, Cantelli C, Polonelli L. Ultrastructural immunodetection of a *Pichia anomala* killer toxin: a preliminary study. *Biol Cell* 1992; 75: 19-23
- 23 Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M, Morace G. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 774-80
- 24 Pfeiffer, P, Radler F, Caspritz G, Hänel H. Effect of a killer toxin of yeast on eukaryotic systems. *Appl Environ Microbiol* 1988; 49: 1211-15
- 25 Polonelli L, Lorenzini R, De Bernardis F, Morace G. Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopath* 1986; 96: 103-7
- 26 Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Castagnola M, Morace G, Chezzi C. 'Antibodies': antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. *J Med Vet Mycol* 1991; 29: 235-42

## Intranasal Inoculation of Mouse, Rat or Rabbit-Derived *Pneumocystis* to SCID Mice

E. M. ALIOUAT<sup>1</sup>, E. MAZARS<sup>1</sup>, E. DEI-CAS<sup>1,2</sup>, J.Y. CESBRON<sup>3</sup>  
AND D. CAMUS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM 42, 369 rue J. Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, <sup>2</sup>Laboratory of Parasitology-Myology, Faculty of Medicine, 1 Place Verdun, 59045 Lille, <sup>3</sup>C. I. B. P.-INSERM 167-CNRS 624, Inst. Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France

Received 20 April 1993 / Accepted 10 July 1993

Key Words: cross infection, *Pneumocystis carinii*, SCID mice, host-species specificity

### ABSTRACT

*Pneumocystis carinii* is a widespread opportunistic agent found in the lungs of mammals. This organism causes severe pneumonia in immunocompromised hosts. Antigenic genomic and karyotypic host-species related differences have been reported among *P. carinii* isolates. Nevertheless, it has not been proved if *Pneumocystis* from a given mammal can infect other host species. We have then attempted to infect *P. carinii* -free SCID mice with either mouse, rat or rabbit-derived *P. carinii* isolates by nasal instillation. Forty and 90 days post-inoculation, only SCID mice instilled with mouse-derived parasites developed *P. carinii* pneumonia (PCP). Our findings suggest that *P. carinii* exhibits strong host species specificity. Furthermore, cross infection experiments would be a useful tool in the identification of *Pneumocystis* species, and in the epidemiology of PCP.

### INTRODUCTION

*Pneumocystis carinii* is an opportunistic agent of severe pneumonia in immunocompromised humans, especially in AIDS patients. A marked biodiversity of *Pneumocystis* has been reported by various authors working on parasite genome (Sinclair et al. 1991; Wakefield et al. 1992), karyotype (Yoganathan et al. 1989; Lundgren et al. 1990; Hong et al. 1990; Weinberg and Bartlett 1991), and antigens (Furuta and Ueda 1987; Linke et al. 1989; Lundgren et al. 1991; Gigliotti 1992).

Most reported differences among parasite isolates have been correlated with the host species, suggesting a marked host species specificity to *Pneumocystis*. In the present study, we have attempted to infect *P. carinii* -free SCID mice (Soulez et al. 1991) with either mouse, rat or rabbit-derived *P. carinii* isolates. SCID mice were selected because cross infection experiments could be hindered by the frequent *P. carinii*

## INTRANASAL INOCULATION OF PNEUMOCYSTIS TO SCID MICE

portage of laboratory animals. Many cross infection experiments have been reported (Walzer 1984; Furuta and Ueda 1987; Sethi 1992; Gigliotti et al. 1993), however only Gigliotti et al. (1993) used *P. carinii*-free recipient hosts. Furthermore, considering that *P. carinii* may be acquired from the environment (Hughes 1987), cross infection experiments in the present study had to be carried out under sterile conditions.

Cross infection experiments would be useful in the taxonomy of *Pneumocystis* at the species level, and in the epidemiology of *P. carinii* pneumonitis.

### MATERIALS AND METHODS

Corticosteroid-treated mice and rats, and non-immunosuppressed rabbits at weaning were used as source of *P. carinii* organisms. Outbred white mice with naturally acquired latent *P. carinii* infection (Soulez et al. 1991) were administered prednisolone metasulfobenzoate (Houde Laboratories, France) in the drinking water (40mg/l) for 13-14 wk Wistar rats (Iffa-Credo, France) were administered dexamethasone (Merck, Sharp and Dohme Chibret, France) in the drinking water (2mg/l) for 9-12 wk (Schmatz et al. 1990). Mice and rats were housed in a conventional room of our laboratory animal facility and were given standard food (UAR, France) and water ad libitum. Nonimmunosuppressed California-New Zealand hybrid rabbits at weaning were purchased from a commercial supplier (Vasseur, Prouzel, France). It was previously found that weanling rabbits are spontaneously and heavily infected with *P. carinii* (Soulez et al. 1989; Dei-Cas et al. 1990).

Parasite extraction was performed as previously described (Aliouat et al. 1993). Briefly, the lungs of infected animals were removed aseptically and cut into small pieces in sterile Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (F0455-Biochrom KG, Berlin). Parasites were isolated by agitation of lung tissues with a magnetic stirrer and the homogenate was sieved through a gauze. After centrifugation, the pellet was suspended in a buffered hemolytic solution, and resuspended in DMEM and filtered successively through 250-63  $\mu$ m stainless steel sieves and through 10-8  $\mu$ m filters (Nuclepore, Serlabo, France). Samples were checked for other pathogens, and quantitation of all stages of *P. carinii* parasite was performed on air dried smears stained with toluidin blue O and RAL-555 (Reactifs RAL, France) as previously described (Aliouat et al. 1993).

*Pneumocystis carinii*-free 8 wk old male and female SCID mice were used as recipient animals. Mice were obtained from a colony (CIBP, Institute Pasteur, Lille) which was previously used in other *P. carinii* transmission experiments and was found free of latent *P. carinii* infection (Soulez et al. 1991).

In all experiments, recipient SCID mice were anesthetized with a drug cocktail (ketamine hydrochloride 2 mg + diazepam 0.03 mg + atropine 0.01 mg) given intraperitoneally, and then instilled nasally with a fresh inoculum of  $3.0 \times 10^7$  *P. carinii* organisms per animal in 30  $\mu$ l culture medium. To establish if nasally

## INTRANASAL INOCULATION OF PNEUMOCYSTIS TO SCID MICE

inoculated parasites reached the lungs, a preliminary experiment was carried out where mice were nasally instilled with trypan blue-stained inocula, sacrificed 5-10 min post-inoculation (p.i.) and then stained zones were observed in the lungs (data not shown). Manipulations were done under sterile conditions (vertical laminar flow) and mouse cages were put into vertical laminar air-flow hood. Mouse cages, food, water and bedding were sterilized before use.

SCID mice were divided into four groups of 6 mice per group. They were nasally instilled with mouse-derived (group 1), rat-derived (group 2) and rabbit-derived (group 3) *P. carinii*, or culture medium without parasites (control group). At 40th and 90th days p.i., three SCID mice from each group were sacrificed for *P. carinii* identification and count. Parasite isolation and quantitation were performed on homogenate smears as aforementioned.

### RESULTS AND DISCUSSION

All SCID mice which had been nasally instilled with mouse-derived parasite (group 1) developed PCP. Parasite rates in these mice were higher at 90 days p.i. ( $175 \pm 59 \times 10^6$ ) than at 40 days p.i. ( $120 \pm 17.7 \times 10^6$ ). No parasites were detected in SCID mice instilled with either rat or rabbit-derived *P. carinii*, and in the control group. For two years, many other attempts to infect SCID mice with rat and rabbit-derived parasites in our laboratory were always unsuccessful (data not shown).

In a recent work by Sethi (1992), monoclonal antibodies against human or mouse-derived *P. carinii* have been used to distinguish recrudescence *P. carinii* pneumonia (PCP) from human-derived *P. carinii* infection in intratracheally inoculated SCID mice, and they noted the establishment of human-derived *P. carinii* in the lungs of SCID mice. However, the same SCID mice simultaneously developed recrudescence PCP due to the reactivation of latent mouse *P. carinii* strain(s). Mouse *P. carinii* proliferation could have provoked changes in SCID mouse lung condition which could have favored the development of human-derived *P. carinii*.

Walzer (1984) reported that the intrapulmonary injection of human or rat-derived parasites induced *P. carinii* infection in nude mice. In contrast, the intranasal inoculation of similar homogenates was unsuccessful. He likewise noted the transmission of *P. carinii* through close contact between corticosteroid-treated rats and nude mice. He was unable, nevertheless, to reproduce mouse infection with rat *Pneumocystis* with a change in rat *P. carinii* source, nude mouse colony and laboratory site. These contradictory results are difficult to explain considering the likely existence of a latent *Pneumocystis* infection in recipient animals.

Furuta and Ueda (1987) noted the development of nasally instilled rat-derived *P. carinii* in corticosteroid-treated nu/nu and nu/+ mice or rats. The proliferation of rat *P. carinii* was 6-25 times higher in corticosteroid-treated nu/nu and nu/+ mice than in corticosteroid-treated nu/nu and nu/+ rats. They concluded that mouse and rat-derived *P. carinii* are apparently non-identical.



## INTRANASAL INOCULATION OF PNEUMOCYSTIS TO SCID MICE

While the results of our study cannot be compared with those of Walzer (1984) and Furuta and Ueda (1987), they are consistent with those reported by Gigliotti et al. (1993) where SCID mice inoculated with ferret-derived *Pneumocystis* failed to develop PCP. Furthermore, genomic (Sinclair et al. 1991; Wakefield et al. 1992), karyotypic (Yoganathan et al. 1989; Lundgren et al. 1990; Hong et al. 1990; Weinberg and Bartlett 1991), antigenic (Gigliotti 1992; Furuta and Ueda 1987; Linke et al. 1989; Lundgren et al. 1991), differences and in vitro behavior (Aliouat et al. 1993) between parasite isolates have been reported and in part correlated with host species. It is likely that *P. carinii* represents several species which could be distinguished by genomic, biochemical or immunological markers, and through their biological properties such as their infectivity to a given experimental host, pathogenicity, drug susceptibility and others. Rat, rabbit and mouse-derived *P. carinii* isolates which were previously found to differ in their thymidylate synthase gene sequence (unpublished results) showed different infectivity to SCID mice. Dei-Cas et al. (1992) argues that in so far as isolate differences are related to infectivity and pathogenicity properties, the problem of biodiversity of natural populations of *Pneumocystis* may have practical consequences, considering that the reservoir(s) of human PCP agent remains to be known.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the French National Agency of Research on AIDS (A. N. R. S. ) and I. N. S. E. R. M. We thank Mrs. Ch. Mullet, P. Delcourt and M. J. P. Decavel for their valuable assistance.

### REFERENCES

- Aliouat, E. M., Dei-Cas, E., Ouaisi, M. A., Palluault, F., Soulez, B. & Camus, D. 1993. In vitro attachment of *Pneumocystis carinii* from mouse and rat origin. *Biol. Cell* 77:209-217.
- Dei-Cas, E., Cailliez, J. C., Palluault, F., Aliouat, E. M., Mazars, E., Soulez, B., Suppin, J. & Camus, D. 1992. Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent? *Eur. J. Epidemiol.* 8:460-470.
- Dei-Cas, E., Soulez, B., Palluault, F., Charet, P. & Camus, D. 1990. *Pneumocystis carinii*, un defi pour le biologiste. *Med. Sci.* 6: 517-525.
- Furuta, T. & Ueda, K. 1987. Intra- and inter-species transmission and antigenic difference of *Pneumocystis carinii* derived from rat and mouse. *Jpn. J. Expt. Med.* 57: 11-17.
- Gigliotti, F. 1992. Host species specific antigenic variation of a mannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* 165: 329-336.
- Gigliotti, F., Harsen, A. G., Haidaris, C. G. & Haidaris, P. 1993. *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. *Infect. Immun.* 61: 2886-2890.

- Hong, S. T., Steele, P. E., Cushion, M. T., Walzer, P. D., Stringer, S. L. & Stringer, J. R. 1990. *Pneumocystis carinii* karyotypes. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1785-1795.
- Hughes, W. T. 1987. *Pneumocystis carinii* Pneumonitis. 1st ed., vol. 1, pp. 97-104. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.
- Linke, M. J., Cushion, M. T. & Walzer, P. D. 1989. Properties of the major antigens of rat and human *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* 57: 1547-1555.
- Lundgren, B., Cotton, R., Lundgren, J. D., Edman, J. C. & Kovacs, J. A. 1990. Identification of *Pneumocystis carinii* chromosomes and mapping of five genes. *Infect. Immun.* 58: 1705-1710.
- Lundgren, B., Lipschick, G. Y. & Kovacs, J. A. 1991. Purification and characterization of a major human *Pneumocystis carinii* surface antigen. *J. Clin. Invest.* 87: 163-170.
- Schmatz, D. M., Romancheck, M. A., Pittarelli, L. A., Schwartz, R. E., Fromtling, R. A., Nolstadt, K. H., Vanmiddlesworth, F. L. & Turner, M. J. 1990. Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia with 1,3-B glucan synthesis inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 5950-5954.
- Sethi, K. K. 1992. Multiplication of human-derived *Pneumocystis carinii* in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Experientia.* 48: 63-67.
- Sinclair, K., Wakefield, A. E., Banerji, S. & Hopkin, J. M. 1991. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human host are genetically distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45: 183-184.
- 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., Palluault, F., Dei-Cas, E., Aliouat, E. M. & Camus, D. 1991. Production of a monoclonal antibody using lymphocytes from *Pneumocystis* infected mice. *J. Protozool.* 38 (suppl.): 189-190.
- Wakefield, A. E., Peters, S. E., Banerji, S., Bridge, P. D. & Hopkin, J. M. 1992. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the Ustomycetous red yeast fungi. *Mol. Microbiol.* 6: 1903-1911.
- Walzer, P. D. 1984. Experimental models of *Pneumocystis carinii* infection. pp. 37-43. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia. Young, L. S. (Ed.). M. Dekker Inc., New York.
- Weinberg, G. A. & Bartlett, M. S. Comparison of pulsed field gel electrophoresis karyotypes of *Pneumocystis carinii* derived from rat lung, cell culture, and ferret lung. *J. Protozool.* 38 (suppl.): 64-68.
- Yoganathan, T., Lin, H. & Buck, G. A. 1989. An electrophoretic karyotype and assignment of ribosomal genes to resolved chromosomes of *Pneumocystis carinii*. *Mol. Microbiol.* 3: 1473-1480.

## *Pneumocystis* Cross Infection Experiments Using SCID Mice and Nude Rats as Recipient Host, Showed Strong Host-Species Specificity

EL MOUKHTAR ALIOUAT,<sup>1\*</sup> EDITH MAZARS,<sup>1</sup> EDUARDO DEI-CAS,<sup>1</sup> PHILIPPE DELCOURT,<sup>1</sup> PIERRE BILLAUT,<sup>2</sup> DANIEL CAMUS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM U42, B.P. 39 59651 Villeneuve d'Ascq, <sup>2</sup> Institut Pasteur, 59000 Lille, France.

*Pneumocystis carinii* is an opportunistic agent found in the lungs of various mammals. This organism causes severe pneumonia in immunocompromised patients. The sources and the transmission of the human infection are not clearly established. Antigenic and genomic host-species related differences have been reported among *P. carinii* isolates [3,5,8], but it has not been proved if *Pneumocystis* from a given mammal can infect other host species. So, we have investigated if *P. carinii*, harvested from different host species (rat, mouse and rabbit), could be infectious for SCID mice or athymic nude rats (nu/nu, F344).

**MATERIALS AND METHODS.** Corticosteroid-treated Wistar rats, corticosteroid-treated outbred mice and nonimmunosuppressed California-New Zealand hybrid rabbits at weaning were used as source of *P. carinii* organisms [1]. It was previously found that weanling rabbits are spontaneously and heavily infected by *P. carinii* [7].

The parasite extraction was performed as previously described [1]. Briefly, parasites were extracted by agitation of lung pieces with a magnetic stirrer and the resulting homogenate was poured through gauze. After centrifugation, the pellet was resuspended in a buffered hemolytic solution. Then, the pellet was resuspended in DMEM and filtered successively through 250µm - 63µm stainless steels, and through 10µm - 8µm filters (Nuclepore, Serlabo, France). Checking of samples for other pathogens and parasite quantitation were performed on air dried smears stained with toluidine blue O and RAL-555 (Réactifs RAL, France) as previously described [1].

SCID mice (8 weeks of age) and nude rats (5 weeks of age) of both sexes were used as recipient animals. These animals came from colonies (CIBP, Institut Pasteur, Lille and Iffa-Credo, France) which were previously used in several *P. carinii* transmission experiments and were found free of latent *P. carinii* infection.

Recipient SCID mice were anesthetized with a drug cocktail (ketamine hydrochloride 2mg + diazepam 0.03mg + atropine 0.01mg) given intraperitoneally. Then, they were nasally instilled with a fresh inoculum of  $3 \times 10^7$  *P. carinii* organisms per animal in culture medium (30µl). Nude rats were anesthetized with a drug cocktail (ketamine hydrochloride 8mg + diazepam 0.12mg + atropine 0.04mg) given intraperitoneally. They were inoculated by intratracheal route. The trachea was exposed surgically and a 100 µl-inoculum ( $10 \times 10^7$  *P. carinii* organisms) was injected in the trachea with 0.3 ml of air behind. The wound was closed with nonresorbable suture (3/8 Seracap, France). All Nude rats were administered dexamethasone (Merck, Sharp and Dohme Chibret, France) in the drinking water (1mg.l<sup>-1</sup>). All the inoculation manipulations were done under sterile conditions. Therefore, during the experiments, animal cages were put into vertical laminar air-flow hood. Mouse or rat cages, food, water and bedding were sterilized before use.

Recipient SCID mice or nude rats were divided into four groups, each one being infected with (i) mouse-derived *P. carinii*, (ii) rat-derived *P. carinii*, (iii) rabbit-derived *P. carinii* or (iv) culture medium without parasites (control group). At the 40th-, 70th- or 90th-day post inoculation (p.i.), SCID mice or nude rats were sacrificed. Parasite extraction and quantitation were performed on homogenate smears as aforesaid.

**RESULTS AND DISCUSSION.** All SCID mice, which had been inoculated with mouse-derived parasites, and all nude rats which had been inoculated with rat-derived parasites, developed a *P. carinii* pneumonia (PCP). Parasite rates in these animals were higher at 70 or 90 days p.i. than at 40 days p.i. (Table 1). In contrast, no *P. carinii* organism was detected in SCID mice instilled with rat- or rabbit-derived parasites or in nude rats inoculated with mouse- or rabbit-

Table 1. Inoculation of *P. carinii*-free SCID mice or nude rats with mouse-, rat- or rabbit-derived *P. carinii* (total parasite number  $\times 10^6$ ).

| Host      | Days p.i. | Control <sup>a</sup> | <i>P. carinii</i> derived from |              |         |
|-----------|-----------|----------------------|--------------------------------|--------------|---------|
|           |           |                      | mouse                          | rat          | rabbit  |
| SCID mice | 40        | 0 (0/3)              | 127±40 (9/9)                   | 0 (0/18)     | 0 (0/7) |
| SCID mice | 90        | 0 (0/3)              | 230±82 (7/7)                   | 0 (0/5)      | 0 (0/3) |
| Nude rat  | 40        | 0 (0/3)              | 0 (0/3)                        | 160±36 (3/3) | 0 (0/5) |
| Nude rat  | 70        | 0 (0/3)              | 0 (0/3)                        | 838±41 (4/4) | 0 (0/4) |

<sup>a</sup>Animals inoculated with culture medium without parasites.

derived *P. carinii*. These results were obtained at the 40th-, 70th- or 90th-day p.i. (Table 1). No parasite was detected in control groups.

These experiments have followed preliminary ones which were performed on SCID mice as recipients animals [2]. In this study, the number of tested SCID mice was increased and a new animal recipient was added. On the whole, these findings showed that *P. carinii* presents a strong host-species specificity. These observations are according with previous reports [4, 6]. Indeed, Gigliotti et al. have concluded that SCID mice were unable to support the growth and replication of ferret-derived *P. carinii* [6]. Likewise, Furuta et al. have observed no PCP on SCID mice or nude rats inoculated with simian-derived *P. carinii* [4].

Thus, at least rat-, mouse-, rabbit-, ferret- or simian-derived *P. carinii* strains showed a strong restricted host range. The mechanism of this phenomenon remains unknown. Cellular and molecular targets of the parasite attachment to lung cells could be essential for the *P. carinii* host species specificity. Endly, from an epidemiological point of view, present results suggest that PCP is not an anthroponosis. Indeed in regard of these results, it seems that there is not an animal reservoir for the agent of human PCP. [Supported by the A.N.R.S. (France) and I.N.S.E.R.M.. We thank C. Mullet, E. Fleurbaix, M. Bouquerel and J.P. Decavel for his valuable technical assistance.]

- Aliouat EM, Dei-Cas E, Ouassiss MA, Palluault F, Soulez B, Camus D. *Biol. Cell* (1993) 77:209.
- Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, Cesbron JY, Camus D. *J. Protozool. Res.* (1993) 3:94.
- Bauer NL, Paulsrud JR, Bartlett MS, Smith JW, Wilde CE. *Infect. Immun.* (1993) 61:1315.
- Furuta T, Fujita M, Mukai R, Sakakibara I, Sata T, Miki K, Hayami M, Kojima S, Yoshikawa Y. *Parasitol Res* (1993) 79:624.
- Gigliotti F. *J. Infect. Dis.* (1992) 165:329.
- Gigliotti F, Harsen AG, Haidaris CG, Haidaris P. *Infect. Immun.* (1993) 61:2886.
- Soulez B, Dei-Cas E, Charet P, Mougeot G, Caillaux M, Camus D. *J. Infect. Dis.* (1989) 160:355.
- Wakefield AE, Peters SE, Banerji S, Bridge PD, Hopkin JM. *Mol. Microbiol.* (1992) 6:1903.

## ORIGINAL PAPER

E. M. Aliouat · E. Dei-Cas · P. Billaut · L. Dujardin  
D. Camus

## ***Pneumocystis carinii* organisms from in vitro culture are highly infectious to the nude rat**

Received: 25 April 1994 / Accepted: 15 July 1994

**Abstract** Many in vitro systems have been used to cultivate *Pneumocystis*, but only limited parasite growth has been obtained by different authors. A reliable in vitro system enabling a sustained propagation of *Pneumocystis* appears to be an important condition for a better definition of the transmission of *P. carinii* pneumonia. In this work, *Pneumocystis* in vitro culture was performed on monolayers of L2 rat lung epithelial-like cells. Ultrastructural assessment revealed that culture parasites were structurally intact. *Pneumocystis* culture samples were intratracheally inoculated into corticosteroid-treated nude rats (nonlatently infected by *P. carinii*), which developed *P. carinii* pneumonia at 40 days postinoculation. The infectious power of parasites obtained in vitro was 7–10 times higher than that of parasites freshly extracted from parasitized rat lung. In summary, the present results show that it is possible to obtain in vitro highly infectious *Pneumocystis* forms, and this study provides a promising infectivity test for use by investigators working on *Pneumocystis* in vitro systems.

### **Introduction**

Many in vitro systems have been used to cultivate *Pneumocystis* (Cushion 1989; Sloand et al. 1993), but only limited parasite growth has been obtained within a few days in systems with or without feeder cells or in long-term explant cultures of parasitized lung (Dei-Cas et al. 1989, 1991). However, cultures were proving to be helpful, interesting tools for the study of the life cycle

(Pifer et al. 1977; Cushion et al. 1988), ultrastructure (Dei-Cas et al. 1989, 1991; Goheen et al. 1989), metabolism (Kovacs et al. 1989), in vitro drug susceptibility (Comley et al. 1991; Atzori et al. 1993), and attachment (Limper and Martin 1990; Dei-Cas et al. 1991; Pottratz et al. 1991; Aliouat et al. 1993) of *Pneumocystis*.

Although a reliable in vitro system enabling a sustained propagation of *Pneumocystis* appears to be an important condition for a better definition of the transmission of *P. carinii* pneumonia (Sloand et al. 1993), no *Pneumocystis* form maintained in culture has been assayed for its infectivity to susceptible experimental hosts nonlatently infected by *P. carinii*. Quantitative evaluation of the parasite growth and qualitative assessment of the biological properties of parasites maintained in vitro (viability, morphological integrity, attachment capacity) have been the main problems associated with *P. carinii* culture systems. Comparison is difficult, as culture systems and evaluation methods are not the same among different laboratories (Cushion 1989; Sloand et al. 1993).

It is surprising that the infectivity for a susceptible experimental host of *Pneumocystis* organisms maintained in vitro has not been tested to date. On the one hand, parasite infectivity seems to be the best test of the viability and potential pathogenicity of *Pneumocystis*. On the other hand, infectivity testing could be useful for comparing the efficiency of different culture systems. To test the infectious power of rat-derived *Pneumocystis* cultivated on monolayers of L2 cells, corticosteroid-treated nu/nu rats were intratracheally inoculated with parasite culture samples.

### **Materials and methods**

#### **Source of *Pneumocystis carinii* organisms**

Corticosteroid-treated rats were used as the source of *P. carinii* organisms. Wistar rats (Iffa-Credo, France) were given dexamethasone (Merck, Sharp and Dohme Chibret, France) in their drinking water (2 mg l<sup>-1</sup>) for 9–12 weeks (Schmatz et al. 1990). Animals

E. M. Aliouat · E. Dei-Cas (✉) · D. Camus  
I.N.S.E.R.M. U. 42, 369 rue Jules Guesde, B.P. 39,  
F-59651 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

P. Billaut  
C.I.B.P. – Institute Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette,  
F-59019 Lille Cedex, France

L. Dujardin  
Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie,  
Rue du Professeur Laguesse, F-59045 Lille, France

were housed in a conventional room of our laboratory animal facilities and were given standard food (UAR, France) and water ad libitum.

#### Obtention and quantitation of *P. carinii* organisms

The parasite extraction was performed as previously described (Aliouat et al. 1993). Briefly, the lungs of infected animals were removed aseptically and cut into small pieces in sterile Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, F0455-Biochrom KG, Berlin). Parasites were extracted by agitation of the lung pieces with a magnetic stirrer, and the resultant homogenate was poured through gauze. After centrifugation, the pellet was resuspended in a buffered hemolytic solution. The pellet was then resuspended in DMEM and the suspension was filtered successively through 250- to 63- $\mu$ m stainless-steel mesh and through 10- to 8- $\mu$ m filters (Nuclepore, Serlabo, France). Checking of samples for other pathogens and parasite quantitation were performed on air-dried smears stained with toluidine blue O and RAL-555 (Réactifs RAL, France) as previously described (Aliouat et al. 1993).

