

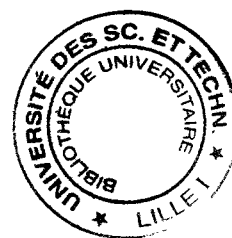
Université des Sciences et Technologies de Lille–Flandres–Artois

THÈSE
présentée par

Nathalie SÉGUY

pour l'obtention du
Doctorat des Sciences de la Vie et de la Santé
de l'Université de Lille–Flandres–Artois

**Etude de la sensibilité de *Pneumocystis carinii*
vis-à-vis d'une toxine de *Pichia anomala* et
des anticorps anti-idiotypes mimant son action**



Soutenue le 15 Novembre 1996 devant les membres du jury

Président : Pr Steven BALL, Service de Génétique Microbienne, Villeneuve d'Ascq
Rapporteur : Pr Luciano POLONELLI, Istituto di Microbiologia, Parma
Rapporteur : Dr Jean-Marie GRZYCH, Institut Pasteur, Lille
Assesseur : Pr Daniel CAMUS, U42 INSERM, Villeneuve d'Ascq
Assesseur : Pr Evelyne GUEHO, Institut Pasteur, Paris
Directeur de thèse : Dr Eduardo DEI-CAS, U42 INSERM, Villeneuve d'Ascq
Assesseur : Dr Jean-Charles CAILLIEZ, U42 INSERM, Villeneuve d'Ascq

*A mes parents,
qui, par leur soutien permanent,
ont permis l'aboutissement de ce travail*

Aux membres du jury,

Mr le Pr D. Camus, qui m'a accueilli dans son unité et m'a donné la possibilité de concrétiser ce travail,

Mr le Dr E. Dei-Cas, qui a su m'intégrer dans son équipe et m'a permis de partager sa passion sur *Pneumocystis*,

Mr le Dr J.C. Cailliez, qui m'a confié ce travail et m'a communiqué ses connaissances sur la toxine "killer",

Mr le Pr S. Ball, qui me fait l'honneur de présider ce jury,

Mme le Pr E. Gueho, Mr le Pr L. Polonelli, Mr Dr J.M. Grzych, 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 ce travail,

Melle Edith Mazars, Mr El Moukhar Aliouat, Melle Cécile-Marie Denis, qui m'ont apporté leur soutien tout au long de ce travail et m'ont conseillé lors de la rédaction de ce mémoire,

Mme Laurence Fleurisse et Mme Sofia Lafitte, qui ont collaboré efficacement l'une en histologie et l'autre pour la production des anticorps,

Mr Philippe Delcourt, Mr le Dr Patrick Delplace, Mr Etienne Dewailly, Mr le Dr Thierry Jouault, Mme Chantal Mullet, Mr le Dr Christian Slomianny, qui par leur discussion ou leur aide, ont permis l'avancée de ce travail,

A tous les membres de l'unité 42 et plus particulièrement à Melle Isabelle Briche, Melle Chantal Fradin, Melle Karine Guyot, Mme Michelle Masurelle, Mme Gilberte Michalski, qui par leur gentillesse ont facilité mon intégration dans le laboratoire,

Je leur exprime mes plus vifs remerciements et toute ma gratitude.

SOMMAIRE

Abréviations	1
Figures et tableaux	2
Liste des publications personnelles	3
INTRODUCTION	4
1^{ère} partie : GENERALITES	
I- <i>Pneumocystis carinii</i>	7
1.1 Historique	7
1.2 Description de <i>P. carinii</i>	7
1.2.1 Morphologie du parasite	8
1.2.2 Cycle biologique	8
1.2.3 Mise en évidence de <i>P. carinii</i>	11
1.3 Culture de <i>P. carinii</i>	13
1.4 Modèles animaux	15
1.5 Position taxonomique de <i>P. carinii</i>	16
1.5.1 Hétérogénéité génétique	18
1.5.2 Impact sur l'infectivité	19
1.5.3 Nomenclature	19
1.6 Relation hôte-parasite	19
1.6.1 Physiopathologie de la pneumocystose	19
1.6.1.1 Mode de transmission	20
1.6.1.2 L'organe cible : le poumon	21
1.6.1.3 Rôle du surfactant dans les mécanismes de défense	23
1.6.1.4 Rôle du mécanisme immunitaire non spécifique contre <i>P. carinii</i>	24
1.6.2 Présentation clinique de la pneumocystose	25
1.6.3 Traitements	26
II- Les toxines "killer" de levures	28
2.1 Contexte général	28
2.1.1 Infections dues à des microorganismes opportunistes	28
2.1.2 Présentation du phénomène "killer"	29
2.2 Mode d'action des toxines "killer"	29
2.2.1 Différentes souches de levures "killer"	29
2.2.2 Mécanismes d'action des toxines "killer"	29
2.2.3 Fixation de la toxine "killer" à la cellule cible	30
2.2.4 Immunité des souches "killer"	31
2.3 Toxines "killer" de <i>Pichia anomala</i>	31
2.3.1 Généralités sur <i>P. anomala</i>	31
2.3.2 Caractéristiques physico-chimiques des toxines de <i>P. anomala</i>	32
2.3.3 Sécrétion des toxines "killer"	32
2.4 Potentialité thérapeutique des toxines "killer"	32
2.4.1 Potentiel antibiotique des toxines "killer"	32
2.4.2 Anticorps anti-idiotypes	33
2.5 Conclusion	36

2^{ème} Partie : MATERIELS ET METHODES

III- Matériels et méthodes	37
3.1 Obtention de <i>Pneumocystis carinii</i>	37
3.1.1 Sources de <i>P. carinii</i>	37
3.1.2 Extraction des parasites par agitation-filtration	37
3.1.3 Extraction des parasites au Stomacher	37
3.1.4 Quantification de <i>P. carinii</i>	38
3.1.5 Méthodes d'inoculation	39
3.1.5.1 Modèles infectés expérimentalement	39
3.1.5.2 Inoculation nasale de <i>P. carinii</i> chez la souris SCID	39
3.1.5.3 Inoculation trachéale de <i>P. carinii</i> chez le rat nude	40
3.2 Culture cellulaire	41
3.2.1 Lignées cellulaires	41
3.2.2 Maintien des lignées cellulaires	41
3.2.3 Culture de <i>P. carinii</i> de rat	41
3.2.4 Attachement et développement de <i>P. carinii</i> de rat <i>in vitro</i>	42
3.2.5 Tests de viabilité	42
3.2.5.1 Utilisation de fluorochromes	43
3.2.5.2 Test avec l'acide para-aminobenzoïque- ³ [H]	43
3.3 Obtention de la toxine "killer" de <i>Pichia anomala</i>	44
3.3.1 Souche produisant la toxine "killer"	44
3.3.2 Sensibilité des levures vis-à-vis de la toxine "killer"	44
3.3.3 Production en milieu non défini	44
3.3.4 Test d'activité de la toxine "killer" en milieu gélosé	45
3.3.5 Test d'activité de la toxine "killer" en milieu liquide	45
3.3.6 Prépurification de la toxine "killer" par chromatographie gel-filtration	46
3.3.7 Etudes biochimiques	47
3.3.8 Prétraitement de <i>P. carinii</i> avec la toxine "killer"	48
3.4 Production d'anticorps monoclonaux anti-idiotypes de rat	48
3.4.1 Immunisation des rats	49
3.4.2 Préparation du matériel cellulaire	49
3.4.2.1 Cellules de myélome	49
3.4.2.2 Cellules péritonéales	49
3.4.3 Fusion	49
3.4.3.1 Préparation de cellules spléniques	49
3.4.3.2 Préparation des cellules de myélome	50
3.4.3.3 Numération et viabilité cellulaire	50
3.4.3.4 Fusion	50
3.4.4 Criblage	51
3.4.5 Clonage	52
3.5 Nébulisation des rats nude avec l'anticorps monoclonal anti-idiotype	52
3.6 Etudes cytologiques	54
3.6.1 Coloration sur lame	54
3.6.2 Préparations histologiques	55
3.6.3 Immunolocalisation de la toxine "killer" sur <i>P. carinii</i>	55
3.7 Etudes ultrastructurales	56
3.7.1 Inclusion en résine hydrophobe	56
3.7.2 Inclusion en résine hydrophile	57
3.7.3 Immunolocalisation de la toxine "killer" sur <i>P. carinii</i>	57
3.8 Etude statistique	58

3^{ème} Partie : RESULTATS

IV- Production de la toxine "killer" en milieu défini	59
4.1 Evaluation de l'activité "killer" sur milieu gélosé	59
4.2 Evaluation de l'activité "killer" en milieu liquide	61
4.3 Activité de la toxine "killer" en milieu défini	63
V- Prépuration de la toxine "killer"	63
5.1. Mise au point de la prépuration en chromatographie gel-filtration	63
5.1.1 Choix du pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium	66
5.1.2 Choix du gel de chromatographie	68
5.2 Contrôle électrophorétique de la toxine "killer" prépurationnée	70
VI- Test d'attachement <i>in vitro</i> de <i>P. carinii</i> sur différentes lignées cellulaires	70
6.1 Etude cytologique	70
6.2 Quantification de l'effet de la toxine "killer"	72
VII- Effet de la toxine sur l'infectivité de <i>P. carinii</i> <i>in vivo</i>	74
7.1 Modèles animaux	74
7.2 Etude morphologique	74
7.3 Etude ultrastructurale	77
7.4 Quantification de l'activité de la toxine "killer"	77
VIII- Activité de la toxine "killer" sur <i>P. carinii</i>	80
8.1 Test de viabilité qualitatif	80
8.2 Test de viabilité quantitatif	83
8.3 Etude ultrastructurale	83
8.4 Immunolocalisation ultrastructurale	84
IX- Action des anticorps anti-idiotypes sur <i>P. carinii</i>	84
9.1 Production d'un anticorps monoclonal anti-idiotype	84
9.2 Activité <i>in vitro</i> d'anticorps anti-idiotypes	86
9.2.1 Etude morphologique	86
9.2.2 Effet de l'anticorps monoclonal anti-idiotype sur <i>P. carinii</i> en co-culture	86
9.2.3 Effet d'anticorps anti-idiotypes naturels humains sur <i>P. carinii</i>	86
9.3 Activité <i>in vivo</i> des anticorps anti-idiotypes	89
9.3.1 Effet des anticorps anti-idiotypes avant l'installation de la pneumocystose	89
9.3.2 Effet des anticorps anti-idiotypes sur la pneumocystose en évolution	89
9.4 Immunolocalisation de l'anticorps monoclonal anti-idiotype sur <i>C. albicans</i> et <i>P. carinii</i>	91

4^{ème} Partie : DISCUSSION ET CONCLUSION

X- Interactions moléculaires entre <i>P. carinii</i> et la toxine "killer" de <i>P. anomala</i>	94
10.1 Prépuration de la toxine "killer" de <i>P. anomala</i>	94
10.2 <i>In vitro</i>	96
10.3 <i>In vivo</i>	98
XI- Interactions entre <i>P. carinii</i> et les anticorps anti-idiotypes	99
11.1 Anticorps monoclonaux anti-idiotypes	99
11.2 Anticorps anti-idiotypes naturels humains	100
11.3 Traitement de la pneumocystose	101
XII- Perspectives	102

5^{ème} Partie : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	105
---	-----

6^{ème} Partie : ARTICLES PERSONNELS	121
---	-----

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
AMP : adénosine monophosphate
ARN : acide ribonucléique
ARNr : acide ribonucléique ribosomal
ATP : adénosine triphosphate
BP : benzoïle peroxyde
BTO : bleu d'orthotoluidine
CF : 5-(6)-carboxyfluorescéine
DHFR : dihydrofolate réductase
DMEM : 'Dulbecco's modified eagle's medium'
DPPC : dipalmitoyl-phosphatidylcholine
DTT : dithiothréitol
GMEM : 'glasgow's modified eagle's medium'
HAT : hypoxantine aminoptérine thymidine
HES : hémalum-éosine-safran
HGPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase
HT : hypoxantine aminoptérine thymidine
Ig : immunoglobuline
Il : interleukine
IP : iodure de propidium
LBA : lavage broncho-alvéolaire
LRW : 'london resin white'
Mab : anticorps monoclonal
MSG : glycoprotéine majeure de surface
NAO : organites associés au noyau
NO : peroxyde d'azote
pABA : acide para-aminobenzoïque
PBS : tampon (mono- et di-) phosphate
PG : phosphatidyl glycérol
PL : phospholipide
PPC : pneumocystose à *Pneumocystis carinii*
SCID : souris 'severe combined immunodeficiency'
SDS : sodium dodécyl sulfate
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SVF : sérum de veau foetal
TNF : 'tumor necrosis factor'
TNT : tris-HCl, NaCl, tween 20
Tris : tris (hydroxy-méthyl) amino-méthane
TS : thymidylate synthétase
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Microscopie

A : alvéole
B : bronchiole
CIK : corps intrakystique
K : kyste
Mi : mitochondrie
N : noyau
Nu : nucléole
P1 : pneumocyte de type I
T : trophozoïte

Figures et Tableaux

- Figure 1 :** Différents stades de *P. carinii* en microscopie électronique à transmission : p9.
- Figure 2 :** Cycle biologique de *P. carinii* proposé par Yoshida (1989) à partir d'observations ultrastructurales faites chez le rat : p10.
- Figure 3 :** Kystes de *P. carinii* de rat : p12.
- Figure 4 :** Différents stades de *Pneumocystis carinii* en microscopie photonique : p14.
- Figure 5 :** Les anticorps anti-idiotypes : verso p33.
- Figure 6 :** Co-culture de *P. carinii* de rat sur cellules épithéliales alvéolaires de rat (Aliouat *et al.*, 1995) : verso p38.
- Figure 7 :** Attachement *in vitro* de *P. carinii* de rat à une lignée cellulaire : verso p39.
- Figure 8 :** Evaluation *in vivo* de l'activité de la toxine "killer" de *P. anomala* sur l'infectivité de *P. carinii*.
- Figure 9 :** Modèle de nébulisation chez le rat nude : p51.
- Figure 10 :** Immunodétection ultrastructurale des récepteurs cellulaires de la toxine "killer" et des anticorps anti-idiotypiques à la surface de *P. carinii* : verso p55.
- Figure 11 :** Schéma d'immunolocalisation de la toxine "killer" sur *P. carinii* : verso p55.
- Figure 12 :** Activité de la toxine "killer" de *P. anomala* K36 sur la souche sensible K3 de *P. anomala* déposée sur un milieu gélosé YEPD : p58.
- Figure 13 :** Activité de la toxine "killer" de *P. anomala* en milieu liquide en fonction de la quantité de toxine déposée (μ l/puits) : p60.
- Figure 14 :** Croissance de la souche K3 de *P. anomala* en milieu défini et non défini : p60.
- Figure 15 :** Schéma de prépurification de la toxine "killer" après deux précipitations successives en sulfate d'ammonium $[(NH_4)_2SO_4]$: p62.
- Figure 16 :** Activité de la toxine "killer" en fonction de deux pourcentages en sulfate d'ammonium : p63.
- Figure 17 :** Activité de la toxine "killer" recueillie après chromatographie gel-filtration : p65.
- Figure 18 :** Activité de la toxine "killer" recueillie après chromatographie gel-filtration sur une colonne Aca44 en fonction de deux pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium : p67.
- Figure 19 :** Attachement et développement de *P. carinii* de rat cultivé sur les cellules L2 (cellules épithéliales alvéolaires de rat) et WI38VA13 (cellules épithéliales alvéolaires d'origine humaine) : p69.
- Figure 20 :** Effet inhibiteur de la toxine "killer" sur l'attachement de *P. carinii* de rat sur les cellules L2 et Vero : p71.
- Figure 21 :** Coupes histologiques de poumons de souris SCID inoculées par voie nasale avec *P. carinii* de souris : p73.
- Figure 22 :** Coupes histologiques de poumons de rats nude inoculés par voie trachéale avec *P. carinii* de rat : p74.
- Figure 23 :** Attachement et phagocytose de *P. carinii* de rat *in vivo* : p76.
- Figure 24 :** Effet inhibiteur de la toxine "killer" de *P. anomala* sur l'infectivité de souris SCID et de rat nude inoculés respectivement par *P. carinii* de souris et *P. carinii* de rat : p77.
- Figure 25 :** Viabilité de *P. carinii* de rat (mise en évidence par l'incorporation de l'iodure de propidium et de la carboxyfluoresceine) en présence ou non de la toxine "killer" de *P. anomala* : p79.
- Figure 26 :** Etude ultrastructurale de *P. carinii* de rat fraîchement extrait et incubé avec de la toxine "killer" de *P. anomala* : p79.
- Figure 27 :** Immunolocalisation ultrastructurale de la toxine "killer" sur *P. carinii* de rat : p83.
- Figure 28 :** Inhibition de l'attachement de *P. carinii* de rat par l'anticorps monoclonal anti-idiotype (MabK10) sur des cellules WI38VA13 (cellules épithéliales alvéolaires d'origine humaine) : p85.
- Figure 29 :** Effet inhibiteur de l'anticorps monoclonal anti-idiotype (MabK10), sur l'attachement de *P. carinii* de rat en co-culture avec les cellules WI38VA13 : p86.
- Figure 30 :** Effet inhibiteur d'anticorps humains anti-idiotypes provenant de deux patientes sur l'attachement de *P. carinii* de rat en co-culture avec les cellules WI38VA13 : p86.
- Figure 31 :** Effet inhibiteur des anticorps humains anti-idiotypes sur l'infectivité des parasites de rat inoculés chez le rat nude : p88.
- Figure 32 :** Effet de l'anticorps monoclonal anti-idiotype sur une pneumocystose en évolution : p88.
- Figure 33 :** Immunolocalisation de l'anticorps monoclonal anti-idiotype (MabK10) sur *C. albicans* : p90.
- Figure 34 :** Immunolocalisation de l'anticorps monoclonal anti-idiotype (MabK10) sur *P. carinii* de rat provenant de culture : p91.
- Tableau 1 :** Stades parasitaires de *P. carinii* en microscopie photonique et électronique (Dei-Cas *et al.*, 1990) : verso p7.
- Tableau 2 :** Position taxonomique de *P. carinii* : verso p17.
- Tableau 3 :** Nouvelle nomenclature de *P. carinii* (The *Pneumocystis* Workshop, Cleveland, 1994) : verso p17.
- Tableau 4 :** Principales propriétés du surfactant pulmonaire (Zupan *et al.*, 1993) : verso p21.
- Tableau 5 :** Composition chimique du surfactant pulmonaire en pourcentage de poids (Jobe *et al.*, 1987) : verso p21.
- Tableau 6 :** Evaluation de l'activité de la toxine "killer" diluée sur la souche sensible de *P. anomala* K3 : p58.
- Tableau 7 :** Effet inhibiteur de la toxine "killer" de *P. anomala* UCFC 25F sur l'infectivité de souris SCID inoculées par *P. carinii* de souris : p77.
- Tableau 8 :** Effet de la toxine "killer" de *P. anomala* sur l'incorporation de l'acide para-aminobenzoïque marqué chez *P. carinii* : p80.

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

E.M. ALIOUAT, J-C. CAILLIEZ, N. SEGUY, E. DEI-CAS, L. POLONELLI, M. GERLONI, S. CONTI, D. CAMUS. Inhibitory effects of a yeast killer toxin to the *in vitro* *Pneumocystis carinii* attachment. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Dis.*, 5 : 102-106, 1993.

N. SEGUY, H.F. HILDEBRAND, J.M. HAGUENOER. Toxic action of ethylene oxide on pulmonary cells (L132) cultured under aerobic conditions. *Toxicol. Letters*, 70 : 23-32, 1994.

N. SEGUY, E.M. ALIOUAT, E. DEI-CAS, L. POLONELLI, D. CAMUS, J.C. CAILLIEZ. Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* killer toxin. *J. Euk. Microbiol.*, 41: 109S, 1994.

J.C. CAILLIEZ, C. CANTELLI, N. SEGUY, S. CONTI, M. GERLONI, G. MORACE, L. POLONELLI. Killer toxin secretion through the cell wall of the yeast *Pichia anomala*. *Mycopathologia*, 126 : 173-177, 1994.

J.C. CAILLIEZ, N. SEGUY, E.M. ALIOUAT, L. POLONELLI, D. CAMUS, E. DEI-CAS. A yeast killer toxin against *Pneumocystis carinii*: a hypothetical way to control pneumocystosis. *Medical Hypotheses*, 43 : 167-171, 1994.

N. SEGUY, J.C. CAILLIEZ, L. POLONELLI, E. DEI-CAS, D. CAMUS. Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on *Pneumocystis carinii* infectivity in SCID mice. *Parasitol. Res.*, 82 : 114-116, 1996.

J.C. CAILLIEZ, N. SEGUY, C.M. DENIS, E.M. ALIOUAT, E. MAZARS, L. POLONELLI, D. CAMUS, E. DEI-CAS. *Pneumocystis carinii* : an atypical fungal microorganism. *J. Med. Vet. Mycol.*, 34 : 227-239, 1996

H.C. JACKSON, N. SEGUY, E. MCKILLING, P.J. MORLEY, E. DEI-CAS, L. POLONELLI, J.C. CAILLIEZ. Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on the uptake of [³H]para-aminobenzoic acid into rat-derived *Pneumocystis carinii*. *J. Euk. Microbiol.*, 1996 (accepté pour publication).

N. SEGUY, L. POLONELLI, CONTI S, E. DEI-CAS, D. CAMUS, J.C. CAILLIEZ. *In Vitro* decrease of rat-derived *Pneumocystis carinii* attachment induced by killer toxin-like antiidiotypic antibodies. *J. Euk. Microbiol.*, 1996 (accepté pour publication).

L. POLONELLI, N. SEGUY, S. CONTI, M. GERLONI, W. MAGLIANI, J.C. CAILLIEZ. Production and characterization of rat monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal antiidiotypic antibodies. *Clin. Diagnostic Lab. Immunol.*, (accepté pour publication).

*** ARTICLES SOUMIS**

N. SEGUY, J.C. CAILLIEZ, L. POLONELLI, P. DELCOURT, S. CONTI, D. CAMUS, E. DEI-CAS. Anti-*Pneumocystis carinii* effect of human yeast killer toxin-like, candidacidal antibodies. *Mol. Med.*, (soumis).

INTRODUCTION

Les améliorations apportées ces dernières années dans la longévité et le bien-être des patients sidéens sont reliées au moins en partie, aux progrès des préventions primaires et secondaires ainsi qu'aux mesures thérapeutiques prises contre des parasitoses et des infections fongiques opportunistes (Lappereau, 1992).