#### *Pneumocystis* in vitro culture

Monolayers of L2 rat lung epithelial-like cells (ATCC CCL number 149) were used as target-cell populations. They were grown in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and antibiotics (penicillin, streptomycin) on 75-cm<sup>2</sup> culture bottles vented in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37° C. Rat-derived *Pneumocystis* organisms (resuspended in complete medium to give a final concentration of 1 $\times$ 10<sup>7</sup> parasites/ml) were inoculated over nonconfluent monolayers of L2 cells. When L2 cells became confluent (about 3 days later), supernatants with unattached parasites were discarded. Cell monolayers with adherent *Pneumocystis* were treated with trypsin (0.05%)–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 0.02%) for about 2 min. Cells with attached parasites contained in one culture bottle were resuspended in fresh complete medium and then plated so as to obtain three new culture bottles. Subcultures were incubated for 4 days, after which attached parasites were collected by hand-shaking of the culture bottles. Parasite detachment from target cells was assessed using inverted phase-contrast microscopy. All *Pneumocystis* life-cycle stages were counted after toluidine blue O and RAL-555 (Réactifs RAL, France) staining as previously described (Aliouat et al. 1993). *Pneumocystis* culture forms were then suspended in DMEM (10 $\times$ 10<sup>7</sup> parasites/100  $\mu$ l medium) for use as the inoculum for nude rats.

#### In vivo *Pneumocystis* infectivity assay

Nu/nu rats of both sexes were used at 5 weeks of age as recipient animals in all experiments. These rats came from a colony (CIBP, Institute Pasteur, Lille) that had previously been used in several *P. carinii* transmission experiments and had been found to be free of latent *P. carinii* infection.

Nude rats were anesthetized with a drug cocktail (8 mg ketamine hydrochloride +0.12 mg diazepam +0.04 mg atropine for each rat) given intraperitoneally. In all experiments, rats were inoculated by the intratracheal route. The trachea was exposed surgically and 100  $\mu$ l of inoculum was injected into the trachea with 0.3 ml of air behind it. The wound was closed with nonresorbable sutures (3/8 Seracap, France). All manipulations were done under sterile conditions (vertical laminar flow) and rat cages were put into a vertical laminar air-flow hood. Rat cages, food, water, and bedding were sterilized before use.

Recipient nu/nu rats were divided into three groups. The first group comprised three rats that were inoculated with 10 $\times$ 10<sup>7</sup> freshly extracted rat-derived *Pneumocystis* organisms. The second group consisted of three rats that were inoculated with 10 $\times$ 10<sup>7</sup> *Pneumocystis* organisms harvested from 7-day cultures. The con-

trol group contained six rats that were inoculated with culture medium without parasites. All nu/nu rats were given dexamethasone (Merck, Sharp and Dohme Chibret, France) in their drinking water (1 mg l<sup>-1</sup>). At the 40th day postinoculation (p.i.), all rats were eutharized for *P. carinii* extraction and count. Parasite extraction and quantitation were performed on homogenate smears as described above.

#### Ultrastructure study

To assess the morphological integrity of *Pneumocystis* culture forms, 7-day parasite culture samples were prepared for ultrastructure study. The fixation procedure was carried out under high-osmolarity conditions as previously described (Palluault et al. 1992). The culture medium was removed and replaced by a phosphate-buffered 2.5% glutaraldehyde solution (0.1 M, pH 7.5) adjusted to about 850 mosmol by the addition of 0.188 M NaCl for 1 h at room temperature. Samples were washed three times for 20 min with 0.1 M phosphate buffer plus 0.412 M NaCl (pH 7.5) at room temperature, postfixed for 1 h in a 1% osmium tetroxide solution in phosphate buffer, and dehydrated in ethanol. Next, the cell monolayers containing attached *P. carinii* organisms were rapidly removed from the bottom of the culture bottle with propylene oxide and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Hitachi H-600 electron microscope.

#### Results

The present cultures made it possible to obtain at least a 2-fold increase in parasite numbers. About 97% of the parasites were at the trophozoite stage. Photonic and ultrastructural assessment of cultured *Pneumocystis carinii* forms attested to their morphological integrity (Figs. 1–3). In 7-day cultures, trophozoites developed filopodia that penetrated the L2 cell cytoplasm anchoring the parasite to them (Fig. 2).

The results of the in vivo infectivity assay are shown in Table 1. Rat-derived *Pneumocystis* forms, obtained in vitro from cultures performed on monolayers of L2 cells, were infective to nude rats. The infectious power of parasites obtained in vitro was 7–10 times higher than that of parasites freshly extracted from parasitized rat lungs.

#### Discussion

The present results show that a successful culture of rat-derived *Pneumocystis* can be performed using the continuous rat-lung epithelial-like cell line L2. A successful passage was possible with a minimal 2-fold increase in the subculture, from which inocula for nude rats were obtained. Moreover, this culture system made it possible to obtain *P. carinii* inocula that was not contaminated without host lung debris. However, when subcultures were made after the 7th day, parasite growth did not occur and only altered residual parasite forms were observed (unpublished results).

An active attachment of parasites to monolayer cells was observed by transmission electronic microscopy (Fig. 2). Ultrastructural evaluation also made it possible to assess the morphological integrity of *Pneumocystis*



Fig. 1 Trophozoite clusters of rat *Pneumocystis carinii* (arrow) as detected after 7 days of culture with L2 rat lung epithelial-like cells. RAL555 stain.  $\times 1000$ . Fig. 2 In vitro attachment of a *Pneumocystis* trophozoite to an L2 cell as observed at 7 days post-inoculation. Attachment zones are well visible (arrowheads). (EC L2 cell, T trophozoite) Bar=0.5  $\mu\text{m}$ . Fig. 3 In vitro *Pneumocystis* trophozoite showing a well-preserved ultrastructure. (Arrows filopodia, N nucleus) Bar=0.5  $\mu\text{m}$

forms from culture (Fig. 3), which is a critical condition for viability (Soulez et al. 1991). In fact, the best means of evaluating in vitro *Pneumocystis* viability is by assessing its development in the lung of a susceptible host. Thus, 7-day-culture parasite samples were highly infec-

Table 1 Development of *Pneumocystis carinii* pneumonia in corticosteroid-treated nu/nu rats intratracheally inoculated with *Pneumocystis* culture forms

| Inoculum                            | Days p.i. <sup>a</sup> | Total parasites ( $\times 10^7$ ) <sup>b</sup> | Infected rats/total |
|-------------------------------------|------------------------|--|---------------------|
| Freshly extracted parasites         | 40                     | 16 $\pm$ 4                                     | 3/3                 |
| Parasite culture forms <sup>c</sup> | 40                     | 116 $\pm$ 13                                   | 3/3                 |
| Control <sup>d</sup>                | 40                     | 0  | 0/6                 |

<sup>a</sup>Number of days postinoculation

<sup>b</sup>Number of parasites ( $\times 10^7$ ) per animal (mean  $\pm$ SD)

<sup>c</sup>*Pneumocystis* organisms harvested from 7-day cultures

<sup>d</sup>Nude rats intratracheally inoculated with culture medium without parasites

tive to corticosteroid-treated nude rats. Moreover, the infectious power of culture parasite samples was higher than that usually found in parasite inocula freshly prepared from parasitized lung. More resistant (and maybe more infectious) parasite forms could be selected during the adaptation of *P. carinii* to culture conditions. Also, the extraction procedures used to obtain *Pneumocystis* from the host lung, which induced ultrastructural parasite damage (Soulez et al. 1991), could explain at least partially the lower infectivity of parasites freshly extracted from lung.

The infectious power of *Pneumocystis* organisms maintained in vitro had not been evaluated prior to the present study. In conclusion, the present results show that it is possible to obtain in vitro highly infectious *Pneumocystis* forms, and this study provides a promising infectivity test for use by investigators working on *Pneumocystis* in vitro systems.

**Acknowledgements** This work was supported in part by the French National Agency of Research on AIDS (A.N.R.S.) and I.N.S.E.R.M. We thank Mr. P. Delcourt, Mrs. C. Mullet, Mr. E. Fleurbaix, and Mr. M. Bouquerel for their valuable technical assistance.

## References

- Aliouat EM, Dei-Cas E, Ouaiissi A, Palluault F, Soulez B, Camus D (1993) In vitro attachment of *Pneumocystis carinii* from mouse and rat origin. *Biol Cell* 77:209–217
- Atzori C, Bruno A, Chichino G, Bombardelli E, Scaglia M, Ghione M (1993) Activity of bilobalide, a sesquiterpene from *Ginkgo biloba*, on *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1492–1496
- Comley JCW, Mullin RJ, Wolfe LA, Hanlon MH, Ferone R (1991) Microculture screening assay for primary in vitro evaluation of drugs against *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1965–1974
- Cushion MT (1989) In vitro studies of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 36:45–52
- Cushion MT, Ruffolo JJ, Walzer PD (1988) Analysis of the developmental stages of *Pneumocystis carinii* in vitro. *Lab Invest* 58:324–331
- Dei-Cas E, Soulez B, Camus D (1989) Ultrastructural study of *Pneumocystis carinii* in explant cultures of rabbit lung and in cultures with and without feeder cells. *J Protozool* 36 [Suppl]:55–57



- Dei-Cas E, Jackson H, Palluault F, Aliouat EM, Hancock V, Soulez B, Camus D (1991) Ultrastructural observations on the attachment of *Pneumocystis carinii* in vitro. *J Protozool* 38 [Suppl]:205-207
- Goheen MP, Blumershire R, Hull MT, Bartlett MS, Smith JW (1989) Enhancement of the fine structure of *Pneumocystis carinii* using potassium ferrocyanide and tannic acid. In: Bailey GW (ed) Proceedings of the 47th annual meeting of the Electron Microscopy Society of America. San Francisco, pp 984-985
- 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 of therapeutic agents. *J Infect Dis* 160:312-320
- Limper AH, Martin WJ (1990) *Pneumocystis carinii*: inhibition of lung cell growth mediated by parasite attachment. *J Clin Invest* 85:391-396
- Palluault F, Slomianny C, Soulez B, Dei-Cas E, Camus D (1992) High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embedding. *Parasitol Res* 78:437-444
- Pifer LL, Hughes WT, Murphy MJ (1977) Propagation of *Pneumocystis carinii* in vitro. *Pediatr Res* 11:305-316
- Pottratz ST, Paulsrud J, Smith JS, Martin WJ II (1991) *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp 120, a fibronectin binding protein. *J Clin Invest* 88:403-407
- Schmatz DM, Romancheck MA, Pittarelli LA, Schwartz RE, Frontling RA, Nolstadt KH, Vanmiddlesworth FL, Turner MJ (1990) Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia with 1,3-*Symbol>b* glucan synthesis inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5950-5954
- Sloand E, Laughon B, Armstrong M, Bartlett M, Blumenfeld W, Cushion M, Kalica A, Kovacs JA, Martin W, Pitt E, Pesanti EL, Richards F, Rose R, Walzer P (1993) The challenge of *Pneumocystis carinii* culture. *J Eukaryote Microbiol* 40:188-195
- Soulez B, Dei-Cas E, Palluault F, Camus D (1991) Morphological evaluation of *Pneumocystis carinii* after extraction from infected lung. *J Parasitol* 77:449-453

## Ultrastructural Observations on the Attachment of *Pneumocystis carinii* in Vitro

EDUARDO DEI-CAS,<sup>\*,\*\*</sup> HELEN JACKSON,<sup>\*\*\*</sup> FRANCOIS PALLUAULT,<sup>\*</sup> EL MOUKHTAR ALIOUAT,<sup>\*</sup> VICKY HANCOCK<sup>\*\*\*</sup>  
BENOIT SOULEZ<sup>\*,\*\*\*\*</sup> and DANIEL CAMUS<sup>\*,\*\*</sup>

<sup>\*</sup>INSERM (U.42) 369 rue J. Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, France, <sup>\*\*</sup>Laboratory of Parasitology-Myology, Faculty of Medicine 1 Place Verdun  
59045 Lille, France, <sup>\*\*\*</sup>GLAXO Greenford Road, Greenford, Middlesex, UB6 0HE, England and  
<sup>\*\*\*\*</sup>Laboratory of Histology and Biology of Reproduction, Faculty of Medicine, 1 Place Verdun, 59045 Lille, France

**SUMMARY.** *Pneumocystis carinii* trophozoites grow in vivo in close contact with host cells. The attachment of *Pneumocystis* to the lung cells seems to be a critical step in the parasite's development. Up to now, the contact of *Pneumocystis* with mammalian tissue culture cells was shown using light and scanning electron microscopy. The methods are not sufficient to observe in detail the parasite-feeder cell area of contact. In this work, the attachment of *Pneumocystis* trophozoites to feeder cells was examined in serial sections using transmission electron microscopy. When the contact of a trophozoite with a feeder cell took place, the development of filopodia penetrating deeply into invaginations of the feeder cell plasma membrane was observed. Then, the apical tips of filopodia become bulged anchoring the parasite to the feeder cell. The behaviour of *Pneumocystis* in feeder cell cultures is compared to that of the parasite in other in vitro or in vivo experimental models.

**Key words.** Adherence assays, cultures, filopodia, lung explants, MRC-5 cells, VERO cells.

**T**HE attachment of *Pneumocystis* to the host cell is probably a critical step in the life cycle of the parasite. Attachment was shown in vivo by transmission electron microscopy (TEM) [3, 12] or freeze-fracture [4, 11] methods. On the contrary, although adherence assays in vitro were reported [8], the attachment was usually evaluated indirectly [5, 8]. Furthermore, only light, fluorescence or scanning electron microscopic pictures [1, 5, 6] were furnished as proof of in vitro *Pneumocystis* attachment to mammalian tissue culture (feeder) cells in co-cultures.

The understanding of the parasite's behaviour in vitro is important to progress in the development of more efficient culture systems. The aim of this work is to establish if *Pneumocystis* is really able to attach to feeder cells in vitro, and to determine the type of attachment. Therefore, we examined the attachment of *Pneumocystis* to feeder cells in vitro by TEM, and we compared it to that of the parasite in vivo.

### MATERIALS AND METHODS

Transmission electron microscopy observations of attachment of *Pneumocystis* organisms were performed in vivo and in vitro. In vivo attachment of *Pneumocystis* was studied in nonimmunosuppressed rabbits at weaning [9], and in corticosteroid-treated mice and rats. In vitro, the attachment was studied in lung explants and in feeder cell cultures. Explant cultures of *P. carinii*-parasitized rabbit lung (ECPRL) were carried out, assessed and prepared for TEM as previously described [2, 7]. Feeder cell cultures were grown with *Pneumocystis* from rat or mouse origin. Rat-derived *Pneumocystis* organisms were separated from lung tissue using Stomacher homogenization and Ficoll-Hypaque gradient purification then inoculated over 40% confluent monolayers of MRC-5 cells (ATCC no. CCL171). Mouse-derived *Pneumocystis* organisms were separated from lung tissue using a magnetic stirrer [10], filtered through 10 - 8 µm filters and inoculated over confluent monolayers of VERO cells (ATCC no. CCL81). All feeder cell cultures were made in minimum essential medium supplemented with 10% foetal calf serum in 25-cm<sup>2</sup> culture bottles vented in 5% CO<sub>2</sub> at 37° C. Light microscope assessment of cultures was made after methanol fixation and staining with Haema Gurr or Giemsa. Fixation of the feeder cell monolayer with the attached *P. carinii* forms was done within the culture bottle. The culture medium was removed and replaced by a cacodylate-buffered (pH 7.3, 0.1 M) 1.25% glutaraldehyde solution for 90 min at 4° C. Samples were post-fixed for 1 h in buffered 1% osmium tetroxide solution, dehydrated in ethanol and embedded in Epon in the culture bottle. Semithin sections were stained with Azur blue II. Ultrathin cross serial sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Zeiss EM 10A electron microscope.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed

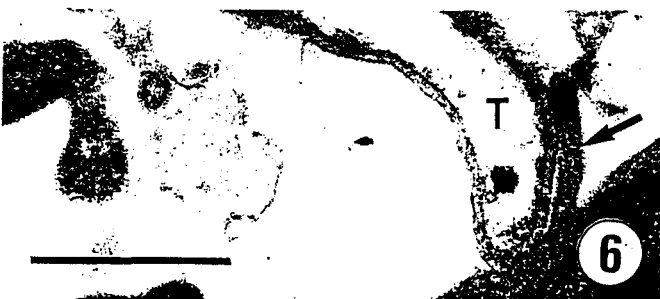
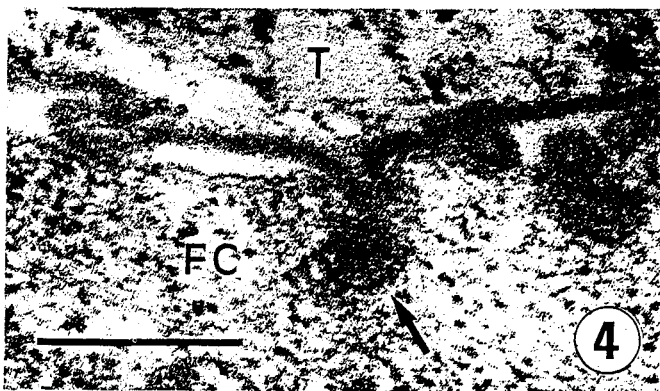
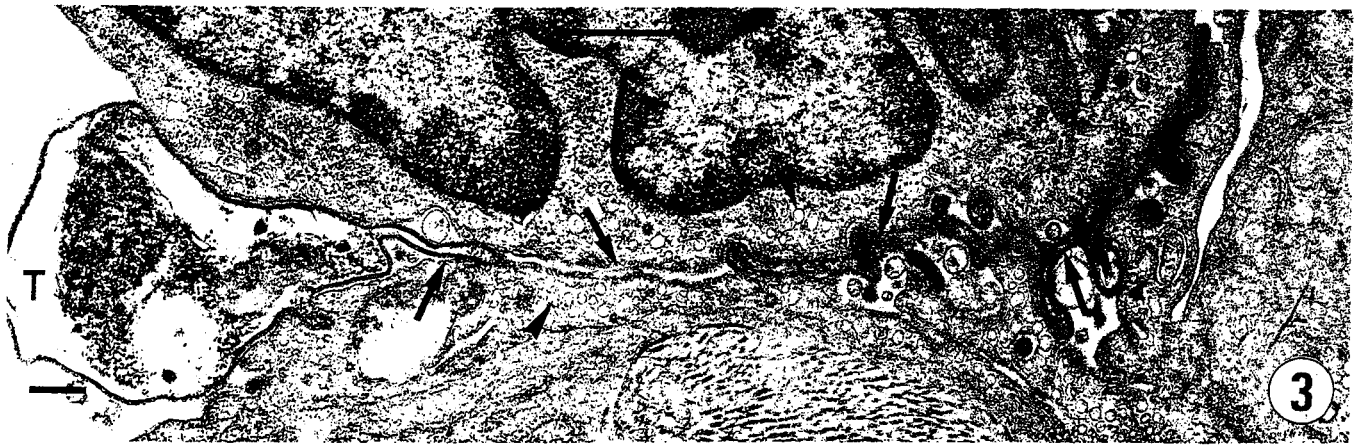
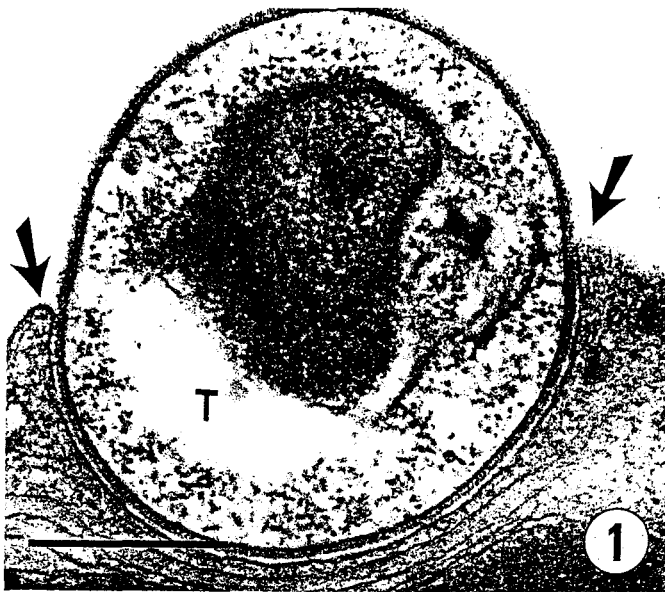
### RESULTS AND DISCUSSION

In the parasitized lungs of rabbit, mouse or rat as well as in ECPRL, *Pneumocystis* attachment was only observed on type I epithelial alveolar cells (Fig. 1, 2 & 3). Although close apposition of other life-cycle stages to lung cells was sometimes observed, only trophozoites were intimately attached. Small trophozoites without filopodia were able to attach to the plasma membrane of the host cell by a regular, smooth adherence surface (Fig. 1). Larger vegetative forms developed more intricate contact (Fig. 2). The surface of attachment showed marked infoldings of the feeder cell plasma membrane. Numerous clear membrane-bound vesicles, which apparently release their content into the parasite-host cell junction (Fig. 2), were observed in the adjacent cytoplasm of the host cell. Sometimes, narrow, flexuous trophozoite filopodia develop in the lung intercellular spaces penetrating deeper and deeper and adhere to epithelial alveolar cells. Numerous vesicles in the area of the cytoplasm next to the attachment zone were also observed in these cells (Fig. 3).

Frequent observation in the in vitro cultures of *Pneumocystis* with MRC-5 feeder cells, was the development of short, trophozoite filopodia with somewhat bulging apical tips that were enclosed within invaginations of the feeder cell plasma membrane. Thus, when contact of a trophozoite with a feeder cell took place, these filopodia developed and penetrated invaginations of the feeder cell membrane that went deeply into the feeder cell cytoplasm. Then, the filopodial apical ends became bulged, anchoring the parasite to the feeder cells (Figs. 4 and 5). The area of the feeder cells's plasmalemma in contact with the parasite, became more electron-dense, but no fusion was observed. Neither cytoplasmic vesicles nor other feeder cell changes were observed. This specific trophozoitic filopodial differentiation of *Pneumocystis* was only observed after 2 days of culture with MRC-5 cells, probably because feeder cells and parasites were too far apart in day 1 - 2 cultures used for TEM studies.

The TEM examination of 6-h samples of *Pneumocystis* cultivated on VERO cell confluent monolayers revealed the initial contact of trophozoites with feeder cells. Close apposition of trophozoites to feeder cells was observed (Fig. 6 & 7). Local increase of electron-dense VERO cell plasmalemma took place but no development of specialized filopodia was observed.

In conclusion, these results lead us to propose a kinetic view of the in vitro attachment of *Pneumocystis* to feeder cells. Initial contact occurred within the first few hours post-inoculation, and it was similar to the attachment of the small trophozoite in vivo. During the next 48 h the trophozoite grew and filopodia with bulged tips developed, anchoring the parasite to the feeder cell. Thus, the kinetics of attachment of *Pneumocystis* in vitro must be taken into account in adherence assays.



## Production of a Monoclonal Antibody Using Lymphocytes From *Pneumocystis* Infected Mice

BENOIT SOULEZ,<sup>\*,\*\*,\*1</sup> FRANCOIS PALLUAULT,<sup>\*</sup> EDUARDO DEI-CAS,<sup>\*,\*\*\*</sup> EL MOUKHTAR ALIOUAT<sup>\*</sup> and DANIEL CAMUS<sup>\*,\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>INSERM (U. 42) 369 rue J. Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq <sup>\*\*</sup>Service d'Histologie-biologie de la reproduction and <sup>\*\*\*</sup>Service de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France

**SUMMARY.** A colony of BALB/c mice maintained in a protected area of our laboratory was not infected with *Pneumocystis carinii*. During corticosteroid treatment, animals became infected by exposure to infected mice. After four months of corticosteroid treatment, BALB/c mice developed severe pneumocystosis. Stopping of treatment was associated with: (i) high mortality of mice, (ii) decreased lung parasite level and (iii) appearance of anti-*P. carinii* antibodies in survivors. A monoclonal antibody (MAB) 4F2 was obtained by immortalisation of spleen lymphocytes of a female BALB/c mouse 3 months after the cessation of corticosteroid treatment. The MAB 4F2 recognized a 210 - 220 kDa mouse *P. carinii* antigen, but did not react with rat-, rabbit- or human-derived *P. carinii*. This MAB reacted with all stages of mouse *P. carinii*.

**Key words.** Airborne transmission, BALB/c mouse, corticosteroids, immunoblot.

**S**EVERAL laboratories have developed monoclonal antibodies (Mab) against *Pneumocystis carinii* by immunisation of the animal donor of spleen cells, with *P. carinii* from different host species [1]. Specific anti-*P. carinii* antibodies produced during pneumocystosis recovery could have a biological role in host-parasite relationships. In this report we discuss the production of a Mab using lymphocytes from a *P. carinii*-infected mouse.

### MATERIALS AND METHODS

The mouse strain BALB/c came from the colony bred in our laboratory. Outbred white mice (OWM), with naturally acquired latent *P. carinii* infection, developed *P. carinii* pneumonia (PCP) under corticosteroid administration (prednisolone, Houdé, France, 40 mg/l in drinking water). They were used as a source of airborne infection for BALB/c mice. Severe combined immunodeficient (SCID) mice developing severe PCP were used as source of antigen for immunofluorescence antibody test (IFAT) or immunoblot.

In order to reveal latent *P. carinii* infection of BALB/c mice and to assess development of PCP, BALB/c mice were: (1) caged under a filter bonnet and subjected to corticosteroid-treatment (n = 18), (2) housed in the same cage with OWM developing PCP and subjected to corticosteroid-treatment, (3) housed in the same room with OWM developing PCP and subjected to corticosteroid-treatment (n= 9) and (4) housed in the same room with OWM developing PCP without

corticosteroid treatment (n= 24).

In protocols 1, 2 and 3, corticosteroid treatment was stopped after four months. Animals were sacrificed at different times after termination of treatment, tail bleeding was done sequentially on live animals. In protocol 4, animals were sequentially sacrificed during their stay (1 - 210 days) in the animal room and tail bleeding was done sequentially on survivors. The number of different stages of *P. carinii* in mouse lungs was determined as described elsewhere [2] but somewhat modified: a Potter-Elvehjem tissue grinder was used to homogenize lung tissue. Absolute and differential counts of parasite stages were performed on toluidine blue O- and Giemsa-stained smears of the homogenates. Immunoblot and IFAT used for testing mouse-specific antibodies as well as supernatant of cell fusions were performed as previously described [3].

The female BALB/c mouse used as spleen cell donor was subjected to four months of corticosteroid treatment and exposed to contact with OWM (protocol 2), then left for three months without treatment before sacrifice.

Spleen cells from the infected mice were fused with hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT)-non producing Sp 2/0 myeloma cells with polyethylene glycol. The cell lines were grown in HAT medium, and supernatant were first screened by isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IFAT). The selected cell line was cloned twice by limiting dilution and implanted intraperitoneally into pristane-primed BALB/c mice.

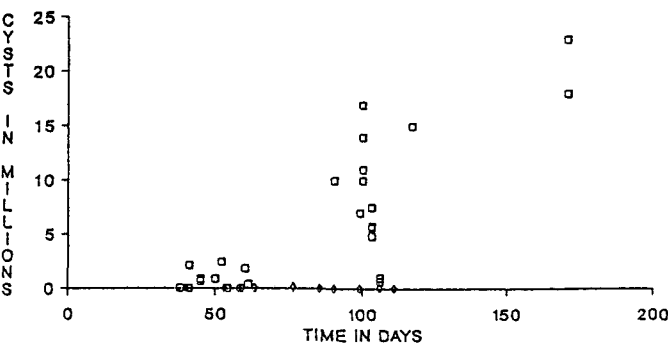


Fig. 1. *Pneumocystis carinii* infection of BALB/c mice by air exposure to *P. carinii*-infected mice. Cyst counts in the lungs of immunosuppressed BALB/c mice housed under the same filter bonnet with *P. carinii*-infected mice (white squares). Cyst counts in lungs of immunosuppressed BALB/c mice isolated from *P. carinii*-infected mice (diamonds).

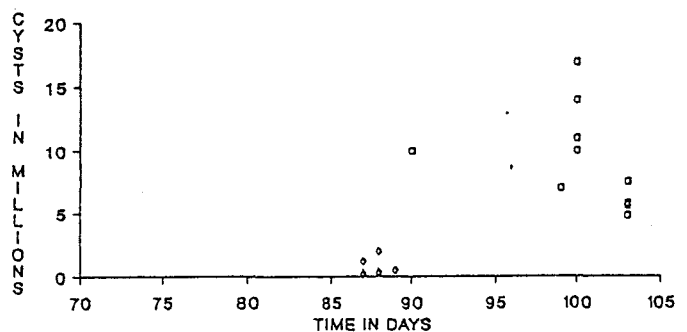


Fig. 2. Airborne *P. carinii* transmission to immunosuppressed *P. carinii*-free BALB/c mice. Cyst counts in the lungs of immunosuppressed BALB/c mice housed under the same filter bonnet with *P. carinii* infected mice (white squares). Cyst counts in lungs of immunosuppressed BALB/c mice housed in the same room with *P. carinii*-infected mice (diamonds).

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.

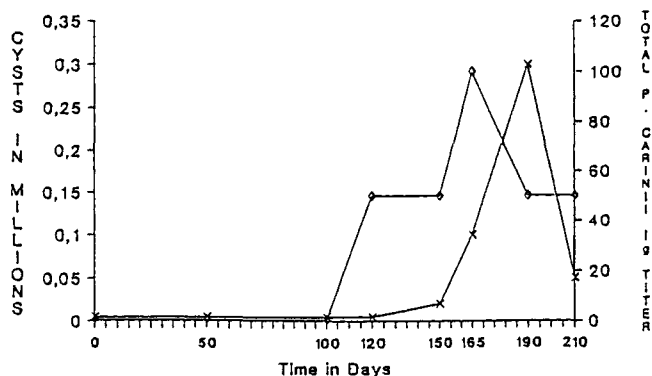


Fig. 3. Airborne transmission of infection of *P. carinii*-free BALB/c mice housed in the same room with *P. carinii*-infected animals. *Pneumocystis carinii* cyst counts in lungs of mice sacrificed after day-0, -50, -100, -120, 150th, -165, -190 and -210 after the beginning of air exposure. The average of cyst counts in 3 mice (X). Anti-*P. carinii* Ig in mice at day-0, -50, -100, -120, -150, -165, -190 and -210 are indicated. The average Ig IFAT titers in live mice (diamonds).

RESULTS AND DISCUSSION

In lungs of BALB/c submitted to 4-month corticosteroid treatment and maintained alone under a filter bonnet (protocol 1), *P. carinii* was not detected (Fig. 1). Thus, the BALB/c mouse colony bred in the laboratory was not naturally infected by *P. carinii*, as previously observed in our preliminary experiments.

*Pneumocystis carinii* was detected after 40 - 60 days in the lungs of immunosuppressed BALB/c mice housed closely exposed to infected animals (protocol 2). Infection increased during corticosteroid treatment, but marked variability in the level of parasitism was observed in different experiments, probably because of the difference in parasite loads in infected animals.

Immunosuppressed Balb/c mice, housed in the same room with PCP-infected OWM (protocol 3), were infected with *P. carinii* but the parasite numbers were lower, which confirmed the influence of close exposure for airborne infection (Fig. 2)

Before and during corticosteroid treatment, specific *P. carinii* antibodies were not detected in mouse blood. Fifteen days following cessation of corticosteroid treatment, a marked mortality was observed (70% of the mice). In surviving mice, lung parasitism slowly

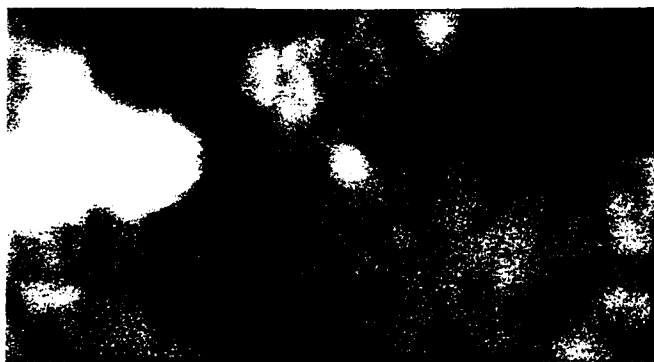


Fig. 5. Fluorescence-labeled anti-*Pneumocystis carinii* IgG MAb 4F2 labelling of parasites attached to VERO cells *in vitro*. Cyst and trophic forms are labelled. x3,200.

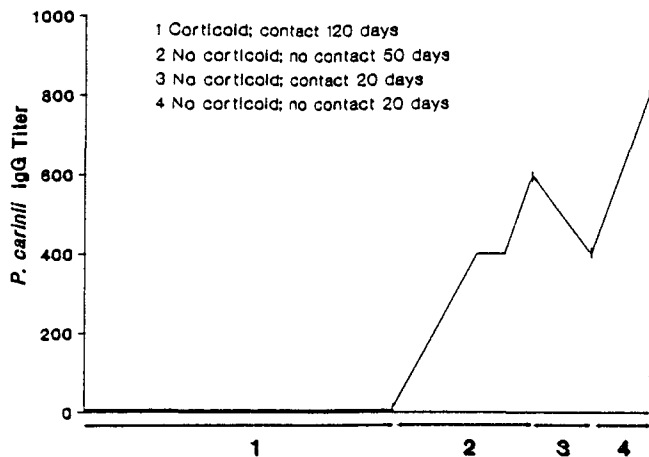


Fig. 4. *Pneumocystis carinii* antibody response, during infection and recovery in the BALB/c mouse used for the spleen cell fusion.

decreased in association with the appearance of specific IgM *P. carinii*-antibodies followed by specific anti-*P. carinii* IgG.

Nonimmunosuppressed BALB/c mice housed in the same room with *P. carinii*-infected animals (protocol 4) were slightly infected after a 5-month exposure, and low titers of specific antibodies were detectable in animal sera after 4 months of exposure (Fig. 3).

The highest titers of *P. carinii*-specific antibodies were obtained after recovery from corticosteroid-induced PCP. Thus, in spite of the high mortality observed after treatment was stopped, protocol 2 was chosen. The BALB/c mouse used for spleen cell fusion was selected, because of its recovery from infection and its antibody response 50 days after corticosteroid treatment was stopped (Fig. 4).

By immunoblotting analysis, the MAb 4F2 reacted with a 110 - 115 kDa antigen of *P. carinii* from mice as determined by analysis done under reducing conditions. In IFAT, this MAb gave a typical peripheral pattern of fluorescence on cyst forms and similar patterns in the other parasite stages of mouse *P. carinii* (Fig. 5). The MAb 4F2 did not react with rat-, rabbit- or human-derived *P. carinii*.

In conclusion, MAb 4F2 was produced by lymphocytes of a BALB/c mouse during recovery of PCP contracted by air exposure. This method avoids extraction of the parasite from infected lung, production of antigenic extracts and immunization, which are critical steps for the development of anti-*P. carinii*-specific MAb. The Mab 4F2 is a good probe for the detection of the parasite in histological or frozen sections of mice lung, or for parasite counts in extracts, inocula or culture samples. The biological effects of MAb 4F2 on the kinetics of mouse *P. carinii* infection is now being studied.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the National Agency of Researchs on AIDS (ANRS) and by M. J.C. Walch from ROCHE (France). We thank laboratory Houdé (France) for providing, prednisolone metasulfobenzoate base. We gratefully thank A. Loyens for her participation and advice, and P. Delcourt, A. Watez and Ch. Mullet for technical assistance.

LITERATURE CITED

1. Graves D. C. 1989. Immunological studies of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.*, 36:60-69.
2. Soulez, B., Dei-Cas, E., Palluault, F. & Camus D. 1991. Morphological evaluation of *Pneumocystis carinii* after extraction from infected lung. *J. Parasitol.*, 77:449-453.
3. Soulez, B., Dei-Cas, E. & Camus, D. 1988. Le lapin, hôte expérimental de *Pneumocystis carinii*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 63:5-15.

---

## IS *PNEUMOCYSTIS CARINII* A DEEP MYCOSIS-LIKE AGENT?

E. DEI-CAS\*,\*\*<sup>1</sup>, J.C. CAILLIEZ\*, F. PALLUAULT\*, E.M. ALIOUAT\*,  
E. MAZARS\*,\*\* B. SOULEZ\*,\*\*\*, J. SUPPIN\* and D. CAMUS\*,\*\*

\*INSERM (U. 42) 369 rue J. Guesde - 59650 Villeneuve d'Ascq - France.

\*\*Laboratory of Parasitology-Myology - Faculty of Medicine 1 Place Verdun 59045 Lille - France.

\*\*\*Laboratory of Histology and Biology of reproduction - Faculty of Medicine - 1 Place Verdun  
59045 Lille - France.

**Key words:** Epidemiology - Pneumocystosis - *Pneumocystis carinii* pneumonia -  
Taxonomy

*Pneumocystis carinii* is a widespread eukaryotic microorganism found in the lungs of healthy mammals, including humans. It is able to proliferate extensively in the alveoli, becoming an important agent of severe pneumonitis in immunosuppressed hosts, especially in persons suffering from AIDS. The taxonomic position of *P. carinii* is uncertain. Typical cytoplasmic organelles of eukaryotic cells have been found and described in the parasite. Biochemical research is hindered by the lack of an efficient *in vitro* culture system. Results of comparative study of nucleic acid sequences suggest that *Pneumocystis* is a fungus. However, ultrastructural, biochemical and nucleic acid homology insights appear as clearly insufficient to class *Pneumocystis*.

*Pneumocystis* infection might be acquired, as deep mycoses, from environmental sources through the respiratory tract. Thus, the hypothesis of an environmental stage of the parasite must be considered. *Pneumocystis* might be seen as a widespread pathogenic dimorphous fungus. As fungal agents, *P. carinii* is able to disseminate from the infected lung to other organs. However, deep mycoses and pneumocystosis induce different histopathological changes in the host. Furthermore, deep fungal infections, unlike pneumocystosis, cannot be transmitted from one infested host to another one. Beside these two aspects, pneumocystosis shares many features with deep mycoses. Research on the epidemiology of pneumocystosis is needed.

---

### INTRODUCTION

*Pneumocystis carinii* Delanoë and Delanoë, 1912, is a widespread eukaryotic microorganism found in the lungs of man and mammals. Low numbers of *P. carinii* organisms are frequently found in the lungs of a large variety of healthy mammals, including humans (86). However, this unicellular parasite is able to proliferate extensively in the alveoli, becoming an important agent of severe pneumonitis in immunosuppressed patients, especially in persons suffering from acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

The taxonomic position of *P. carinii* is uncertain (19).

The first problem is that it has still to be established whether *P. carinii* should be classed among the protozoa, the fungi, or if it should be included in another eukaryotic group. The great extension of the pulmonary benign or latent parasitism by *P. carinii* in the animal world suggests that this organism has been successful, through a long phylogenetic evolution, in adaptation to a large spectre of host species.

A second problem concerns the genus *Pneumocystis*: must it be considered as containing only one species (including several subspecies or strains) or several species?

Although in several recent papers (26, 27, 30, 38, 39, 45, 62, 77, 83, 88) the taxonomy of *P. carinii* is discussed, the problem is not considered from a practical point of view. Actually, although the

<sup>1</sup> Corresponding author.



establishment of the fungal or protozoan nature of *P. carinii* is a fascinating question in the theoretic field, the consideration of *P. carinii* pneumonia (PCP) as a pulmonary mycosis or as a lung disease caused by a protozoan organism has important practical consequences on the medical field. Thus, epidemiological, clinical, physiopathological and histopathological features are markedly different in deep mycoses and protozoan diseases. Also, laboratory diagnostic methods and therapeutic measures are generally different in the two groups of diseases. Therefore, the fungal or protozoan nature of PCP will involve the setting of specifically oriented research programs.

In the same way, at the "species-subspecies-strain" level the study of the differences among *P. carinii* isolates from different host species would make it possible to establish whether the populations of *P. carinii* share the same genic pool (i.e., if "*P. carinii*" is a single and "good" species) and, above all, if the observed differences are related to infectivity and pathogenicity to other host species. This problem will be examined elsewhere (manuscript in preparation), considering recent observations made in our laboratory.

During the last years, important results suggesting a fungal nature of *Pneumocystis carinii* have been published (26, 62, 77, 83). Therefore, in this work PCP and deep mycoses will be comparatively examined.

### The life cycle of *Pneumocystis carinii*

All the known stages of *P. carinii* are found in the lung of the hosts. However, the presence of the parasite in other organs is occasionally reported in man (14, 66) and, recently, we have found *P. carinii* in several extrapulmonary sites in deeply immunosuppressed laboratory animals (unpublished results).

Figure 1 shows the generally accepted life cycle of *P. carinii* (19, 53, 56). It includes the following parasite stages: an amoeboidal mononucleate trophozoite, a precyst and a mature cyst containing eight intracystic bodies that will evolve to trophozoite forms. Electron microscopy makes it possible to distinguish three precystic stages, where the number of nuclei increases from one to eight in the early, intermediate and late precysts (47). Synaptonemal complexes were observed in the nucleus of the early precyst, suggesting the occurrence of meiosis, i.e., of a sexual cycle (47). Surface structures also evolve through the life cycle: the trophozoite and the early precyst have a thin pellicle consisting of a plasma membrane and an electron-dense outer layer, whereas the other precystic stages and mature cyst have a thick pellicle (named "cyst wall" henceforth) consisting of a plasma membrane, an electron-lucent middle layer and an electron-dense outer layer (Fig. 1) (19, 47, 53, 56).

### Is *Pneumocystis carinii* a fungus?

It is usually considered that *P. carinii* shares tinctorial affinities, biochemical, cytochemical, and genomic characteristics with fungal organisms. In this section, the "fungal" features of *P. carinii* will be critically analyzed.

**Cyst wall** - The structure and chemical composition of the cyst wall of *P. carinii* are generally quoted as arguments in favor of the fungal nature of this parasite. Thus, as in the fungal wall, carbohydrate was detected in *P. carinii* cyst wall at light microscopy level by periodic acid-Schiff (PAS) staining (91), and at the ultrastructural level by Thiéry staining (53, 91). In the same way, the wall of *P. carinii* cystic organisms was reactive to the lectin Concanavalin A (ConA) (53, 61, 91).

However, in our experience, the staining of *P. carinii* with PAS is less intense than PAS-staining of yeast or hyphal cells. Furthermore, the *P. carinii* cyst wall was about 5 to 10 times less reactive to ConA and Thiéry reagent than the cell wall of *Candida albicans* (53, 64) (Fig. 2). Moreover, when reactivity of *P. carinii* cyst wall to ConA is considered strong (16, 91) the authors overlook the fact that lectin concentration used to label the cell wall of *C. albicans* is about 20 times as low as the lectin concentration needed to label the *P. carinii* cyst wall (53, 91). Comparative evaluation attempts should also take into account the fact that endogenous biotin could be present in the *P. carinii* cytoplasm and be directly labelled by streptavidin conjugates (53, 59). Furthermore, streptavidin contains a RYD sequence which mimics the RGD receptor domain of fibronectin (3): this may also be important as it was shown that gp120, a major constitutive surface *P. carinii* antigen, functions as a fibronectin binding protein (63).

The results of the analysis of carbohydrates of the *P. carinii* cyst wall clarify this discussion: the total sugar composition was in the order of 75-80 µg/mg dry weight (8%), which is a low amount in relation to that of most fungi (24).

The presence of β-1,3 glucans was suggested in the cyst wall of *P. carinii* (24, 48). Accordingly, echinocandins and papulocandins, two cyclic lipopeptide β-1,3 glucan synthesis inhibitors, were effective against *P. carinii* *in vivo* (72). However, these compounds have shown limited inhibition of the *P. carinii* β-1,3 glucan synthesis, and their mode of action against the parasite could be different from that in *C. albicans* (72).

With regard to glucan compounds in the trophozoite of *P. carinii*, it was recently reported that trophozoite-rich extracts of *P. carinii* catalysed the polymerisation of glucose to an α-1,4 D glucan. This *P. carinii* α-glucan synthase activity was at least 50 times more active than that of *S. cerevisiae* (89). α-glucans are also present in the fungus cell wall. In the pathogenic dimorphous *Paracoccidioides brasiliensis*, β-glucans are predominant in the saprophytic mycelium, whereas α-glucans predominate in the parasitic yeast-like form (21).

Lastly, marked structural differences exist between *P. carinii* and *C. albicans* cell walls. In this yeast, the cell wall is about 200-300nm thick and nine layers were distinguished by Thiéry's staining (64). In contrast, the cyst wall of *P. carinii* is about 100nm thick

and Thiéry's reagent only stained the inner electron-lucent layer (53). In addition, the cyst wall of this parasite shows an outer surface membrane which is frequently observed in intracystic bodies and young trophozoites (37). Recently, the presence of this outer membrane

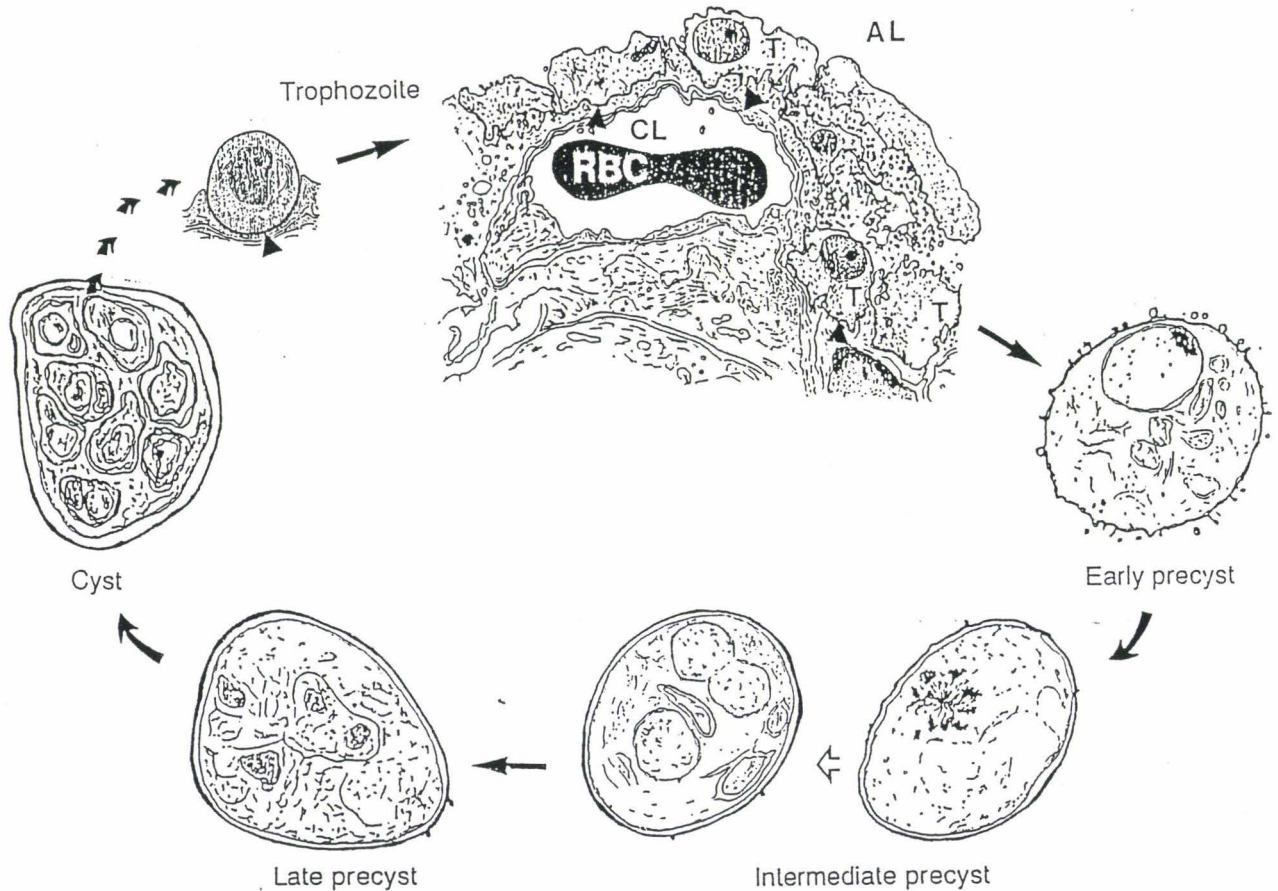


Figure 1. - Life cycle of *Pneumocystis carinii*. The different parasite stages are represented as seen on transmission electron microscopy. Attachment zones (see text) are sometimes indicated (arrow heads). AL: alveolar lumen; CL: capillary lumen; RBC: red blood cell within a pulmonary capillary blood-vessel; T: trophozoites attached to alveolar epithelium.

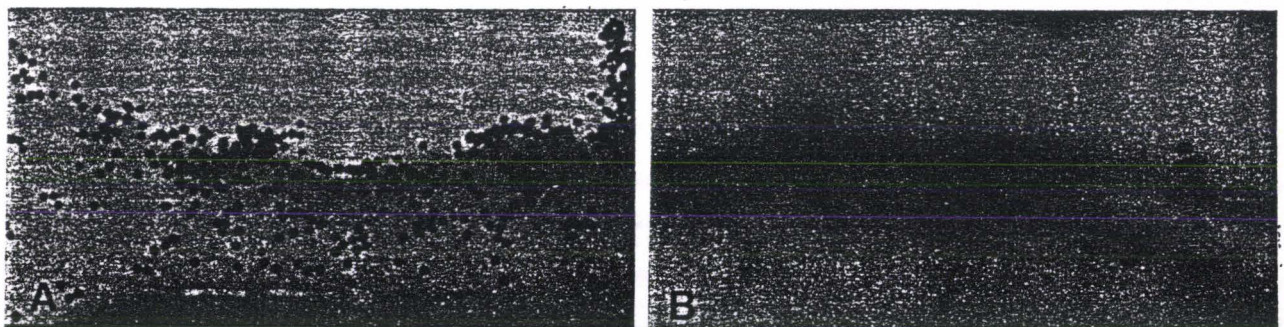


Figure 2. - Ultrastructural detection of carbohydrate of *Candida albicans* and *Pneumocystis carinii*. A: Cell wall of a *C. albicans* blastoconidium strongly labeled with Concanavalin-Au<sub>14</sub> (10 µg.ml<sup>-1</sup>) x 90,000; B: *P. carinii* cyst wall labeled with Concanavalin-Au<sub>20</sub> (120µg.ml<sup>-1</sup>) x 120,000.

was also reported in the cystic forms of *P. carinii*, where it would be closely associated with surface glycocomplex (23). To our knowledge, this outer membrane was not reported in fungi. In contrast, procaryotic Gram-negative bacteria and blue-green algae have a similar outer membrane, which may have a role in selective permeability, osmoregulation and uptake of macromolecules (23).

**Filopodia and attachment** - The amoeboid morphology of *P. carinii* trophozoite, especially the presence of filopodia or tubular extensions, and the presumed mobility (78) of this parasite stage, suggest *P. carinii* being a protozoan. *In vitro*, when the contact of a trophozoite with a target cell takes place, filopodia develop and penetrate deeply the cell cytoplasm. Then, the filopodial apical ends became bulged, anchoring the parasite to the feeder cell (18). No discontinuity is observed in the host plasmalemma area in contact with the parasite. Similar structures were reported *in vivo* (36). Although identical structures have not been found amongst the fungi (45), it is interesting that the apical tips of the *C. albicans* parasitic hyphae become bulged (65), resembling appressoria of some phytopathogenic fungi.

The *P. carinii* trophozoite attaches itself to the surface of the lung epithelial cells, especially to type 1 pneumocytes. In the attachment zone the parasite surface is closely apposed to the epithelial cell. This zone seems metabolically very active, as suggested by the development of numerous vesicles in the cytoplasm of either *P. carinii* trophozoite (58) or host cell (18, 51).

In pathogenic fungi, as in *P. carinii*, attachment to the host cell surface is an essential initial step of the pathogenic parasitism (21). Yeast cell wall receptors can interact with epithelial cells (15) or host proteins like albumin (52), fibronectin (75), laminin (7), complement (10, 71), fibrinogen and fibrin, which present similarities with integrins of human cells (80). Similarly, fibronectin, and perhaps other extracellular matrix molecules, play a role in the attachment of *P. carinii* to lung epithelial cells (2, 63).