Comme les autres agents opportunistes, *Pneumocystis carinii* participe à la pathogénicité du SIDA. *P. carinii* est un microorganisme eucaryote très répandu qui parasite le poumon de l'homme et d'autres mammifères (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).

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, 1991 ; Sepkowitz *et al.*, 1995).

En dépit de 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). La connaissance de ces aspects aurait des retombées pratiques évidentes sur les plans 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. Les progrès récents les plus marquants dans la recherche sur *P. carinii*, ont concerné sa biodiversité. En effet, depuis quelques années, un nombre croissant de publications rapporte l'existence d'une forte diversité génétique chez *P. carinii* principalement en fonction de l'espèce hôte (Stringer *et al.*, 1996).

P. carinii est sensible aux drogues anti-protazoaires comme l'association sulfaméthoxazole-triméthoprim (SMX-TMP), la pentamidine et d'autres agents. Les antifongiques sont en général inefficaces contre *P. carinii*. Toutefois, les échinocandines et les papulocandines, deux antifongiques inhibiteurs de la synthèse des β -1-3-glucanes, seraient actifs contre le parasite *in vivo* (Schmatz *et al.*, 1990). De nouvelles stratégies pourraient être envisagées pour le traitement et la prévention de la PPC et d'autres infections opportunistes chez les patients immunodéprimés. En effet, les protocoles thérapeutiques disponibles ne sont pas nombreux, ils entraînent souvent des effets secondaires importants et les méthodes classiques d'immunoprophylaxie semblent difficilement applicables chez ces patients.

Des souches de levures "killer" sécrètent des toxines protéiques (Palfree *et al.*, 1979) ou glycoprotéiques (Sugisaki *et al.*, 1983) pouvant avoir une action létale (Middelbeck *et al.*, 1980) ou seulement inhibitrice (Sugisaki *et al.*, 1984) vis-à-vis d'autres souches de levures. Le caractère "killer" a été mis en évidence chez de nombreux genres tels *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, etc. Bien que les toxines "killer" de levures ne puissent être utilisées directement *in vivo* comme agents thérapeutiques (vu leur toxicité et leur immunogénicité), elles offrent néanmoins, de réelles perspectives d'utilisation en infectiologie.

L'attachement de *P. carinii* aux cellules épithéliales alvéolaires et donc son développement au sein du poumon seraient en grande partie responsables des altérations pulmonaires caractéristiques de la PPC. Cependant, aucune molécule connue n'est actuellement disponible pour inhiber cet attachement et par conséquent son développement. Il nous semble donc pertinent de caractériser des molécules qui s'avèrent capables d'interférer dans l'interaction entre *P. carinii* et les cellules épithéliales alvéolaires en inhibant l'attachement du parasite à ces cellules.

Sur le plan fondamental, les organismes qui présentent des analogies avec *P. carinii* (classé récemment parmi les champignons microscopiques) sont des levures. Notre objectif principal est de comprendre l'interaction entre une toxine "killer", produite par la souche K36 de *Pichia anomala* et *P. carinii* afin d'évaluer l'activité biologique de cette toxine sur le parasite.

Dans un premier temps, une mise au point importante de tests permettant l'évaluation de l'activité biologique de la toxine en milieu liquide ainsi que sa production en milieu défini a été réalisée. Par la suite, la toxine "killer" ainsi produite a été purifiée pour tenter de caractériser sa nature biochimique. La production d'une toxine "killer" en milieu défini nous a permis de tester son activité sur des parasites se développant *in vitro*, en co-culture avec des cellules épithéliales ou fibroblastiques.

Dans un deuxième temps, nous avons examiné l'activité de la toxine "killer" sur *P. carinii* *in vitro* et *in vivo*. De plus, des études sur la localisation immunocytochimique de la toxine sur *P. carinii* ont été entreprises.

In vitro, l'étude de l'influence de la toxine "killer" sur l'attachement du parasite a été réalisée sur des lignées continues de cellules pulmonaires d'origine animale ou humaine (L2, WI38VA13) et sur des fibroblastes de rein de singe (Vero).

In vivo, l'étude de l'influence de la toxine "killer" sur l'infectivité de *P. carinii* a été testée sur deux modèles animaux que sont la souris SCID et le rat nude. Pour cela, il nous fallait des

modèles animaux de pneumocystose adaptés à nos objectifs. 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. 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 des animaux de laboratoire non porteurs latents (modèles "par inoculation"). Ces modèles, la souris SCID et le rat nude, permettent d'obtenir, dans des délais plus courts, des infections intenses et reproductibles.

Dans un troisième temps, des anticorps anti-idiotypes mimant l'action de la toxine "killer" ont été produits contre un anticorps monoclonal anti-toxine "killer". On a alors testé l'attachement et l'infectivité des parasites préalablement incubés avec ces anticorps anti-idiotypes respectivement sur des cellules en culture et chez l'animal. Avec cet anticorps anti-idiotype utilisable directement chez l'animal, un véritable traitement d'une pneumocystose évolutive a pu être entrepris, par nébulisation de l'anticorps anti-idiotype chez des rats nude infectés.

Dans ce travail, nous allons d'abord présenter les notions actuelles sur *P. carinii* et la pneumocystose ainsi que sur le phénomène "killer". Puis, les résultats sont présentés. Enfin, ils sont discutés et confrontés aux données bibliographiques les plus récentes.

1-GENERALITES

I- *PNEUMOCYSTIS CARINII*

1.1 Historique

Pneumocystis carinii a été observé pour la 1^{ère} fois en 1909 par Carlos Chagas dans le poumon de cobaye et d'homme infectés par *Trypanosoma sp.* (Chagas, 1909). En 1910, Antonio Carini le retrouve chez des rats infectés par *Trypanosoma lewisi* (Carini, 1910). Ces deux auteurs pensaient alors qu'ils avaient découvert des formes kystiques correspondant à un nouveau stade dans le cycle biologique des trypanosomes.

Ce ne fut qu'en 1912 que Delanoë et Delanoë rapportèrent la présence du parasite chez le rat non infecté par *Trypanosoma sp.* Ils le décriront comme une nouvelle entité, affirmeront son tropisme pulmonaire et le nommèrent *Pneumocystis carinii* (Delanoë et Delanoë, 1912). En 1942, Van Der Meer *et al.*, retrouvent ce microorganisme dans le poumon humain.

Toutefois, ce n'est qu'en 1952, que *P. carinii* est décrit comme l'agent d'une pneumonie interstitielle décrite chez des enfants prématurés et malnutris en Europe dès les années 30 (Vanek, 1951 ; Vanek *et al.*, 1952). A cette même période, les premières images ultrastructurales de *P. carinii* apparaissent (Dieckmann *et al.*, 1954). Depuis, de nombreuses observations sur l'ultrastructure de *P. carinii* ont été rapportées, associant les cas cliniques avec les études morphologiques, cytochimiques, immunologiques et biochimiques. Au cours des années 60-70, *P. carinii* est reconnu comme une cause de pneumonie grave, voire mortelle en absence de traitement, chez les patients immunodéprimés par des traitements chimiothérapeutiques et au cours de déficits immunitaires congénitaux (Walzer *et al.*, 1974).

A partir des années 80, la pneumonie à *P. carinii* (PPC) devient la parasitose la plus importante au cours du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). En effet, en Europe et aux USA, 60 à 80% des adultes VIH + contractent une PPC (Hughes, 1987 ; Dei-Cas *et al.*, 1990). En dépit de la chimioprophylaxie, les épisodes infectieux se renouvellent dans 30% des cas et sont responsables du décès de 25% des patients atteints du SIDA (Kovacs, 1989).

Ces dernières années, une augmentation du nombre de personnes développant une PPC, en dehors du SIDA, mais dans un contexte d'immunodépression, a été enregistrée (Palluault *et al.*, 1994).

1.2 Description de *Pneumocystis carinii*

En dépit, des progrès réalisés dans la connaissance de cet agent opportuniste, de nombreuses incertitudes demeurent encore quant à son cycle biologique, son mode de reproduction, son pouvoir infectieux et son réservoir.

Tableau 1 : Stades parasitaires de *Pneumocystis carinii* en microscopie photonique et électronique (Dei-Cas *et al.*, 1990).

	Trophozoïte	Prékyste			Kyste
		Précoce	Intermédiaire	Tardif	
MP (1)					
BTO*	-	-	+	+	+
RAL 555**	+	+	+	+	+
ME (2)					
Forme	irrégulière	ovoïde	ovoïde	ovoïde	ovoïde
Noyau	1	1 (2µm)	2-4	4-8 (0.5µm)	1***
Complexe synaptonémal	non	oui	non	non	non
Fuseaux de division	non	non	oui	non	non
Mitochondries	allongées	groupées	groupées	?	1***
Paroi cellulaire	2 couches 20-30nm	2 couches 40-50nm	3 couches 100nm	3 couches 80-120nm	3 couches 80-120nm
Filopodes	nombreux	quelques	quelques	quelques	quelques

(1)MP: microscopie photonique, (2)ME: microscopie électronique

* bleu de toluidine O: coloration métachromatique des formes à paroi à 3 couches, ** coloration panoptique: paroi non colorée (halo clair), *** dans chaque corps intrakystique.

1.2.1 Morphologie du parasite

Diverses études ultrastructurales réalisées sur des poumons humains ou d'animaux infectés par *P. carinii*, ont permis de différencier trois formes principales du parasite : le trophozoïte, le prékyste et le kyste (Tableau 1).

Le **trophozoïte**, encore appelé forme végétative, est uninucléé. Il mesure de 2 à 8 μ m de diamètre et est délimité par une membrane cellulaire aux contours améboïdes, sur laquelle repose une couche dense aux électrons (Figure 1).

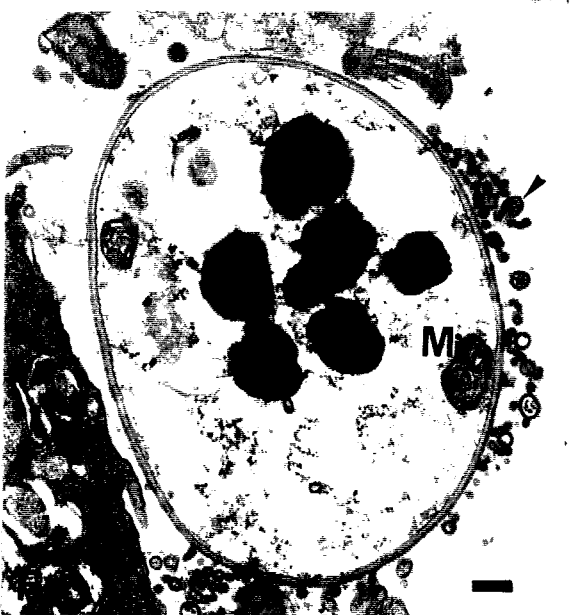
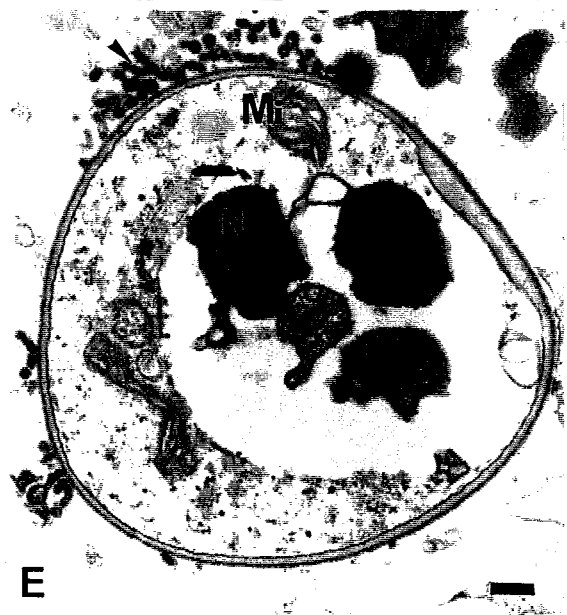
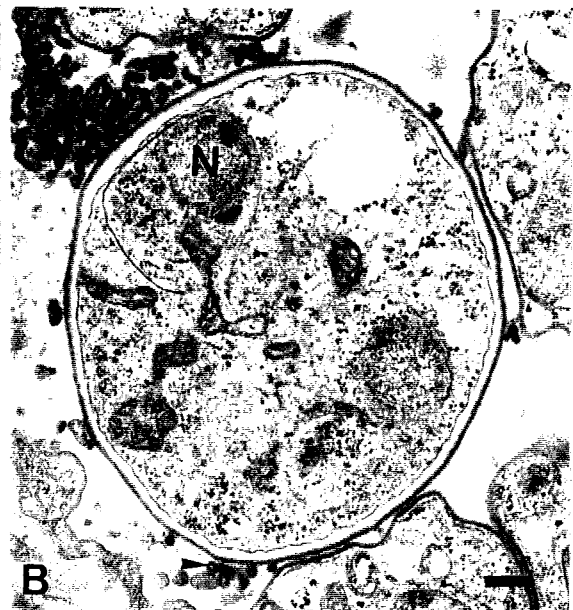
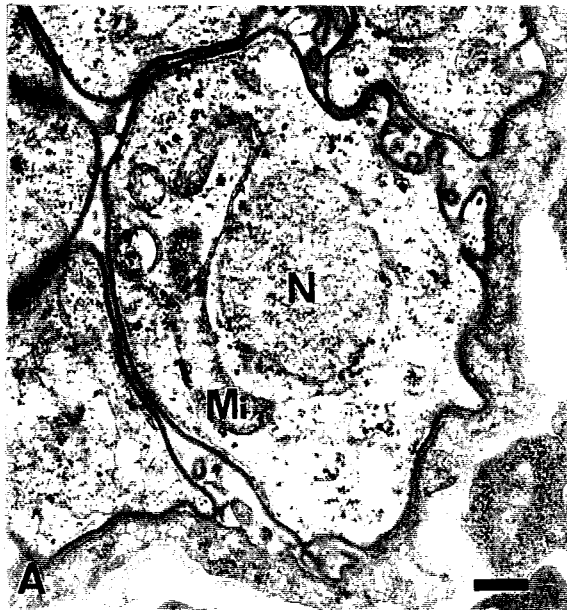
Le **prékyste** mesurant de 3 à 5 μ m est ovoïde et peut être observé sous trois formes différentes : le *prékyste précoce*, uninucléé, possède une paroi similaire à celle des trophozoïtes. A ce stade, Matsumoto *et al.* (1984) ont mis en évidence des complexes synaptonémaux (structures des régions d'appariement des chromosomes homologues permettant leur alignement durant la prophase de première division méiotique, zygotène et pachytène). Le *prékyste intermédiaire* peut contenir de 2 à 4 noyaux. Une couche intermédiaire peu dense aux électrons est, à ce stade, intercalée entre la membrane cellulaire et la couche dense externe (Figure 1). Chez le *prékyste tardif*, une paroi plus épaisse délimite un cytoplasme dans lequel vont s'individualiser les 8 corps intrakystiques uninucléés (CIK), par invagination de la membrane plasmique.

Le **kyste** mesure de 4 à 6 μ m. Il possède une paroi semblable à celle des prékystes intermédiaires et tardifs. Il contient 8 CIK bien individualisés, uninucléés. Sur la paroi des CIK, une deuxième membrane à double couches lipidiques, d'aspect similaire à la membrane plasmique, entourant la couche dense aux électrons a été décrite par Vávra *et al.* (1970). Cette membrane "externe" a été retrouvée dans la couche externe dense aux électrons de la paroi kystique, affleurant la couche intermédiaire peu dense (DeStefano *et al.*, 1990). Après fixation des parasites dans des conditions optimales (pression osmotique élevée) cette deuxième membrane est aisément observée sous forme d'un fin dépôt osmiophile chez les trophozoïtes, les prékystes et dans la paroi kystique (Palluault *et al.*, 1992a et b). 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 (DeStefano *et al.*, 1990).

1.2.2 Cycle biologique

A partir d'études ultrastructurales menées sur différents hôtes, plusieurs cycles biologiques de *P. carinii* ont été proposés (Campbell, 1972 ; Vossen *et al.*, 1978 ; Yoshida, 1989).

Figure 1 : Différents stades de *Pneumocystis carinii* en microscopie électronique à transmission. **A** : trophozoïte attaché à un pneumocyte de type I ; **B** : prékyste intermédiaire. La paroi cellulaire caractéristique et l'individualisation de corps intrakystiques sont visibles ; **C** et **D** : kystes matures avec deux et trois corps intrakystiques ; **E** et **F** : kystes matures montrant quatre et six corps intrakystiques. CIK : corps intrakystiques, Mi : mitochondrie, N : noyau. La pointe de flèche indique des filopodes. Trait = 0,3 μ m.



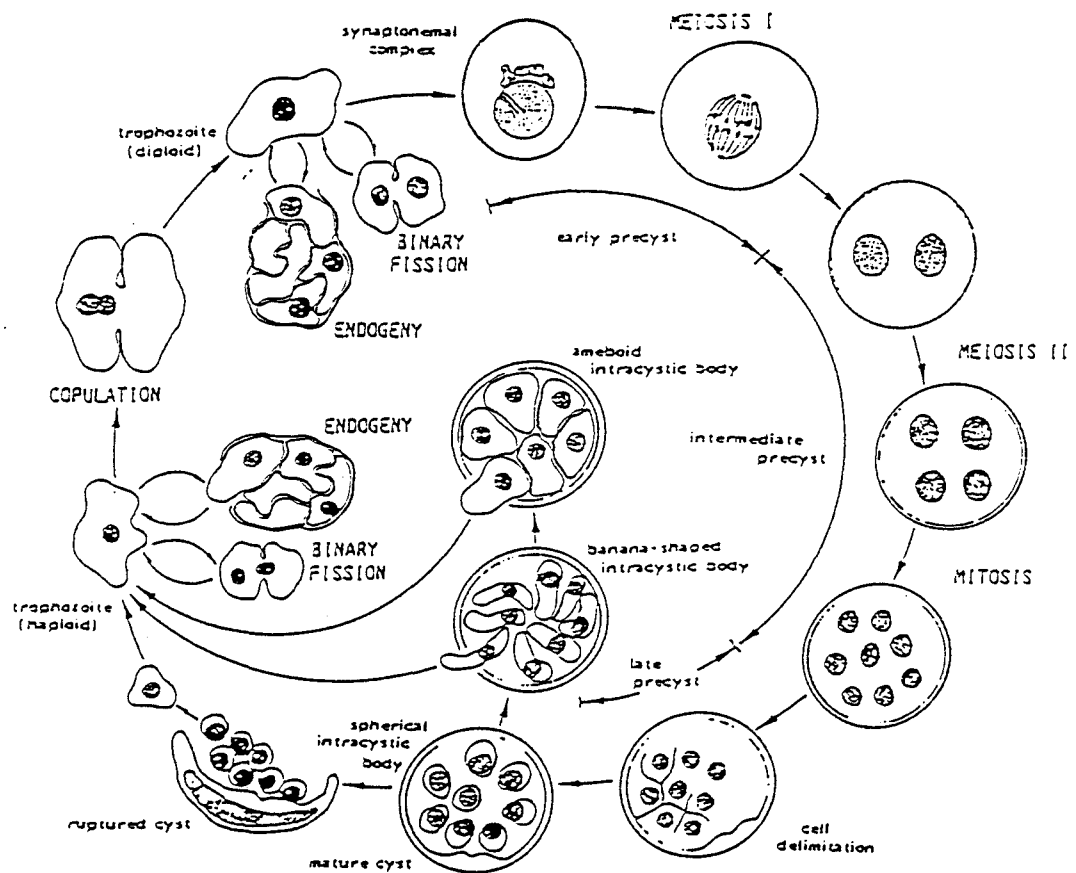


Figure 2 : Cycle biologique de *Pneumocystis carinii* à partir d'observations ultrastructurales faites chez le rat par Yoshida (1989)

Chez le rat immunodéprimé par absorption de corticoïdes, Yoshida proposa en 1989, le cycle suivant : les kystes matures libéreraient les 8 CIK qui se développeraient en trophozoïtes haploïdes. Après fusion de ces derniers, la forme diploïde évoluerait vers le prékyste précoce. Chez ce prékyste qui subit une première division méiotique, Matsumoto *et al.* (1984) ont observé des complexes synaptonémaux. La formation des 8 CIK se ferait par invagination de la membrane plasmique prékystique autour de chacun des noyaux. A ce cycle sexué s'ajouterait un cycle asexué impliquant les trophozoïtes haploïdes, diploïdes qui se multiplieraient par division binaire et/ou par endodiogénie (Figure 2).

L'expulsion des CIK en dehors des kystes matures demeure une énigme. Seule la microscopie électronique peut montrer cette libération. Pour Vavra *et al.* (1970) et Hasleton *et al.* (1981), cet exkystation aurait lieu par rupture de la paroi kystique, libérant ainsi les 8 CIK. Des travaux récents de Itatani (1994) révèlent la présence d'un pore au niveau de la paroi kystique, qui permettrait l'expulsion des CIK.

Les formes de *P. carinii* décrites chez l'homme par Campbell en 1972, se rapprochent de celles retrouvées chez le rat. Ce cycle s'appuie aussi sur des observations ultrastructurales.

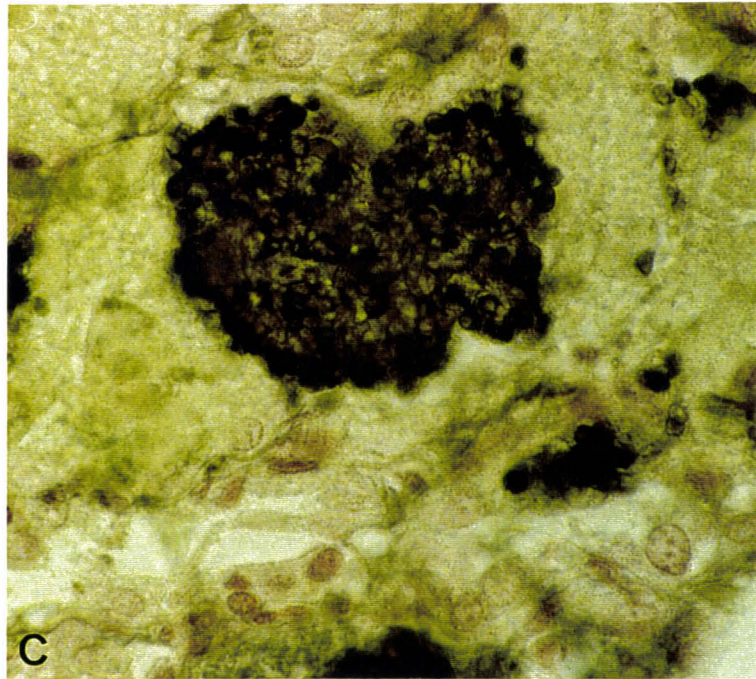
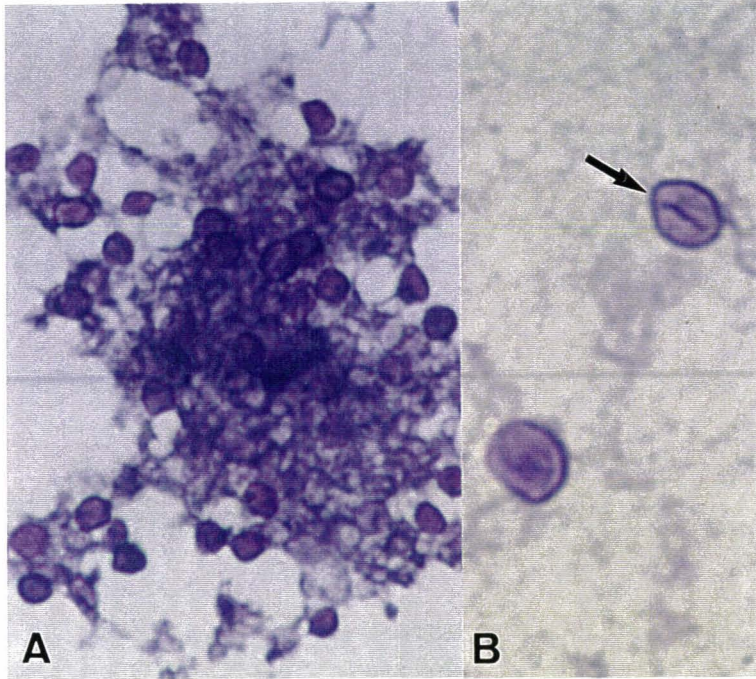
1.2.3 Mise en évidence de *P. carinii*

La mise en évidence du parasite repose sur deux types de colorations microscopiques. Le premier type révèle uniquement la paroi kystique comme les techniques d'imprégnation à l'argent, le bleu d'orthotoluidine, le violet de crésyl. Le second type est représenté par des colorations panoptiques qui permettent de visualiser le matériel intrakystique et les trophozoïtes, comme le May-Grünwald-Giemsa ou le Giemsa.

Les différents stades parasitaires comportant une paroi cellulaire (prékystes intermédiaires, prékystes tardifs, kystes) sont visualisés par les techniques argentiques, le bleu d'orthotoluidine et le violet de crésyl. Ces colorations mettent en évidence les glucides complexes au niveau de la paroi cellulaire (Radding *et al.*, 1989 ; Vierduchen *et al.*, 1990) et révèlent souvent des épaissements typiques de la paroi visualisés sous forme de "virgule" ou de "parenthèse" (Figure 3).

Plusieurs techniques d'imprégnation à l'argent existent, elles dérivent toutes de la technique initiale : le Gomori-Grocott (Grocott, 1955 ; Shimono *et al.*, 1986 ; Watts *et al.*, 1989). Avec ces colorations, les parois kystiques apparaissent en brun-noir (Figure 3C). L'absence de couche intermédiaire chez les trophozoïtes expliquerait qu'ils ne soient pas colorés par les techniques de Gomori-Grocott. Le nitrate d'argent aurait une affinité pour cette couche

Figure 3 : Kystes de *Pneumocystis carinii* de rat. **A :** les kystes colorés métachromatiquement par le bleu d'orthotoluidine apparaissent violet pourpre (Gx600) ; **B :** kyste avec un plissement de la paroi, formant une virgule (indiquée par la flèche, Gx1200) ; **C :** coupe histologique de poumon de rat soumis à des corticoïdes. Les kystes sont colorés par la technique de Gomori–Grocott, ils remplissent l'alvéole pulmonaire et apparaissent brun–noir (Gx760).



(Yoshikawa *et al.*, 1987).

Le **bleu d'orthotoluidine** (BTO), technique rapide mise au point par Chalvardjian *et al.* (1963), estérifie les groupements hydroxyles des polysaccharides présents dans la paroi kystique. Ainsi, le BTO chargé positivement, peut interagir avec les groupements anioniques produits et colore les formes kystiques en violet pourpre (Figure 3). L'aspect des kystes est semblable à celui obtenu avec la technique de Gomori–Grocott.

Comme pour le BTO, la coloration au **violet de crésyl** débute par une réaction de sulfatation (Le Tan, 1975). Il s'en suit une coloration au violet de crésyl, puis une contre-coloration au naphthol S. Les kystes sont colorés en rouge vif. Dans toutes ces techniques, la présence de levures peut rendre difficile la lecture, constituant un piège diagnostique.

La technique au **méthanol–Giemsa**, coloration panoptique, permet l'identification des différents types cellulaires et de tous les stades parasitaires (Bommer, 1966). Cette coloration est couramment employée en recherche et pour le diagnostic biologique de la pneumocystose. La paroi du kyste apparaît comme un halo clair. Les noyaux des trophozoïtes et des corps intrakystiques sont colorés en pourpre. Les trophozoïtes ont un cytoplasme bleuté. Les réactifs **RAL–555** permettent de réaliser des colorations panoptiques rapides (moins de 2 minutes) et visualisent tous les stades parasitaires (Figure 4) avec le même aspect qu'au Giemsa (Soulez *et al.*, 1988 ; Tollerad *et al.*, 1989).

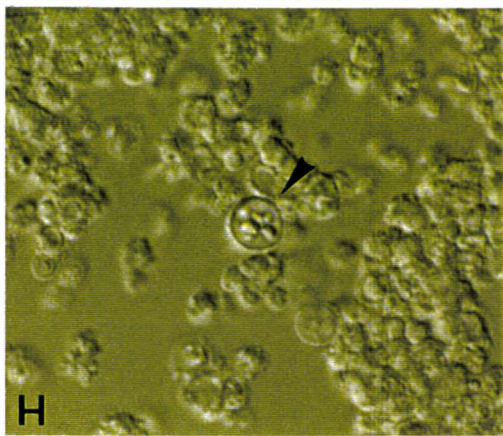
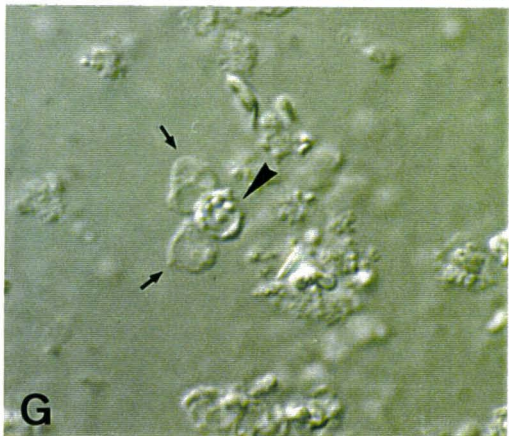
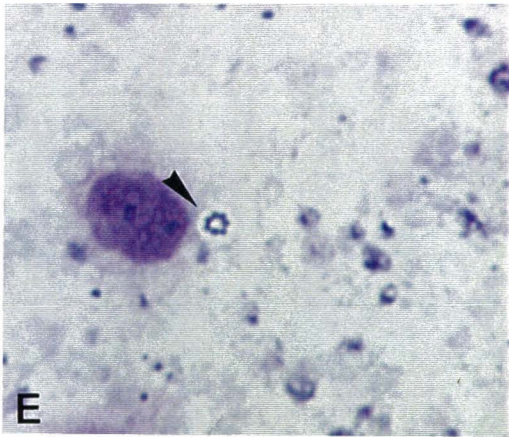
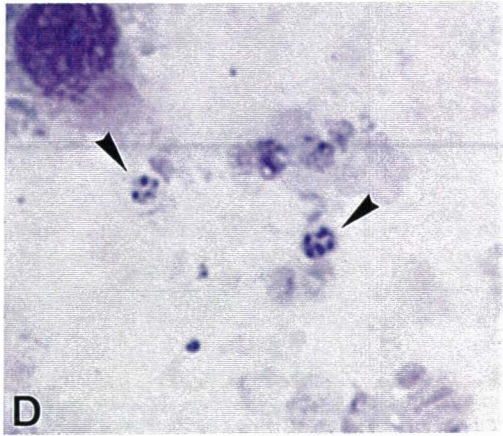
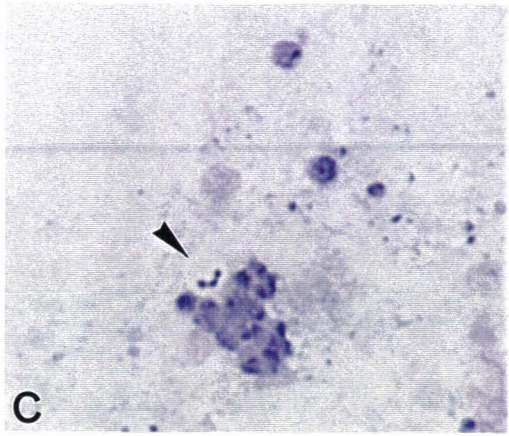
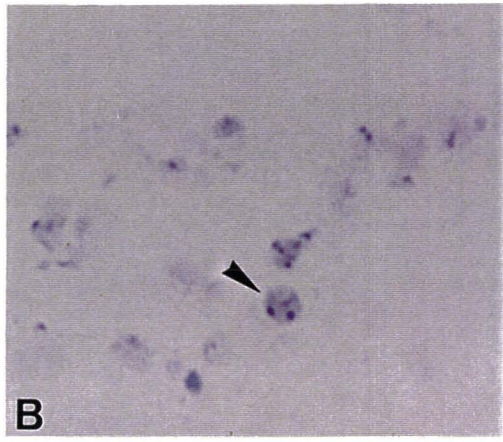
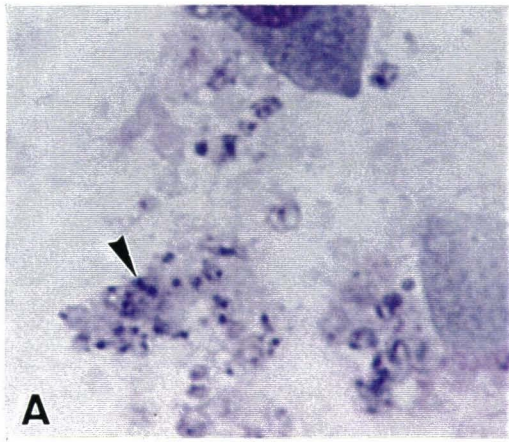
1.3 Culture de *Pneumocystis carinii*

Jusqu'à présent, les systèmes de culture *in vitro* ne permettent qu'un développement très limité de *P. carinii* ; cette restriction technique limite de façon évidente l'étude approfondie du parasite sur le plan fondamental et au niveau du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les 1^{ères} tentatives de culture datent de 1977 (Pifer *et al.* 1977 ; Cushion *et al.*, 1984). Les auteurs rapportent la croissance du parasite en co-culture avec des lignées primaires ou continues de cellules nourricières.

La culture de *P. carinii* fût tentée sur de très nombreuses lignées cellulaires. 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 (fibroblastes de poumon humain), WI38VA13–2RA (cellules épithéliales embryonnaires du poumon humain), Mv 1 Lu (fibroblastes de vison) (Sloand *et al.*, 1993). Plus récemment, Aliouat *et al.* (1995) ont pu maintenir durant 7 jours des parasites de rat infectants sur un tapis de

Figure 4 : Différents stades de *Pneumocystis carinii* en microscopie photonique. **A** : amas de trophozoïtes ; **B–E** : prékystes intermédiaires et tardifs à 2, 3, 4, 5 et 7 noyaux ; **F** : kyste mature avec 8 CIK en banane ; **G et H** : formes végétatives (petites flèches) et kystiques (pointes de flèches) en microscopie interférentielle. Des CIK en banane sont également visibles en H. Coloration de A–F : RAL–555 ; Grossissement : x600, sauf en F: x1200.



cellules L2. Ces parasites inoculés par voie intra-trachéale à des rats nude sous corticoïdes se sont avérés plus infectieux que ceux inoculés directement après extraction de l'animal ; probablement parce que ces parasites sont dépourvus de débris cellulaire qui gênent l'attachement de *P. carinii* aux cellules pulmonaires et donc son développement.

La culture axénique a aussi été tentée (Tegoshi *et al.*, 1989 ; Cushion *et al.*, 1990). Elle permet un développement parasitaire tout aussi important que celui obtenu dans les systèmes de co-culture.

Dans tous ces systèmes *in vitro*, les parasites sont préalablement extraits du tissu pulmonaire selon différentes techniques utilisant le potter, le stomacher (Lab-blender 80) ou l'agitation-filtration. Or ces techniques d'extraction entraînent des altérations importantes de *P. carinii* (Soulez *et al.*, 1991a). Pour les expérimentations proposées, le parasite ne serait métaboliquement actif que les premiers jours ; les parasites sont alors capables d'incorporer de l'acide para-aminobenzoïque-³[H] (Kovacs *et al.*, 1989b). La viabilité durant les premiers jours se traduit par une augmentation du nombre de parasites, probablement due à la multiplication des trophozoïtes et /ou à la libération des CIK contenus dans les kystes matures. Ces systèmes se maintiennent rarement plus de 8 jours.

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.

1.4 Modèles animaux

P. carinii 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) et les porcelets (Bille-Hansen *et al.*, 1990 ; Settnes *et al.*, 1991) sont utilisés comme hôtes expérimentaux (Walzer, 1991).

Le modèle le plus couramment utilisé est le rat (Armstrong *et al.*, 1994). 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, 1982), l'administration de corticoïdes reste le traitement le plus efficace pour induire une pneumocystose (Hughes, 1989b). La voie d'administration peut être sous-cutanée (Hughes, 1987) ou orale. Pour cette dernière, le corticoïde est placé dans l'eau de boisson (Soulez *et al.*, 1988 ; Armstrong *et al.*, 1991).

La souris constitue un autre modèle intéressant pour étudier *P. carinii* (Walzer *et al.*, 1977). Comme pour le rat, des colonies de souris hébergeant *P. carinii* à l'état latent, soumises à une corticothérapie, développent une pneumocystose (Walzer *et al.*, 1983). Cependant,

l'infection engendrée est moins intense que celle obtenue chez le rat (Walzer *et al.*, 1982). Des souches murines atteintes d'un déficit immunitaire congénital comme les souris "Severe Combined Immunodeficiency" ou SCID (Roths *et al.*, 1990 ; Soulez *et al.*, 1991b), et des souris et des rats athymiques ou nude (Walzer *et al.*, 1977 et 1982 ; Furuta *et al.*, 1987) sont aussi utilisés comme hôtes expérimentaux. Par ailleurs, des souris SCID et des rats nude non porteurs latents de *P. carinii*, infectés respectivement par instillation nasale ou injection intra-trachéale, constituent des modèles très reproductibles (Aliouat *et al.*, 1993 et 1995).

Le modèle lapereau, modèle 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). A partir d'une étude réalisée sur des animaux provenant de plusieurs régions, il est apparu que l'ensemble des lapereaux sevrés développe une pneumonie d'importance variable mais généralement bénigne. Dans les semaines suivant le sevrage, les lapins guérissent spontanément et produisent parallèlement des anticorps spécifiques (Dei-Cas *et al.*, 1990).

1.5 Position taxonomique de *P. carinii*

Depuis très longtemps, de nombreux auteurs ont tenté de définir la position taxonomique de cet organisme eucaryote unicellulaire (Csillag, 1955; Vávra *et al.*, 1970 ; Frenkel, 1976 ; Edman *et al.*, 1988 ; Gradus *et al.*, 1988 ; Hughes, 1989a ; Walzer, 1989 ; Frenkel *et al.*, 1990 ; Jackson *et al.*, 1991 ; Pixley *et al.*, 1991 ; Stringer *et al.*, 1992 ; Dei-Cas *et al.*, 1992 ; Wakefield *et al.*, 1992). Cependant, *P. carinii* reste une énigme.

L'aspect améboïde du trophozoïte et la présence de prolongements tubulaires ou filopodes rapprochent ce microorganisme 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 (MSG) capable de varier, ce qui faciliterait son échappement vis-à-vis de la réponse immune. Or ce phénomène n'a pas encore été signalé chez un champignon pathogène. La sensibilité de *P. carinii* vis-à-vis de drogues anti-protozoaires telles que la pentamidine ou encore l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime 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 (Kovacs *et al.*, 1989b) à partir de l'acide para-aminobenzoïque (pABA) 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 apportés dont certains considérés aujourd'hui comme quasiment irréfutables. Ils permettent de positionner *P. carinii* parmi les Fungi (Edman *et al.*, 1994). Des critères morphologiques ont été avancés par Vávra et Kucera (1970). Ils proposent de classer *P. carinii* parmi les champignons sur ses caractéristiques observées en microscopie électronique, de même que Haque *et al.* (1987) et Hughes (1989a). Hughes observe des éléments considérés comme caractéristiques des cellules fongiques : "pauvreté en organites, noyaux indistincts, des espaces vacuolaires, des mitochondries très pauvrement développées, une organisation du réticulum endoplasmique très pauvre". Toutefois, cette description ne correspond plus avec l'ultrastructure décrite de *P. carinii* depuis que de nouvelles méthodes de fixation-inclusion ont été établies (Palluault *et al.*, 1992a et b). Itatani (1996) a montré chez les trophozoïtes binucléés, la présence d'organites associés au noyau (NAO). Cette configuration unique du noyau et la présence des NAO font que ces caractères se rapprochent de ceux observés lors de la conjugaison de *Saccharomyces cerevisiae*. De plus les affinités tinctoriales et la structure de la paroi des formes kystiques évoquent celles de la paroi fongique (Matsumoto *et al.*, 1989 ; Hughes, 1989a). Bien que résistant à l'amphotéricine B, ce parasite est sensible à d'autres molécules antifongiques comme les echinocandines et papulocandines (Schmatz *et al.*, 1990). Au niveau de la paroi kystique du parasite il existerait des β 1-3 glucanes, composés majeurs de la paroi des Fungi. Enfin, des anticorps monoclonaux dirigés contre *P. carinii* croisent avec des champignons (Lundgren *et al.*, 1992).

Les critères qui permettent d'étayer les arguments en faveur de la nature fongique de *Pneumocystis* dérivent de travaux de biologie moléculaire. Une séquence génomique identique à celle du gène du facteur d'élongation 3 (EF-3), indispensable à l'élongation protéique chez de nombreux genres fongiques, a été détectée chez *P. carinii* de rat (Ypma-Wong *et al.*, 1992). Cependant, ce même facteur n'avait pas été détecté par des méthodes immunologiques 2 ans auparavant (Jackson *et al.*, 1991). La séquence de ce gène présente un haut degré de similarité avec le gène homologue de *S. cerevisiae* (Edman *et al.*, 1994). Les enzymes thymidylate synthétase (TS) et dihydrofolate réductase (DHFR), sont codées chez les protozoaires par un même gène (Garret *et al.*, 1984) et constituent une même protéine bifonctionnelle (Ivanetich *et al.*, 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.*, 1989a et b). De plus, la TS de *P. carinii* présente une séquence d'acides

Tableau 2 : Position taxonomique de *Pneumocystis carinii*

Auteurs	Gènes	Organismes proches
Edman <i>et al.</i> , 1988	ARN 16S	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <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> <i>Candida albicans</i>
Watanabe <i>et al.</i> , 1989	ARN 5S	"Protista/Fungi"
Dyer <i>et al.</i> , 1992	β -tubuline	Ascomycètes
Liu <i>et al.</i> , 1992	ARN 26S, 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>

aminés similaire à 65% avec celle de *S. cerevisiae* (Edman *et al.*, 1989a) et sa DHFR est proche de celle des Fungi (Edman *et al.*, 1994). De même, *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 ; Liu *et al.*, 1992). Le gène codant pour la petite sous-unité de l'ARNr mitochondrial (mt ARNr) ainsi que 6 autres séquences adjacentes dans l'ADN mitochondrial présentent une similarité de 60% avec des Fungi, seulement de 20% avec des protozoaires (Pixley *et al.*, 1991). De plus, après amplification et séquençage d'une partie du gène de la grande sous-unité de mt ARNr, il apparaît que *P. carinii* présente une similitude significative avec l'ADN des Ustomycètes (Wakefield *et al.*, 1992). La position taxonomique de *P. carinii* reste cependant à être éclaircie (Tableau 2).

1.5.1 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 al.*, 1987 ; Lundgren *et al.*, 1991 ; Gigliotti, 1992 ; Bauer *et al.*, 1993 ; Andrews *et al.*, 1994), isoenzymatique (Mazars *et al.*, 1994), caryotypique (Fishman *et al.*, 1989 ; Hong *et al.*, 1990 ; Weinberg *et al.*, 1994) et nucléique (Sinclair *et al.*, 1991 ; Wakefield *et al.*, 1992 ; Lee *et al.*, 1993 ; Lu *et al.*, 1994).

La réactivité de certains 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 en 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 (Lundgren *et al.*, 1991 ; Gigliotti, 1992).

Un second niveau de variation antigénique est rapporté par Andrews *et al.* et Vasquez *et al.* en 1994. Les tests de prolifération des 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, suggérant ainsi, une expression variable de la MSG dans les différents isolats d'une même espèce d'hôte (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 al.*, 1994 ; Sunkin *et al.*, 1994 ; Wada *et al.*, 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

Tableau 3 : Nouvelle nomenclature de *Pneumocystis carinii* (The *Pneumocystis* Workshop, Cleveland, 1994).

Organismes	Noms
Rat	<i>P. carinii</i> sp. f. <i>carinii</i> (prototype)
Rat	<i>P. carinii</i> sp. f. <i>rattus</i> (variant)
Homme	<i>P. carinii</i> sp. f. <i>hominis</i>
Furet	<i>P. carinii</i> sp. f. <i>mustelae</i>
Souris	<i>P. carinii</i> sp. f. <i>muris</i>
Cheval	<i>P. carinii</i> sp. f. <i>equi</i>
Porc	<i>P. carinii</i> sp. f. <i>suis</i>
Lapin	<i>P. carinii</i> sp. f. <i>oryctolagi</i>

constituer un mécanisme d'échappement vis-à-vis des défenses de l'hôte (Kovacs *et al.*, 1993 ; Wada *et al.*, 1993).