However, attachment to host cells seems to be different in *P. carinii* and pathogenic fungi. For instance, while the viability of either yeast cells or host cells is not required for the attachment of *Candida* (70), the viability of the two partners is a critical condition for the attachment of *P. carinii* (2). Furthermore, while *C. albicans* is able to attach itself to plastic and acrylic surfaces (67, 69), *P. carinii*, to our knowledge, does not.

**Mitochondria** - It was suggested that *P. carinii* mitochondria are poorly developed, as in ascosporeous yeasts (82). More recently, mitochondria of *P. carinii* were considered as having lamellar cristae, and this was proposed as a fungal feature of *P. carinii* (68).

Today, all these affirmations must be rectified. Actually, it has been established, using three-dimensional reconstruction methods, that *P. carinii*

trophozoite has a mitochondrion occupying a large cytoplasmic volume and showing budding zones. In the intermediate precyst the mitochondrion develops, becoming highly complex (55, 56, 57).

The morphology of mitochondrial cristae was also recently described more precisely (57). Serial sectioning and cytochemical methods made it possible to establish that the shape of *P. carinii* mitochondrial cristae is roughly conical, with a broad ("lamellar") base and an upper portion which is tubular (57).

Furthermore, the shape of mitochondrial cristae can not be considered as a fungal or protozoan specific feature (19). Indeed, numerous protozoan organisms (cryptomonads, euglenids, zoomastigophorids) have mitochondria with lamellar cristae (22, p 63). Moreover, lamellar or tubular cristae are found in fungal mitochondria (31).

**Other organelles** - Hughes (38) summarizes ultrastructural observations on *P. carinii*, which are considered by the authors as fungal features of the microorganism: "paucity of organelles, indistinct nuclei, vacuolar spaces, layering pattern of the cell membranes, poorly developed mitochondria and poorly organized endoplasmic reticulum".

Recent results allow us to rectify this surprisingly poor image. The biological relevance of these ultrastructural results, summarized below, may be given by the fact that up to 1989-90, neither Golgi complex nor lysosomal system had been observed in any stage of *P. carinii*. On the one hand, improvements were performed in methods to prepare *P. carinii* samples for ultrastructural study (32, 58, 59). On the other hand, cytochemistry, serial sectioning and three-dimensional reconstruction methods were applied to the ultrastructural study of the parasite (53, 54, 55, 56). Thus, it was shown that *P. carinii* has a highly complex endomembranous system which includes rough and smooth endoplasmic reticulum, Golgi vesicles, lysosomes and complex endoplasmic saccular structures (type I and II endoplasmic saccules). Rough endoplasmic reticulum seemed poorly developed in trophozoitic and precystic stages. In contrast, endoplasmic saccules and Golgien structures, which are not abundant in trophozoites, were highly complex and well-developed in the intermediate precyst, suggesting that the last two structures are involved in the morphogenesis of the precystic wall (55).

**DNA and RNA sequence homologies** - The 16srRNA of *P. carinii* presents affinities with Ascomycota yeast rRNA (26, 77). Accordingly, the gene coding for the *P. carinii* large subunit of mitochondrial rRNA (74), and seven other continuous mitochondrial genic sequences (62), show significant homology with fungal DNA sequences.

In contrast, the DNA content of *P. carinii* cells is closer to protozoans than to fungi (33). Furthermore, the comparison of the *P. carinii* 5srRNA with that of a number of other organisms suggest that *P. carinii* could be associated to the Rhizopoda/Myxomycota/



Zygomycota group (88). In other words, from this point of view, *P. carinii* does not show affinities with common fungi (i.e., Ascomycota or Basidiomycota) nor with typical protozoa.

Johnson and Baverstock (40) attempt a critical evaluation of the srRNA comparative sequence methods applied to protists. Following this insight, neither protists nor protozoa form monophyletic assemblages. Within protozoa, ciliated groups are monophyletic, but Mastigophora and Rhizopodea are not. Within Apicomplexa, only *Sarcocystis* and *Toxoplasma* are clearly monophyletic. The authors conclude that "protozoa" is not a "respectable taxon". Other facts are also striking. For instance, *Plasmodium* is more closely related to humans than to *Euglena*, and ciliated are more closely related to fungi than they are to the flagellates. With regard to the intragenic variations in protists, Johnson and Baverstock (40) indicate that the extent of divergence in srRNA sequences may be as large as that between mammals and frogs. These authors propose that the srRNA sequencing method should not be seen as "a panacea" for phylogenetic reconstructions but, rather, it should be used for testing phylogenetic hypotheses formulated following traditional insights.

These critical considerations on the rRNA insight should be taken into account when the classification of *Pneumocystis* is attempted solely on the basis of rRNA sequencing methods. Obviously, caution should be extended to the taxonomic or phylogenetic interpretation of all divergence/convergence in nucleic acid sequences between *Pneumocystis* and other organisms.

**Protein synthesis** - Protein synthesis in eukaryote cells requires two soluble proteins or elongation factors (EF-1 and EF-2) for the peptide elongation cycle. In contrast, protein synthesis in several genera of fungi requires three elongation factors (EF-1, EF-2 and EF-3). EF-3 could not be detected in *P. carinii* using immunological methods (39) and this fact may be considered as an evidence against fungal nature of the parasite. However, the taxonomic significance of the absence of EF-3 remains to be determined.

**Dihydrofolate Reductase (DHFR) and Thymidylate Synthase (TS)** - The genes of two important enzymes, TS, catalysing the conversion of deoxyuridylate (dUMP) to TMP (thymidylate), and DHFR, catalysing the conversion of dihydrofolate to tetrahydrofolate, were found to be located on different chromosomes of *P. carinii* (27, 44). Thus, in *P. carinii*, as in non-protozoan organisms with perhaps the exception of plants, TS and DHFR reside in two polypeptide chains, clearly distinct and monofunctional (27). This may be considered as evidence against *P. carinii* being a protozoan, in so far as these two enzymatic activities exist in one bifunctional protein in all protozoa studied to date (42).

**Susceptibility to drugs** - The susceptibility of *P. carinii* to the combination trimethoprim / sulfamethoxazole, pentamidine, or other chemotherapeutic agents

effective against protozoa, suggests that *P. carinii* could be associated to protozoan organisms. As *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa (42), *P. carinii* possesses: i. a pathway for *de novo* folate synthesis (using pteridines and paraaminobenzoic acid), which is susceptible to sulphonamides; ii. the enzyme dihydrofolate reductase, which is the target of trimethoprim (41).

Most antifungal drugs are inefficacious against *P. carinii* (38). The presumed absence of ergosterol in the plasma membrane of this microorganism (90), could explain the poor response of this parasite to amphotericin B (17). In contrast, echinocandins and papulocandins, two antifungal molecules, are effective against *P. carinii in vivo* (72).

**Antigenic composition** - Antigenic composition might represent an insight to evaluate affinity between *P. carinii* and other organisms. Thus, common antigenic determinants could be shared by *P. carinii* and some potentially pathogenic fungi, such as *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae* (11, 81). However, the existence of at least a common epitope with the protozoa *Toxoplasma gondii* was reported (35). The existence of common antigens could be viewed as the widespread distribution of certain epitopes, perhaps as a consequence of convergent antigen evolution due to selection pressure by the host (35), rather than evidence of taxonomic affinity (45).

#### Is pneumocystosis a fungal disease?

*P. carinii* pneumonia (PCP) was rarely compared to fungal diseases (26). In this section, epidemiological and clinico-pathological features of deep mycoses and PCP are examined.

As several experiments (critically summarized by Hughes, (37), pp. 97 to 104) suggest that environmental transmission of *P. carinii* can occur, it seems reasonable to compare PCP with the deep mycoses which may be acquired from environmental sources (26). This is the case of fungal diseases caused by pathogenic dimorphous fungi such as *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum* and other exosaprophytic fungal agents (21). These fungi are filamentous in their saprophytic state, becoming yeastlike when invading the host (21).

**Natural history and clinico-pathological features of deep mycoses and PCP** - It is known that *Pneumocystis* infection may be transmitted from one infested host to another one, or acquired from environmental sources, "without difficulty" by airborne route (37, vol. I, p 101). Deep mycoses may also be acquired from environmental sources through the respiratory tract but, unlike PCP, they cannot be transmitted from one infested host to another one.

What are the *Pneumocystis* infective stages? As the yeastlike parasitic forms of *H. capsulatum*, the *P. carinii* organisms present in infected lung tissue were

not naturally infective to germ-free rats (37). Although nasal instillation with cyst / trophozoite suspensions, isolated from mouse infected lungs, makes it possible to induce PCP in SCID mice non-latently infected by *P. carinii* (Dei-Cas *et al.*, unpublished results), the existence of an environmental stage of *P. carinii*, forming infectious structures, remains possible.

In the geographic regions where the environmental, saprophytic development of pathogenic dimorphous fungi is observed, subclinical lung fungal infections (occurring through the respiratory route) have high incidence but severe, clinical manifestations may be rare, generally occurring in weakened hosts (21).

This pattern seems to be similar in PCP. Serological evidence suggests that in European, North American and sub-Saharan African populations (see 37 for review; 85), subclinical *P. carinii* infection commonly occurs in young healthy children. However, no studies have investigated the primary infection in humans, and its exact nature has not been determined (37). Probably, the understanding of the balanced relationships between *P. carinii* and the healthy host is important to explain the factors concerned in either the activation of latent forms of the parasite, which could occur in the immunosuppressed host (37), or the parasite proliferation following exogenous reinfection of the susceptible host, in so far as two recent works have not demonstrated carriage of *P. carinii* in the lungs of healthy people (50, 84).

It seems difficult to study the *P. carinii*-healthy host relationship in steroid immunosuppressed murine hosts. Normal host-parasite relationships in a non-immunosuppressed natural host of *P. carinii* may be studied in untreated rabbits. Actually, it has been shown in our laboratory that 80%-100% of untreated (i.e., not submitted to immunosuppressing drugs) young rabbits, purchased from commercial suppliers in France, Holland and England, are spontaneously and heavily infected with *P. carinii* at weaning (19, 76). Before weaning, very low rates of *P. carinii* organisms may be found from the first week of life (20). At weaning (28 days of age), the number of *P. carinii* organisms rapidly increases. Parasitic proliferation is associated with marked histopathological and biochemical changes, typical of PCP. Almost all animals recover within 3-4 weeks. The favorable outcome of this relatively benign, acute, natural PCP is usually associated with an increase of the humoral anti-*P. carinii* response (19, 76).

As in rabbits, the first contact of *Pneumocystis* organisms with humans (or other mammals), might cause either subclinical respiratory infection or benign, spontaneously resolving, acute pulmonary infection, since the majority of healthy young children have acquired antibodies to *P. carinii*. Therefore, the existence of a benign clinical form of PCP should be investigated in immunocompetent children suffering from apparently common lung diseases.

In histoplasmosis (*H. capsulatum*), paracoccidioidomycosis, blastomycosis, and coccidioidomycosis, the infection is primarily pulmonary. This is also true for the non-dimorphous pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. As in PCP, primary infections in these deep mycoses occur usually in a mild or asymptomatic respiratory form. The primary pulmonary lesion may be inapparent when secondary lesions appear in other organs (5).

*Pneumocystis* is also able to disseminate, by hematogenous and lymphatic routes, from the infected lung to other organs (lymph nodes, spleen, liver, bone marrow, adrenal glands, gastrointestinal tract, kidney, thyroid gland, heart, pancreas, eyes, ears, etc), where it is occasionally reported (14, 66). The real incidence of *P. carinii* extrapulmonary infection in humans remains unknown. In patients with AIDS, a 2.5% incidence was found in an autopsy study (14). Extrapulmonary *P. carinii* infection of many organs is found in deeply immunosuppressed laboratory animals with PCP (unpublished results). Although human cases of extrapulmonary pneumocystosis without lung involvement were reported (14), earlier pulmonary lesions may be inapparent when extrapulmonary lesions are found, as it was observed in deep mycoses with a pulmonary portal of entry.

Deep mycoses and PCP appear to resemble one another less when one considers radiological and pathological data. In deep mycosis patients (29), X-ray examination may show pulmonary lesions resembling those of tuberculosis (cavitation, lesions of miliary type, parenchymal nodules or calcified lesions eventually associated with hilar or paratracheal adenopathy). In contrast, bilateral homogenous interstitial infiltrates, progressing from the hilar regions to the periphery, occur usually in PCP patients (37).

Histopathological changes are also different in deep mycoses and PCP. Dimorphous fungi usually elicit a granulomatous reaction of histiocytes, epithelioid cells, and giant cells of the foreign body or of Langhans' type (5). Fibrocaseous pulmonary nodules may be caused by *C. immitis*. Abscess formation, where polymorphonuclear neutrophils are accumulated in large numbers, may be seen in blastomycosis. Caseous necrosis may develop in histoplasmosis where calcification is a characteristic feature of old necrotic lesions (5). In PCP, alveolar type II cell hypertrophy, macrophagic infiltrate in the alveolar septa and filling of the alveolar spaces with a foamy eosinophilic exudate are the most typical histopathological changes (4, 19, 37, 87). Eosinophilic exudate and necrosis were reported in extrapulmonary pneumocystosis (14).

*Epidemiology of deep mycoses and PCP* - PCP has a cosmopolitan geographic distribution. However, if one consider HIV-infected human populations, the frequency of this disease is markedly lower in tropical Africa than in the temperate North American or European countries, where PCP occurred in 50 to 65% of HIV-infected subjects before 1987 (73), remaining,

in 1991, the more frequent parasitic disease in these patients (8). In Africa, PCP was reported in 22% of AIDS patients in Zimbabwe (49), in only 11% of AIDS patients in Central Africa (12), and it was not found in AIDS patients from Uganda (43), Zambia (28), nor in non-AIDS immunosuppressed patients from Kenya (34). In African AIDS patients living in Europe, PCP seems more frequent than in African AIDS patients living in Africa (6, 13).

The low prevalence of PCP in African AIDS patients is not due to the absence of *P. carinii*. This parasite was reported in animals from the African continent as early as 1971 (see 37, for review). With regard to human PCP, cases have been reported from Congo in 1963 (15 cases dating from 1941-1944, where PCP was detected by retrospective histopathological examination) (79), South Africa in 1958 (60), Nigeria in 1967 (1) and Uganda in 1970 (9), well before the AIDS pandemic.

More virulent infections, such as tuberculosis (28, 43), might kill African AIDS patients before they develop PCP. However, alternative hypotheses, such as lower environmental exposure to *P. carinii* in Africa or genetic differences between African *P. carinii* strains and European or North American strains, may also be considered.

The consideration of *P. carinii* as a pathogenic, perhaps dimorphous fungus (26), makes easy to propose another hypothesis: the low prevalence of PCP in African AIDS patients could be due to climatic and/or ecological factors. Actually, in fungal diseases these factors may influence both the saprophytic development of the agent in the environment and the severity of the clinical manifestations (21). Thus, the actual existence of pathogenic fungi in nature is not enough to explain infection, let alone the occurrence of fungal illness among exposed mammals (21).

The ambient temperature, which is of great importance for the development of fungi in nature and for survival of their infectious stages in the environment, also plays a role in the clinical manifestations and the severity of the deep mycoses. Inoculation of laboratory animals, kept at various ambient temperatures with *P. brasiliensis*, *S. schenckii* or *H. capsulatum*, enabled Mackinnon (46) to show that experimental paracoccidioidomycosis, sporotrichosis and histoplasmosis are most severe when the ambient temperature is lowest. Thermic influence is direct, in so far as the lesions are situated in the most easily cooled parts of the body.

Epidemiological studies on human histoplasmosis seem to go in the same way. In the Mississippi-Ohio valley (USA), a hot, wet summer (which seems to favor the dissemination of infective conidia) alternating with a relatively cold season (which favors the occurrence of severe clinical types) facilitates human infection (as shown by the high rate of histoplasmin sensitization) and clinical manifestations of histoplasmosis (46). In contrast, in Panama, high temperature and level of humidity facilitate the spread of *H. capsulatum* and the subclinical infection of a

large number of people, but clinical cases are rare, serious, and generally occur in children, in whom thermoregulation is less perfect (46).

Similarly, in tropical Africa, although the hot, wet climate might facilitate the dissemination of an hypothetical environmental infective stage of *P. carinii*, as shown by the apparent high incidence of subclinical or latent infections in sub-Saharan African children (85), the absence of a cold season might limit, as in histoplasmosis, the number of evolutive clinical cases.

## CONCLUSION

Meaningful advances in the ultrastructure of *Pneumocystis* organisms have been made. Typical cytoplasmic organelles of eukaryotic cells have been found and described in the parasite (53, 54, 55, 58, 59). In contrast, the cyst wall shows an outer membrane, which seems similar to the outer membrane described in prokaryote organisms (23). Biochemical data on *Pneumocystis* are not abundant, and research in this field is hindered by the lack of an efficient *in vitro* culture system. Results of comparative studies of nucleic acid sequences suggest that *Pneumocystis* is a fungus (26, 62, 77, 83). However, with regard to the srRNA insight, strong variations are known in protists and comparative data should be used cautiously when phylogenetic reconstructions are attempted (40). In short, ultrastructural, biochemical and nucleic acid homology insights appear as clearly insufficient to class *Pneumocystis*.

Deep mycoses and pneumocystosis induce different histopathological changes in the host. Furthermore, deep fungal infections, unlike PCP, cannot be transmitted from one infested host to another. Aside from these two points, pneumocystosis shares many features with deep mycoses.

*Pneumocystis* might be seen as a widespread pathogenic dimorphous fungus. Perhaps attempts could be made to find affinities between this parasite and the members of well-defined groups of fungi. Pathogenic fungi belong to the four large groups of Eumycotina. The Gymnoascaceae family (Eurotiales, Euascomycetes) includes the sexual forms of the dimorphous *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*), *Histoplasma capsulatum* (*A. capsulata*), and probably *Paracoccidioides brasiliensis* and *Coccidioides immitis* (21). As in most ascomycetous fungi, in the life cycle of *P. carinii*, meiosis (47) seems to lead to 8 haploid intracystic bodies ("ascospores"). Therefore, *P. carinii* mature cyst might be the homologous structure of ascus. Although sexual forms of mammalian's pathogenic fungi are not usually found in the host, *in vivo* development of cleistothecia and Hülle cells was reported in one case of human aspergillosis (25).

Research in the epidemiological field is needed. Actually, neither the sources of human *P. carinii* infection nor how humans become infected by this



parasite have been clearly established. The hypothesis of an environmental stage of the parasite must be considered, and remains to be tested.

#### Acknowledgements

This study was supported in part by the "Agence Nationale de Recherches sur le SIDA" (ANRS).

#### REFERENCES

1. *Abioye, A.A.* (1967): Interstitial plasma cell pneumonia (*Pneumocystis carinii*) in Ibadan - *W. Afr. Med. J.* 16: 130.
2. *Aliouat E.M., Dei-Cas E., Ouaiissi M.A., Palluault F., Soulez B., Mazars E. and Camus D.* (1991): Attachement de *Pneumocystis carinii* in vitro: approches cellulaire et moléculaire - Abstracts Soc. Francaise Parasitol. Orléans.
3. *Alon R., Bayer E.A. and Witchek M.* (1990): Streptavidin contains a RYD sequence which mimics the RGD receptor domain of fibronectin - *Biochemical and Biophysical Research Communications* 170 (3): 1236-1241.
4. *Bartlett M.S. and Smith J.W.* (1991): *Pneumocystis carinii*, an opportunist in immunocompromised patients - *Clin. Microbiol. Rev.* 4 (2): 137-149.
5. *Binford C.H. and Dooley J.R.* (1976): Diseases caused by fungi and actinomycetes. In: Pathology of Tropical and Extraordinary Diseases, Binford C.H. and Connor D.H., editors, Vol 2, A.F.I.P., Washington, pp. 551-609.
6. *Blaser M.J. and Cohn D.L.* (1986): Opportunistic infections in patients with AIDS: clues to the epidemiology of AIDS and the relative virulence of pathogens - *Rev. Infect. Dis.* 8: 21-30.
7. *Bouchara J.P., Tronchin G., Annaix V., Robert R. and Senet J.M.* (1990): Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes - *Infect. Immun.* 58: 48-54.
8. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* (1991): Surveillance du SIDA en France 20: 79-81.
9. *Bwibo N.O. and Owor R.* (1970): *Pneumocystis carinii* pneumonia in Uganda African children - *W. Afr. Med. J.* 19: 184-185.
10. *Calderone R.A., Linehan L., Wadsworth E. and Sandberg A.L.* (1988): Identification of C3d receptors on *Candida albicans* - *Infect. Immun.* 56: 252-258.
11. *Camus D., Soulez B., Faille C., Poulain D. and Dei-Cas, E.* (1989): Immunological cross reactivity between *Pneumocystis carinii* and yeast cell wall (Abstract). ISHAM Janssen Research Council. 3rd Symposium Topics in Mycology: Mycoses in AIDS Patient - Inst. Pasteur, Paris.
12. *Carne B., Mboussa J., Andzin M., Mbouni E., Mpele P. and Datry A.* (1991): *Pneumocystis carinii* is rare in AIDS in Central Africa - *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 80.
13. *Clumeck N., Sonnet J., Taelman H., Mascart-Lemone F., De Bruyère M., Vandepierre P., Dasnoy J., Margelis L., Lamy M., Jonas C., Eyckmans L., Noel H., Vanhaeverbeek M. and Butzler J.P.* (1984): Acquired Immunodeficiency Syndrome in African patients - *N. Engl. Med. J.* 310(8): 492-497.
14. *Cohen O.J. and Stoeckle M.Y.* (1991): Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections in the acquired immunodeficiency syndrome - *Arch. Intern. Med.* 151: 1205-1214.
15. *Critchey I.A. and Douglas L.J.* (1987): Role of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans* - *J. Gen. Microbiol.* 133: 637-643.
16. *Cushion M.T., DeStefano J.A. and Walzer P.D.* (1988): *Pneumocystis carinii*: surface reactive carbohydrates detected by lectin probes - *Exp. Parasitol.* 67: 137-147.
17. *Dei-Cas E., Ajana F., Deldicque P., Bonaly R. and Vernes A.* (1987): Place actuelle de l'Amphotéricine B dans le traitement des mycoses profondes - *Ann. Biol. Clin.* 45(6): 673-679.
18. *Dei-Cas, E., Jackson, H., Palluault, F., Aliouat, E.M., Hancock, V., Soulez, B. and Camus, D.* (1991): Ultrastructural Observations on the Attachment of *Pneumocystis carinii* In Vitro - *J. Protozool.* 38: 2055-2075.
19. *Dei-Cas E., Soulez B., Palluault F., Charet P. and Camus D.* (1990): *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste - *Médecine/Sciences*, 6: 517-525.
20. *Dei-Cas E., Soulez B., Palluault F., Saquer J.G., Charet P. and Camus, D.* (1990): La pneumocystose chez le lapin. Ve Journées-Recherche cunicole, INRA edit. - Vol. I, pp. 34/1-34/9, Paris.
21. *Dei-Cas E. and Vernes A.* (1986): Parasitic adaptation of pathogenic fungi to mammalian hosts. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 13 (2): 173-218.
22. *De Puytorac P, Grain J. and Mignot J.P.* (1987): Précis de Protistologie - Boubée, edit., Paris.
23. *DeStefano J.A., Cushion M.T., Sleigh R.G. and Walzer P.D.* (1990): Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. I. Evidence for an outer surface membrane - *J. Protozool.* 37: 428-435.
24. *DeStefano J.A., Cushion M.T., Puvaanesarajah V. and Walzer P.D.* (1990): Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. II. Carbohydrate composition. *J. Protozool.* 37: 436-441.
25. *Doby J.M. and Kombila-Favry M.* (1978): Présence de formes sexuées (cleistothèces et Hülle cells), dans un cas humain d'aspergillose du sinus maxillaire chez *Aspergillus nidulans* associé à *Aspergillus fumigatus* - *Mycopathologia* 64: 157-161.