1.5.2 Impact sur l'infectivité

Des auteurs ont constaté que l'infectivité d'un isolat parasitaire de *Pneumocystis* dépend de l'espèce-hôte. Ainsi des souris SCID inoculées avec des isolats de *P. carinii* provenant de furet ne développent pas de pneumocystose (Gigliotti *et al.*, 1993). De même, des souris SCID instillées avec *P. carinii* provenant de rat ou de lapin ne développent pas de pneumocystose alors que les souris SCID instillées avec *P. carinii* de souris contractent une PPC importante (Aliouat *et al.*, 1994). Enfin aucune pneumocystose ne s'installe après inoculation de *P. carinii* de singe chez des souris SCID ou des rats nude (Furuta *et al.*, 1993). Bien que d'autres auteurs, en travaillant sur des hôtes receveurs différents, aient décrit des résultats quasiment contraires (Walzer, 1984 ; Furuta *et al.*, 1987 ; Sethi, 1992), d'une façon globale, il semblerait que *P. carinii* présente une spécificité parasitaire étroite (sténoxénisme) ou stricte (oïoxénisme). Néanmoins, cette hypothèse ne pourra être confirmée que par la réalisation d'infections croisées expérimentales supplémentaires.

1.5.3 Nomenclature

Ce haut degré d'hétérogénéité génomique entre *P. carinii* d'hôtes différents, a conduit à définir une nouvelle nomenclature pour *P. carinii*. Elle est représentée dans le tableau 3 (The *Pneumocystis* Workshop, 1994).

1.6 Relations hôte - parasite

1.6.1 Physiopathologie de la pneumocystose

Pneumocystis carinii fréquemment retrouvé dans les poumons de l'homme et d'autres animaux peut être responsable de pneumopathies dont la sévérité est presque totalement liée au degré de susceptibilité de l'individu qui l'héberge.

Ainsi, la pneumonie à *P. carinii* (PPC) est limitée aux individus ayant une déficience immunitaire importante (Akono *et al.*, 1994). Ces 10 dernières années, en raison notamment de la survenue du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et des progrès liés aux transplantations d'organes et donc imposant l'utilisation d'immunosuppresseurs, la fréquence de la PPC a considérablement augmentée.

P. carinii est devenu l'agent pathogène pulmonaire le plus important chez les patients

atteints du SIDA (Beck *et al.*, 1989). Par ailleurs, la pneumopathie à *P. carinii* a été la première manifestation reconnue du SIDA puisque sa fréquence accrue chez des sujets "apparemment sains" a permis, en 1981 aux USA, d'individualiser le syndrome d'immunodéficience acquise. Par sa fréquence, sa gravité et son tropisme essentiellement pulmonaire, elle occupe une place majeure dans la longue liste des infections opportunistes.

1.6.1.1 Mode de transmission

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

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 possibilité que la voie transplacentaire soit une voie supplémentaire d'infection (Dei-Cas *et al.*, 1990). L'existence de pneumocystoses chez des prématurés est un deuxième argument en faveur de cette dernière hypothèse (Gajdusek, 1957). Enfin un cas de pneumocystose materno-foetale a été rapporté tout récemment (Mortier *et al.*, 1995), mais l'identification du parasite a été mise en question par Hughes (1995).

La forme infectante de *P. carinii* demeure encore inconnue. Certains auteurs ont suggéré l'existence d'une forme parasitaire environnementale (Dei-Cas *et al.*, 1992 ; Wakefield *et al.*, 1992). Récemment des observations ont été décrites étayant cette dernière hypothèse; des traces d'ADN de *P. carinii* ont été détecté par PCR dans l'air ambiant d'un laboratoire où étaient 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, 1994). 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, la mise en évidence d'ADN identique à celui du parasite, 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 le réservoir 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 PPC apparente, ni 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 cliniquement déclarée par *P. carinii* produit des immunoglobulines G (IgG) dirigées contre le parasite (Meuwissen *et al.*, 1977 ; Kovacs *et al.*, 1988).

Actuellement, 2 hypothèses ont été formulées pour expliquer l'apparition d'une pneumocystose chez un sujet débilité. La première hypothèse, la seule émise jusqu'à récemment, 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 propose l'existence d'une forme environnementale 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 ambiant (Bartlett *et al.*, 1994 ; Wakefield, 1994), (ii) bien que profondément immunodéprimés certains animaux ne contractent pas spontanément de 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.*, 1990b ; Leigh *et al.*, 1993), dans des LBA de patients immunodéprimés sans pneumocystose (Oka *et al.*, 1993 ; Tamburrini *et al.*, 1993), ni dans des biopsies pulmonaires *post-mortem* (Peters *et al.*, 1992).

1.6.1.2 L'organe cible : le poumon

La pathologie à *P. carinii* a essentiellement lieu dans le poumon. Le poumon comporte un système de conduction aérique (bronche, bronchiole) et un système d'échange (alvéolaire). La surface alvéolaire est tapissée de cellules épithéliales : les pneumocytes de types I et II, recouverts de surfactant. La cloison alvéolaire est l'élément fonctionnel du poumon, elle lui permet de jouer un rôle important qui est l'hématose.

Les pneumocytes de types I et II. Les pneumocytes de type I recouvrent 95% de la surface alvéolaire. Ce sont des cellules pauvres en organites, se présentant comme un voile cytoplasmique mince et étendu. Les voiles cytoplasmiques des cellules voisines se chevauchent sur une surface plus ou moins importante et glissent vraisemblablement les unes par rapport aux

Tableau 4 : Principales propriétés du surfactant pulmonaire (Zupan *et al.*, 1993)

Propriétés mécaniques

- Diminution de la tension de surface alvéolaire
- Augmentation de la compliance pulmonaire
- Stabilisation des alvéoles et des bronchioles terminales
- Maintien d'une capacité résiduelle fonctionnelle
- Diminution du travail respiratoire et effet sur l'équilibre des fluides intra-alvéolaires (effet "anti-oedème")

Modulations des fonctions macrophagiques

Autres propriétés

- Cyto-protection et antioxydant
- Lutte contre l'évaporation et la dessiccation
- Effet favorable sur la clairance mucociliaire

Tableau 5 : Composition chimique du surfactant pulmonaire en pourcentage de poids (Jobe *et al.*, 1987)

Phospholipides	85%
Phosphatidylcholines saturées dont DPPC	52%
Phosphatidylcholines insaturées	18%
Phosphatidylglycérol	8%
Phosphatidyléthanolamine	4%
Phosphatidylinositol	2%
Sphingomyéline	1%
Lipides neutres et Cholestérol	5%
Protéines	10%
Protéines non spécifiques	7%
Glycoprotéines spécifiques :	
protéine SP-A	1%
protéine SP-D	1%
Protéines hydrophobes :	
protéine SP-B	0.5%
protéine SP-C	0.5%

autres lors des mouvements respiratoires. Ces cellules sont unies entre elles par des jonctions étanches serrées ("tight-junctions").

Le cytoplasme des pneumocytes de type I, la lame basale et l'endothélium capillaire forment la membrane alvéolo-capillaire à travers laquelle se déroulent les échanges gazeux. *P. carinii* transmet par voie aérienne, rencontre donc ces premières cellules. Les trophozoïtes munis de nombreux filopodes s'attachent très étroitement à la surface des pneumocytes de type I (Yoshida, 1989 ; Nielsen *et al.*, 1991), de même que les formes kystiques. L'attachement des parasites aux pneumocytes de type I n'est pas exclusif puisqu'ils peuvent occasionnellement s'attacher aux pneumocytes de type II (Millard *et al.*, 1990).

Les pneumocytes de type II sont des cellules de forme cubique, présentant de nombreuses microvillosités. Enchassés dans les voiles cytoplasmiques des pneumocytes de type I, elles ne dépassent que de très peu le niveau de la surface épithéliale. Contrairement à ces derniers, elles ont un cytoplasme riche en organites et en corps lamellaires (représentant 18 à 24% du cytoplasme, Morgenroth, 1988), qui fournissent le substrat pour la production de surfactant par ces cellules.

Le surfactant et ses composants. Le surfactant s'étale en un film monomoléculaire qui recouvre l'épithélium pulmonaire; son rôle principal est d'abaisser la tension de surface entre l'air et les cellules alvéolaires (Tableau 4) (Denizot *et al.*, 1991 ; West *et al.*, 1992). Il est constitué essentiellement par des phospholipides, des lipides neutres et du cholestérol, ainsi que par des protéines spécifiques (Tableau 5) (Jobe *et al.*, 1987).

Les **phospholipides (PL)** représentent environ 85% du matériel tensio-actif du surfactant. Le dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC), principal composant de ces phospholipides, abaisse fortement la tension superficielle lors de l'expiration. Le phosphatidyl glycérol (PG), phospholipide insaturé représentant environ 10% des PL totaux dans le surfactant pulmonaire humain, permet la fluidification des phospholipides saturés, pendant l'inspiration et donc le réétalement du film surfactant à l'interface (Dehan *et al.*, 1989). Cette cinétique d'adsorption est accélérée par les apoprotéines hydrophobes.

Ces deux **protéines hydrophobes (SP-B et SP-C)** sont synthétisées par les pneumocytes de type II et sont indispensables au bon fonctionnement du surfactant. Elles permettent de maintenir une faible tension à la surface de l'alvéole (Pison *et al.*, 1994). Elles influencent

également, l'état d'agrégation des PL, rendent possible l'adsorption rapide, l'étalement et le réétalement du surfactant au cours des cycles respiratoires (King, 1985). Elles jouent aussi un rôle dans la réutilisation des PL par les pneumocytes de type II (Claypool *et al.*, 1984).

La protéine **SP-A**, globalement hydrophile, est la plus abondante des apoprotéines du surfactant (Weaver *et al.*, 1991). Cette protéine possède du côté NH₂-terminal, un domaine présentant une forte homologie avec le collagène (domaine "collagen-like") et à l'extrémité COOH-terminale, un domaine ayant 30% d'homologie avec la famille des lectines (protéines qui ont une affinité dépendante du calcium). Les conséquences des interactions SP-A et PL sont importantes puisqu'elles permettent l'agrégation des PL en présence du calcium et surtout, la formation de myéline tubulaire en coopération avec les SP-B et le calcium. La contribution de SP-A à l'élaboration du film hautement tensio-actif qu'est le surfactant apparaît toutefois plus modeste que celle des protéines hydrophobes SP-B et SP-C. Néanmoins, la forte synergie dépendante du calcium entre SP-A et SP-B (Schürch *et al.*, 1992) et la propriété qu'a la SP-A de pouvoir combattre les effets inhibiteurs qu'exercent certaines protéines sériques (notamment les polymères de fibrine) sur l'adsorption des PL (Cockshutt *et al.*, 1990), sont deux raisons pour expliquer la nette différence entre les expérimentations menées *in vitro* et *in vivo* (Hallman *et al.*, 1991). Le rôle de la protéine SP-A dans le contrôle du métabolisme des PL et du "turnover" du surfactant est une découverte plus récente. Ainsi la partie COOH-terminale confèrerait à la protéine la propriété d'activer la recapture de certaines fractions du surfactant (Pison *et al.*, 1990) et d'inhiber la sécrétion des PL par les pneumocytes de type II (Batenburg, 1992).

Quant à la **SP-D**, protéine collagénoïde, elle est synthétisée et sécrétée par les pneumocytes de type II et les cellules bronchiques non-ciliaires, comme les cellules de Clara (Person *et al.*, 1990 ; Voorhout *et al.*, 1992). Des études structurales démontrent que la SP-D possède un domaine de liaison lectine calcium dépendant qui a une très forte homologie avec les lectines de mammifères de type C (Rust *et al.*, 1991 ; Wiedemann *et al.*, 1993). Les lectines sont des composants importants de l'immunité non spécifique chez les mammifères.

1.6.1.3 Rôle du surfactant dans les mécanismes de défense

Le surfactant alvéolaire contribue largement aux réactions de défense locale. En effet, ce film qui tapisse de façon continue la totalité de l'alvéole, empêche le contact direct entre les particules exogènes en suspension dans l'air, notamment les agents infectieux comme les bactéries

et les virus, et la membrane cellulaire de l'épithélium alvéolaire. Le surfactant s'oppose au phénomène d'adhésion, indispensable à l'action pathogène des agents infectieux (Reynolds, 1987).

Mais, lors de la pneumocystose, même si globalement les taux de PL et de protéines ne sont pas modifiés (Su *et al.*, 1996), plusieurs composants du surfactant le sont (Su *et al.*, 1994). Ainsi, au cours de la pneumocystose, le taux de PG et de PL diminue dans le LBA (Escamilla *et al.*, 1992 ; Su *et al.*, 1996), alors que la SP-A augmente (Phelps *et al.*, 1991) en fonction du nombre de parasites (Sternberg *et al.*, 1993). La SP-A est aussi capable de reconnaître des antigènes de surface d'organismes bactériens et non bactériens comme *P. carinii* (Zimmerman *et al.*, 1992). Il a été proposé que la symptomatologie respiratoire liée à ce microorganisme, était due en partie à l'induction d'une altération fonctionnelle du surfactant (Su *et al.*, 1996). Le parasite utiliserait la protéine SP-A comme une enveloppe de protection vis-à-vis des sites de reconnaissance et de liaison présents sur le macrophage (Van Iwaarden *et al.*, 1990). Au contraire, pour Williams *et al.* (1996), la SP-A serait une sorte de ligand entre *P. carinii* et les macrophages et jouerait un rôle important dans la détection et dans les mécanismes de clairance du parasite. La protéine SP-D aurait un rôle modulateur lors de l'interaction de *P. carinii* avec les macrophages (O'Riordan *et al.*, 1995). *P. carinii* inhiberait directement la sécrétion de la phosphatidylcholine par les pneumocytes de type II (Rice *et al.*, 1993). Une déficience spécifique en PG entrainerait un désordre du surfactant, provoquant une modification des échanges gazeux lors de la pneumocystose (Su *et al.*, 1993, 1996). Par ailleurs, il a été rapporté par Pesanti *et al.* (1987) que *P. carinii* fixe le surfactant, ce qui pourrait jouer un rôle dans l'évasion du parasite vis-à-vis des défenses de l'hôte et entraîner une déficience relative en surfactant, provoquant ainsi, l'insuffisance respiratoire observée chez les patients avec PPC.

D'autres mécanismes de défense incluraient la phagocytose, après opsonisation, des macrophages alvéolaires qui internaliseraient les particules inertes ou les microorganismes, et la réponse inflammatoire qui mobiliserait le système immunitaire.

1.6.1.4 Rôle du mécanisme immunitaire non spécifique contre *P. carinii*

Plusieurs observations illustrent l'importance des mécanismes immunitaires non spécifiques dans la défense de l'hôte vis-à-vis du parasite. La réponse inflammatoire contre *P. carinii* se décompose en 2 éléments : (i) la production de composés solubles toxiques pour *P. carinii* (cytokines, lysozymes, interféron), et (ii) les éléments cellulaires (macrophages, polynucléaires neutrophiles).

La présence d'un infiltrat macrophagique dans les poumons infectés ainsi que la phagocytose des parasites observée *in vivo* et *in vitro* sont importants pour expliquer la clairance

de *P. carinii*. Cette réponse cellulaire contre *P. carinii* interviendrait selon un mécanisme indépendant des lymphocytes CD4 (Beck *et al.*, 1991a). En effet, chez des souris SCID infectées, une augmentation du nombre de macrophages est visible, mais ceux-ci ne sont pas suffisants pour assurer la régression de l'infection (Beck *et al.*, 1991b ; Chen *et al.*, 1992). Un effet similaire est obtenu lorsque des rats ou des souris sont traités avec des corticoïdes (Walzer *et al.*, 1980). Les macrophages auraient un rôle prépondérant en agissant soit directement sur *P. carinii*, soit indirectement par l'intermédiaire de composés solubles (Tumor Necrosis Factor ou TNF). Le rôle des cytokines lors de la pneumocystose reste très complexe, bien que plusieurs d'entre elles aient été étudiées comme le TNF- α , l'interleukine-1 (Il-1), l'interleukine-2, l'interleukine-6, l'interféron- γ (Su *et al.*, 1994). En réponse à l'infection par *P. carinii*, le macrophage produira du TNF- α actif contre *P. carinii* (Tamburrini *et al.*, 1991). Une libération de radicaux libres et de peroxyde d'azote (NO) par ces mêmes macrophages induit une altération des parasites, allant jusqu'à leur mort. Ishimine *et al.* (1995) ont montré que l'interféron- γ amplifiait la production de NO et de TNF- α via les macrophages, provoquant la mort du parasite. Quant à l'Il-1 produit par macrophage, elle va induire de l'interféron- γ par l'intermédiaire des lymphocytes T. Cette réponse provoque une amplification par le macrophage des paramètres déjà cités (Chen *et al.*, 1992). Une étude récente révèle que lors d'une PPC chez 10 patients non infectés par le VIH, le taux de TNF- α augmente ainsi que celui des facteurs anti-inflammatoires comme l'Il-1RA (le récepteur antagoniste d'Il-1). Dans le même temps, une suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires a lieu (Perenboom *et al.*, 1996).

1.6.2 Présentation clinique de la pneumocystose

Le spectre clinique de la pneumocystose s'est considérablement élargi depuis les débuts de l'infection par le VIH. Les symptômes sont plus insidieux, notamment à la phase initiale de la PPC où une altération de l'état général précède parfois de plusieurs semaines l'installation des signes pulmonaires. Ainsi, 6 à 23% des pneumocystoses peu symptomatiques n'ont aucune traduction radiologique à la phase initiale (Meduri *et al.*, 1992). La PPC présente une évolution plus aiguë chez les patients non infectés par le VIH.

Les opacités radiologiques, qui étaient classiquement alvéolo-interstitielles à prédominance para-hilaire et basale, sont maintenant plus fréquemment atypiques. Les images pulmonaires sont alors unilatérales, localisées aux sommets, lobaires simulant une pneumopathie bactérienne, nodulaires évoquant une opacité tumorale ou tuberculeuse (Travis *et al.*, 1990), pouvant se compliquer d'un pneumothorax (Mc Clellan *et al.*, 1991 ; Chow *et al.*, 1993).

Certains auteurs insistent sur le rôle favorisant de pneumocystose atypique et

extrapulmonaire, des chimioprophylaxies par aérosols de pentamidine lors des 1^{ers} épisodes de PPC (Abd *et al.*, 1988 ; Dembinski *et al.*, 1991). La mauvaise diffusion des aérosols serait aussi responsable de la persistance de foyers de *P. carinii* inaccessibles aux drogues car trop distaux (Kambouchner *et al.*, 1994). De plus, la pentamidine en aérosol semblerait favoriser l'apparition de localisations extrapulmonaires qui touchent de nombreux organes. Les sites d'infection les plus communément observés sont les ganglions lymphatiques, la rate (Raviglione, 1990 ; Wakabayashi *et al.*, 1992), la moelle osseuse et le foie (Bazin *et al.*, 1993). Mais d'autres organes peuvent être envahis soit isolément soit en association avec l'atteinte pulmonaire.

1.6.3 Traitements

Deux principaux médicaments sont disponibles pour un traitement préventif ou curatif (Kovacs *et al.*, 1989a ; Walker *et al.*, 1994). Le cotrimoxazole commercialisé sous les noms de Bactrim[®] 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[®] et de Lomidine[®].

L'efficacité thérapeutique du cotrimoxazole (**triméthoprime+sulfaméthoxazole**) a été démontrée en premier lieu chez le rat (Hughes *et al.*, 1974). Puis, une étude réalisée chez des enfants a démontré que l'efficacité du cotrimoxazole était équivalente à celle de la pentamidine et présentait l'avantage d'induire moins d'effets secondaires (Hughes *et al.*, 1978). Son mécanisme d'action est double : le sulfaméthoxazole inhibe la dihydroptéroate synthétase qui catalyse la transformation du pABA en dihydroptéroate et le triméthoprime inhibe la DHFR, enzyme responsable de la réduction de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique. Le cotrimoxazole agit ainsi sur le métabolisme des folates et en particulier sur la synthèse de la thymidine chez les microorganismes 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). En dépit de la sévérité des accidents thérapeutiques (cutanés et hématologiques) et la relative fréquence des rechutes, le cotrimoxazole est en général le traitement de première intention de la pneumocystose. Récemment des auteurs ont montré l'efficacité supérieure de ce produit sur la pentamidine en prophylaxie secondaire chez les patients sidéens (Hardy *et al.*, 1992).

La **pentamidine** a un large spectre d'action sur les protozoaires. Il fut démontré de son efficacité pour traiter la pneumocystose 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 al.*, 1939 ; Goodman *et al.*, 1973), inhibition de la phosphorylation oxydative et de la synthèse des acides nucléiques (Borstein *et al.*, 1970), inhibition de la DHFR (Robbins, 1967 ; Waalkes *et al.*, 1976). La pentamidine peut entraîner de nombreux effets secondaires. En 1970, Western *et al.* rapportent que, sur 164 patients atteints de PPC traités par la pentamidine, 69 ont développé des symptômes secondaires au traitement. Ces réactions secondaires peuvent être multiples : hypotension, tachycardie, nausée, vomissements, nécrose au point d'injection, rash cutané, anémie, thrombopénie, *etc.* Les aérosols de pentamidine constituent une des thérapies préventives utilisées (Farinotti *et al.*, 1989). Ce mode d'administration évite les réactions systémiques potentiellement graves de la pentamidine et les interactions médicamenteuses (Golden *et al.*, 1989). Mais comme nous l'avons déjà indiqué, l'incidence de la pneumocystose extrapulmonaire augmenterait chez les patients bénéficiant de cette prophylaxie (Raviglione, 1990; Noskin *et al.*, 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 pneumocystose, 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. La **dapsone**, seule ou associée au triméthoprime (Mills *et al.*, 1988). L'**atovaquone** (ou hydroxynaphtoquinone) présente une activité anti-*P. carinii in vitro* et sur modèle animal (Hughes *et al.*, 1990). Les essais cliniques sont en cours. Le **difluorométhylornithine** ou éflornithine est capable d'inhiber de manière spécifique et réversible l'ornithine décarboxylase, enzyme-clé de la synthèse des polyamines. De nombreuses autres molécules ont été testées (Queener, 1995).