26. Edman J.C., Kovacs J.A., Masur H., Santi D.V., Elwood H.J. and Sogin M.L. (1988): Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the Fungi - *Nature* 334: 519-522.
27. Edman U., Edman J.C., Lundgren B. and Santi D.V. (1989): Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (17): 6503-6507.
28. Elvin K.M., Lumbwe C.M., Luo N.P., Bjrkman A., Kllenius G. and Linder E. (1989): *Pneumocystis carinii* is not a major cause of pneumonia in HIV infected patients in Lusaka, Zambia - *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 553-555.
29. Emmons C.W., Binford C.H. and Utz J.P. (1970): *Medical Mycology*. Lea Febiger, Philadelphia.
30. Frenkel J.K., Bartlett M.S. and Smith J.W. (1990): RNA homology and the reclassification of *Pneumocystis* - *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 1-2.
31. Garrison R.G. (1983): Ultrastructural Cytology of Pathogenic Fungi. In: *Fungi Pathogenic for Humans and Animals*. Howard DH, ed. Marcel Dekker - Inc. New York p 229-321.
32. Goheen, M., Blumershine, R., Hull, M., Bartlett, M. and Smith J. (1989): Enhancement of the fine structure of *Pneumocystis carinii* using potassium ferrocyanide and tannic acid. In: *Proceedings of the 47th annual meeting of the electron microscopy society of America*, Bailey G.W. ed. San Francisco, p. 984-985.
33. Gradus M.S., Gilmore M. and Lerner M. (1988): An isolation method of DNA from *Pneumocystis carinii*: a quantitative comparison to known parasitic protozoan DNA - *Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem.* 89 (1): 75-77.
34. Griffin L. and Lucas S. (1982): Does *Pneumocystis carinii* exist in Kenya? - *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76: 198-199.
35. Hassl A., Muller W.A. and Aspöck H. (1991): An identical epitope in *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* causing serological cross reactions - *Parasitology Research* 77 (4): 495-500.
36. Henshaw N.G., Carson J.L. and Collier A.M. (1985): Ultrastructural observations of *Pneumocystis carinii* attachment to rat lung - *J. Infect. Dis.* 151 (1): 181-186.
37. Hughes W.T. (1987): *Pneumocystis carinii* Pneumonitis - CRC Press, Boca Raton.
38. Hughes W.T. (1989): *Pneumocystis carinii*: taxing taxonomy - *Eur. J. Epidemiol.* 5: 265-269
39. Jackson H.C., Colthurst D., Hancock V., Marriot M.S. and Tuite M.F. (1991): No detection of characteristic fungal protein Elongation Factor EF-3 in *Pneumocystis carinii* - *J. Infect. Dis.* 163 (3): 675-677.
40. Johnson A.M. and Baverstock P.R. (1989): Rapid Ribosomal RNA Sequencing and the Phylogenetic Analysis of Protists - *Parasitology Today* 5: 102-105.
41. Kovacs J.A., Allegra C.J., Beaver J., Boarman D., Lewis M., Parrillo J.E., Chabner B.A. and Masur H. (1989): Characterisation of De Novo Folate Synthesis in *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii*: Potential for Screening Therapeutic Agents - *J. Infect. Dis.* 160: 312-320.
42. Kungkrai J., Webster H.K. and Yuthavong Y. (1990): Folate and Cobalamin metabolism in *Plasmodium falciparum* - *Parasitol. Today* 6 (12): 388-391.
43. Lucas S., Goodgame R., Kocjan G. and Serwada D. (1989): Absence of pneumocystosis in Ugandan AIDS patients - *AIDS* 3 (1): 47-48.
44. Lundgren B., Cotton R., Lundgren J.D., Edman J.C. and Kovacs J.A. (1990): Identification of *Pneumocystis carinii* chromosomes and mapping of five genes - *Infect. Immun.* 58 (6): 1705-1710.
45. Mackenzie D.W.R. (1990): *Pneumocystis carinii*: a nomadic taxon. In: *Mycosis in AIDS patients*, Vanden Bossche H., Mackenzie D.W.R., Cauwenbergh G., Van Cutsem J., Drouhet E. and Dupont B. - Edit. Plenum Press, New York.
46. Mackinnon J.E. (1968): The effect of temperature on the deep mycoses. In: *Systemic mycoses*, Wolstenholme G.E.W. and Porter R., Eds., Churchill Livingstone, London, pp. 164-178.
47. Matsumoto Y. and Yoshida Y. (1984): Sporogony in *Pneumocystis carinii*: Synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts - *J. Protozool.* 31: 420-428.
48. Matsumoto Y., Matsuda S. and Tegoshi T. (1989): Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii* - *J. Protozool.* 36: 21S-22S.
49. McLeod D.T., Latif A., Neill P. and Lucas S. (1988): Pulmonary diseases in AIDS patients in Central Africa - *Am. Rev. Respir. Dis.* 137: 119.
50. Millard P.R. and Heryet A.R. (1988): Observations favouring *Pneumocystis carinii* pneumonia as a primary infection: a monoclonal antibody study on paraffin sections - *J. Pathol.* 154: 365-370.
51. Nielsen M.H. and Settnes O.P. (1991): Morphology of *Pneumocystis carinii* and activation of the plasmalemmal vesicular system in alveolar epithelial cells of the host - *APMIS* 99: 219-225.
52. Page S. and Odds F.C. (1988): Binding of plasma proteins to *Candida* species *in vitro* - *J. Gen. Microbiol.* 134: 2693-2702.
53. Palluault F., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B. and Camus D. (1990): Golgi complex and lysosomes in rabbit-derived *Pneumocystis carinii* - *Biol. Cell.* 70: 73-82.

54. Palluault F., Pietrzyck B., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B. and Camus D. (1991): Three-Dimensional Reconstruction of Rabbit-Derived *Pneumocystis carinii* - I. Trophozoite. *J. Protozool.* 38: 402-407.
55. Palluault F., Pietrzyck B., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B. and Camus D. (1991): Three-Dimensional Reconstruction of Rabbit-Derived *Pneumocystis carinii*. II. Intermediate Precyst - *J. Protozool.* 38: 407-411.
56. Palluault F., Pietrzyck B., Dei-Cas E. and Camus D. (1991): Application of 3-D Computer-aided Reconstruction in Parasitology - *Parasitol. Today* 7: 215-217.
57. Palluault F., Slommianny C., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Soulez B. and Camus D. (1992): 3-Dimensional and cytochemical study of the mitochondrion of rabbit-derived *Pneumocystis carinii* - *J. Protozool.* (submitted)
58. Palluault, F., Slommianny, C., Dei-Cas, E., Soulez, B. and Camus D. (1992): High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I: Epon embedding - *Parasitol. Res.* (accepted). 78: 437-444.
59. Palluault F., Slommianny C., Dei-Cas E., Soulez B. and Camus D. (1992): High osmotic pressure for *Pneumocystis carinii* LR with embedding allows fine ultrastructural complex and cell wall synthesis - *Parasitol. Res.* (accepted) 78: 482-488.
60. Pepler W.J. (1958): *Pneumocystis pneumonia* - *South African Medical Journal* 32: 1003.
61. Pesanti E.L. and Shanley J.D. (1988): Glycoprotein of *Pneumocystis carinii*: characterisation by electrophoresis and microscopy - *J. Inf. Dis.* 158: 1353-1360.
62. Pixley F.J., Wakefield A.E., Banerji S. and Hopkin J.M. (1991): Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii* - *Molecular Microbiology* 5 (6): 1347-1351.
63. Pottratz S.T., Paulsrud J., Smith J.S. and Martin II W.J. (1991): *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp 120, a fibronectin binding protein - *J. Clin. Invest.* 88: 403-407.
64. Poulain D., Hopwood V. and Vernes A. (1985): Antigenic variability of *Candida albicans* - *CRC Critical Reviews in Microbiology* 12: 223-270.
65. Rajasingham K.C. and Cawson R.A. (1982): Ultrastructural identification of extracellular material and appressoria in *Candida albicans* - *Cytobios* 35: 77-79.
66. Raviglione M.C. (1990): Extrapulmonary pneumocystosis: the first 50 cases - *Rev. Infect. Dis.* 12 (6): 1127-1138.
67. Rotrosen D., Calderone R.A. and Edwards J.E. (1986): Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces - *Rev. Infect. Dis.* 8: 73-85.
68. Ruffolo J.J., Cushion M.T. and Walzer P.D. (1989): Ultrastructural Observations on Life Cycle Stages of *Pneumocystis carinii* - *J. Protozool.* 36: 53-54.
69. Samaranyake L.P., McCourtie J.F. and McFarlane T.W. (1980): An *in vitro* study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces - *Arch. Oral Biol.* 25: 603-609.
70. Samaranyake L.P. and McFarlane T.W. (1981): The adhesion of the yeast *Candida albicans* to epithelial cells of human origin *in vitro* - *Arch. Oral Biol.* 26: 815-820.
71. Saxena A. and Calderone R.A. (1990): Purification and characterization of the C3d-binding protein of *Candida albicans* - *Infect. Immun.* 58: 309-314.
72. Schmatz D., Romancheck M., Pittarelli L., Schwartz R., Fromtling R., Nollstadt K., Vanmiddlesworth F., Wilson K. and Turner M. (1990): Treatment of *Pneumocystis carinii* with 1,3-glucan synthesis inhibitors - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5950-5954.
73. Selik R.M., Starcher T. and Curran J.W. (1987): Opportunistic diseases reported in AIDS patients: frequencies, associations and trends - *AIDS* 1: 175-182.
74. Sinclair K., Wakefield A., Banerji S. and Hopkin J.M. (1991): *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct - *Mol. Biochem. Parasitol.* 45: 183-184.
75. Skerl K.G., Calderone R.A., Segal E., Sreevalsan T. and Scheld W.M. (1984): *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin - *Can. J. Microbiol.* 30: 221-227.
76. Soulez B., Dei-Cas E., Charet P., Mougeot G., Caillaux M. and Camus D. (1989): The young rabbit: a nonimmunosuppressed model for *Pneumocystis carinii* pneumonia - *J. Infect. Dis.* 160 (2): 355-356.
77. Stringer S.L., Stringer J.R., Blase M.A., Walzer P.D. and Cushion M.T. (1989): *Pneumocystis carinii*: Sequence from Ribosomal RNA Implies a Close Relationship with Fungi - *Exp. Parasitol.* 68: 450-461.
78. Szabados A., Tybus K., Schierz G. and Deinhardt F. (1987): Studies on the mobility of *Pneumocystis carinii* daughter cells. Abstracts of the 6th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases, p 13.
79. Thijs A. and Janssens P.G. (1963): Pneumocystosis in Congolese infant - *Trop. Geograph. Med.* 15: 158.
80. Tronchin G., Bouchara J.P., Annaix V., Robert R. and Senet J.M. (1991): Fungal cell wall adhesion molecules in *Candida albicans* - *Eur. J. Epidemiol.* 7: 23-33.
81. Trull A.K., Warren R.E. and Thiru S. (1986): Novel immunofluorescence test for *Pneumocystis carinii* - *Lancet* 1 (8475): 271.
82. Vavra J. and Kucera K. (1970): *Pneumocystis carinii* Delano, its ultrastructure and ultrastructural affinities - *J. Protozool.* 17: 463-483

83. Wakefield A.E., Pixley F.J., Banerji S., Sinclair K., Miller R.F., Moxon E.R. and Hopkin J.M. (1990): Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin - Mol. Biochem. Parasitol. 43: 69-76.
84. Wakefield A.E., Pixley F.J., Banerji S., Sinclair K., Miller R.F., Moxon E.R. and Hopkin J.M. (1990): Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification - Lancet 336: 451-453.
85. Wakefield A.E., Stewart T.J., Moxon E.R., Marsh, K. and Hopkin J.M. (1990): Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 84 (6): 800-802.
86. Walzer P.D. (1984): Experimental models of *Pneumocystis carinii* infections. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia. Young L.S. - edit., Marcel Dekker, Inc., New York, p. 7.
87. Walzer P.D. (1991): Immunopathogenesis of *Pneumocystis carinii* infection. J. Lab. Clin. Med. 118 (3): 206-216.
88. Watanabe J., Hori H., Tanabe K. and Nakamura Y. (1989): Phylogenetic association of *Pneumocystis carinii* with the 'Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group' indicated by comparison of 5S ribosomal RNA sequences - Mol. Biol. Parasitol. 32: 163-168.
89. Williams D.J., Radding J.A., Dell A., Khoo K.H., Rogers M.E., Richards F.F. and Armstrong M.Y.K. (1991): Glucan synthesis in *Pneumocystis carinii* - J. Protozool. 38 (4): 427-437.
90. Yoshikawa H., Morioka H. and Yoshida Y. (1987): Freeze fracture localisation of filipinsterol complexes in plasma- and cyto-membranes of *Pneumocystis carinii* - J. Protozool. 34: 131.
91. Yoshikawa H., Morioka H. and Yoshida Y. (1988): Ultrastructural detection of carbohydrates in the pellicle of *Pneumocystis carinii* - Parasitol. Res. 74: 537-543.

## The Yeast Killer Phenomenon: a Hypothetical Way to Control *Pneumocystis carinii* Pneumonia

J.C. CAILLIEZ<sup>\*†</sup>, N. SÉGUY<sup>\*</sup>, E.M. ALIOUAT<sup>\*</sup>, L. POLONELLI<sup>‡</sup>, D. CAMUS<sup>\*</sup> and E. DEI-CAS<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Unité 42 INSERM, 369 Rue Jules Guesde, B.P. 39, 59651, Domaine du CERTIA, Villeneuve d'Ascq, France. <sup>†</sup> Faculté Libre des Sciences, Institut Catholique de Lille, France. <sup>‡</sup> Istituto di Microbiologia, Università Degli Studi di Parma, Italia (correspondence to J-CC)

**Abstract** — *Pneumocystis carinii* is an important agent of pneumonia in immunocompromised individuals, especially in acquired immunodeficiency syndrome AIDS patients. *P. carinii* attaches specifically to type 1 pneumocytes. Although this phenomenon must play a marked role in pneumocystosis pathophysiology, no therapeutic molecules able to inhibit specifically the parasite attachment were found. A killer toxin, secreted by the yeast *Pichia anomala*, induced a significant decrease in *P. carinii* in vitro attachment and inhibited the parasite infectivity in SCID mice. Killer toxins cannot be used as systemic antibiotics. However, it was possible to produce anti-idiotypic antibodies against a monoclonal antibody specific of the toxin active site. These antibodies were shown to mimic the in vitro killer effect for the toxin and were called 'antibiobodies'. The susceptibility of *P. carinii* to the antimicrobial activity of the killer toxin made it possible to hypothesize that the killer phenomenon could constitute a new way for the treatment and prophylaxis of *P. carinii* infections.

### *Pneumocystis carinii* and pneumocystosis

Of late, interest in *Pneumocystis carinii* has been stimulated by its ability to cause severe pneumonia in immunocompromised patients, especially those suffering from acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (1). *P. carinii* pneumonia (PCP) occurred in 50–65% of human immunodeficiency virus (HIV) infected subjects (2). *P. carinii* is the most frequently encountered parasitic pathogen agent in these patients and often results in death (3). A significant decrease in PCP incidence has been obtained by chemoprophylaxis, however, this is somewhat expensive, not fully successful and the drugs used often induce deleterious side effects (eighth International Conference

on AIDS, Amsterdam, July 1992). *P. carinii* is also an important cause of severe pneumonia in HIV-uninfected patients with deficiencies in cell-mediated immunity following therapy for hematological malignancies, solid tumors and transplantations (4). The nosocomial transmission of PCP to HIV-uninfected patients has been reported (5–7).

Many chemotherapeutic agents, such as the combination trimethoprim-sulfamethoxazole or pentamidine which were effective against protozoan organisms, were also found to be efficacious against *P. carinii* (8). In contrast, antifungal drugs, in the main, have been demonstrated to be inefficacious. For instance, *P. carinii* is resistant to amphotericin B, though this may be explained by the probable absence

of ergosterol in the *P. carinii* plasmalemma. However, echinocandins and papulocandins, antifungal cyclic lipopeptide  $\beta$ -1,3 glucan synthesis inhibitors, were effective in vivo against *P. carinii* (9).

Until recently, *P. carinii* was assumed to be a protozoan. However, recent DNA-RNA studies have led to the parasite being reclassified as a fungus (10,11). Anyway, even if *P. carinii* is a fungus, it remains a unique parasite microorganism in that it has very specific features, which distinguish it from all other known fungal (or non-fungal) species.

*P. carinii* exists in two main morphological stages, the cystic and trophic forms. Cysts are ovoid in shape and have a thick wall. They contain up to eight mononuclear intracystic bodies which can be considered as daughter cells or spores (Fig. 1a). The trophic forms, which are termed trophozoites, have one nucleus and are amoeboid. A great number of trophozoites are usually found in aggregates in the alveolar lumen of humans, where they are specifically attached to the type I pneumocytes (12). No free-living environmental parasite stages were found.

#### *Pneumocystis carinii* attachment to lung cells

An important aspect of *P. carinii* pathogenicity is its attachment to the alveolar cells which is an active process (1). Filopodia appear at the surface of the trophozoites which allow the parasite to anchor in vivo to

type I pneumocytes or in vitro, to other cell types (13,14). In the process in vivo and in vitro contact of the trophozoite with target cells, filopodia are able to penetrate the host cell cytoplasm without disruption of the plasmalemma (14,15) (Fig. 1b). The attachment of *P. carinii* to host cells could be compared to the specific binding of parasite yeast species to epithelial cells. Cell wall receptors of pathogenic fungi interact with host proteins such as fibronectin, laminin or fibrinogen (16). Extracellular matrix molecules can also play a similar role in *P. carinii* binding to host cells. Thus, fibronectin is involved in the *Pneumocystis* attachment and specific fibronectin-binding receptors could be present at the surface of the parasite (13,17).

Although the attachment of *P. carinii* to alveolar cells must play a marked role in PCP pathophysiology (18,19), no therapeutic molecules able to inhibit specifically the parasite attachment, are known.

#### Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin to the *Pneumocystis carinii* attachment

The effect of a killer toxin secreted by the yeast *Pichia anomala* (strain UCSC 25F) on the attachment of *P. carinii* to cultured cells was investigated (20). The *P. anomala* killer toxin was selected for its antibiotic properties against a variety of unrelated pathogens (21). It induced a significant decrease in *P.*

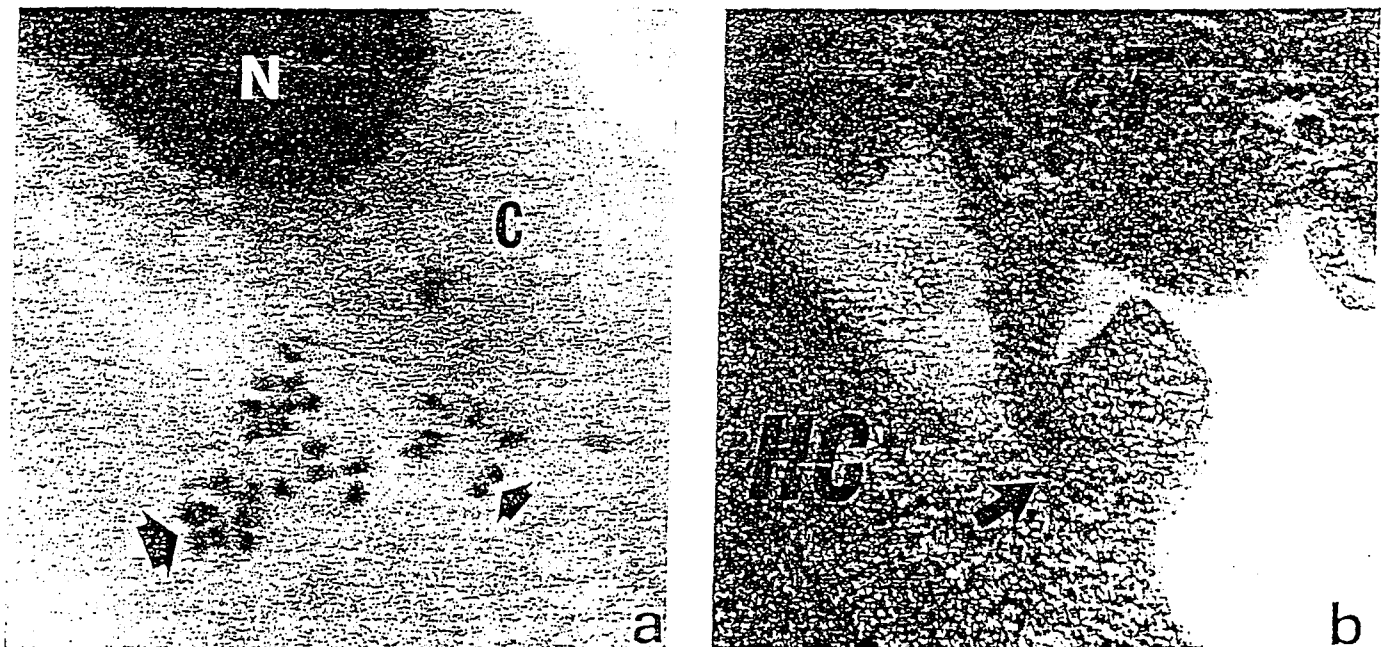


Fig. 1 In vitro attachment of rat *Pneumocystis carinii* to Vero cells. (1a) Precystic, cystic (big arrow) and trophozoite (small arrow) forms were found attached to the target cells. Preparations were stained with methanol-Giemsa. N: nucleus; C: cell surface. (1b): in vitro attachment of a rat *P. carinii* trophozoite to the surface of host cell (HC) (Vero cell). The development of trophozoite (T) filopodia (arrow) which penetrated the target cytoplasm anchoring the parasite to the host cell, is observed.



of ergosterol in the *P. carinii* plasmalemma. However, echinocandins and papulocandins, antifungal cyclic lipopeptide  $\beta$ -1,3 glucan synthesis inhibitors, were effective in vivo against *P. carinii* (9).

Until recently, *P. carinii* was assumed to be a protozoan. However, recent DNA-RNA studies have led to the parasite being reclassified as a fungus (10,11). Anyway, even if *P. carinii* is a fungus, it remains a unique parasite microorganism in that it has very specific features, which distinguish it from all other known fungal (or non-fungal) species.

*P. carinii* exists in two main morphological stages, the cystic and trophic forms. Cysts are ovoid in shape and have a thick wall. They contain up to eight mononuclear intracystic bodies which can be considered as daughter cells or spores (Fig. 1a). The trophic forms, which are termed trophozoites, have one nucleus and are amoeboid. A great number of trophozoites are usually found in aggregates in the alveolar lumen of humans, where they are specifically attached to the type I pneumocytes (12). No free-living environmental parasite stages were found.

#### *Pneumocystis carinii* attachment to lung cells

An important aspect of *P. carinii* pathogenicity is its attachment to the alveolar cells which is an active process (1). Filopodia appear at the surface of the trophozoites which allow the parasite to anchor in vivo to

type I pneumocytes or in vitro, to other cell types (13,14). In the process in vivo and in vitro contact of the trophozoite with target cells, filopodia are able to penetrate the host cell cytoplasm without disruption of the plasmalemma (14,15) (Fig. 1b). The attachment of *P. carinii* to host cells could be compared to the specific binding of parasite yeast species to epithelial cells. Cell wall receptors of pathogenic fungi interact with host proteins such as fibronectin, laminin or fibrinogen (16). Extracellular matrix molecules can also play a similar role in *P. carinii* binding to host cells. Thus, fibronectin is involved in the *Pneumocystis* attachment and specific fibronectin-binding receptors could be present at the surface of the parasite (13,17).

Although the attachment of *P. carinii* to alveolar cells must play a marked role in PCP pathophysiology (18,19), no therapeutic molecules able to inhibit specifically the parasite attachment, are known.

#### Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin to the *Pneumocystis carinii* attachment

The effect of a killer toxin secreted by the yeast *Pichia anomala* (strain UCSC 25F) on the attachment of *P. carinii* to cultured cells was investigated (20). The *P. anomala* killer toxin was selected for its antibiotic properties against a variety of unrelated pathogens (21). It induced a significant decrease in *P.*

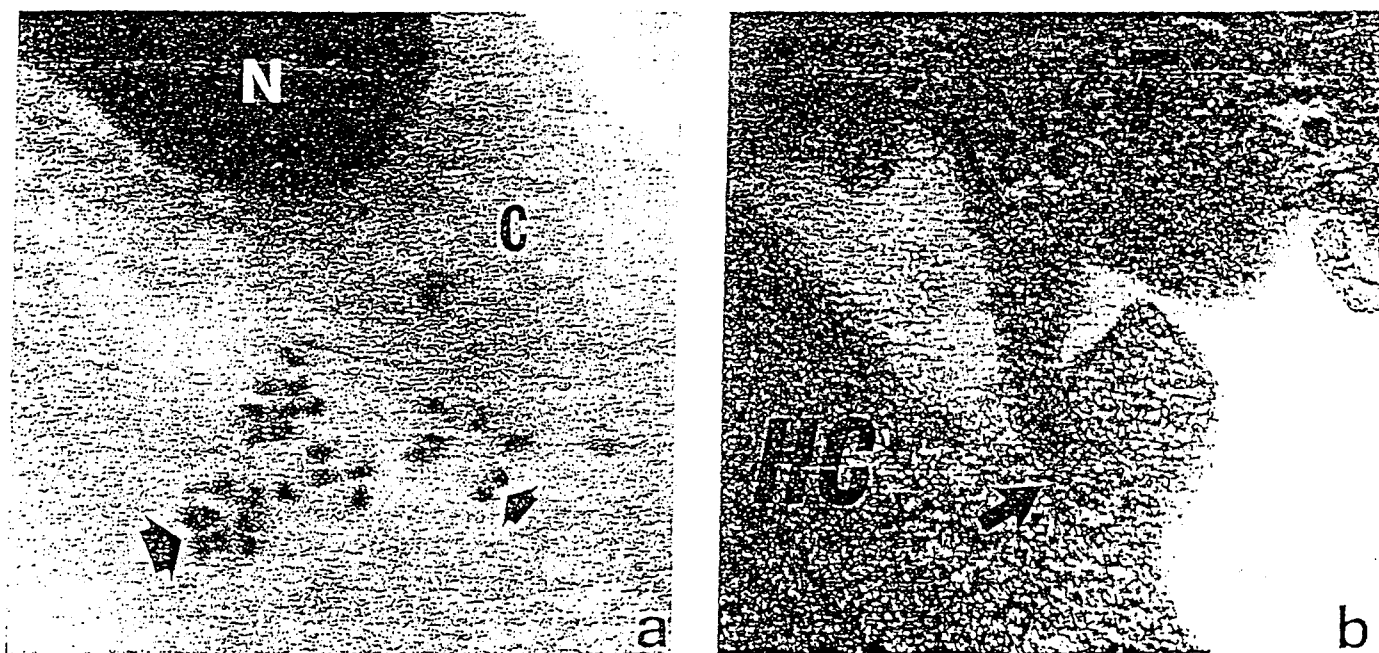


Fig. 1 In vitro attachment of rat *Pneumocystis carinii* to Vero cells. (1a) Precystic, cystic (big arrow) and trophozoite (small arrow) forms were found attached to the target cells. Preparations were stained with methanol-Giemsa. N: nucleus; C: cell surface. (1b): in vitro attachment of a rat *P. carinii* trophozoite to the surface of host cell (HC) (Vero cell). The development of trophozoite (T) filopodia (arrow) which penetrated the target cytoplasm anchoring the parasite to the host cell, is observed.

*carinii* in vitro attachment which could be blocked by preincubation of the toxin with mAb KT4, a monoclonal antibody neutralizing the antibiotic properties of the toxin (22). These data suggested that the decrease in *P. carinii* attachment was due to a specific action of the *P. anomala* killer toxin.

Further experiments are being developed in vivo, using Severe Combined Immunodeficient (SCID) mice as the experimental host of *Pneumocystis*, to establish if the *P. anomala* killer toxin is able to inhibit *P. carinii* infectivity. Preliminary results indicate that the *P. anomala* toxin inhibits the *P. carinii* infectivity in SCID mice. These results reinforce the in vitro data. Other investigations will be carried out to determine if the attachment inhibition resulted from the death of the parasite or from a specific inhibitory effect of the killer toxin on the mechanism of *P. carinii* in vivo attachment to pneumocytes. Moreover, mAb KT4 will be used to localize and identify specific toxin receptors present at the surface of *P. carinii* organisms and probably involved in the attachment process.

#### The antimicrobial activity of yeast killer toxins

Yeast killer toxins are glycoproteins secreted by different fungal species (21). They are so called because of their ability to kill certain specific microorganisms. In the *Saccharomyces cerevisiae* K1 killer system, the killer phenomenon involves a perturbation of the plasmalemma permeability of sensitive cells following a specific binding of the K1 toxin to cell wall receptors constituted by  $\beta$ 1,3-D-glucan. In *P. anomala*, killer toxin secretion has been examined using a mAb KT4 in immunoelectron microscopy and compared to glycoprotein secretion in other yeast species (23,24). The killer toxin cell wall receptors of a *Candida albicans* sensitive strain were immunolocalized by using antiidiotypic antibodies mimicking the yeast killer toxin. A heterogeneous distribution of these receptors was shown on *C. albicans* cells at different stages of growth (25). The yeast killer phenomenon is known to be displayed against a wide range of unrelated microorganisms (bacteria, algae, yeast or other pathogenic fungi) (21). These observations suggest the possible existence of an ubiquitous form of yeast toxin receptor. Since the presence of  $\beta$ -1,3-glucans in the cell wall of *P. carinii* seems probable (26,27) the presence of killer toxin receptors at the surface of the parasite could be hypothesized, all the more that a *P. anomala* killer binds to the parasite surface (20).

#### Yeast killer toxin-like 'antibiobodies' and idiotypic vaccination

Killer toxins proved to be very labile at physiological temperature and pH (28). Moreover, they are not used as systemic antibiotics because, as might be expected of large, foreign proteins, they are both toxic and antigenic. However, it was possible to obtain antiidiotypic antibodies (antilds) which exerted identical antimicrobial effects to that of corresponding killer toxins. These antilds were raised in rabbits by injection by hybridoma producing mAb KT4 and were demonstrated to be able to inhibit the in vitro growth of a *C. albicans* strain, thus, showing the antimicrobial properties of the *P. anomala* toxin. For this reason, such antilds exerting a receptor mediated antibiotic activity were called 'antibiobodies' (28).

By immunofluorescence assay, mAb KT4 and antilds were respectively used to localize the secretion sites of the toxin at the surface of *P. anomala* and the toxin receptors at the surface of *C. albicans* sensitive strains (25,29). In electron microscopy studies, the use of mAb KT4 permitted the ultrastructural visualization of the reacting epitope in the process of secretion (30). The ability of antilds to mimic killer toxin activity could prove to be a useful tool in the study of the mechanism of killer toxin binding at the surface of sensitive cells. The ultimate aim of these studies could be the development of preventive and therapeutic strategies directed against pathogenic microorganisms susceptible to yeast killer toxins.

Recently, Polonelli et al produced rabbit polyclonal antilds against mAb KT4 which apparently shared the active site of the *P. anomala* toxin. These antilds mimicked the killer effect of the secreted toxin in the in vitro growth of *C. albicans* sensitive cells (28). Moreover, the administration of mAb KT4 to syngeneic mice induced a significant protection against lethal inocula of *C. albicans* cells. This protection was related to the in vivo elicitation of antilds possessing killer properties (31). This was the first report of antimicrobial protection (idiotypic vaccination) using the properties of killer toxin-like antilds which presumably acted in vivo as antibiotics.

#### 'Antibiobodies' against *Pneumocystis carinii*

Our preliminary results permit us to hypothesize that an idiotypic vaccination could be performed by using mAb KT4 as a vaccine against toxin-susceptible *P. carinii* strains (Fig. 2). This could represent a potential application of the network theory as defined by Polonelli et al (31). Rates have been already immunized with mAb KT4. These animals produced an-

tilds, as demonstrated by inhibition competitive enzyme linked immunosorbent assay. The protective role of antitids against *P. carinii* infection will be tested using our experimental models of *P. carinii pneumonia* (13,32,33). PCP could be prevented in transplant recipient or in cancer patients by idiotypic vaccination carried out before the induction of immunosuppressed states resulting from chemotherapeutic protocols. With regard to HIV-infected patients, they could also be protected against PCP by carrying out idiotypic vaccination when their immunological response is still efficient, to delay the first PCP outbreak.

Finally, nucleotide primers could be used to amplify, using the polymerase chain reaction, DNA sequences corresponding to the variable domains of mouse immunoglobulin light and heavy chains (34), thus allowing the DNA encoding the antitids variable domains to be cloned and sequenced. The production of small synthetic peptides corresponding to artificial idio type and avoiding undesired side effects to the host might constitute a new way for the treatment and prophylaxis of *P. carinii* infections.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Mrs Chantal Mullet and Mr Philippe Delcourt, U42 INSERM, Villeneuve d'Ascq, France, for their valuable technical assistance. They would like to thank Dr Derek Sul-

livan, School of Dental Science, University of Dublin, Ireland, for the critical reading of the manuscript.

Sources of support: This investigation was supported in part by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS) and developed in the framework of the European Economic Community BIOMED-1 Concerted Action entitled: 'Pneumocystis and pneumocystosis. Impact of the biodiversity of *Pneumocystis carinii* on epidemiology pathology, diagnosis, monitoring and prevention of pneumocystosis. New therapeutic approaches' (ref. no PL931118). The coauthor N.S. was awarded a grant from the ANRS (ref. no 94635).

#### References

1. Dei-Cas E, Cailliez J C, Palluault F et al. Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent? *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 460-470.
2. Selik R M, Starcher T, Curran J W. Opportunistic diseases reported in AIDS patients: frequencies, associations and trends. *AIDS* 1987; 1: 175-182.
3. Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire. 1991. Surveillance du SIDA en France, May 20, No 20.
4. Chanock S. Evolving risk factors for infectious complications of cancer therapy. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1993; 7: 771-793.
5. Santiago-Delpin E A, Mora E, Gonzalez Z A, Morales-Otero L A, Bermudez R. Factors in an outbreak of *Pneumocystis carinii* in a Transplant Unit. *Transplantation Proc* 1988; 20: 462-465.
6. Chave J P, David S, Wauters, J P, Van Melle G, Francioli P. Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients: a cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. *AIDS* 1991; 5: 927-932.
7. Walzer P D. *Pneumocystis carinii* - New clinical spectrum?

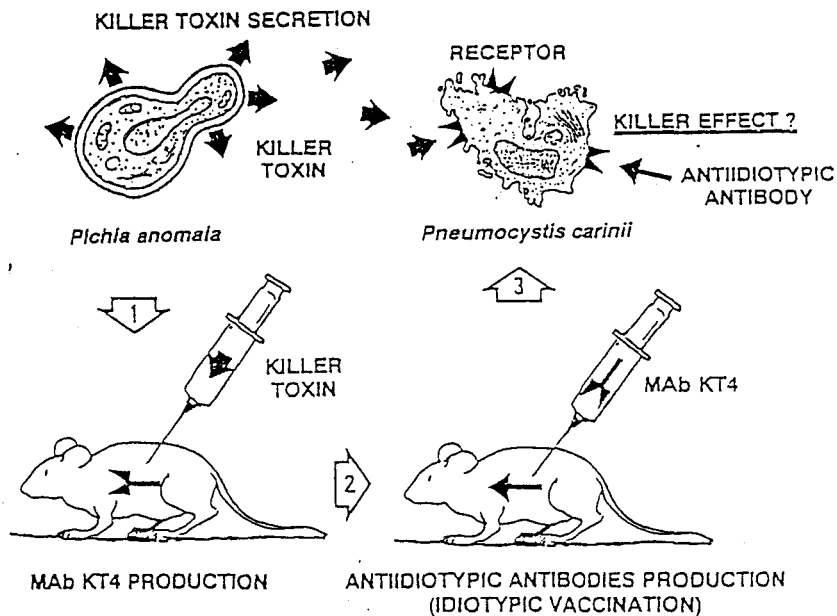


Fig. 2 The network system of the *Pichia anomala* killer phenomenon and its application to idiotypic vaccination. 1: The *Pichia anomala* secreted killer toxin has been used to produce a monoclonal antibody (mAb KT4); 2. mAb KT4 was used as an idiotypic vaccine to produce antiidiotypic antibodies; 3. The killer effect of antiidiotypic antibodies was tested against *Pneumocystis carinii*. Antiidiotypic antibodies should mimic the killer activity of the yeast killer toxin and act as antibiotic molecules.

- New Engl J Med 1991; 324: 263-265.
8. Kovacs J A, Allegra C J, Beaver J et al. Characterization of de novo folate synthesis in *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii*: potential for screening therapeutic agents. J Infect Dis 1989; 160: 312-320
  9. Schmatz D, Romancheck M, Pittarelli et al. with 1,3-glucan synthesis inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 5950-5954.
  10. Stringer J R, Edman, J C, Cushion M T, Richard F F, Watanabe J. The fungal nature of *Pneumocystis carinii*. J Med Mycol 1992; 30: 271-278.
  11. Wakefield A E, Peters S E, Banerji S, Bridge P D, Hopkin J A. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the Ustomycetous Red yeast fungi. Mol Microbiol 1992; 6: 1903-1911.
  12. Chen W, Mills J W, Harmsen A G. Development and resolution of *Pneumocystis carinii* pneumonia in severe combined immunodeficient mice. Int J Exp Path 1992; 73: 709-720.
  13. Aliouat E M, Dei-Cas E, Ouassii A, Palluault F, Soulez B, Camus D. In vitro attachment of *Pneumocystis carinii* from mouse and rat origin. Biol Cell 1993; 77: 209-217.
  14. Dei-Cas E, Jackson H, Palluault F et al. Ultrastructural observations on the attachment of *Pneumocystis carinii* in vitro. J Protozool 1991; 38: 205-207.
  15. Henshaw N G, Carson J L, Collier A M. Ultrastructural observation of *Pneumocystis carinii* attachment of rat lung. J Infect Dis 1985; 151: 181-186.
  16. Tronchin G, Bouchara J P, Annaix V, Robert R, Senet J M. Fungal cell wall adhesion molecules in *Candida albicans*. Eur J Epidemiol 1992; 7: 23-33.
  17. Pottraz S T, Paulsrud J, Smith J S, Martin II W J. *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp120, a fibronectin binding protein. J Clin Invest 1991; 88: 403-407.
  18. Itatani C A, Marshall J. Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* in situ and from bronchoalveolar lavage. J Parasitol 1988; 74: 700-712.
  19. Limper A H, Martin W J. *Pneumocystis carinii*: inhibition of lung cell growth mediated by parasite attachment. J Clin Invest 1990; 85: 391-396.
  20. Aliouat E M, Cailliez J C, Seguy N et al. Inhibitory effect of a yeast killer toxin to the in vitro *Pneumocystis carinii* attachment. Serodiagn Immunother Infect Disease 1993; 5: 102-106.
  21. Polonelli L, Morace G, Conti S, Gerloni M, Menozzi M G, Cailliez J C. Conception et perspectives du phenome l ne 'killer' chez les levures. J Mycol Med 1991; 1: 284-295.
  22. Polonelli L, Morace G. Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1986; 25: 460-462.
  23. Cailliez J C, Cantelli C, Seguy N et al. Killer toxin secretion through the cell wall of the yeast *Pichia anomala*. Mycopath 1994; in press.
  24. Cailliez J C, Poulain d, Mackenzie D W R, Polonelli L. Cytological immunodetection of yeast glycoprotein secretion. Eur J Epidemiol 1992; 8: 452-459.
  25. Polonelli F, Fanti F, Conti S et al. Detection by immunofluorescent anti-idiotypic antibodies of yeast killer toxin cell wall receptors of *Candida albicans*. J Immunol Methods 1990; 132: 205-209.
  26. DeStefano J A, Cushion M T, Puvaanesarajah V, Walzer P D. Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. II. Carbohydrate composition. J Protozool 1990; 37: 436-441.
  27. Matsumoto Y, Matsuda S, Tegoshi T. Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. J Protozool 1989; 36: 21S-22S.
  28. Polonelli L, Conti S, Gerloni M et al. 'Antibodies': antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. J Med Vet Mycol 1991; 29: 235-242.
  29. Cailliez J C, Gerloni M, Morace G, Conti S, Cantelli C, Polonelli L. Ultrastructural immunodetection of a *Pichia anomala* killer toxin: a preliminary study. Biol Cell 1992; 75: 19-23.
  30. Cailliez J C, Cantelli C, Conti S et al. *Pichia anomala* killer toxin secretion in the presence of tunicamycin. J Med Vet Mycol 1993; 31: 337-342.
  31. Polonelli L, Lorenzini F, DeBernardis F et al. Idiotypic vaccination: immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. Scand J Immunol 1993; 37: 105-110.
  32. Soulez B, Dei-Cas E, Palluault F, Camus D. Morphological evaluation of *Pneumocystis carinii* after extraction from infected lung. J Parasitol 1991; 77: 449-453.
  33. Soulez B, Palluault F, Cesbron J Y, Dei-Cas E, Capron A, Camus D. Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice. J Protozool 1991; 38: 123S-125S.
  34. Orlandi R, Gussow D H, Jones P T, Winter G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3833-3837.

## Ultrastructural, Genomic, Isoenzymatic and Biological Features Make It Possible To Distinguish Rabbit *Pneumocystis* from Other Mammal *Pneumocystis* Strains

EDUARDO DEI-CAS,<sup>1,2\*</sup> EDITH MAZARS,<sup>1</sup> CARMEN ÖDBERG FERRAGUT,<sup>1</sup> ISABELLE DURAND,<sup>1</sup> EL-MOUKHTAR ALIOUAT,<sup>1</sup> MOHAMED DRIDBA,<sup>1,3</sup> FRANCOIS PALLUAULT<sup>1</sup>, JEAN-CHARLES CAILLIEZ,<sup>1,3</sup> NATHALIE SEGUY,<sup>1</sup> MICHEL TIBAYRENC,<sup>4</sup> CHANTAL MULLET,<sup>1</sup> COLETTE CREUSY<sup>3</sup> and DANIEL CAMUS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM U42, BP 39, 59651 Villeneuve d'Ascq, <sup>2</sup>Parasitol. Dept., Univ. Hosp. Center, 59045 Lille, <sup>3</sup>Pathol. Dept., UCL, 59000 Lille, <sup>4</sup>ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier, France

Rabbit has been used as *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) model in our lab since 1986. We have shown that 95%–100% of untreated (=not submitted to immunosuppressing drugs) rabbits at weaning are spontaneously and heavily infected with *P. carinii* (*Pc*) [2,3,5]. Many observations suggested rabbit *Pc* being distinct from *Pc* from other mammals [1,2]. This is consistent with the marked genetic heterogeneity that has been reported in *Pc* from different host species [6].

In this work, a cluster of ultrastructural, genomic, isoenzymatic and biological features of rabbit *Pc*, which makes it possible to distinguish it from other mammal *Pc* strains, are presented.

**MATERIALS AND METHODS.** More than 1000 untreated rabbits were studied between 1987 and 1994. Most animals were California–New Zealand hybrid rabbits from different French region suppliers (Picardie, Nord, Normandie, Touraine, Rhône). Outbred rabbits from Toulouse or North of France farms and other strain rabbits (Dutch, Chinchilla) from Holland or England were also studied. Parasite rates were determined in rabbits of varying age by using parasite extraction and quantitation methods as described [1,5].

Rabbit-derived *Pc* was compared with parasite isolates from the following hosts [1]: (i) corticosteroid-treated Wistar rats (Iffa Credo, France); (ii) corticosteroid-treated outbred white mice (INSERM U42, France); (iii) SCID mice (Iffa Credo, France) [1]; (iv) PCP patients. Corticosteroid regimes has been described [1]. Human *Pc* isolates were obtained from broncho-alveolar lavage (BAL) samples. Comparisons were made using light and transmission electronic microscopy [4], genomic sequencing and multilocus enzyme electrophoresis (MEE).

The polymerase chain reaction (PCR) has been used to amplify a 400-bp fragment of the thymidylate synthase (TS) gene from rabbit, mouse, rat or human *Pc*. The 4 amplified fragments were cloned and sequenced.

MEE was carried out on cellulose acetate plates (Helena, USA). The following enzymatic activities were detected: glucose-6-phosphate isomerase (GPI, EC 5.3.1.9), malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), malic enzyme (ME, EC 1.1.1.40) and leucine-aminopeptidase (LAP, EC 3.4.11.1). Specific running conditions and enzymatic assays were performed as described [7] with slight modifications. Controls were uninfected host lung samples.

The infectivity power of rabbit *Pc* to other mammals was evaluated. *Pc*-free SCID mice were intranasally inoculated with rabbit-derived *Pc* as described [1] and sacrificed 40 or 90 days post-inoculation. Anesthetized *Pc*-free nu/nu rats were intratracheally inoculated with rabbit-derived *Pc*, administered dexamethasone and sacrificed 40 or 70 days post-inoculation. The susceptibility of recipient hosts to *Pc* was controlled by inoculation of mouse- or rat-derived *Pc* in recipient SCID mice or nu/nu rats, respectively. At the end of experiments parasites were extracted and counted.

**RESULTS AND DISCUSSION.** The kinetic pattern of the *Pc* infection of untreated rabbits from different origin was typical. Low parasite levels were detected as early as 7 days after birth. *Pc* rates remained low, up to the 26th or 28th day. At this time, the parasite number increased markedly to reach  $1 \times 10^4$  to  $7 \times 10^4$  total parasites. As most French breeders wean rabbits by 28 days after birth, it was tempting to link weaning to spontaneous rabbit PCP. However, many careful kinetic experiments showed that the *Pc* proliferation starts 1–2 days before young rabbits being separated from mother. After weaning, parasite levels decreased gradually becoming very low in 60-day old

rabbits. It must be outlined that rabbit PCP was less severe in summer.

The *Pc* proliferation in the rabbit lung, was associated with histological changes typical of PCP. Parasites were rather localized in the alveolar tissue, both on the epithelial surface and deeply, in alveolar septa as in mouse PCP. In contrast, parasites filled the alveolar lumen



Fig. 1. Trophozoites of rabbit- (A) and mouse-derived *Pc* (B). Filopodia (arrows) are well visible. A: x 20 160 ; B: x 12 000.

in rats. Ultrastructurally, rabbit-derived *Pc* was easily differentiated from mouse *Pc*: filopodia of rabbit parasites were clearly thicker and less numerous than those of mouse *Pc* (Fig. 1).

The sequence of the four TS-400 bp gene fragments was found different in rabbit-, mouse-, rat- and human-derived *Pc*. This apparently host species-linked genetic heterogeneity of *Pc* has been confirmed when MEE methods were applied. For each one of the 4 analysed loci, 3 patterns, which were typical to each one of 3 host species (rabbit, mouse and rat), were respectively obtained. (The number of human *Pc* organisms in BAL samples was too low for MEE to be performed). No difference was found among *Pc* isolates from different rabbit strains and/or different geographic origin.

Rabbit-derived *Pc* was not able to develop in the SCID mouse nor in the corticosteroid-treated nu/nu rat. These recipient hosts were however highly susceptible to mouse- or rat-derived *Pc*, respectively.

On the whole, present results indicate that the rabbit *Pc* "strain" represents a new species as it can clearly be distinguished from *Pc* from other mammals by morphological, genomic and biochemical features, and through its biological properties. [Supported in part by the ANRS (France) and developed in the framework of an EC-Concerted Action (CT94-PL1118). We thank P. Billaut (CIBP, Lille's Inst. Pasteur) who has provided the *Pc*-free nu/nu rats].

- Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, Cesbron JY, Camus D. *J. Protozool. Res.* (1993) 3:94.
- Dei-Cas E, Cailliez JC, Palluault F, Aliouat EM, Mazars E, Soulez B, Suppina J, Camus D. *Eur. J. Epidemiol.* (1992) 8:460.
- Dei-Cas E, Soulez B, Palluault F, Charet P, Camus D. *Médecine/Sciences* (1990) 6:517.
- Soulez B, Dei-Cas E, Camus D. *J. Parasitol.* (1992) 77:449.
- Soulez B, Dei-Cas E, Charet P, Mougeot G, Caillaux M, Camus D. *J. Infect. Dis.* (1989) 160:355.
- Stringer JR. *Infect. Agents Dis.* (1993) 2:109.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FI. *PNAS USA* (1986) 83:115.

## Does *Pneumocystis carinii* Remain Infectious in the Bloodstream ?

CECILE-MARIE DENIS,<sup>1</sup> JEAN-CHARLES CAILLIEZ,<sup>1</sup> EL MOUKHTAR ALIOUAT,<sup>2</sup> PHILIPPE DELCOURT,<sup>3</sup> GILBERT LEPAGE,<sup>1</sup>  
NATHALIE HERMANT,<sup>3</sup> MARYSE LAMOURET,<sup>3</sup> EDUARDO DEI-CAS<sup>2,3\*</sup>.

<sup>1</sup> F.L.S., Univ. Catholique de Lille; <sup>2</sup> U42 INSERM, B.P. 39, Villeneuve d'Ascq; <sup>3</sup> C.H.R.U. Lille, France

Although extrapulmonary infections with *Pneumocystis carinii* (EP) remain a relatively rare occurrence, an increasing number of cases has been reported in the last 5 years. EP were particularly found in AIDS patients where the influence of aerosolized pentamidine for treatment or prophylaxis of *P. carinii* pneumonia (PCP) was hypothesized. In these patients, lymph nodes, spleen, kidneys, liver, heart and bone marrow were the most common extrapulmonary sites. According to most authors, the dissemination of parasites could occur via lymphatic and/or hematogenous routes from the infected lungs. Two questions could be stated. Do EP result from a *P. carinii* infection in which the parasite virulence is higher than usually ? Are EP part of the normal evolution of parasite infection: a primary pulmonary phase followed by dissemination of parasites by hematogenous or lymphatic route ? In order to answer these questions, the frequency of EP, in our laboratory animals, was investigated. Another question—mark was to evaluate the ability of *P. carinii* to colonize organs through the bloodstream. Thus, fresh infective parasites were inoculated by intravenous (IV) injection in Severe Combined Immunodeficient (SCID) mice or intracardiac (IC) injection in athymic nude rats (nu/nu F344) non latently infected by *P. carinii*.

**MATERIALS AND METHODS.** Three *P. carinii* infection models were used: (i) outbred white (OW) mice were administrated prednisolone metasulfobenzozate (40 mg/ml) in the drinking water for 9–12 weeks, (ii) SCID mice were maintained 15 to 20 days in contact with *P. carinii* infected mice, (iii) Wistar rats were administrated prednisolone (40 mg/ml) or dexamethasone (2 mg/l) in the drinking water. Animals were sacrificed 3 months after the beginning of the immunosuppressing treatment. The number of EP cases was presented in Table 1.

Mouse-derived *P. carinii* organisms were inoculated in the caudal vein of both untreated and corticosteroid-treated SCID mice. Animals were sacrificed from 15 min to 60 days post-inoculation and the organs were removed and cut into small pieces before being immersed in Hanks solution without calcium and magnesium. Samples were grinded in a Potter homogenizer. The homogenate was poured through gauze and centrifuged. The pellet was resuspended in Hanks solution. The relative percentage of intermediate, precysts and cysts was numbered on homogenate smears stained with a Giemsa-like staining (RAL-555, France) [1].

**RESULTS AND DISCUSSION.** *P. carinii* has been found in lungs, heart, liver, spleen and kidneys of corticosteroid-treated Wistar rats, OW and SCID mice (Table 1). In Wistar rats, EP were more frequent in liver (with a maximum score of  $18.75 \times 10^6$  cysts for  $33 \times 10^6$  cysts found in lungs) and in spleen. The maximum of parasites localized outside the rat lungs was found in heart with a score of  $44 \times 10^6$  cysts for  $350 \times 10^6$  cysts found in lungs. In SCID mice, *P. carinii* was found in heart (with a maximum score of  $52 \times 10^6$  cysts for  $6,6 \times 10^6$  cysts found in lungs). Our results suggest that EP are highly frequent in laboratory animals. Comparatively, EP frequency in human is probably underestimated. This last consideration could be explained by the fact that many EP localisations are asymptomatic and available diagnostic methods are not sensitive enough. As no correlation between EP frequency and PCP extension was found (EP have been described without PCP), the trend of *P. carinii* to disseminate from lungs could not be the general rule.

Although many parasites were found in the mice lungs and were able to reach other organs few minutes up to about 30 hours post-injection, any of the studied animals developed PCP or EP. The fact that *P. carinii* infections were not induced by IV inoculation, suggested that inoculated fresh parasites, which were able to infect SCID mice by nasal instillation, could lost their infectivity in our experimental conditions.

Table 1. EP frequency in laboratory animals.

| Model       | <i>P. carinii</i> in Lungs ( $\times 10^6$ ) | Heart | Liver | Spleen | Brain | Kidneys |
|-------------|--|-------|-------|--------|-------|---------|
| O.W. mice   | 68±37  | 1/10  | 2/10  | 0/10   | 1/10  | 0/10    |
| SCID mice   | 89±96  | 7/15  | 2/16  | 2/16   | 0/7   | 3/15    |
| Wistar rats | 1266±1311                                    | 2/9   | 5/9   | 4/9    | 0/9   | 3/9     |

The establishment of EP is unknown [2]. Some pathologic evidence suggested that EP occurred by hematogenous and/or lymphatic dissemination from infected lungs. Parasites have been localized in pulmonary capillary blood vessels, sinusoids and lymph nodes. The finding of PCP in cesarian-delivered germ-free rats showed that vertical transmission of the parasite could be a natural way of acquiring primary infection [3]. In our laboratory, we have noticed that almost all untreated young rabbits, purchased from a large panel of commercial suppliers, were spontaneously and heavily infected by *P. carinii* at weaning (more than one thousand rabbits were studied). In this case, a transplacental infection was also suggested. The development of EP could be due to a reactivation of a latent infection. Experiments have demonstrated that *P. carinii* trophozoites could be found in the lungs of germ-free rats born and maintained in sterile conditions [3]. A clinical apparent PCP was induced in these rats following an immunosuppressive treatment.

Our main problem was that *P. carinii* inocula could be contaminated with host-derived cells. Moreover, the extraction procedure used to prepare inocula from infected animals could induce parasite damage and cause, at least partially, a decrease in the *P. carinii* infectivity. Therefore, we have developed a short-time in vitro cultivation assay of rat-derived *P. carinii* which should make possible the obtention of *P. carinii* inocula without host lung debris. These parasites were recently showed to be very infective in nude rats by intratracheal inoculation. Corticosteroid-treated nude rats were then infected by IC route with these inocula, but any of them developed PCP or EP. From these studies, we are led to the conclusion that IV or IC inoculations of *P. carinii* organisms are ineffective in producing PCP or EP in SCID mice and nude rats, respectively. However, the potential interest of these inoculation methods to induce PCP or EP need to be still investigated. As highly infective parasites revealed to be unable to induce PCP or EP by IV or IC inoculation, it was hypothesized that seric factors could inhibit the infectivity of inoculated parasites during their stay in the bloodstream. Further experiments are in progress to investigate the potential inhibitory effect of such host factors [Supported by the ANRS (France) and by an EC-Concerted Action (CT94-PL1118)].