II- LES TOXINES "KILLER" DE LEVURES

2.1 Contexte général

2.1.1 Infections dues à des microorganismes opportunistes

Dans un contexte d'immunodépression, les infections nosocomiales prévalentes sont souvent dues à des microorganismes opportunistes. C'est souvent le cas pour les levures du genre *Candida*, qui est un élément habituel de la flore commensale. C'est pourquoi, un affaiblissement même léger, du système de défense de l'hôte peut engendrer une prolifération de ces champignons opportunistes, entraînant une réaction inflammatoire de l'hôte en réponse au comportement pathogène adopté par *Candida*. La notion de virulence fait référence à un comportement particulier du champignon associé à une manifestation pathologique. Il pourra s'agir de la sécrétion de substances toxiques, d'une aptitude à proliférer, à envahir et à dégrader certaines cellules ou tissus de l'hôte. Dans le cas de *Candida*, la virulence est largement associée à la variabilité de son comportement, de sa grande plasticité génotypique et phénotypique (Senet *et al.*, 1995), tout comme *P. carinii*.

D'autres microorganismes opportunistes comme des champignons filamenteux, des parasites, ou encore d'autres levures (Hoy *et al.*, 1986 ; Anaissie *et al.*, 1989) sont présents en milieu hospitalier.

C'est le cas de la levure : *Pichia anomala*. Un 1^{er} cas fut décrit en 1955, par Csillag *et al.*, qui relataient la présence de *P. anomala* chez un jeune enfant de 2 mois, atteint d'une pneumonie interstitielle. Depuis, *P. anomala* a causé des infections opportunistes chez des enfants (Yamada *et al.*, 1995) ou chez des adultes (Goss *et al.*, 1994). Ainsi, de 1986 à 1994, 13 cas ont été répertoriés. La contamination à *P. anomala* était due à la pose de cathéter au niveau de veine ou d'artère, créant alors une porte d'entrée directe de la levure dans le sang (Murphy *et al.*, 1986).

Ainsi, les facteurs risquant d'induire des infections dues à des champignons, chez des enfants ou chez des adultes, sont : la durée de la pose d'un cathéter, les opérations chirurgicales, la neutropénie, la lymphopénie, la chimio- ou radiothérapie, l'administration de corticoïdes ou de stéroïdes, en fait les facteurs immunosuppresseurs (Maksymiuk *et al.*, 1984 ; Bodey *et al.*, 1984).

Lors des cas dus à l'infection par *P. anomala* uniquement, le traitement fut l'administration d'amphotéricine B et de flucytosine. Mais, si la suspicion porte aussi sur *Candida albicans*, un autre agent antifongique azolé comme la fluconazole est préconisé afin d'enrayer les 2 agents

(Sherman *et al.*, 1994 ; Yamada *et al.*, 1995).

2.1.2 Présentation du phénomène "killer"

Le phénomène "killer" est une interaction spécifique existant entre une cellule "tueuse", productrice d'une toxine et une cellule cible, sensible à cette toxine. Découvert en 1963 par Makower *et al.*, ce phénomène a d'abord été décrit chez la levure *S. cerevisiae*. Les espèces de levures "killer" appartiennent à des souches qui sécrètent des toxines protéiques (Ashida *et al.*, 1983 ; Petering *et al.*, 1991) ou glycoprotéiques (Sugisaki *et al.*, 1983). Elles peuvent avoir une action létale (Middelbeek *et al.*, 1980) ou seulement inhibitrice (Sugisaki *et al.*, 1984) vis-à-vis d'autres microorganismes. Toutefois, ces toxines "killer" n'exercent aucun effet sur les souches qui les produisent, celles-ci possèdent un système spécifique d'"auto-immunité".

2.2 Mode d'action des toxines "killer"

2.2.1 Différentes souches de levure "killer"

Le caractère "killer" a été mis en évidence chez de nombreux genres de levures comme *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, (*Hansenula*) (Middelbeek *et al.*, 1980), *Saccharomyces* (Schmitt *et al.*, 1995) ou *Ustilago*.

La caractérisation d'une toxine peut être faite en considérant plusieurs critères : (i) la détermination du spectre d'activité, soit l'ensemble des microorganismes sensibles à la toxine, (ii) la détermination des souches mutantes résistantes à l'activité de la toxine, (iii) la détermination de la structure chimique de la toxine, (iv) l'évaluation de la résistance ou de la sensibilité d'une souche "killer" à des toxines sécrétées par d'autres souches "killer". On parlera alors de groupe "killer" lorsque les souches à activité "killer" le sont vis-à-vis d'autres souches "killer", on parlera de groupe résistant, quand des levures "killer" sont résistantes aux toxines d'autres souches "killer" (Young, 1987).

2.2.2 Mécanismes d'action des toxines "killer"

Trois mécanismes d'action sont à l'heure actuelle proposés pour expliquer l'action des toxines "killer" de levures.

– Une activité nucléase est attribuée à certaines toxines produites par *Ustilago maydis* et *S. cerevisiae* (Levine *et al.*, 1976), codées par des "plasmides" cytoplasmiques à ARN bicaténaire (Bussey, 1991). Des souches de *U. maydis* peuvent sécréter des toxines glycoprotéiques (Koltin *et al.*, 1976). Chez cette espèce, 3 systèmes "killer" ont été caractérisés et nommés P1, P4 et P6.

Ces 3 toxines sont formées de 2 polypeptides de 10 et 12,5kDa. Ces dernières possèdent chacune un rôle spécifique dans l'activité "killer". Ainsi, une souche mutante ne possédant pas le peptide de 10kDa sécrète une toxine inactive. Toutefois, lorsque ce peptide est de nouveau fixé à la molécule, l'activité "killer" est restaurée. Les 2 polypeptides semblent agir de manière séquentielle, le composant de 10kDa initiant l'effet toxique en agissant comme un élément de reconnaissance. Il interagit ensuite avec un récepteur pariétal afin de rendre la cellule cible accessible au composant de 12,5kDa (Koltin, 1988).

– La toxine "killer" de la souche de *Kluyveromyces lactis*, quant à elle, est codée par 2 plasmides linéaires à ADN (Stark *et al.*, 1990 ; McCracken *et al.*, 1994). Elle est composée de 3 sous-unités protéiques (1 polypeptide glycosylé de 100kDa et 2 peptides non glycosylés de 27,5 et 30kDa). La toxine sécrétée inhiberait l'adénylate cyclase chez les souches sensibles, provoquant alors l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Sugisaki *et al.*, 1983). La réinitialisation du cycle cellulaire par addition d'AMP cyclique est controversée (White *et al.*, 1989). Dans ce cas, la toxine a une action irréversible.

– Le mécanisme "killer" le mieux connu reste toutefois celui de la perturbation de la perméabilité membranaire de la cellule cible. Ainsi, les toxines "killer" de *Pichia kluyveri* (Middelbeek *et al.*, 1980) ou de *S. cerevisiae* (Middelbeek *et al.*, 1980) peuvent modifier le gradient électrochimique de la membrane plasmique de la cellule cible. Ces toxines induisent la formation de canaux ioniques à travers la membrane plasmique. Un afflux de protons provoque alors une réduction du pH intracellulaire de la cellule cible et une fuite d'ions potassium (De la Pena *et al.*, 1981). Par la suite, la quantité d'ATP intracellulaire diminue, entraînant une chute des processus métaboliques nécessitant de l'énergie.

2.2.3 Fixation de la toxine "killer" à la cellule cible

La toxine "killer" de *S. cerevisiae* se lie aux cellules cibles de manière plus ou moins forte, ce qui tend à démontrer que la spécificité de la fixation des toxines "killer" s'explique par l'existence de récepteurs pariétaux à la surface des cellules cibles. Ceux-ci sont nécessaires à la fixation des substances "killer" mais non suffisants pour entraîner une action toxique sur la membrane plasmique (Zhu *et al.*, 1989).

S. cerevisiae sécrète 3 toxines "killer" connues et nommées K1, K2 et K3, qui ont un effet létal sur un grand nombre de souches sensibles. Pour induire l'effet "killer", 2 étapes sont nécessaires et nécessitent des récepteurs. Ainsi, il a été montré que la fixation de la toxine K1 est

énergie-dépendante, elle intervient sur un récepteur de la paroi (identique à celui des lectines) de la cellule cible de nature $(1, 6)\beta$ -D-glucanes (Hutchins *et al.*, 1983). Cette fixation initiale se fait par l'intermédiaire de la sous-unité β de K1, permettant ainsi de rendre accessible la sous-unité α à un récepteur de la membrane plasmique. L'effet toxique se manifeste en provoquant une fuite d'ions et la mort de la cellule (De la Pena *et al.*, 1981). Plus récemment, Schmitt *et al.* (1995) ont émis l'hypothèse qu'un autre mécanisme serait impliqué lors de la fixation de la toxine K1. Quant à la toxine "killer" K3, elle agirait sur les cellules cibles via un récepteur membranaire impliquant des α -1,3 mannane.

2.2.4 "Immunité" des souches "killer"

L'"immunité" d'une souche "killer" à l'action de sa propre toxine est attribuée à différents systèmes moléculaires spécifiques (Tipper *et al.*, 1984). L'"immunité" d'une cellule vis-à-vis d'une toxine n'est pas obligatoirement due à l'absence de récepteurs car une souche "killer" peut posséder des récepteurs pariétaux à sa propre toxine.

Chez *S. cerevisiae* un facteur d'"immunité" est décrit comme pouvant altérer ou masquer des sites récepteurs de la membrane plasmique, ce qui rend impossible l'interaction entre le récepteur et la toxine K1. Ce facteur pourrait intervenir dans le retrait ou le repositionnement du récepteur membranaire (Douglas *et al.*, 1988).

Un autre mécanisme est décrit pouvant protéger les souches "killer" contre leurs propres toxines, il s'agit de la production de protéases capables de détruire directement la toxine (Wickner *et al.*, 1985).

2.3 Toxines "killer" de *Pichia anomala*

2.3.1 Généralités sur *Pichia anomala*

Il existe 95 espèces de levures appartenant au genre *Pichia*, anciennement dénommé *Hansenula* en référence à Hansen (1904). Parmi ces espèces se trouve *P. anomala*, classée chez les Ascomycètes. Elle forme des colonies blanches à crèmes et dont la phase de reproduction végétative se fait par bourgeonnement. On peut trouver cette levure au niveau des baies, des gommes de caoutchouc, chez les brasseurs et les boulangers, dans les jus de fruits, les sirops, la mélasse, le lait concentré. Elle peut parasiter l'homme et certains animaux.

L'activité "killer" des toxines de *P. anomala* a d'abord été mise en évidence sur des cellules sensibles appartenant à plusieurs genres de levures (Morace *et al.*, 1984). Par la suite, d'autres microorganismes pathogènes tels les hyphomycètes et les bactéries se sont avérés être

sensibles aux toxines de *P. anomala* (Polonelli *et al.*, 1986). Ainsi, les toxines "killer" de *P. anomala* ont une action antibiotique vis-à-vis d'un large spectre d'hôte. Peut être parce que *P. anomala* produit plusieurs substances "killer" différentes (Sawant *et al.*, 1990). De plus, comme la toxine "killer" de *S. cerevisiae*, celle de *P. anomala* agit après s'être fixée à un récepteur pariétal de la cellule cible.

Comme le mode de ségrégation du phénomène "killer" chez *P. anomala* est de type mendélien, cela implique que l'activité "killer" est portée sur un gène chromosomique.

2.3.2 Caractéristiques physico-chimiques des toxines "killer" de *Pichia anomala*

Comme de nombreuses protéines ayant une activité biologique, les toxines "killer" de levure sont des molécules instables. Leur activité est fortement dépendante des conditions de pH et de température. Elles sont assez sensibles à l'agitation mécanique et peuvent perdre leur activité "killer" en se fixant non spécifiquement à des macromolécules en suspension (Bussey, 1981), des membranes de filtration ou à la surface de matériel chromatographique (Pfeiffer *et al.*, 1982). En général, les toxines "killer" sont instables à pH alcalin. En ce qui concerne les toxines de *P. anomala*, son pH et sa température d'activité optimale sont respectivement de 4,6 et 25°C.

2.3.3 Sécrétion des toxines "killer"

A part quelques travaux réalisés sur l'étude de la fixation des toxines "killer" sur les cellules sensibles, peu de choses sont connues sur la synthèse des toxines, leur transport et leur sécrétion à travers la membrane plasmique via la paroi des cellules productrices. Ainsi, à l'aide d'un anticorps monoclonal qui neutralise l'action d'une toxine de *P. anomala*, le MabKT4, des expériences ont été réalisées pour tenter de localiser cette toxine sur *P. anomala*. Des réactions d'immunofluorescence indirecte ou d'immunomarquage ultrastructural réalisées sur les cellules de la souche "killer" permettent de localiser les sites de sécrétion de la toxine au niveau de la paroi. Ces immunomarquages suggèrent que la sécrétion de la toxine "killer" n'est vraisemblablement pas uniforme (Cailliez *et al.*, 1994).

2.4 Potentialité thérapeutique des toxines "killer"

2.4.1 Potentiel antibiotique des toxines "killer"

Des antibiotiques naturels peuvent inhiber des fonctions enzymatiques en agissant comme des substrats analogues ou en masquant, par leur fixation aux sites actifs, certaines enzymes. Des antibiotiques peptidiques, produits par des champignons ou des bactéries, possèdent des

propriétés communes à celles de substances biologiques classées parmi les toxines "killer" de levure (Hoffman *et al.*, 1965).

L'exemple de *Pichia mrakii* illustre ce potentiel antibiotique des toxines "killer" de levure. La 1^{ère} cible de la toxine "killer" de *P. mrakii* (HM1) chez les levures sensibles est la synthèse des β -glucanes (Yamamoto *et al.*, 1988). Certains antibiotiques antifongiques comme l'aculéacine A, l'échinocandine B et la papulocandine B ont montré une action inhibitrice spécifique de la synthèse des β -glucanes pariétaux (Yamamoto *et al.*, 1986). Cependant, il a été récemment décrit que ces composés n'inhibent pas la synthèse de l'activité β -(1,3)-glucane synthétase mais l'incorporation de glucanes dans l'organisation des macromolécules de la paroi de *C. albicans* (De Mora *et al.*, 1993). Il s'avère toutefois que la toxine HM1 agit contre *S. cerevisiae* en perturbant la synthèse de la paroi cellulaire (Takasuka *et al.*, 1995). En effet, la toxine HM1 inhibe la synthèse des β -(1,3)-glucanes présents sur les sites de bourgeonnement, ce qui induit la lyse de la cellule.

En raison des conditions de pH et de température très particuliers auxquelles la toxine "killer" est active, elle ne peut être utilisée *in vivo* comme agent thérapeutique. C'est pourquoi, une nouvelle stratégie est envisageable. Des anticorps anti-idiotypes produits contre l'anticorps monoclonal anti-toxine et qui miment les propriétés biologiques de la toxine, permettraient de visualiser l'effet "killer" *in vivo*.

2.4.2 Anticorps anti-idiotypes

En 1963, les équipes de Kunkel et de Oudin ont observé presque simultanément, la présence des idiotypes. Pour Kunkel *et al.*, les travaux portaient sur les anticorps humains spécifiques de déterminants antigéniques des globules rouges et pour Oudin *et al.*, le sujet traitait des anticorps de lapins immunisés contre *Salmonella typhi*. Ils ont injecté à un lapin des antigènes de *Salmonella typhi* afin de produire des anticorps (Ab1). Ceux-ci ont été réinjectés à un autre animal qui a produit des anticorps Ab2 (anticorps anti-Ab1). Les Ab2 se lient spécifiquement aux Ab1 et non pas aux autres anticorps. De ce point de vue, ils reconnaissent l'individualité des 1^{er} anticorps. Oudin leur a donc donné le nom d'idiotype (du grec "individuel" et "forme") aux déterminants antigéniques spécifiques des Ab1. Il a appelé anti-idiotype l'ensemble des Ab2 produits spécifiquement en réponse aux anticorps Ab1.

En 1974, Jerne a postulé que la réponse immunitaire était régulée par un réseau d'anticorps idiotypes et anti-idiotypes (Figure 5A). Les idiotypes étaient selon lui portés par des récepteurs de surface des lymphocytes B. Lorsque les lymphocytes B prolifèrent en réponse à un antigène

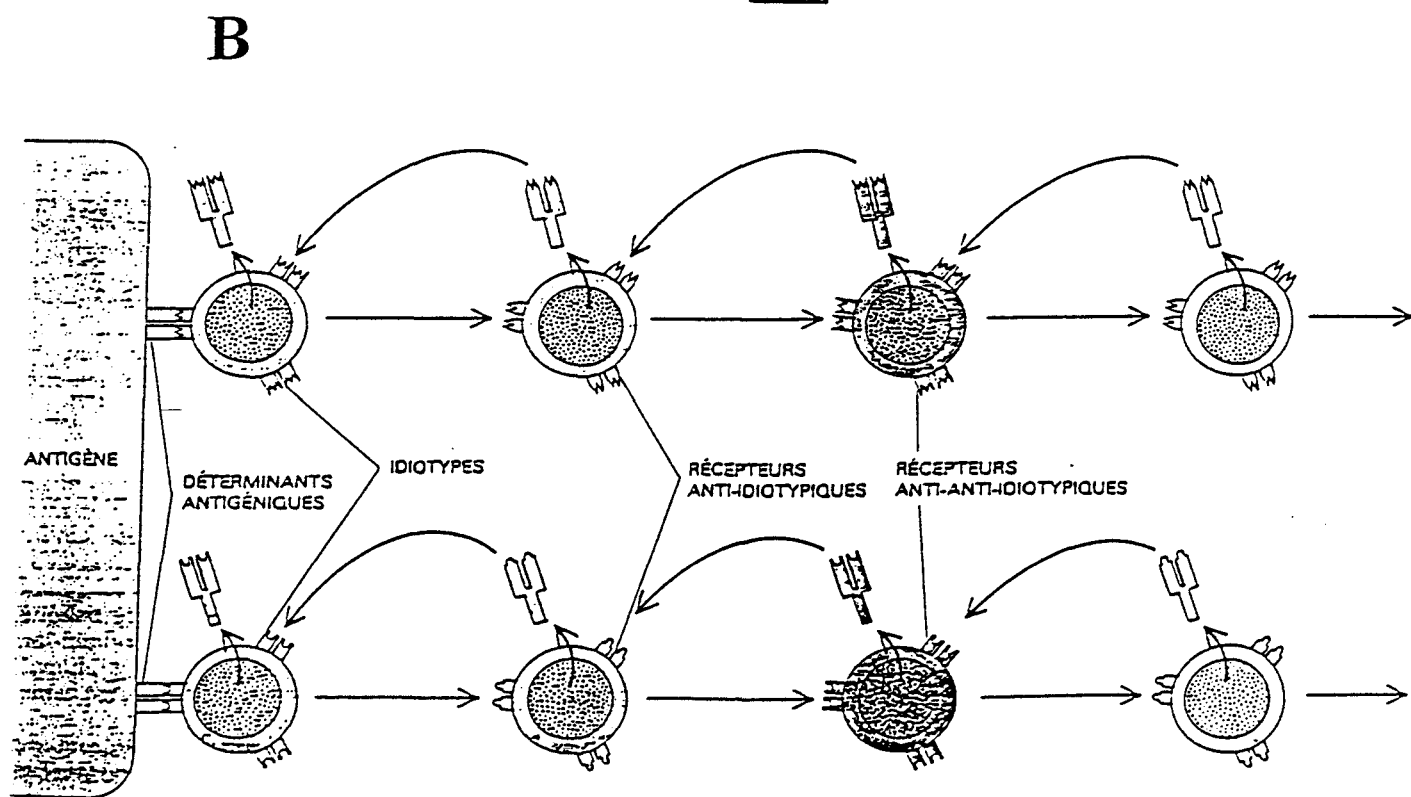
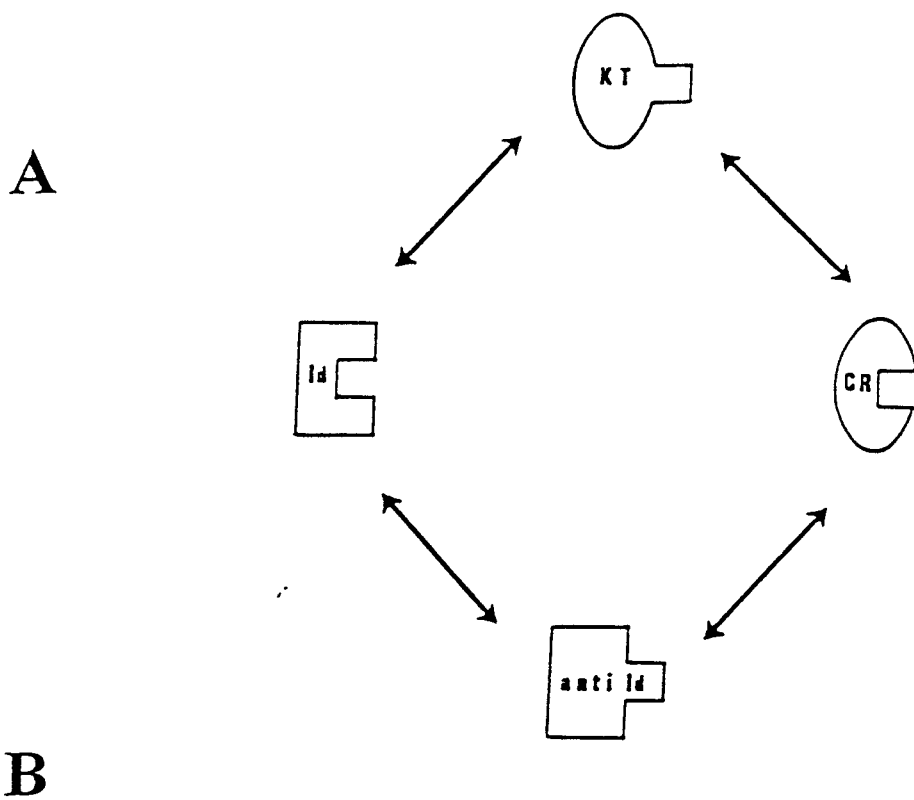


Figure 5 : Les anticorps anti-idiotypes. A : présentation schématique des idiotypes et anti-idiotypes, KT : toxine "killer", Id : idiotype, anti-Id : anti-idiotype (avec la même image que la toxine "killer"), CR : récepteur de la cellule cible. B : Réseau idiotypique.

la quantité d'anticorps augmente, la concentration en idiotypes croît. L'augmentation de la concentration en idiotypes stimulerait la prolifération d'autres lymphocytes portant des récepteurs anti-idiotypiques. Ces derniers sécrèteraient des anticorps anti-idiotypes qui réguleraient en retour la réponse immunitaire initiale. Mais, la réponse immunitaire persiste, car après la 1^{ère} génération d'anticorps anti-idiotypes produits, ces anticorps qui portent également des idiotypes stimulent une 3^{ème} population de lymphocytes. C'est en fait une production en cascade (Tableau 5B), un réseau idiotypique. Cette théorie du réseau idiotypique repose sur 3 structures essentielles des immunoglobulines que sont :

- le déterminant antigénique ou épitope
- le déterminant idiotypique ou idiotope
- le site de la liaison de l'anticorps à l'antigène ou paratope

Son concept se base sur l'hypothèse qu'à chaque antigène ou épitope correspond un idiotope, son **image interne**. Ainsi, "l'univers des antigènes se confond du point de vue conformationnel avec celui des idiotopes". La somme des idiotopes d'une partie variable des immunoglobulines (Ig) constitue l'idiotype. Généralement, l'idiotype est spécifique d'un seul clone cellulaire, on parle alors d'idiotypes privés. Mais parfois, différents clones cellulaires peuvent exprimer le même déterminant idiotypique appelé idiotype public ou récurrent (Jerne *et al.*, 1982).