- Aliouat EM, Cailliez JC, Séguy N, Dei-Cas E, Polonelli L, Gerloni M, Conti S, Camus D. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease* (1993) 5: 102.
- Dei-Cas E, Cailliez JC, Palluault F, Aliouat EM, Mazars E, Soulez B, Suppin J, Camus D. *Eur. J. Epidemiol.* (1992) 8: 460.
- Pifer LL, Lattuada CP, Edwards CC, Woods DR, Owens DR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (1984) 2: 23.
- Raviglione MC. *Rev. Infect. Dis.* (1990) 12: 1127.



## Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* Killer Toxin

NATHALIE SÉGUY,<sup>1\*</sup> EL MOUKHTAR ALIOUAT,<sup>1</sup> EDUARDO DEI-CAS,<sup>1</sup> LUCIANO POLONELLI,<sup>3</sup> DANTEL CAMUS,<sup>1</sup> JEAN-CHARLES CAILLIEZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>U42 INSERM, BP 39, 59651 Villeneuve d'Ascq and <sup>2</sup>F.L.S., Univ. Catholique de Lille, France, <sup>3</sup>Ist. Microbiol., Univ. Parma, Italia

Although a significant decrease in *Pneumocystis carinii* pneumonia incidence has been obtained by chemoprophylaxis, anti-*Pneumocystis* drugs are not fully successful and often induce deleterious side effects, especially in AIDS patients. For these reasons, new prophylactic and therapeutic antimicrobial strategies must be developed. In our laboratory, the effect of a *Pichia anomala* killer toxin (*PaKT*) on *P. carinii* has been investigated. This *PaKT* was selected for the following reasons: (i) it possess a wide antibiotic spectrum against unrelated pathogenic microorganisms; (ii) the *PaKT* activity can be neutralized by a monoclonal antibody (mAb KT4); (iii) anti-idiotypic antibodies, produced against mAb KT4, are able to mimic the in vitro killer effect of the toxin ('antibodies'). In the present work, the inhibitory effect of the *PaKT* was investigated on both the attachment of *P. carinii* to cultured cells and the parasite infectivity in Severe Combined Immunodeficient (SCID) mice.

**MATERIALS AND METHODS.** Corticosteroid-treated rats or mice were used as source of parasites. Wistar rats were administered dexamethasone (2 mg/ml in the drinking water for 6–9 weeks), whereas SCID mice were nasally instilled with *P. carinii* organisms derived from outbred white mice which were administered prednisolone (40 mg/ml for 9–12 weeks) in the drinking water. Extraction and quantitation of parasites were performed as previously described [1].

A standard suspension of *Pichia anomala* UCSC 25F yeast killer cells ( $5 \times 10^8$  cells/ml) was inoculated into 100 ml flask of Dulbecco Minimum Essential Medium, pH 4.6 (DMEM; FO455-Biochrom KG, Berlin), complemented with 5% fetal calf serum (complete DMEM). After 48 h at 25°C, the yeast suspension was centrifuged and the supernatant was filtered. The killer activity of the *PaKT* was evaluated by using the following assay: a standard inoculum of *P. anomala* UM3, a yeast strain sensitive to the *PaKT*, was streaked into the surface of Yeast Extract Peptone Dextrose-agar (YEPD-agar) pH 4.6. Then, 5-mm diameter wells were made in the YEPD-agar and filled with 100 µl of each following preincubation media: DMEM (complete DMEM, pH 4.6), *KT* (*PaKT* extract in complete DMEM, pH 4.6), *KT* + *mAb KT4* (*KT* preincubated for 90 min at 25°C with mAb KT4). MAb KT4 is a monoclonal antibody which specifically neutralized the *PaKT* activity. The killer effect was considered positive when a clear zone of inhibition was observed after 24h of growth at 25°C.

For the in vitro experiments, rat-derived *P. carinii* samples were preincubated for 1 h to 2 h at 25°C in the different media (DMEM, *KT*, *KT* + *mAb KT4*). After centrifugation, pellets containing *P. carinii* cystic forms and trophozoites were added to Vero (fibroblastic cells, ATCC-CCL n° 81) or L2 (lung epithelial cells, ATCC-CCL n° 149) monolayer cell cultures to evaluate the parasite attachment [2].

For the in vivo experiments, *P. carinii* organisms were preincubated for 90 min at 25°C in DMEM, *KT* or *KT* + *mAb KT4*. Preincubated parasites were then centrifuged before being resuspended in fresh complete DMEM, pH 7.4. SCID mice were divided into 4 groups. They were anesthetized and nasally instilled with DMEM, *KT*, *KT* + *mAbKT4* pretreated parasites ( $30 \times 10^6$  parasites/animal) or with culture medium (DMEM, pH 7.4) without parasite (control). Animals were sacrificed 40 days after inoculation and their lungs were quickly removed. Parasites were extracted and counted on homogenate lungs smears stained with Toluidine-blue-O or RAL-555 stain, a Giemsa-like staining (Reactifs RAL, France).

**RESULTS AND DISCUSSION.** The *PaKT* produced a marked inhibitory effect on the rat-derived *P. carinii* attachment to Vero cells (Fig.1a). Same results were obtained with mouse-derived parasites [1]. The inhibitory effect of the *PaKT* was blocked by a preincubation of this killer molecule with mAb KT4. These data showed that the decrease in *P. carinii* attachment on fibroblasts or lung epithelial cells was due to a specific action of the *PaKT*.

Further experiments were performed by using SCID mice non latently infected by *P. carinii*. Results indicated that a pretreatment of fresh

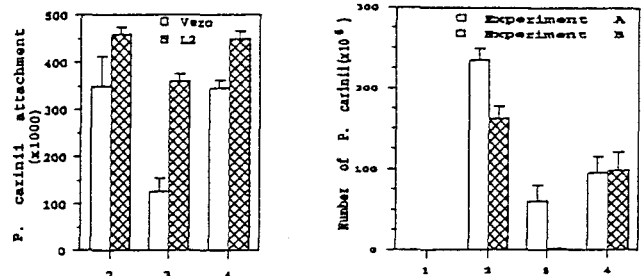


Fig.1. a) Inhibitory effect of the *PaKT* on the attachment of rat-derived *P. carinii* to Vero and L2 cells. b) Activity of the *PaKT* on the infectivity of mouse-derived *P. carinii* to the SCID mice (controls (1) were mice inoculated with DMEM without parasite. Samples of *P. carinii* were preincubated in: DMEM (2) or *KT* (3) or *KT*+*mAbKT4* (4)).

mouse-derived parasite inocula with the *PaKT* inhibited the infectivity of *P. carinii* in these animals (Fig.1b). The specificity of the toxin activity was controlled by using the neutralizing properties of mAb KT4. Although it is too early to affirm the existence of a real killer effect, *P. carinii* infectivity appeared clearly sensitive to the *PaKT* activity. The decrease of *P. carinii* in vitro attachment on fibroblasts and the inhibition of the parasite infectivity in SCID mice was due either to the death of parasite or to a specific inhibitory effect of the toxin on *P. carinii* adhesion mechanism at the surface of host cells.

*P. carinii*, which was first assumed to be a protozoan, presents cellular and molecular similarities with fungi. For this reason, the antifungal properties of the *PaKT* could be used against this fungus-like microorganism. Polyclonal anti-idiotypic antibodies (antiIdDs) were produced by immunization of rabbits with mAb KT4. These antiIdDs apparently shared the active site of the *PaKT* since they were able to mimic the killer effect of the secreted toxin in the in vitro growth of yeast and bacteria sensitive strains. Moreover, the injection of mAb KT4 to syngeneic mice induced a significant protection against lethal inocula of *Candida albicans* cells [4]. This protection was related to the in vivo elicitation of antiIdDs possessing killer properties. It was the first report of immunoprotection using the properties of killer toxin-like antiIdDs which presumably acted as antibiotics (idiotypic vaccination).

Our present results permit to hypothesize that an idiotypic vaccination carried out against *P. carinii* infections could be tested by using mAb KT4 as a vaccine. This could represent a potential application of the network theory as defined by Polonelli et al. [5]. Rats have been already immunized with mAb KT4 in order to produce antiIdDs. The protective role of antiIdDs against *P. carinii* infection will be tested using our experimental models of *P. carinii* pneumonia. [Supported by ANRS (France), ref. n° 94635 and developed in the framework of a EEC BIOMED-1 Concerted Action (ref. n° PL931118)]

- Aliouat EM, Cailliez JC, Séguy N, Dei-Cas E, Polonelli L, Gerloni M, Conti S, Camus D. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease* (1993) 5: 102.
- Aliouat EM, Dei-Cas E, Ouassia A, Palluault F, Soulez B, Camus D. *Biol. Cell* (1993) 77: 209.
- Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, Cesbron JY, Camus D. *J. Protozool. Res.* (1993) 75: 19.
- Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Castagnola M, Morace G, Chezzi C. *J. Med. Vet. Mycol.* (1991) 29: 235.
- Polonelli L, De Bernardis F, Conti S, Boccanera M, Gerloni M, Morace G, Magliani W, Chezzi C, Cassone A. *J. Immunol.* (1994) 152: 3175.

## Polymorphism of the Thymidylate Synthase Gene of *Pneumocystis carinii* from Different Host Species

EDITH MAZARS,\* CARMEN ÖDBERG-FERRAGUT,\* EDUARDO DEI-CAS,\*\*\*, MARIE-NOELLE FOURMAUX,\* EL MOUKHTAR ALIOUAT,\* MONIQUE BRUN-PASCAUD,\*\*\* GENEVIEVE MOUGEOT\*\*\*\* and DANIEL CAMUS\*\*

\*INSERM (U. 42) 369 rue J. Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, France,

\*\*Laboratory of Parasitology-Mycology, Faculty of Medicine, 1 Place Verdun 59046 Lille, France,

\*\*\*INSERM (U. 13), 190 boulevard Mac Donald 75944 Paris, France, and

\*\*\*\*Faculty of Medicine Saint Antoine, 27 rue de Chaligny 75571 Paris, France

**ABSTRACT.** *Pneumocystis carinii* is an opportunistic agent found in the lung of various mammals which often causes severe pneumonia in immunocompromised humans, especially in AIDS patients. In the past several years significant additions have been made to the collection of knowledge we have concerning the genetic diversity of *P. carinii*. These additions provide new understanding of *Pneumocystis* transmission and the effect of possible reservoirs of *Pneumocystis* in the various species. In this study, a 400-bp fragment of the thymidylate synthase (TS) gene of *P. carinii* has been amplified by PCR from 43 parasite isolates obtained from 4 mammalian host species: rat, mouse, rabbit and human. A probe selected from the TS gene sequence of rat-derived *P. carinii* was hybridized with the amplified products from rat- and mouse-derived *P. carinii*, but not with rabbit or human *P. carinii* DNA. Restriction profiles were performed on amplified fragments from all isolates, and the 4 nucleotide sequences of the TS gene fragment amplified from rat, mouse, rabbit and human *P. carinii* were determined. Differences were detected in the gene fragment in *P. carinii* isolates from the 4 host species; however no difference was revealed in *P. carinii* isolates within a single host species, whatever the host strain or its geographic origin. Thus, the sequence differences of the *P. carinii* TS gene appeared as host-species specific. A specific probe which recognized all human *P. carinii* isolates was defined.

**Supplementary key words.** Diagnosis, epidemiology, genomic markers, PCR, probe, restriction profile, sequence.

*PNEUMOCYSTIS carinii* is an opportunistic agent found in the lungs of various mammals [14]. This parasite causes severe pneumonia in humans immunocompromised by AIDS [4, 8, 17, 27] or by immunosuppressive therapy [11, 30]. The polymorphism of this eukaryotic microorganism has been revealed through antigenic [3, 12, 13, 16, 18, 19] or genomic [22, 24, 28] differences observed among various isolates. It appears essential to investigate this genetic diversity in relation to the host species in order to develop further specific probes for diagnosis and determine the reservoir of the human *P. carinii* pneumonia (PCP) agent. Therefore, specific genomic and phenotypic markers of *P. carinii* derived from different host species are required [29].

In the present study, we describe genomic differences among *P. carinii* isolates obtained from 4 different mammalian host species: rat, mouse, rabbit and human. The polymerase chain reaction (PCR) has been used to amplify a 400-bp region of the thymidylate synthase (TS) gene, and to analyze this target se-

quence by hybridization, restriction profile and sequence analysis. Our results suggest that the diversity of the *P. carinii* TS gene is related to the host species.

### MATERIALS AND METHODS

**Sources of *P. carinii* and controls.** *P. carinii* was obtained from parasitized lungs of several strains of rats, white mice, rabbits at weaning and from bronchoalveolar lavage (BAL) samples from patients with PCP living either in France or in Burundi (Table 1). WKY, Wistar, Lewis and Sprague-Dawley rats, which were purchased from Janvier (Laval, France), were housed in the INSERM U13 laboratory (Paris, France), immunosuppressed with hydrocortisone acetate (20 mg) twice weekly by sub-cutaneous injection, and subjected to a low-protein diet (8%). Tetracyclin (1 g/liter) was added to the drinking water. One Wistar rat from Iffa-Credo (Lyon, France) was housed in the Parasitology laboratory of the St. Antoine Hospital (Paris) and treated with hydrocortisone acetate (25 mg) once a week by sub-cutaneous injection. The other 6 Wistar rats were purchased from Iffa-Credo (Lyon, France), housed in our laboratory (Villeneuve d'Ascq, France) and immunosuppressed with dexa-

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.

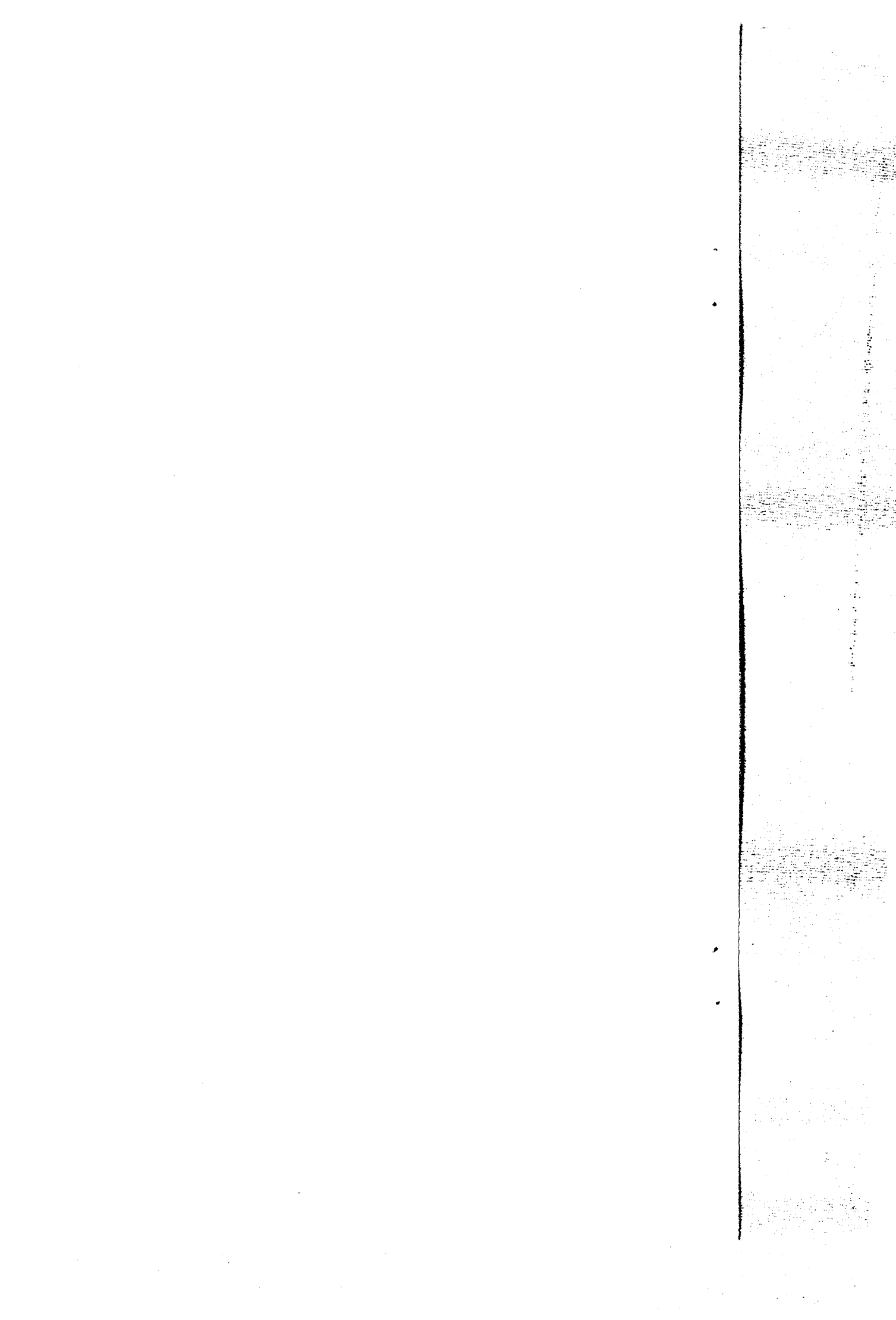


Table 1. Sources of *Pneumocystis carinii*.

| Host species | Host strain                          | Number | Sample           | Origin  |
|--------------|--------------------------------------|--------|------------------|---|
| Rat          | Wistar                               | 6      | Lung             | Iffa-Credo, Lyon (France)                                 |
| Rat          | Wistar                               | 1      | Lung             | Janvier, Laval (France)                                   |
| Rat          | WKY                                  | 1      | Lung             | Janvier, Laval (France)                                   |
| Rat          | Lewis                                | 1      | Lung             | Janvier, Laval (France)                                   |
| Rat          | Sprague-Dawley                       | 1      | Lung             | Janvier, Laval (France)                                   |
| Mouse        | Outbred U42 <sup>a</sup>             | 3      | Lung             | INSERM U42, Villeneuve d'Ascq (France)                    |
| Mouse        | Outbred BU <sup>a</sup>              | 3      | Lung             | INSERM U42, Villeneuve d'Ascq (France)                    |
| Rabbit       | California/<br>New Zealand<br>hybrid | 7      | Lung             | Vasseur, Prouzel (France)                                 |
| Rabbit       | California/<br>New Zealand<br>hybrid | 2      | Lung             | Charles River, Rouen (France)                             |
| Rabbit       | Dutch                                | 1      | Lung             | Harlan, Oxon, (United Kingdom)                            |
| Rabbit       | Chinchilla                           | 1      | Lung             | Harlan, Austerlitz (Netherlands)                          |
| Rabbit       | Outbred                              | 2      | Lung             | Farm, St. Omer (France)                                   |
| Human        | —                                    | 8      | BAL <sup>b</sup> | Centre Hospitalier Régional Universitaire, Lille (France) |
| Human        | —                                    | 1      | BAL              | Centre Hospitalier, Valenciennes (France)                 |
| Human        | —                                    | 4      | BAL              | Centre Hospitalier Régional, Tourcoing (France)           |
| Human        | —                                    | 1      | BAL              | Centre Hospitalo-Univ. Kamenge (Burundi)                  |

<sup>a</sup> Outbred U42 = white mice bred in our laboratory; Outbred BU = Balb-c/U42 hybrid white mice.

<sup>b</sup> BAL = broncho-alveolar lavage.

methasone (2 mg/L) (Merck, Sharp and Dohme Chibret, Paris, France) added to their drinking water for 3–4 months. The mice bred in our laboratory were immunosuppressed with prednisolone (40 mg/L) (Houdé Laboratories, Puteaux, France) added to their drinking water for 3–4 months and maintained in the same room and similar housing conditions as the rats. Rabbits at weaning develop a PCP spontaneously [25]. They were obtained from different strains and from many suppliers (Table 1). Parasite isolates were collected over a period of 3 years.

Uninfected samples from rats, mice, rabbits and humans were used as negative controls, while *Candida albicans* (clone VW 32) and *Saccharomyces cerevisiae* (clone DSM 70-470) were used as specificity controls.

**Extraction of parasites.** The animals were killed by anaesthesia (pentobarbital, Clin-Midy, Paris, France). Their lungs were removed aseptically and the parasites were extracted by the agitation of lung pieces with a magnetic stirrer as previously described [26], but with some modifications. Parasite extracts were filtered through sterile stainless steel (250–63 µm) and through Nuclepore filters (10 and 8 µm) (Serlabo, Paris, France). The number of *P. carinii* in infected samples was assessed in lung extract smears stained with either toluidine blue O [6] or RAL 555 (Réactifs RAL, Paris, France) [26]. There were no other detected microbes in these parasite extracts.

**Preparation of genomic DNA.** Template DNA was prepared following the protocol described by Maniatis et al. [20]. Each sample was treated by proteinase K (0.2 mg/ml) (Boehringer Mannheim, France) in Sodium Tris EDTA buffer in presence of 1% SDS. DNA was purified by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. Yeast samples were previously treated in 50 mM phosphate buffer, 0.8 M sorbitol, 12 M 2-β mer-

Table 2. Sense and antisense primers used in PCR analysis of *P. carinii* DNA.

| Type              | Code | Sequence                        |
|-------------------|------|---------------------------------|
| Sense primers     | A    | 5'-ATTTATGGGTTTCAATGG-3'        |
|                   | A'   | 5'-GGATCCATTTATGGGTTTCAATGG-3'  |
| Antisense primers | B    | 5'-TGCAATATTAAGGGAAC-3'         |
|                   | B'   | 5'-TTCTAGATTAAGGGAACACCTAGC-3'  |
|                   | B''  | 5'-GCTCTAGATGCAATATTAAGGGAAC-3' |

captoethanol, pH 7.5, with 0.25 volume of zymolyase 20 T (Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan) 20 Units/ml for 35 min at 28° C. This digestion results in split fungi walls.

**Amplification procedures.** The synthesized oligonucleotide primers (Pasteur Institut, Paris, France) are reported in Table 2. Primers A', B' and B'' were provided with restriction sites to the 5' end. Primer A' had a *Bam* HI site and primers B' and B'' had a *Xba* I site. Primers A and B were used to obtain amplified products for hybridization and restriction profiles. Primers A' and B' or B'' were used for cloning and sequencing. The DNA amplification reaction mixture had been previously described by Edman et al. [10]. The thermocycler program was modified according to the following scheme: denaturation at 94° C for 5 min, then 36 cycles performed with denaturation at 94° C for 30 s, annealing at 50° C for 25 s, extension at 70° C for 1 min and finally 5 min at 72° C (PREM III, Lepscentific, Flobio, France). Controls without a template were included in each experiment, in order to detect any contamination. The amplification products were run in a 1.5% agarose gel with ethidium bromide (0.5 µg/ml).

**DNA hybridization.** After electrophoresis, a capillary alkaline southern blot was performed using polyvinylidenedifluoride filters (Immobilon P, Millipore, St. Quentin Yvelines, France). DNA was crosslinked for 2 hours at 80° C. Filters were prehybridized for 2 hours at 42° C in 5× SSPE (1× SSPE = 0.15 M NaCl, 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.001 M EDTA), 5× Denhart's solution, 0.5% SDS [20] containing *Escherichia coli* tRNA (0.1 mg/ml). They were then hybridized overnight to a probe at 42° C. The probe is as follows: 5'-CATATACCATCGAA-TAACCACCG-3' from rat-derived *P. carinii* TS gene sequence [10]. The probe was 5' end-radiolabelled using <sup>32</sup>P-ATP and T4 polynucleotide kinase (Biolabs, France). Filters were subsequently washed at 42° C, 50° C and 55° C in 2× SSC (1× SSC = 0.015 M citrate buffer containing 0.15 M NaCl) for an hour. Autoradiography was performed using Kodak X OMAT AR film at -80° C with intensifying screens. Using the same protocol, a sequence of the human-derived *P. carinii* TS gene sequence was selected and tested as probe as follows: 5'-CCAA-ATGGCGGTGACGTG-3'. The prehybridization and hybridization were performed at 57° C. Filters were washed twice at 57° C and 62° C.

**Cloning.** *E. coli* strain MC1061 and plasmid pMa58 were provided by Prof. E. Remaut (University of Gent, Belgium). This strain was used for the transformation with hybrid DNA as well as for stable propagation and preparation of plasmid DNA in LB medium (g/liter: Bactotryptone, 10; Yeast extract, 5; NaCl, 5; pH 7.4). Genomic amplifications were performed with primers A' and B', or primers A' and B''. After electrophoresis, the amplified fragments were extracted from agarose gel with the GeneClean kit (Bio 101, France), digested with *Bam* HI and *Xba* I, and ligated to pMa58 using a typical three part ligation method [2]. *E. coli* competent cells [7] were transformed with the resulting chimeric plasmid. Plasmid DNA from positive clones was prepared by alkaline lysis [5].

**Restriction profiles.** Restriction digestions were performed either on the chimeric plasmids or on the amplified fragments. Nine endonucleases—*Hind* II, *Pst* I, *Taq* I (Boehringer Mannheim, France), *Hind* III, *Hph* I, *Mnl* I, *Nde* I, *Sal* I, *Ssp* I, (Biolabs, France)—were used according to the supplier's recommendations.

**Sequencing.** Amplified fragments cloned in pMa58 were completely sequenced on both strands by the dideoxy chain-termination method [23]. Previously, chimeric plasmids were prepared with the Quiagen kit (Coger, France). The clone products were sequenced with the TAQuence<sup>®</sup> version 2.0 brief protocol kit (United States Biochemical, Cleveland, OH) and appropriate primers. Multiple clones were sequenced.