Ces différents marqueurs idiotypiques ont été abondamment étudiés pour détecter et comparer la structure des régions variables des Ig grâce à la production de plusieurs anticorps spécifiques appelés anticorps anti-idiotypes. L'injection dans un organisme d'un anticorps Ab1 conduit à la production d'anticorps Ab2 spécifique des idiotypes de l'anticorps Ab1, mais qui expriment des propriétés très différentes selon qu'ils sont spécifiques d'idiotopes situés dans le paratope ou hors de celui-ci. Ainsi, on peut définir 4 catégories d'anticorps anti-idiotypiques.

- les **anticorps anti-idiotypes α** (Ab2 α) sont aussi appelés anticorps anti-idiotypes spécifiques d'idiotypes non paratopiques.

- les **anticorps anti-idiotypes β** (Ab2 β) sont induits par des idiotypes paratopiques qui puisqu'ils sont reconnus par l'anticorps Ab2 comme l'est l'épitope, portent l'image interne de l'épitope. Ces Ab2 β sont donc capables de mimer les propriétés immunologiques fonctionnelles de cet épitope. De ce fait, ils sont capables d'induire la production d'anticorps Ab3 qui doivent refléter les propriétés des anticorps Ab1 initiaux. Ces anticorps présentent d'autre part la propriété d'inhiber la réaction Ab1-épitope.

- les **anticorps anti-idiotypes γ** (Ab2 γ) inhibent la réaction Ab1-épitope, sans toutefois porter l'image interne de l'épitope. Ils sont généralement dirigés contre des idiotopes proches du

site de liaison anticorps-antigène et exercent leur effet par inhibition stérique ou modification conformationnelle du site paratopique.

– les anticorps anti-idiotypiques ϵ (Ab2 ϵ) représentent une catégorie à part puisqu'ils reconnaissent aussi bien les idiotopes présents sur l'anticorps Ab1, que les structures présentes sur l'antigène (Bona *et al.*, 1982).

Parmi les anticorps anti-idiotypes, les Ab2 β tiennent une place toute particulière car ils portent l'image interne de l'épitope. De nombreux travaux ont été consacrés à leur possible utilisation comme antigène de substitution, dans l'immunoprophylaxie des maladies transmissibles, de même leurs propriétés ont été exploitées en cancérologie (Koprowski *et al.*, 1984), lors de transplantation d'organe ou pour les maladies autoimmunes (MacKearn *et al.*, 1974 ; Feldman *et al.*, 1985).

De nombreux arguments en faveur des images internes ont été apportés lors d'infections bactériennes, virales ou parasitaires. C'est ainsi que Kennedy *et al.* en 1983, montrent que la production d'anticorps IgM et IgG spécifiques des antigènes de surface du virus de l'hépatite B est stimulée par un traitement anti-idiotypique préalable de la souris. De même, le rôle protecteur des anticorps anti-idiotypes a été montré pour la 1^{ère} fois lors d'une infection par *Trypanosoma rhodesiense* par Sacks *et al.* (1982). Dans ce modèle, des anticorps polyclonaux anti-idiotypes spécifiques d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes variables du *T. rhodesiense* (VAT) ont été préparés chez la souris. L'injection de la fraction IgG purifiée chez la souris Balb/c modifie considérablement le cours d'une infection ultérieure par le trypanosome par rapport au groupe d'animaux témoins. Cette immunité s'exprime soit par une diminution de la parasitémie ou par une sélection des parasites exprimant le VAT correspondant. Ces résultats suggèrent donc que les anticorps anti-idiotypes injectés portent l'image interne d'un épitope du trypanosome.

La présence d'anticorps anti-idiotypes a été confirmée plus récemment par de nombreux auteurs. Les travaux portent aussi bien sur des cellules cytotoxiques (Lester *et al.*, 1994), sur des virus comme le virus syncytial (Rueda *et al.*, 1995), ou des bactéries comme *Chlamydia* (Ts'ao *et al.*, 1994) ou encore des parasites comme *Taenia* (Hayunga *et al.*, 1992).

L'une des applications de cette théorie, est la vaccination basée sur l'injection d'anticorps idiotypiques permettant d'obtenir une production massive d'anticorps anti-idiotypes ou leurs fractions dérivées dépourvue de tout contaminant toxique inducteur de réactions secondaires. Très récemment, des expériences avec des modèles de mycoses expérimentales : candidoses systémiques chez le souris et candidoses vaginales chez le rat, ont été entreprises. Dans le 1^{er} modèle, des souris sont vaccinées par injections répétées de MabKT4 avant d'être infectées par

des souches de *C. albicans* (Polonelli *et al.*, 1993). Dans le 2^{ème} modèle, des rates soumises à des candidoses vaginales sont traitées localement par le MabKT4 (Polonelli *et al.*, 1994). Dans les 2 expériences, une réduction significative de l'extension de la mycose est obtenue chez les animaux vaccinés ou traités avec l'idiotype.

2.5 Conclusion

En ce qui concerne *P. carinii*, il faut souligner ici qu'indépendamment du rôle anti-parasitaire potentiel, soit des toxines "killer", soit des anticorps anti-idiotypes correspondants, le phénomène "killer" constitue un outil intéressant et original pour aborder l'étude de l'attachement et du développement de *P. carinii* dans le poumon et pour parvenir à la synthèse de molécules pouvant inhiber ces processus.

2-MATERIELS ET METHODES

III- MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Obtention de *Pneumocystis carinii*

3.1.1 Sources de *P. carinii*

La souris et le rat sont 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 (Merck Sharp et Dohme Chibret, Paris) à une concentration de 2mg/l dans l'eau de boisson (Schmatz *et al.*, 1990). Souris et rats, sous corticoïdes, développent alors une PPC intense après 3 mois de traitement. Tous les animaux sont nourris (UAR, France) et abreuvés *ad libitum*.

3.1.2 Extraction de parasites viables par agitation-filtration

Après sacrifice des animaux infectés (rats et souris sous corticoïdes), les poumons sont prélevés stérilement et mis dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sans sérum et contenant des antibiotiques (pénicilline 100 UI/ml et streptomycine 100 µg/ml, Eurobio, France). Ils sont ensuite découpés en petits morceaux et mis sous agitation 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 (NH₄Cl 150 mM: 9 volumes ; Tris-HCl 20 mM pH 7,4: 1 volume), incubé 10 min à 4°C et centrifugé. Du DMEM est ajouté au culot et la suspension est filtrée successivement sur tamis métalliques de 250µm et 63µm puis sur filtres en polycarbonate de 10µm et 8µm (Nuclepore, Costar, France). Après centrifugation 10 min à 2900g, le culot est resuspendu dans un volume défini de DMEM.

Les parasites ainsi obtenus sont bien préservés, viables et relativement purs (Soulez *et al.*, 1991a). Ils pourront être inoculés à d'autres animaux afin qu'ils développent une pneumocystose, ou sur des lignées cellulaires, en culture, pour produire un grand nombre de parasites.

Toutefois, cette technique d'extraction, intéressante pour obtenir des parasites viables, est longue et présente un rendement assez faible. C'est pourquoi, lorsque l'objectif est de numérer les parasites en fin d'expérience, une technique au Stomacher est préférée.

3.1.3 Extraction de parasites au Stomacher

L'intérêt principal de cette technique d'extraction est de connaître le nombre de parasites contenus dans les poumons des animaux inoculés expérimentalement, de manière précise et

reproductible. Le rendement important et la rapidité sont également des avantages de cette méthode qui ne permet pas cependant, de préserver la viabilité des parasites extraits (Soulez *et al.*, 1991b).

Après sacrifice des animaux infectés, les poumons sont prélevés et déposés dans du tampon de Hanks sans Ca²⁺, ni Mg²⁺. 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 contenant les parasites est suspendu dans un volume défini de tampon de Hanks.

3.1.4 Quantification de *Pneumocystis carinii*

Pour déterminer le nombre de parasites obtenus après extraction, des gouttes calibrées de 2 μ l sont déposées sur des lames de verre, puis séchées à température ambiante. Ces lames sont colorées au bleu d'orthotoluidine : BTO (Chalvardjian *et al.*, 1963) ou au RAL-555 (Société RAL, Paris, France), deux colorations complémentaires. Le BTO permet d'établir le nombre absolu de formes à paroi épaisse (prékystes intermédiaires, tardifs et kystes matures) qui prennent par métachromasie une coloration violette. Le nombre de formes à paroi présentes dans la suspension est déterminé par la formule suivante (Soulez *et al.*, 1991a) :

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

- N : nombre total de formes à paroi épaisse présentes dans la suspension ;
- n : nombre moyen de formes à paroi épaisse par champ microscopique (moyenne obtenue sur un minimum de 10 champs dans 3 gouttes différentes) ;
- S1 : surface du champ (objectif x50 à immersion, oculaire x15) = 0,053 mm² ;
- S2 : surface de la goutte de 2 μ 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. Elle met en évidence tous les stades parasitaires et permet de réaliser une "formule" 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:

$$\text{Nombre total de parasites} = N \times 100 / \%N$$

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

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

3.1.5 Méthodes d'inoculation

3.1.5.1 Modèles infectés expérimentalement

Des souris congénitalement immunodéficientes (SCID), des rats athymiques Fisher-344 nu/nu (donnés par P. Billaut et E. Fleurbaix de l'Institut Pasteur, Lille) âgés de 8 à 12 semaines sont utilisés comme hôtes expérimentaux pour évaluer l'infectivité de *P. carinii*.

Les souris SCID (IFFA-CREDO, Lyon, France) présentent une sévère déficience congénitale en lymphocytes T et B et possèdent généralement une lymphopénie, une agammaglobulinémie et une tolérance aux allogreffes et aux tumeurs. Par contre, les granulocytes, les monocytes et les cellules NK ("natural killer") sont en proportion normale. Ces souris sont très susceptibles aux infections bactériennes, virales et à de nombreux microorganismes opportunistes (Bosma *et al.*, 1983 ; Deschryver-Kecsckemeti *et al.*, 1988).

Les rats nu/nu ou 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, éosinophiles et les monocytes sont 2 à 10 fois plus nombreux par rapport aux rats hétérozygotes (Vos *et al.*, 1980).

Les souris SCID et les rats nude sont contrôlés au sein du laboratoire, comme étant non porteurs latents de *P. carinii*. En effet, soumis à une corticothérapie, ces animaux ne développent pas de pneumocystose s'ils sont maintenus dans des enceintes stériles. Ainsi, dans toutes les expériences, les animaux sont installés dans une enceinte autonome et en surpression (FLUFRANCE, Wissous, France) qui permet de maintenir une atmosphère stérile (filtre 0,2 μm). Cette enceinte possède 4 compartiments indépendants qui sont désinfectés à chaque nouvelle expérience. Ainsi séparés, les groupes d'animaux ayant subi des traitements différents ne peuvent s'infecter entre eux. Les cages, la nourriture, l'eau de boisson et la litière sont systématiquement stérilisées par autoclavage.

3.1.5.2 Inoculation nasale de *P. carinii* chez la souris SCID

Les souris SCID sont anesthésiées par voie intrapéritonéale avec un mélange

d'hydrochlorure de kétamine (100 mg/kg ; Imalgène[®], Rhône Mérieux, France), de diazépam (1,5 mg/kg ; Valium[®], Roche, France) et d'atropine (0,5 mg/kg ; Atropine[®], Aguetant, France).

Un inoculum contient 40.10^6 parasites de souris resuspendus dans $30\mu\text{l}$ de DMEM sans sérum. Les parasites sont déposés à l'aide d'un "pipetman" au bord de la narine de l'animal. Ainsi, lors d'une inspiration, l'animal inhale les parasites. Les animaux anesthésiés perdent le réflexe de déglutition ; ceci assure la progression des parasites inhalés jusqu'aux poumons. Les souris SCID maintenues sous corticoïdes développent alors une pneumocystose au bout de trois mois.

La quantification des parasites est réalisée après extraction au Stomacher (3.1.3) pour évaluer l'évolution de l'infection.

3.1.5.3 Inoculation trachéale de *P. carinii* chez le rat nude

Quinze jours avant l'inoculation de *P. carinii* de rat, le rat nude est mis sous corticoïdes (dexaméthasone, 1mg/l dans l'eau de boisson). Cette étape semble réduire l'écart existant lors de l'installation de la pneumocystose entre les rats femelles et mâles, ainsi que les écarts présents au sein d'un même groupe. Les animaux semblent alors plus sensibles à l'installation du parasite. En effet, la corticothérapie précédant l'inoculation rend le terrain plus propice à l'installation du parasite.

Les rats nude sont également anesthésiés par voie intrapéritonéale avec un mélange de drogues qualitativement identique à celui utilisé pour les souris SCID, mais quantitativement différent avec les concentrations suivantes: hydrochlorure de kétamine 45mg/kg, diazépam 0,7mg/kg et atropine 0,25mg/kg.

Dans toutes les expériences, les rats sont inoculés par voie trachéale, suivant le protocole de Bartlett *et al.* (1988), avec 100.10^6 *P. carinii* de rat fraîchement extraits par agitation-filtration. La trachée est dégagée par une incision d'environ 1cm dans la région cervicale antérieure de l'animal. L'inoculum parasitaire, suspendu dans $100\mu\text{l}$ de DMEM sans sérum, est directement injecté dans la trachée à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille fine. L'air (0,3 ml) placé derrière l'inoculum permet de propulser la totalité des parasites dans les poumons. Avant de recoudre la plaie, quelques gouttes de pénicilline (10 000 UI/ml) et de stréptomycine (10 000 $\mu\text{g/ml}$, Eurobio, France) sont déposées dans la région opérée afin d'éviter tout risque d'infection. La plaie est alors refermée par deux points de suture, à l'aide de fil non résorbable (3/8 Seracap, France). Toutes les étapes sont réalisées sous hotte à flux laminaire, dans des conditions de stérilité rigoureuses.

La pression des corticoïdes est maintenue jusqu'au sacrifice de l'animal, c'est-à-dire 40 jours après l'inoculation. La quantification des parasites est réalisée après une extraction au

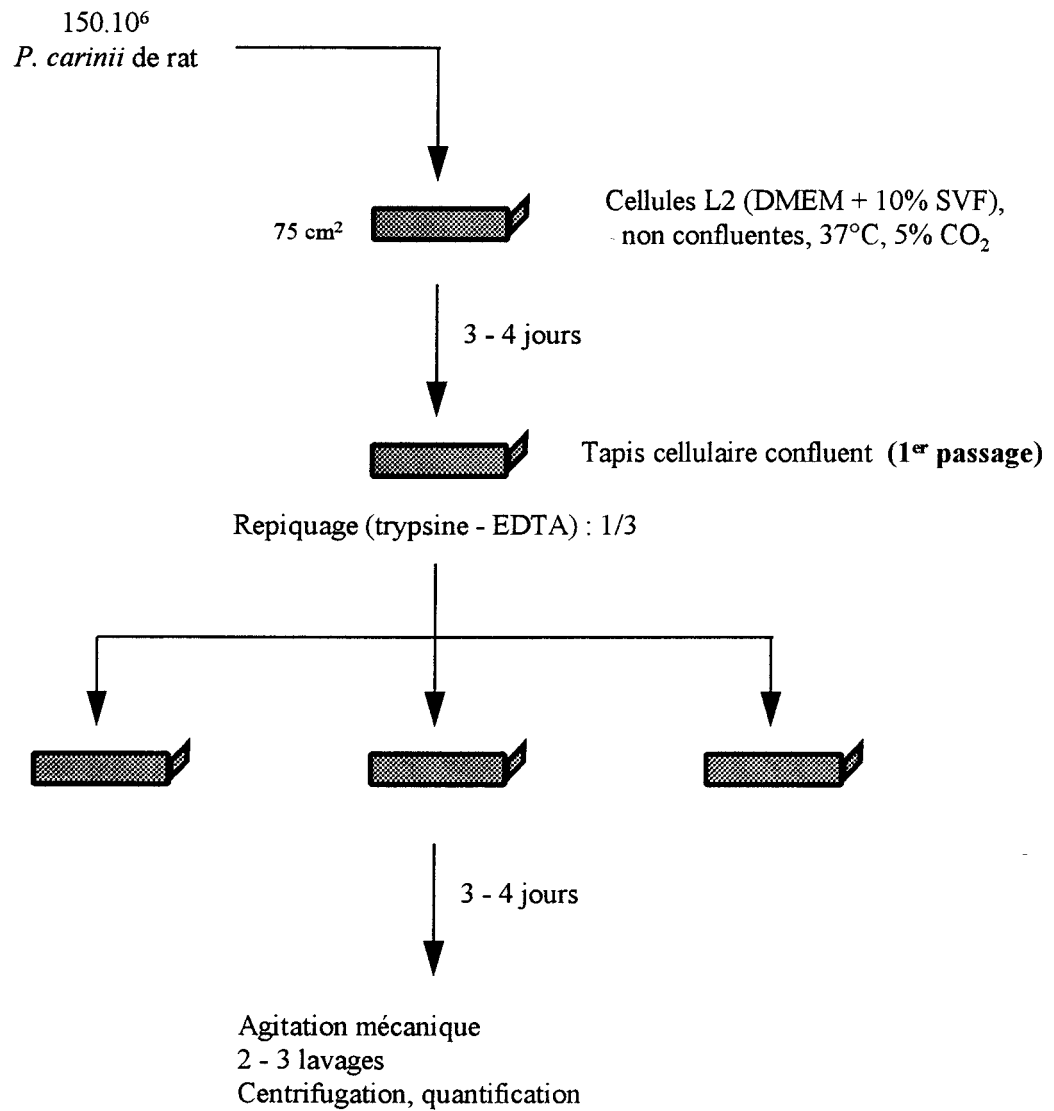


Figure 6 : Co-culture de *P. carinii* de rat sur cellules épithéliales alvéolaires L2 (Aliouat *et al.*, 1995).

Stomacher (3.1.3)

3.2 Culture cellulaire

3.2.1 Lignées cellulaires

L'évaluation de l'attachement de *P. carinii* a été réalisée en co-culture en utilisant des lignées cellulaires continues : (i) L2 (ATCC n°CCL149), cellules épithéliales alvéolaires de rat; (ii) WI38VA13 sous-lignée 2RA (ECACC n°85062512), cellules embryonnaires épithéliales de poumon humain ; (iii) VERO (ECACC n°84113001), fibroblastes de rein de singe vert.

La lignée L2 synthétise peu de phosphatidylcholine et ne présente pas d'inclusions lamellaires en étude ultrastructurale. De ce point de vue, cette lignée se rapprocherait des pneumocytes de type I. Quant à la lignée WI38VA13 sous-lignée 2RA, elle se positionne d'un point de vue ultrastructural entre les pneumocytes de type I et II. Cette dernière lignée a été choisie afin de nous rapprocher du poumon humain. Enfin, les cellules VERO ont été les premières cellules utilisées dans ce travail.

3.2.2 Maintien des lignées cellulaires

Les cellules s'entretiennent facilement dans du DMEM (Bio-Whittaker, France) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (SVF, Dutscher, France) et d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline 100 UI/ml et streptomycine 100µg/ml) à 37°C, en atmosphère enrichie de 5% de CO₂. Le passage s'effectue deux fois par semaine à l'aide d'une solution de trypsine 0,05% - EDTA 0,02% préparée dans du PBS sans Ca²⁺, ni Mg²⁺.

3.2.3 Culture de *P. carinii* de rat

Les cellules L2, cellules alvéolaires de rat, se sont avérées les plus adaptées à la production de *P. carinii* de rat (Aliouat *et al.*, 1995).

Lorsque les cellules L2 parviennent à confluence dans des boîtes de culture de 75 cm² (Costar, France), elles sont diluées au 1/4 après action de la trypsine-EDTA. Les boîtes sont ensuite incubées 12 à 24h avant l'inoculation de *P. carinii* de rat (150.10⁶ parasites/boîte).

Les cellules L2 avec les parasites sont incubés dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF, à 37°C et en atmosphère enrichie de 5% de CO₂. Après 3-4 jours de co-culture, les cellules et les parasites sont repiqués au 1/3 (passage 1). Lorsque le tapis cellulaire est de nouveau confluent, les parasites de rat sont détachés des cellules par agitation mécanique manuelle, suivie de 5 à 6 lavages du tapis cellulaire avec du milieu de culture (Figure 6). La suspension parasitaire

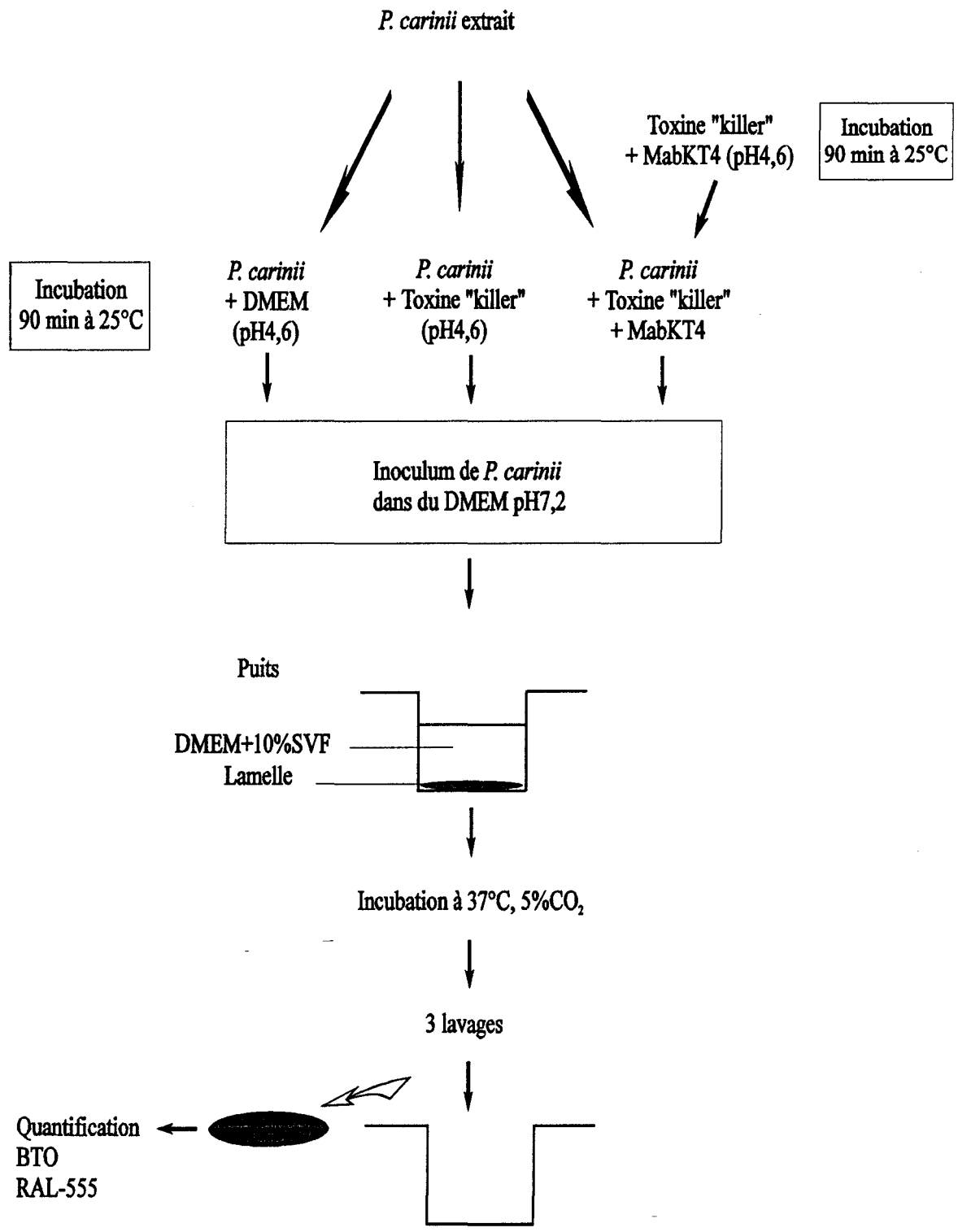


Figure 7 : Attachement *in vitro* de *P. carinii* de rat à une lignée cellulaire.

ainsi obtenue est centrifugée 10 min à 2900g et le culot est repris dans un volume défini de DMEM (Aliouat *et al.*, 1995). Les parasites sont quantifiés après colorations au RAL-555 et au BTO.

3.2.4 Attachement et développement de *P. carinii* de rat *in vitro*

L'attachement et le développement *in vitro* de *P. carinii* de rat ont été étudiés sur différentes lignées cellulaires (Vero, L2 et WI38 VA13 2RA). Dans tous les cas, les cellules sont dissociées classiquement par l'action de la trypsine-EDTA et déposées dans des plaques dont les puits ont un diamètre de 17 mm (plaques de 4 ou 24 puits), contenant une lamelle en verre de 12mm de diamètre. Trois ou quatre millions de parasites, en suspension dans du DMEM supplémenté de 10% de SVF, sont déposés sur le tapis cellulaire confluent de chacun des puits et incubés dans une atmosphère enrichie de 5% de CO₂ (Cushion *et al.*, 1984).

Après 24 h à 37°C, les lamelles sont lavées 3 fois avec 1ml de PBS Dulbecco (Eurobio, France), afin d'éliminer les débris cellulaires et les parasites non attachés. Elles sont ensuite colorées au méthanol-Giemsa (Figure 7) et montées sur lame à l'aide d'une résine synthétique (Eukitt, Labonord, France).

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

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

- **n** : nombre moyen de parasites (les kystes comme les trophozoïtes équivalent à un parasite) par champ microscopique (objectif x50, oculaire x15);
- **Sp** : surface du puits de culture ;
- **So** : surface du champ microscopique.

3.2.5 Tests de viabilité

Les tests simples utilisant des colorants d'exclusion, comme le bleu trypan, ne peuvent être utilisés pour contrôler la viabilité de *P. carinii*. En effet, les trophozoïtes sont de très petite taille et les kystes, de par leur structure à paroi épaisse, ne permettent pas le passage des colorants vitaux. Toutefois, deux tests différents sont employés pour tenter de savoir si la toxine "killer" de *P. anomala* a réellement un effet sur la viabilité du parasite ou si par son interaction avec la surface du parasite, elle gêne simplement son attachement aux cellules et donc son développement.

Les deux tests de viabilité retenus sont fondés sur l'utilisation de deux fluorochromes que

sont l'iodure de propidium (IP) et le 5-(6)-carboxyfluorescéine (CF), et de l'acide para-aminobenzoïque-³ [H] (pABA).

3.2.5.1 Utilisation de fluorochromes

Ce test combine l'utilisation de deux fluorochromes, l'iodure de propidium : IP (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) et le 5-(6)-carboxyfluorescéine : CF (Sigma Chemical Co., St Louis, USA). L'IP est un agent intercalant de l'ADN, capable d'atteindre le noyau lorsque la membrane de la cellule ou du parasite est lésée. Il émet alors une fluorescence rouge observable à une longueur d'onde de 545nm ou orange à une longueur d'onde comprise entre 450 et 490nm.

La CF est un substrat des estérases cytoplasmiques. Lorsque la cellule est vivante, la CF est clivée par des enzymes actives, libérant la fluorescéine qui émet une fluorescence verte à une longueur d'onde comprise entre 450 et 490nm.

Le protocole suivi est adapté de Kenneth *et al.* (1985). Après avoir incubé 100.10⁶ de *P. carinii* avec la toxine "killer" ou les molécules homologues (anticorps monoclonaux), ceux-ci sont centrifugés 5 min à 2900g. Les parasites sont alors resuspendus dans 200µl de PBS Dulbecco à température ambiante, en présence des deux fluorochromes (2µg/ml de CF et 0,6µg/ml de IP). L'incorporation des 2 fluorochromes est quasi immédiate, elle se fait en 3 min à température ambiante. Pour stopper la réaction, les échantillons sont placés à 4°C. Avant l'observation, les parasites sont centrifugés 5 min à 2900g et suspendus dans du SVF afin d'éliminer les fluorochromes libres. L'opération est répétée 3 fois. Les préparations sont observées en microscopie photonique (Axiophot, Zeiss, Allemagne), à une longueur d'onde d'excitation de 450-490nm et une longueur d'onde d'émission de 510nm. Dans ces conditions, les 2 fluorescences (rouge et verte) sont visibles simultanément.

Cette technique, semi-quantitative, permet d'apprécier la proportion de parasites vivants (fluorescence verte) par rapport aux parasites morts (fluorescence rouge). Des *P. carinii* fraîchement extraits et n'ayant subi aucun traitement sont utilisés comme contrôles positifs et des parasites incubés 30min avec du formaldéhyde à 10% dans l'eau sont les contrôles négatifs.

3.2.5.2 Test avec l'acide para-aminobenzoïque-³[H]

Ce test évalue la viabilité des parasites en mesurant l'incorporation d'un précurseur radiomarké de la synthèse des folates, l'acide para-aminobenzoïque (pABA). Il fut réalisé par l'équipe d'Helen Jackson (Cambridge).

Après traitement des parasites avec différentes molécules dont l'activité anti-*P. carinii* doit être testée, ils sont distribués en plaque de 96 puits (5.10⁷ noyaux/ml). Alors, le pABA-³ [H]

(dont l'activité spécifique est de 50Ci/mM) est ajouté pour obtenir une concentration finale dans chaque puits de 5 μ Ci/ml. La pentamidine, drogue agissant sur *P. carinii*, est utilisée comme contrôle positif à une concentration de 50 μ g/ml. La viabilité est mesurée par rapport au contrôle en absence de drogue. Les échantillons sont incubés une nuit à 37°C en atmosphère enrichie de 5% de CO₂. Puis, 2 lavages avec du PBS sont réalisés afin d'éliminer le pABA-[³H] non incorporé. Enfin, l'incorporation du pABA-[³H] est mesurée par un compteur à scintillation (Beckman LS 1800). Les données sont exprimées en coups par minute (cpm). La viabilité de *P. carinii* est proportionnelle au taux de pABA-[³H] incorporé.

3.3 Obtention de la toxine "killer" de *Pichia anomala*

3.3.1 Souche produisant la toxine "killer"

La souche de *Pichia anomala* qui produit la toxine "killer", nous a été donnée par le Pr. L. Polonelli (Institut de Microbiologie de Parme, Italie) et est enregistrée par l'ATCC sous le n°96603 (anciennement dénommée UCSC25F ou K36). Cette souche de *P. anomala* produit plusieurs toxines "killer". Toutefois, nous nous attacherons à une seule de ces toxines, la toxine "killer", pour laquelle nous possédons un anticorps monoclonal le MabKT4 (produit et donné par le Pr L. Polonelli).

3.3.2 Sensibilité des levures vis-à-vis de la toxine "killer"

Les toxines "killer" n'ont aucun effet sur les souches qui les produisent car elles possèdent des systèmes spécifiques d'"auto-immunité". L'activité "killer" de la toxine de *P. anomala* a d'abord été mise en évidence sur des cellules appartenant à plusieurs genres de levures sensibles. Il existe donc, de nombreuses souches de levures sensibles à la toxine "killer" de *P. anomala*. Toutefois, lors de ce travail, nous nous sommes attachés à quelques unes d'entre elles pour vérifier la bonne production de la toxine, ainsi que pour contrôler son effet "killer".

Les souches citées, sensibles à la toxine sont : *P. anomala* K3 (hautement sensible) M117 et *Candida albicans* 10S et B385.

Les souches résistantes sont : *P. anomala* K36 (souche productrice de la toxine), M109 et *C. albicans* 10R et N84.

3.3.3 Production en milieu non défini

La souche K36 de *P. anomala* est ensemencée dans du milieu Sabouraud liquide (BioMérieux, France), qui est un milieu non défini. Après une culture de 24h à 25°C, 5.10⁸

organismes de cette souche sontensemencés dans 100ml de Sabouraud liquide à pH4,6 (pH d'activité optimale de la toxine). Cette deuxième culture est incubée 48h à 25°C, centrifugée (2900g pendant 10min) et le surnageant contenant la toxine "killer" est filtré à 0,22 μ m. A ce stade, la toxine "killer" produite est dite "brute".

Pour établir la production effective de la toxine "killer", des tests ont été développés en milieu gélosé et en milieu liquide.

3.3.4 Test d'activité de la toxine "killer" en milieu gélosé

Le milieu contenant de l'extrait de levures (1%), de la peptone pancréatique (2%), du glucose (2%) et de l'agarose à 2% (YEPD) est dissout dans du tampon Mac Ilvain à pH4,6 (acide citrique 0,1M et phosphate disodique 0,2M) auquel est additionné du bleu de méthylène (0,1%). Ce milieu gélosé est coulé stérilement dans une boîte de Pétri. Le bleu de méthylène donne une couleur verte au milieu, ce qui permet de mieux visualiser les halos d'inhibition dûs à la toxine "killer".

Lorsque le milieu YEPD est pris en gélose, il suffit d'étaler de manière homogène, une souche sensible à la toxine "killer" ; nous avons utilisé préférentiellement *P. anomala* K3, très sensible à la toxine. Toujours stérilement, des puits sont ensuite effectués dans la gélose à l'aide d'un emporte-pièce.

La toxine "killer" produite comme précédemment décrit (3.3.4), est alors déposée dans chaque puits. Les boîtes de Pétri sont incubées à 25°C (température optimale d'activité de la toxine). Après 24h, si la toxine "killer" est active, la souche K3 ne se développe pas autour du puits rempli de toxine formant ainsi, un halo d'inhibition. Ainsi, l'activité de la toxine est évaluée de façon semi-quantitative par la mesure du diamètre d'inhibition. Cette technique, bien qu'efficace, est toutefois assez longue. De plus, les puits peuvent être irréguliers et engendrer des biais lors de la mesure des diamètres. C'est pourquoi, afin d'optimiser ces mesures d'activité, une méthode en milieu liquide a été développée.

3.3.5 Test d'activité de la toxine "killer" en milieu liquide

Ce test est basé sur des techniques qui évaluent la sensibilité de microorganismes aux antifongiques (Dei-Cas *et al.*, 1991). La souche sensible utilisée est *P. anomala* K3 repiquée 24h auparavant. Une suspension de 5.10⁶ levures de cette souche est introduite dans 1ml d'eau stérile. Après agitation, cette suspension de levures est diluée dans 12ml de milieu Sabouraud liquide à pH4,6 et distribuée dans une plaque de 96 puits (240 μ l/puits ; soit 10⁵ levures/puits). Pour mesurer l'activité "killer" de la toxine, on dépose 10 μ l de toxine dans chaque puits. Ces plaques sont

placées 24h à 25°C. La lecture est réalisée après agitation d'une minute, en évaluant par turbidimétrie la croissance de la souche sensible au spectrophotomètre (Jbio LP400, Techgen) à une longueur d'onde de 620nm (longueur d'onde qui élimine l'absorbance du plastique).

Les contrôles positifs sont des microcultures dans le même milieu sans toxine. En pratique, la difficulté réside en une bonne homogénéisation des levures afin d'obtenir des microcultures avec le même nombre d'organismes. Pour limiter les écarts de mesure, les tests sont répétés sur 5 microcultures pour chaque concentration de toxine "killer".

3.3.6 Prépurification de la toxine "killer" par chromatographie en gel-filtration

La toxine "killer" de *P. anomala* K36 est prépurifiée par chromatographie gel-filtration dont le principe repose sur la séparation des molécules en fonction de leur poids moléculaire.

La colonne de 45cm de long sur 1,5cm de diamètre, est remplie de gel de Séphadex (Ultrogel, IBF, Biotechnics), en tampon Mac Ilvain. Afin de conserver l'activité biologique de la toxine "killer", ce tampon d'élution est utilisé à un pH de 4,6 (pH optimal d'activité "killer"). Au cours de la chromatographie, le débit d'élution est maintenu constant, entre 10 et 12ml/h, à l'aide d'une pompe péristaltique. Les protéines contenues dans les différentes fractions sont détectées à l'aide d'une lampe UV à une longueur d'onde de 280nm (Uvicord SII-2238, LKB, Bromma). Le pic visualisé est tracé sur un enregistreur (2210, LKB, Bromma). Un collecteur de fractions (2112, LKB, Bromma) est placé en fin de colonne.

La toxine "killer" de *P. anomala* obtenue dans les cultures est considérée comme toxine brute. Cependant, pour des études biochimiques, cette toxine doit être purifiée. Ainsi, après avoir filtré le surnageant contenant la toxine "killer", les protéines sont précipitées en présence de sulfate d'ammonium (à 80% de saturation) à 4°C avec une agitation toutes les 10min pendant 1h. Après une centrifugation de 10min à 9000g, le culot est resuspendu dans un faible volume de tampon Mac Ilvain à pH4,6.

Cette solution protéique est alors éluee par chromatographie en gel-filtration. Plusieurs types de gel (Aca34, 44 et 54, avec un pourcentage de polyacrylamide et d'agarose variable dans le gel), ont été testés avant d'obtenir une gamme de fractionnement comprise entre 10 et 130 KDa (Aca 44, Ultrogel, IBF, Biotechnic). Le tampon d'élution est le tampon Mac Ilvain (pH4,6), afin de contrôler à la sortie de la colonne l'activité biologique des différentes fractions recueillies. Ainsi, à la sortie de la colonne, un collecteur recueille des fractions de 2ml, chacune d'entre elles sera testée par les deux méthodes décrites précédemment (3.3.4 et 3.3.5), afin d'identifier la ou les fractions contenant la toxine "killer" qui est alors dénommée toxine "killer" prépurifiée.

3.3.7 Etudes biochimiques

L'analyse électrophorétique est effectuée en parallèle sur des extraits de levures provenant de la souche de *P. anomala* K36 et sur une fraction contenant la toxine "killer" prépurifiée après chromatographie gel-filtration.

- Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)

L'électrophorèse est réalisée en milieu dénaturant avec du sodium dodécyl sulfate (SDS). Le gel de séparation d'une hauteur de 15cm et d'une épaisseur de 0,75mm contient 12% d'acrylamide (38,96% d'acrylamide et 1,04% de bis-acrylamide) (Interchim, Montluçon, France) en tampon Tris-HCl (375mM), SDS (0,1%) à pH8,8. Le gel de concentration contient 5% d'acrylamide en tampon Tris-HCl (125mM), SDS (0,1%) à pH6,8.

Les échantillons extraits de levures (la souche K36 subit plusieurs congélation-décongélation) et la fraction de toxine "killer" prépurifiée (264 μ g de protéines/cm) sont repris dans du tampon Tris-HCl (62,5mM à pH6,8) contenant 2% de SDS, 10% de saccharose et 0,2% de bleu de bromophénol. L'addition de dithiothréitol (DTT 0,1M) permet de réduire les ponts disulfures intra et inter chaînes polypeptidiques. Avant d'être déposés sur le gel, les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 10min. Des marqueurs de poids moléculaires (bas poids moléculaires, Pharmacia ; hauts poids moléculaires, Sigma) sont utilisés. La migration s'effectue à ampérage constant (30mA par gel de 0,75mm d'épaisseur) pendant 150min en tampon Tris (25mM), glycine (192mM) et SDS (0,1%) à pH8,3.

- Immunoélectrotransfert

La détection des protéines est réalisée par le technique d'immunoélectrotransfert. Les protéines séparées par SDS-PAGE sont transférées électriquement sur une feuille de nitrocellulose selon la technique de Towbin *et al.* (1978). Le gel de séparation est déposé sur une feuille de nitrocellulose (porosité 0,45 μ m, Schleicher et Schuell, France) imprégnée de tampon de transfert (glycine 39mM, Tris 48mM, SDS 0,037%, méthanol 20%, pH8,9). L'ensemble est inséré entre 2 séries de feuilles de papier Whatman (3MM Chr) imbibées du même tampon. Le transfert est effectué dans un appareil de transfert semi-sec (LKB) à ampérage constant (0,8mA/cm²) pendant 1h. Pour vérifier le transfert des protéines, la feuille de nitrocellulose est colorée 10min par une solution contenant 0,2% de rouge Ponceau et 3% d'acide trichloroacétique, puis rincée à l'eau distillée.

Des bandes correspondant aux pistes d'électrophorèse sont découpées dans la feuille de

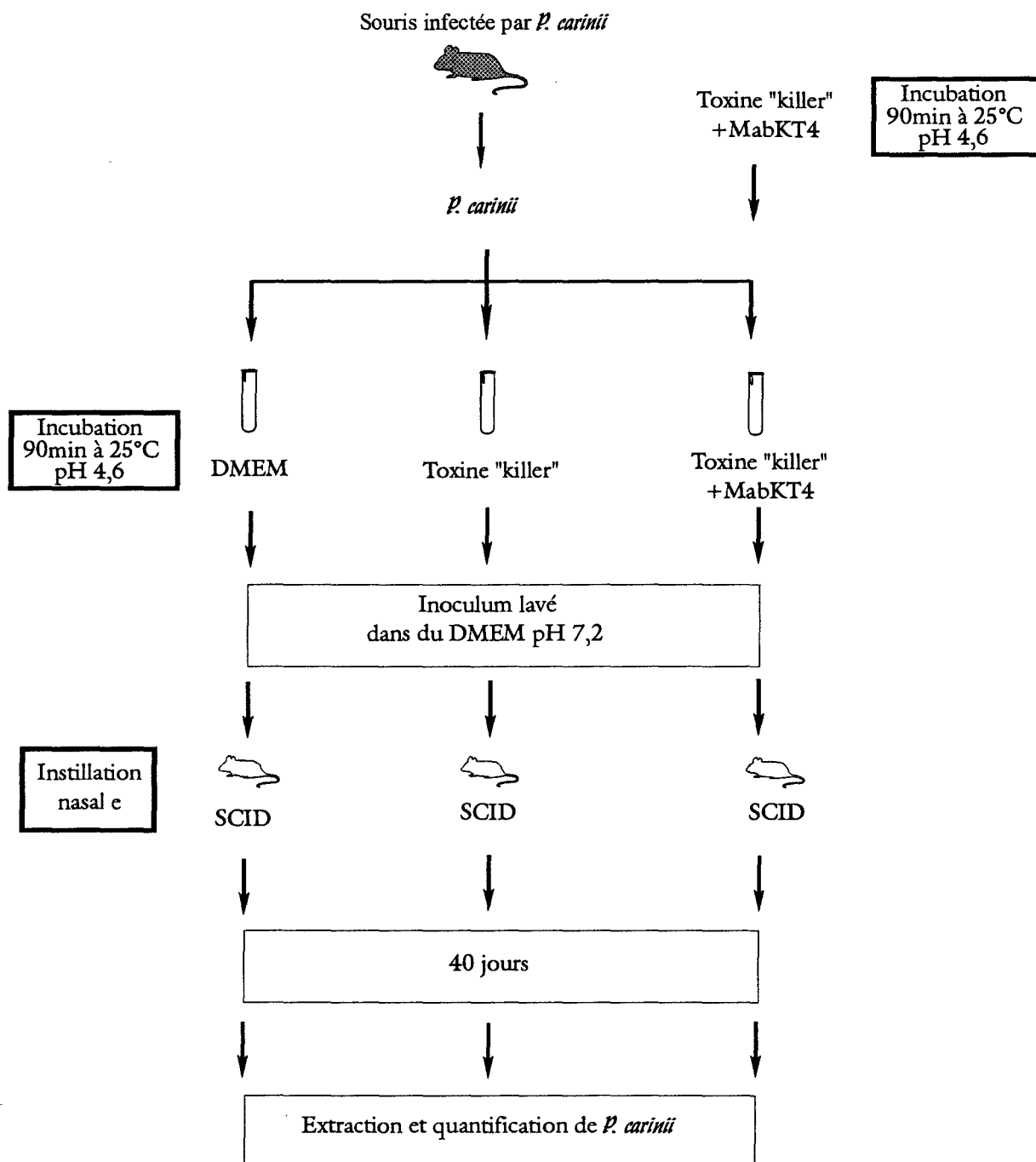


Figure 8: Evaluation *in vivo* de l'activité de la toxine "killer" de *P. anomala* sur l'infectivité de *P. carinii*.

nitrocellulose et saturées ou non pendant 30min dans du lait (5%) et du tampon TNT(Tris-HCl 15mM, pH8, NaCl 140mM et 0,05% de Tween 20). Après un lavage de 10min en TNT, les bandes sont incubées avec le MabKT4 dans le TNT pendant 1 à 2h à température ambiante. Trois lavages avec le tampon TNT sont ensuite effectués ; puis les bandes sont incubées avec une solution d'immunoglobulines spécifiques du 1^{er} anticorps (anti-IgG) marquées à la phosphatase alcaline (Proméga, France) et diluées au 1/7500 dans du tampon TNT. Les bandes sont lavées 3 fois avec du tampon TNT et 1 fois avec un tampon de révélation (Tris-HCl 100mM, pH9,5 ; NaCl 100mM et MgCl₂ 5mM). La révélation est réalisée à l'obscurité par addition du substrat 5-bromo-4chloro 3-indolyl phosphate (Proméga) et du colorant nitrobleu de tétrazolium (Proméga) dilués dans le tampon de révélation. Les bandes sont ensuite rincées à l'eau, séchées et juxtaposées aux marqueurs de poids moléculaires colorés au rouge Ponceau afin de déterminer le poids moléculaire des protéines reconnues par le MabKT4.