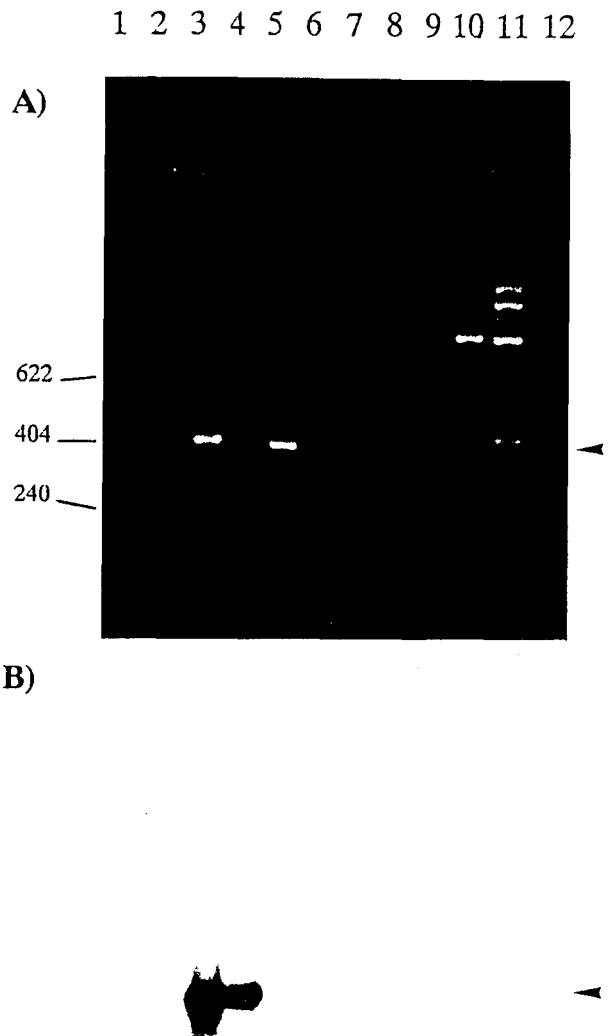
## RESULTS

The polymerase chain reaction was performed on *P. carinii* isolates infecting 10 rats, 6 mice, 13 rabbits, 14 humans and also on negative or specificity controls, using the oligonucleotide primers A and B which were selected from conserved regions of the TS amino acid sequence of rat-derived *P. carinii* [10]. As expected, a 400-bp fragment was amplified from all *P. carinii*-infected samples. No product was amplified from negative or specificity controls (Fig. 1A). With a view to cloning the amplified products, slightly different primers were chosen (Table 2). Unexpectedly, primer A' and B' produced an efficient amplification of *P. carinii* DNA from rats, mice and humans but not from rabbits. Primers A' and B'' were needed to amplify rabbit-derived *P. carinii* DNA. This result suggested obvious mutations in this gene.

A probe was selected from a variable region [21] of the TS gene sequence of rat-derived *P. carinii* (Fig. 2). After amplification, the defined radiolabelled probe hybridized strongly with rat- or mouse-derived *P. carinii* DNA. No hybridization was observed with the amplified rabbit- or human-derived *P. carinii* DNA, nor with the controls (Fig. 1B). The same results were observed when the hybridization was performed at low temperature. They were consistent with the occurrence of TS gene variations in parasite isolates from each host species.

In order to detect genomic differences, all the samples described in Table 1 were treated with endonucleases. Differences were observed in the restriction profiles of the DNA targets from rats, mice, rabbits and humans *P. carinii* (Fig. 2). Restriction fragments from rat-derived *P. carinii* were those expected from the TS gene sequence already described [10]. The obtained restriction profiles made it possible to accurately characterize 4 parasite lines which correlated with the 4 host species studied. Indeed, these restriction profiles were identical in *P. carinii* isolates from all tested individuals of a given host species. For example, similar restriction profiles (Fig. 3) were obtained from amplified products from human *P. carinii* isolates of French and Burundian origin.

The 4 amplified products from the rat-, mouse-, rabbit- and human-derived *P. carinii* TS gene were sequenced and compared (Fig. 2). It was found that the TS sequence of rat *P. carinii* was identical to that published by Edman et al. [10]. The open reading frames were aligned without introducing gaps. Two small presumptive introns were contained in the sequences of rat-, mouse-, rabbit- and human-derived *P. carinii*. The introns were found at the same positions. When compared to the rat *P. carinii* sequence, the mouse-, rabbit- and human-derived *P. carinii* ones have respectively shown 24, 86 and 81 mutations. About 40% of these mutations occurred in the 2-intron region. The 4 sequences were not GC-rich and no marked differences were found in the % G + C: 34%, 33.9%, 35.5% and 34.2% G + C for rat, mouse, rabbit and human *P. carinii*, respectively.



**Fig. 1.** PCR and hybridization analysis of *Pneumocystis carinii* isolates from different host species. Amplified products were obtained using primers A and B corresponding to conserved regions of the rat-derived *P. carinii* TS gene. **A.** Ethidium bromide stained gel. pBR322-MspI fragments as molecular weight markers (lanes 1 and 12), rabbit-derived *P. carinii* DNA (lane 2), rat-derived *P. carinii* DNA (lane 3), mouse-derived *P. carinii* DNA (lane 4), human-derived *P. carinii* DNA (lane 5), rabbit DNA (lane 6), rat DNA (lane 7), mouse DNA (lane 8), human DNA (lane 9), *Candida albicans* DNA (lane 10) and *Saccharomyces cerevisiae* DNA (lane 11). Molecular-sizes are indicated in base pair on the left. The arrowhead shows the amplified 400-bp fragment of *P. carinii* DNA. **B.** Autoradiography after hybridization with an internal probe selected from the rat-derived *P. carinii* TS gene. The rat- (lane 3) and mouse- (lane 4) derived *P. carinii* amplified 400-bp fragments are labelled with the selected probe (arrowhead).

The TS nucleotide sequences of rat, mouse, rabbit and human *P. carinii* encoded similar peptides (Fig. 4). Indeed, amino acid sequences were 83% identical. In relation to the TS amino acid fragment of the rat-derived *P. carinii*, those of mouse-, rabbit- and human-derived *P. carinii* showed respectively 3, 14 and 11

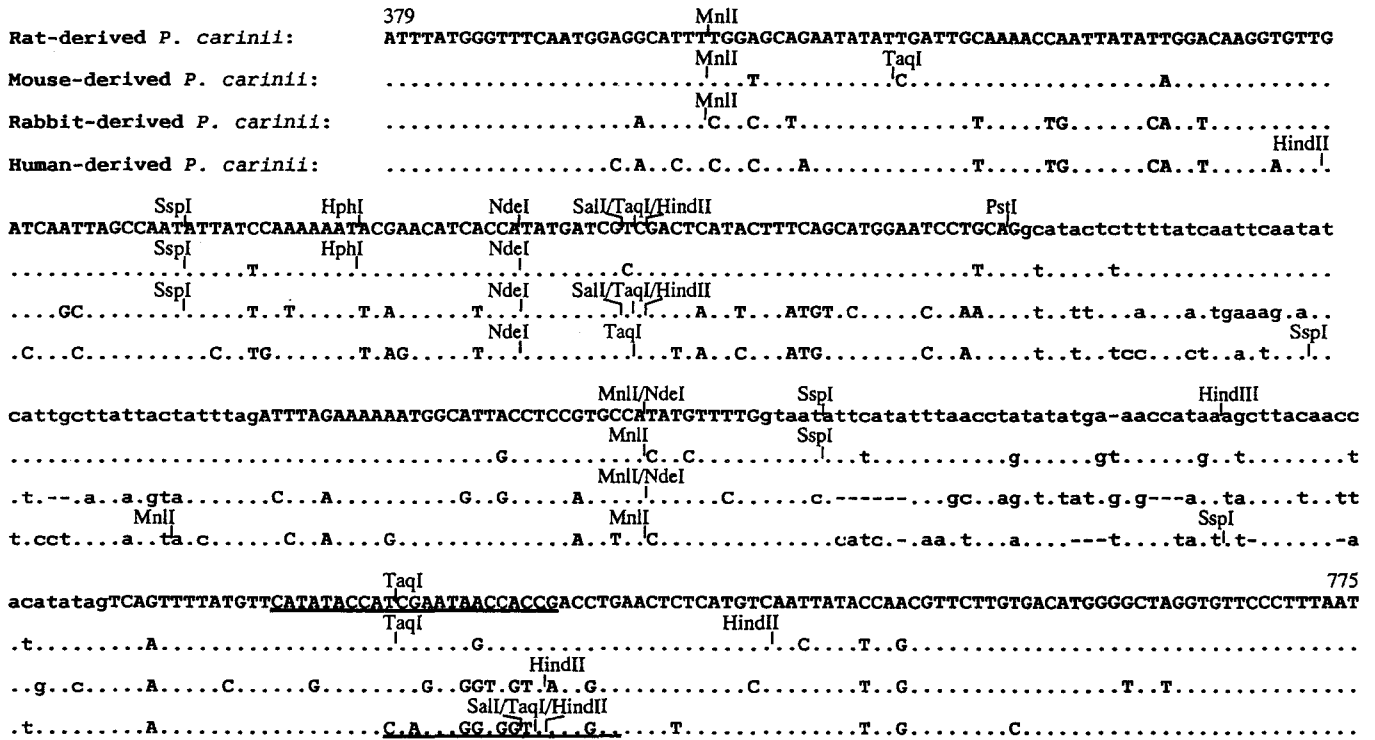
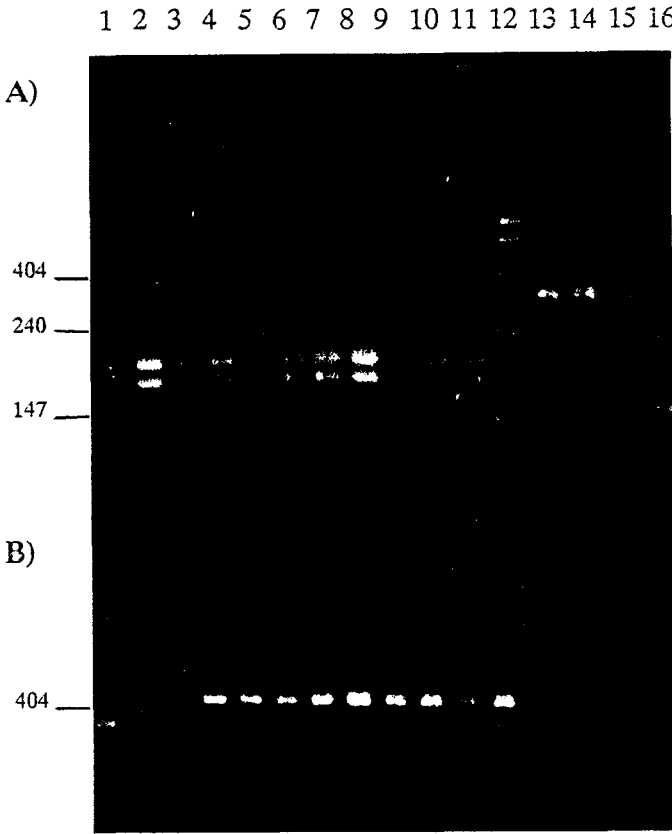


Fig. 2. DNA sequences of the 400-bp fragment of the TS gene from rat-, mouse-, rabbit- and human-derived *P. carinii*. The upper case letters show the exon sequences. The small case letters show the location of the introns. Dots represent nucleotides identical to those found in the rat *P. carinii* TS sequence. Dashes indicate gaps introduced to obtain alignment. Sequences selected as probes in this work are underlined. The restriction sites of the 9 tested endonucleases are indicated on the four sequences.



different amino acids. When rat, mouse, rabbit and human *P. carinii* TS peptides were compared, most amino acid mutations were clustered in a region known to be hypervariable [21], while regions known to be highly conserved showed no differences.

In order to obtain a human *P. carinii* specific probe, a 19-bp sequence was selected in this hypervariable encoding region of the TS gene (Fig. 2). This probe hybridized with all the human-derived *P. carinii* amplified products, whereas no hybridization was found with the amplified rat-, mouse- or rabbit-derived *P. carinii* DNA (Fig. 5).

DISCUSSION

TS is among the most highly conserved enzymes [21]. The gene of this enzyme was selected for this study because its se-

Fig. 3. Analysis of PCR products from human-derived *P. carinii* isolates with 3 restriction enzymes. The ethidium bromide gel shows TS amplified products digested with *Mnl* I, *Sal* I or *Hph* I. A. PCR products from 11 human-derived *P. carinii* isolates digested with *Mnl* I (lanes 1-11). PCR products from 4 human-derived *P. carinii* isolates digested with *Sal* I (lanes 13-16). pBR322-MspI is used as molecular weight markers (lane 12). B. PCR products from 2 human-derived *P. carinii* isolates digested with *Sal* I (lanes 1-2). PCR products from 10 human-derived *P. carinii* isolates, digested with *Hph* I (lanes 4-13). pBR322-MspI is used as molecular weight markers (lane 3). Molecular-sizes are indicated in base pair on the left.



Rat-derived *Pneumocystis carinii* : IYGFQWRHFGEAIED  
 Mouse-derived *Pneumocystis carinii* : .....  
 Rabbit-derived *Pneumocystis carinii* : .....  
 Human-derived *Pneumocystis carinii* : .....K...

CKTNYIGQGVDQLANIIQKIRTSFYDRRLILSAWNPADLEKMALPPCHMFCQFYV  
 .....S.....I.....  
 ...D.T.....H..Q.....MS...T..K.....  
 ...D.T.....E..Q.....M.....K.....

HIPSNHRPELSCQLYQRSCDMGLGVPFN  
 .....S.....  
 .V..DGRQR.....  
 ...P.GG.R.....

Fig. 4. Amino acid sequences corresponding to DNA sequences of the 400-bp fragment of the TS gene from rat-, mouse-, rabbit- and human-derived *P. carinii*. Dots represent residues identical to those found in the rat *P. carinii* TS sequence.

quence in rat-derived *P. carinii* has already been established [10]. A 400-bp fragment of the TS gene was analyzed in 43 *P. carinii* isolates from the 4 host species (Table 1).

At first, a probe of 23-bp was selected from the rat-derived *P. carinii* TS gene (Fig. 2). This probe concerned a non-conserved region of TS amino acid sequence which seemed specific to rat *P. carinii* TS when compared to the prokaryotic or eukaryotic homologous sequence [21]. Although the selected probe hybridized with the 400-bp DNA fragment of rat- and mouse-derived *P. carinii* isolates, it was unable to hybridize with human- or rabbit-derived *P. carinii* DNA (Fig. 1B). The digestion of this fragment with *Taq* I or *Sal* I or *Hind* II revealed DNA mutations in the probe hybridization region (Fig. 2).

The sequence analysis confirmed the mutations in the probe hybridization region and explained the non-hybridization of the probe with the DNA of *P. carinii* isolates from human and rabbit hosts. The sequence differences also explained why the amplification of rabbit-derived *P. carinii* DNA was not possible using the primer B': the guanine was replaced by a thymine blocking the start of the synthesis (Fig. 2). Furthermore, a specific DNA probe (Fig. 2), which was able to identify human *P. carinii* isolates, was defined in this work (Fig. 5).

On the whole, results showed a polymorphism among *P. carinii* isolates from different host species, but not among parasite isolates within a given host species. Considering that identical genomic sequences for *P. carinii* isolates from the same host species might be related to animal-to-animal transmission (between hosts housed in the same laboratory animal facilities) mammalian hosts were taken from, housed in, and sacrificed in laboratories from different regions or countries (Table 1). This is explained further in Materials and Methods.

The present data have supported that *P. carinii* isolates from rats, mice, rabbits and humans are genetically different. One might think that such a genetic diversity reflects the different geographic origin or strain of the host species. However, we should keep in mind that: 1) hosts came from various French

geographic regions, different European countries or, with regard to human isolates, different continents (Table 1); 2) the TS gene fragment sequence of *P. carinii* derived from the rats used in this study was identical to the homologous DNA sequence of *P. carinii* from American rats, reported by Edman et al. [9, 10]; 3) except for mouse, many strains of each host species were used as a parasite source (Table 1). Therefore we concluded that *P. carinii* genomic differences reported in this work cannot be linked either to the geographic origin of the hosts or to their strain.

It is important to notice that over a period of 3 years no variation was observed among *P. carinii* isolates within a single host species, even when mammalian hosts were obtained from different suppliers.

In addition, the present data agree with previous results obtained by comparative analysis of *P. carinii* DNA sequences or karyotype studies of the parasite. Sequence differences were found in the gene of the large subunit of the mitochondrial ribosomal RNA of *P. carinii* taken from several host species [22, 24, 31]. Karyotype differences between rat- and ferret-derived *P. carinii* [32] as well as between rat- and human-derived *P. carinii* [28] were also reported. In contrast, Kitada et al. [15] did not show differences in the 5S rDNA sequence among *P. carinii* isolates from rats, mice and humans.

In this study, differences were detected in a 400-bp fragment of the TS gene in *P. carinii* isolates from 4 host species. No difference was revealed in *P. carinii* isolates within a single host species whatever the host strain or its geographic origin were. This fact suggests that the genetic diversity of *P. carinii* reported here is host-species specific. Recently, the infectivity power of rat-, rabbit- or mouse-derived *P. carinii* isolates to the SCID mouse was tested: only mouse *P. carinii* was infectious to this experimental host [1]. Thus, the TS polymorphism of *Pneumocystis* isolates was associated with their infectivity properties [1] and could be useful as a genomic marker in epidemiological studies on PCP. Nevertheless, a higher number of *P. carinii* isolates from different host species must be investigated.

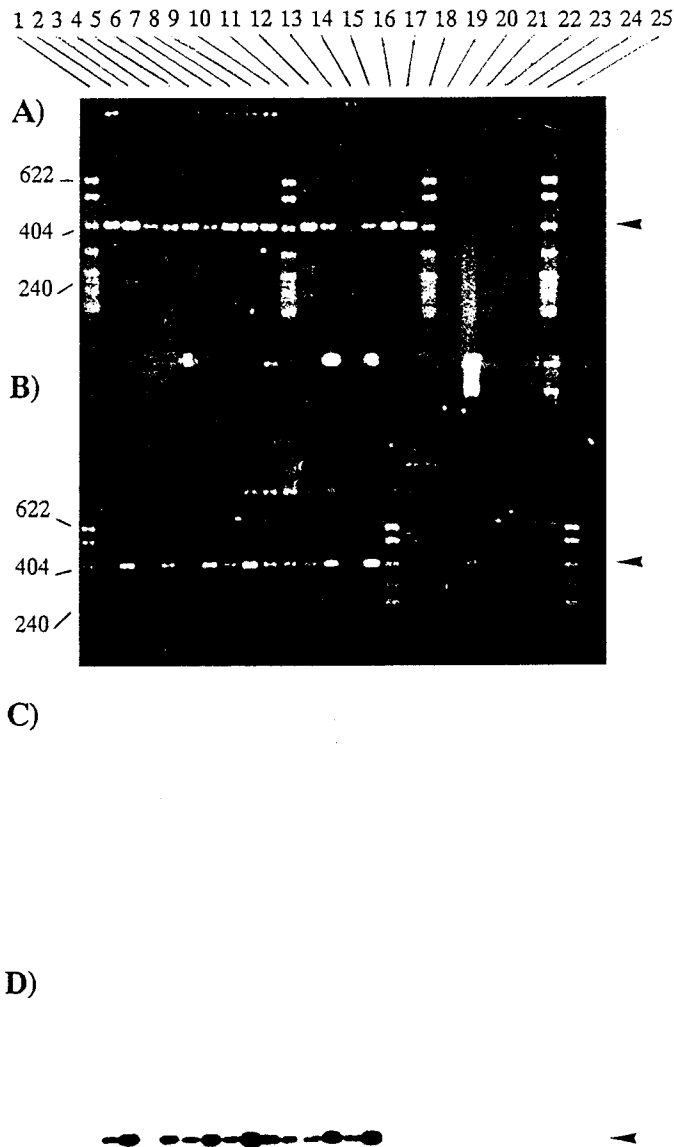


Fig. 5. PCR and hybridization analysis of *P. carinii* isolates from 4 host species. Amplified products were obtained using primers A and B corresponding to conserved regions of the rat-derived *P. carinii* TS gene. pBR322-MspI is used as molecular weight markers. Molecular-sizes are indicated in base pair on the left. A, B. Ethidium bromide stained gel. Arrowheads mark the position of the amplified 400-bp products. C, D. Autoradiography after hybridization with an internal probe selected from the human-derived *P. carinii* TS sequence. The 14 human-derived *P. carinii* amplified 400-bp fragments are labeled with the selected probe (arrowhead). A, C. Nine rat-derived *P. carinii* isolates (lanes 2–10), 6 mouse-derived *P. carinii* isolates (lanes 12–17), 5 rabbit-derived *P. carinii* isolates (lanes 19–23), molecular weight markers (lanes 1, 11, 18, 24). B, D. Fourteen human-derived *P. carinii* isolates (lanes 2–15), 8 rabbit-derived *P. carinii* isolates (lanes 17–24), molecular weight markers (lanes 1, 16, 25).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Larouzé for the gift of human *Pneumocystis carinii* isolates, Prof. E. Remaut for the gift of the *Escherichia coli* strain and the pMa58 plasmid, C. Mullet, P. Delcourt and

I. Szuster for technical support and D. Hipple who has reviewed the English text. This work received financial support from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS). The author E. M. was awarded a grant from the ANRS.

#### LITERATURE CITED

1. Aliouat, E. M., Mazars, E., Dei-Cas, E., Cesbron, J. Y. & Camus, D. 1993. Intranasal inoculation of mouse-, rat-, or rabbit-derived *Pneumocystis* to SCID mice. *J. Protozool. Res.*, 3:94–98.
2. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene publishing associates and Wiley-Interscience, New York.
3. Bauer, N. L., Paulsrud, J. R., Bartlett, M. S., Smith, J. W. & Wilde, C. E. 1993. *Pneumocystis carinii* organisms obtained from rats, ferrets and mice are antigenically different. *Infect. Immun.*, 61:1315–1319.
4. Bennet, C. L., Gertler, P., Guze, P. A., Garfinkle, J. B., Kanouse, D. E. & Greefield, S. 1990. The relation between resource use and in-hospital mortality for patients with acquired immunodeficiency syndrome-related *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Arch. Intern. Med.*, 150:1447–1453.
5. Birboim, H. C. & Doly, J. 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7:1513.
6. Chalvardjian, A. M. & Grawe, L. A. 1963. A new procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cysts in tissue sections and smears. *J. Clin. Pathol.*, 16:383–384.
7. Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. 1989. One step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:2172–2175.
8. Dei-Cas, E., Soulez, B., Palluault, F., Charet, P. & Camus, D. 1990. *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. *Médecine/Sciences*, 6:517–525.
9. Edman, J. C., Kovacs, J. A., Masur, H., Santi, D. V., Elwood, H. J. & Sogin, M. 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334:519–522.
10. Edman, U., Edman, J. C., Lundgren, B. & Santi, D. V. 1989. Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:6503–6507.
11. Fossieck, B. E. & Spagnolo, S. V. 1980. *Pneumocystis carinii* pneumonitis in patients with lung cancer. *Chest*, 78:721–722.
12. Gigliotti, F. 1992. Host species-specific antigenic variation of a mannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.*, 165:329–336.
13. Gigliotti, F., Stokes, D. C., Cheatham, A. B., Davis, D. S. & Hughes, W. T. 1986. Development of murine monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.*, 154:315–322.
14. Hughes, W. T. 1987. *Pneumocystis carinii* Pneumonitis. CRC Press, Boca Raton.
15. Kitada, K., Oka, S., Kimura, S., Shimada, K., Serikawa, T., Yamada, J., Tsunoo, H., Egawa, K. & Nakamura, Y. 1991. Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by polymerase chain reaction: animal models and clinical application to noninvasive specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 29:1985–1990.
16. Kovacs, J. A., Halpern, J. L., Lundgren, B., Swan, J. C., Parillo, J. E. & Masur, H. 1989. Monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*: Identification of specific antigens and characterization of antigenic differences between rat and human isolates. *J. Infect. Dis.*, 159:60–70.
17. Kovacs, J. A. & Masur, H. 1989. Prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: an update. *J. Infect. Dis.*, 160:882–886.
18. Linke, M. J., Cushion, M. T. & Walzer, P. D. 1989. Properties of the major antigens of rat and human *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.*, 57:1547–1555.
19. Lundgren, B., Lipschick, G. Y. & Kovacs, J. A. 1991. Purification and characterization of a major human *Pneumocystis carinii* surface antigen. *J. Clin. Invest.*, 87:163–170.
20. Maniatis, T., Fritsch, E. & Sambrook, J. 1981. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
21. Perry, K. M., Fauman, E. B., Finer-Moore, J. S., Monfort, W. R., Maley, G. F., Maley, F. & Stroud, R. M. 1990. Plastic adaptation

toward mutations in proteins: structural comparison of thymidylate synthases. *Proteins*, **8**:315-333.

22. Peters, S. E., Wakefield, A. E., Whitwell, K. E. & Hopkin, J. M. 1994. *Pneumocystis carinii* pneumonia in thoroughbred foals: identification of a genetically distinct organism by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.*, **32**:213-216.

23. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **74**:5463-5467.

24. Sinclair, K., Wakefield, A. E., Banerji, S. & Hopkin, J. M. 1991. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol. Biochem Parasitol.*, **45**:183-184.

25. 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.

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

27. Speich, R., Opravil, M., Weber, R., Hess, T., Luethy, R. & Russi, E. 1992. Prospective evaluation of a prognostic score for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. *Chest*, **102**:1045-1048.

28. Stringer, J. R., Stringer, S. L., Zhang, J., Baughman, R., Smulian, A. G. & Cushion, M. 1993. Molecular genetic distinction of *Pneumocystis carinii* from rats and humans. *J. Euk. Microbiol.*, **40**:733-741.

29. Tibayrenc, M. & Ayala, F. J. 1991. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today*, **7**:228-232.

30. Varthalitis, J., Aoun, M., Daneau, D. & Meunier, F. 1992. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with cancer. *Cancer*, **71**:481-485.

31. Wakefield, A. E., Peters, S. E., Banerji, S., Bridge, P. D. & Hopkin, J. M. 1992. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the Ustomycetous red yeast fungi. *Mol. Microbiol.*, **6**:1903-1911.

32. Weinberg, G. A. & Bartlett, M. S. 1991. Comparison of pulsed field gel electrophoresis karyotypes of *Pneumocystis carinii* derived from rat lung, cell culture, and ferret lung. *J. Protozool.*, **38**:64S-65S.

Received 12-30-92, 4-22-94; accepted 8-9-94