3.3.8 Prétraitement de *Pneumocystis carinii* avec la toxine "killer"

La toxine "killer" ayant une activité antibiotique optimale à 25°C et à pH4,6, son activité est évaluée sur *Pneumocystis* en préincubant les parasites avec la toxine dans ces conditions pendant 90min, avant de procéder à l'inoculation des animaux ou des boîtes de cultures.

Les contrôles incluent la préincubation des parasites à 25°C et pH4,6 pendant 90min, dans un milieu sans toxine. De même, pour contrôler la spécificité de la toxine "killer", le MabKT4 (anticorps monoclonal neutralisant l'effet "killer" de la toxine) est au préalable incubé avec la toxine pendant 90min à 25°C. Ce complexe, incubé ensuite 90min à 25°C avec les parasites, est utilisé comme contrôle de la spécificité de l'action de la toxine. Dans tous les cas, les parasites sont traités de la même manière quelques soient les drogues mises en présence. Ils sont ensuite centrifugés (2900g pendant 10min) et resuspendus dans du DMEM sans sérum de veau foetal (SVF) à un pH de 7,2. Cette stratégie est employée tant pour les manipulations *in vitro* (tests d'attachement), que lors des expériences *in vivo* (tests d'infectivité, Figure 8).

3.4 Production d'anticorps monoclonaux anti-idiotypiques de rat

En vue d'évaluer directement l'activité des molécules "killer" sur *Pneumocystis* sans recourir à la préincubation des parasites avant leur inoculation, des molécules ayant le même effet "killer" que la toxine, c'est-à-dire inhibés par MabKT4 mais actives à pH7,2 et à 37°C, sont nécessaires. Ainsi, des anticorps monoclonaux anti-idiotypiques reproduisant l'effet antibiotique de la toxine de *P. anomala* ont été obtenus selon la technique décrite ci-dessous.

3.4.1 Immunisation des rats

Des rats Fischer 344 reçoivent 4 injections sous-cutanées du MabKT4 (58 µg/ml) dirigé contre la toxine "killer" ; deux injections surviennent 15j et 90j après la 1^{ère}. La dernière injection est pratiquée 3 jours avant la fusion, pour optimiser la production d'IgG. Lors des injections 2, 3 et 4, les rats reçoivent une dose immunisante administrée en 10 piqûres de 100 µl d'une solution contenant du PBS Dulbecco (dilué au 1/2), de l'adjuvant incomplet de Freund (dilué au 1/2) et du MabKT4 (dilué au 1/200), excepté pour la 1^{ère} injection où l'adjuvant incomplet de Freund est remplacé par de l'adjuvant complet. Le rat contrôle a subi les mêmes injections sans l'anticorps monoclonal. Il sera donc possible de comparer la présence d'anticorps dans le sérum des 2 animaux.

3.4.2 Préparation du matériel cellulaire

3.4.2.1 Cellules de myélome

La lignée de myélome de rat (IR983F) est cultivée avec du DMEM additionné de 10% de SVF (Bazin, 1982). Ces cellules sont déficientes en une enzyme, l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT) qui assure une étape essentielle de la voie alterne, une des voies de la synthèse des nucléotides. Cette enzyme permet la réaction entre un phosphoribosyl pyrophosphate et une base purique, pour former un nucléotide purique monophosphate. La souche est relancée avant la fusion afin de vérifier l'absence de contamination.

3.4.2.2 Cellules péritonéales

Des cellules péritonéales de souris sont prélevées 48h avant la fusion et réparties sur des plaques de 24 puits avec du DMEM supplémenté avec 15% de SVF. La manipulation a lieu quelques jours avant la fusion, pour vérifier que ces cultures sont dépourvues d'agents contaminants et pour que les cellules aient le temps de bien adhérer au fond des puits.

Les macrophages péritonéaux sont utilisés comme nettoyeurs (ou éboueurs) des cellules mortes facilitant ainsi l'adaptation des hybridomes à leur milieu.

3.4.3 Fusion

3.4.3.1 Préparation des cellules spléniques

Après avoir vérifié le taux d'anticorps produit par l'animal immunisé avec le MabKT4, la rate est prélevée, puis écrasée dans du DMEM sur un film de nylon (Blutex, Polylabo, France), reposant sur une boîte de Pétri en verre. Ce broyat est tamisé à travers le film de nylon avec du

DMEM. La boîte de Pétri est rincée plusieurs fois avec du DMEM afin de récupérer toutes les cellules spléniques. Trois centrifugations (900g pendant 5min) sont réalisées en DMEM et les cellules sont reprises par un volume défini de milieu en vue d'une numération.

3.4.3.2 Préparation des cellules de myélome

Les cellules de myélome déposées dans des plaques de 24 puits sont lavées 3 fois avec du DMEM pour éliminer le SVF nécessaire à la culture, mais qui gêne lors de la fusion. Le filtrat de la rate et des cellules de myélome ainsi préparés, sont centrifugés à 900g pendant 10 min.

3.4.3.3 Numération et viabilité cellulaire

Après numération des cellules spléniques (excluant les hématies) et des cellules de myélome, leurs viabilités sont évaluées à l'aide d'un colorant vital d'exclusion, le bleu trypan. Ainsi, 1/5^{ème} des cellules myéломateuses sont mélangées avec les cellules de la rate. Après centrifugation à 900g pendant 10 min, le culot est resuspendu dans du DMEM et la fusion entre les deux types cellulaires peut avoir lieu.

3.4.3.4 Fusion

Sous agitation douce et continue, 1ml de polyéthylène glycol (PEG-400, Prolabo, France) est ajouté, goutte à goutte, à la suspension de cellules de myélome et spléniques. Cette opération est réalisée assez rapidement, car le PEG toxique, ne doit pas rester trop longtemps en contact avec les cellules. Ensuite, 1 puis 10ml de DMEM sont additionnés, toujours goutte à goutte, tout en agitant. Finalement, 10 ml supplémentaires sont ajoutés.

Après 10min de centrifugation à 900g, le culot cellulaire est resuspendu dans un milieu sélectif : contenant de l'hypoxantine, l'aminoptérine et la thymidine (HAT, Sigma Chemical Co., USA) et du DMEM, 20% SVF, 1% de pyruvate, sans antibiotiques.

Ce milieu HAT permet d'éliminer les cellules de myélome qui n'ont pas fusionné. En effet, ces cellules déficientes en HGPRT, ne peuvent synthétiser les nucléotides en présence d'aminoptérine. Par contre, les lymphocytes spléniques possèdent cette enzyme, mais ne se divisent pas. Ainsi, seules les cellules qui ont fusionné (les hybridomes), qui possèdent donc cette enzyme, peuvent se multiplier en utilisant l'hypoxantine et de la thymidine pour la synthèse des néonucléotides, par la voie alterne (Kohler *et al.*, 1975).

Sur des plaques de 24 puits, 5.10⁵ cellules sont déposées dans chaque puits. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% en CO₂. Une dizaine de jours plus tard, les premiers hybridomes de rat apparaissent. En général, à partir d'une rate, 12 plaques de 24 puits

peuvent être ensemencées. Chaque hybridome parvenu à confluence est repiqué afin d'établir s'il possède les propriétés anti-idiotypiques recherchées, c'est-à-dire exprimant une activité mimant l'action de la toxine "killer".

Trois à quatre semaines après la fusion, estimant que seuls les hybridomes se développent, le milieu HAT est progressivement changé en milieu HT (sans aminoptérine), dans du DMEM avec 15% de SVF.

3.4.4 Criblage

Pour effectuer le criblage, le test utilisé doit être de préparation rapide et avec une lecture qui n'excède pas 24h. En effet, lorsque la culture des hybridomes est commencée, c'est journalièrement qu'il faut surveiller et tester plusieurs dizaines de surnageants, afin de ne pas entretenir inutilement des hybridomes négatifs. Ainsi, le test biologique sélectionné pour le criblage est le test d'activité en milieu liquide (3.3.5).

Vingt-quatre heures avant le criblage, la souche sensible de *P. anomala* K3 est entretenue sur le milieu de Sabouraud gélosé, afin d'obtenir une culture en phase exponentielle de croissance. Pour réaliser le test d'activité, $5 \cdot 10^5$ organismes sont resuspendus dans du Sabouraud liquide. Le surnageant de chaque hybridome ($10 \mu\text{l}$) est introduit dans chaque puits, et complété avec $240 \mu\text{l}$ de suspension de Sabouraud contenant la levure sensible.

Les contrôles indispensables à la lecture sont au nombre de 6.

- Le 1^{er} est le milieu de Sabouraud seul, qui permet d'effectuer le blanc au spectrophotomètre.
- Le 2^{ème} contrôle est le contrôle positif : la microculture de *P. anomala* K3 en Sabouraud liquide.
- Le contrôle négatif est la microculture de *P. anomala* K3 dans le milieu de Sabouraud en présence de toxine "killer", il permet de déterminer le taux d'inhibition maximum de croissance des levures.

Comme les surnageants d'hybridomes se trouvent dans un milieu défini et contenant de l'HAT, il faut doubler les contrôles cités en ajoutant de l'HAT.

- Ainsi, le 4^{ème} témoin est le blanc. Il est constitué du milieu de Sabouraud liquide additionné de HAT (quantité identique à celle ajoutée pour tester l'activité des surnageants d'hybridomes, soit $10 \mu\text{l}$).
- Le 5^{ème} contrôle est constitué du même mélange en présence de la souche sensible K3.
- Le dernier contrôle est représenté par le mélange de Sabouraud liquide et d'HAT additionné des surnageants de cellules de myélome non inhibiteurs, mais qui libéreront dans le milieu de culture les mêmes métabolites que les hybridomes.

Les plaques ainsi préparées sont incubées à 25°C pendant 24h. La mesure de la turbidité

du milieu, proportionnelle à la croissance des levures, est effectuée par un spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 620nm. Trois microcultures sont effectuées pour chaque surnageant d'hybridomes. L'inhibition a été considérée comme significative quand la moyenne des densités optiques était inférieure à celle obtenue lors de l'addition des surnageants de cellules de myélome. Seuls les surnageants d'hybridomes qui inhibent fortement la croissance de *P. anomala* K3 sont conservés.

3.4.5 Clonage

Le clonage résulte d'une dilution limite d'un des hybridomes sélectionné, en plaque de 96 puits contenant des macrophages péritonéaux. Les surnageants des différents clones sont à leur tour testés en milieu liquide (3.3.5). Le surnageant possédant la plus grande activité inhibitrice vis-à-vis de la souche K3 pourra être utilisé dans les différentes expérimentations, directement sans préincubation, puisque son activité est optimale à une température de 37°C et un pH de 7,2.

Les clones positifs sont cryopréservés dans du SVF additionné de 10% de diméthyl sulfoxyde dans l'azote liquide. L'anticorps monoclonal MabK10, est utilisé pour nos expériences ultérieures.

3.5 Nébulisation des rats nude avec l'anticorps monoclonal anti-idiotypique

Un modèle de traitement par nébulisation des rats nude faisant une pneumocystose est mis au point, en utilisant l'anticorps monoclonal anti-idiotype le plus actif *in vitro*, le MabK10.

Les rats nude sont infectés par *P. carinii*, par voie trachéale (3.1.6.2). Soumis à un traitement par des corticoïdes, ils développent une pneumocystose après 30 jours. Quatre rats nude femelles âgées de 8 semaines sont réparties en 4 groupes. Un animal par groupe est sacrifié 30 jours après l'inoculation afin de vérifier le taux de parasites présents dans les poumons (le poids moyen des rats est alors de 110g). Les 3 rats restants reçoivent par nébulisation différent un traitement suivant les lots.

Le groupe 1 reçoit uniquement de l'eau physiologique.

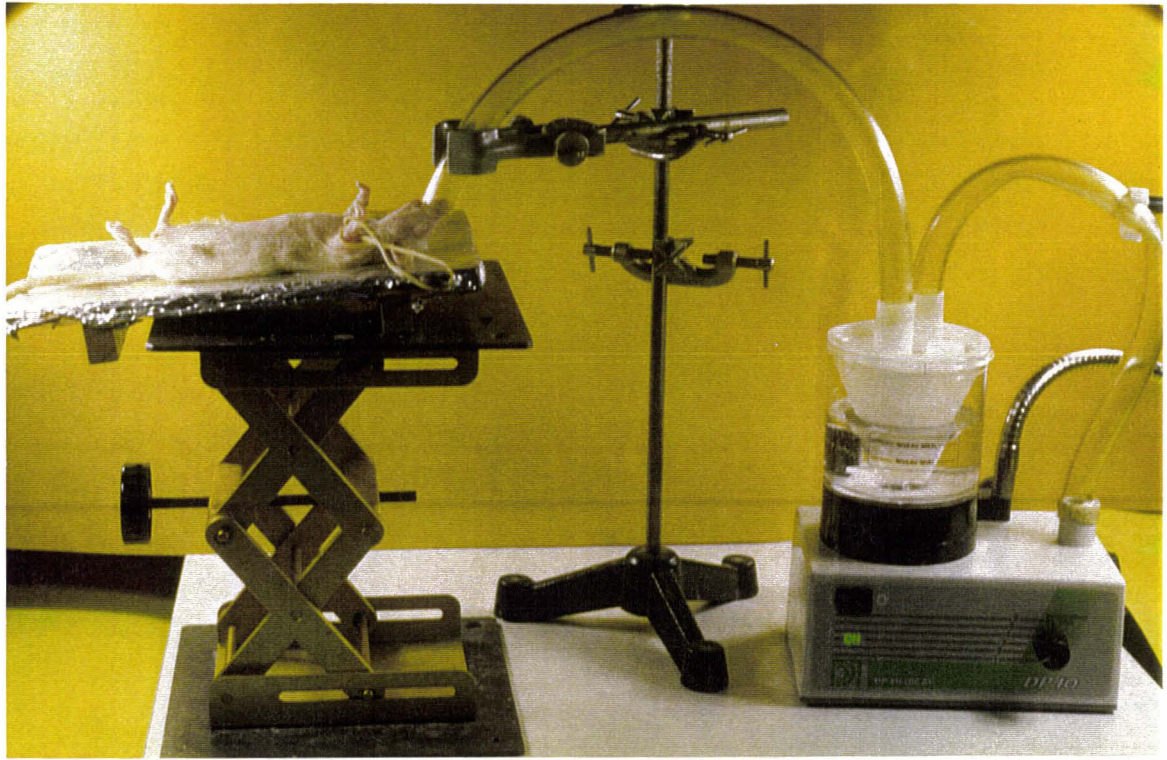
Le groupe 2 reçoit le MabK10 produit (2mg/ml) dans l'eau physiologique.

Le groupe 3 est nébulisé avec le MabK10 incubé au préalable avec le MabKT4 (90min à 37°C). C'est le contrôle de spécificité.

Le groupe 4 reçoit de l'iséthionate de pentamidine (Pentacarinat[®], Laboratoire Roger Bellon, Rhône-Poulenc, France), drogue agissant sur *P. carinii* et utilisée à la même concentration que le MabK10, c'est-à-dire à 2mg/ml.

La nébulisation est pratiquée avec un appareil DP 10 (DP médical, Meylan, France) qui

Figure 9 : Modèle de nébulisation chez le rat nude.



nous a été gentiment prêté par le Dr. Monique Brun-Pascaud (INSERM U13, Paris). Cet appareil élabore de fines gouttelettes par sonication. Ainsi, les solutions contenant les drogues sont nébulisées. La concentration des molécules introduites dans l'eau physiologique est calculée en fonction de plusieurs paramètres : le débit ventilatoire du rat (300ml/min), le débit d'air adapté au bon fonctionnement de l'appareil (20ml/min), le débit du liquide souhaitable (0,5ml/min). La durée de la nébulisation est en moyenne de 15min, ainsi le volume inhalé par le rat est : $300 \times 15 = 4500$ ml. De plus, si le rat doit prendre 2mg/kg de pentamidine (0,22mg/rat), il faut calculer la concentration de la solution à nébuliser de la manière suivante :

$$\frac{[\text{solution}] \times 0,5\text{ml/min}}{20\text{l/min}} = 0,22\text{mg}/4,5\text{l} \quad \text{soit } [\text{solution}] = 2\text{mg/ml}$$

Les différentes molécules sont mélangées à de l'eau physiologique et le volume final est de 11,5ml. Toutefois, après la sonication, un volume mort de 4ml reste dans la coupelle. Les rats ne inhalent donc 7,5ml de solution.

Les nébulisations sont réalisées sur un animal anesthésié comme précédemment décrit (Figure 9), à raison de 2 nébulisations par semaine pendant 3 semaines, soit 6 nébulisations par animal. Le lendemain du dernier traitement, les rats sont sacrifiés et les parasites sont extraits au Stomacher (3.1.4) en vue de leur numération.

3.6 Etudes cytologiques

Deux types de coloration sont disponibles pour mettre en évidence le parasite. Les premières permettent d'observer uniquement la paroi kystique (avec les techniques d'imprégnation à l'argent, le bleu d'orthotoluidine-O) ou le kyste plein (Gomori-Grocott associé au Giemsa). Les secondes sont de type panoptique, elles permettent de visualiser le matériel intrakystique et les trophozoïtes (Giemsa, RAL-555).

3.6.1 Coloration sur lame

Deux colorations sont associées tout au long de cette étude, la coloration au bleu d'orthotoluidine (BTO) et le RAL-555.

Le BTO (Chalvardjian *et al.*, 1963) est une technique rapide et la coloration (15min) commence par une sulfatation (éther-acide sulfurique) qui estérifie les groupements hydroxyles des polysaccharides présents dans la paroi kystique. Le BTO peut alors réagir avec les esters. Ce phénomène est une métachromasie induite. De plus, l'étape de sulfatation permet de "digérer" le matériel pulmonaire et assure un bon contraste lors de l'observation microscopique. Les formes kystiques en violet pourpre se dégagent sur un fond bleu pâle. Les différents stades parasitaires

possédant une paroi cellulaire épaisse (prékystes intermédiaires, prékystes tardifs et kystes) seront donc visibles.

La coloration au **Giemsa**, permet l'identification de tous les stades parasitaires (Bommer, 1966). La paroi du kyste ne se colore pas et apparaît comme un halo clair. Les noyaux des trophozoïtes et des corps intrakystiques sont colorés en pourpre. Leur cytoplasme est bleuté.

La coloration au **RAL-555**, quant à elle plus rapide (moins de 2min), est également une coloration panoptique et permet une visualisation de tous les stades parasitaires.

3.6.2 Préparations histologiques

L'effet antibiotique des molécules "killer" sur le développement parasitaire *in vivo* a été analysé histologiquement. Après sacrifice des animaux traités (rats ou souris), un petit morceau de poumon est fixé dans du formaldéhyde tamponné à 2%. Il s'ensuit une déshydratation (3 bains d'1h dans l'éthanol 95°, 2 bains d'1h dans l'éthanol 100°, 3 bains de 30min dans le toluène) jusqu'à l'inclusion en paraffine (2 bains de 30min et d'1h). La déshydratation et l'inclusion sont réalisées par un appareil automatique (Tissue Tek II, Sakura fine technical Co. LTD, Japon). Les coupes de 5-7 μ m d'épaisseur obtenues à l'aide d'un microtome (Leitz Wetzlar, Allemagne) sont étalées sur film de gélatine, déposées sur lame de verre puis séchées au four à micro-onde (mode décongélation) pendant 10min. Des coupes sériées sont effectuées afin de comparer les mêmes zones tissulaires avec des colorations différentes, comme le Gomori-Grocott et l'hématoxyline-éosine-safran (HES).

Le **Gomori-Grocott** (Grocott, 1955) est basé sur le principe de l'imprégnation par une solution de méthénamine d'argent. Les parois kystiques apparaissent colorées en brun noir. L'absence de couche intermédiaire dans la paroi des trophozoïtes explique qu'ils ne soient pas colorés par cette technique, le nitrate d'argent ayant une affinité sélective pour cette couche (Yoshikawa *et al.*, 1987).

L'**HES** met en évidence la structure de l'organe ainsi que d'éventuelles perturbations dues à la présence de *P. carinii*. L'hématoxyline colore en violet les noyaux, l'éosine en rose les cytoplasmes et le safran en jaune-orangé le collagène et les fibres conjonctives.

3.6.3 Immunolocalisation de la toxine "killer" sur *Pneumocystis carinii*

Des expériences de fluorescence indirecte sont réalisées pour localiser les sites de fixation du MabK10 sur le parasite. Elles sont effectuées avec une population de parasites fraîchement

extraits ou provenant de culture, le site de fixation du MabK10 se trouvant à la surface des parasites. Après incubation 1h à 37°C en chambre humide du MabK10 (dilué à 1/100) sur des parasites fixés par séchage, 3 lavages avec du PBS Dulbecco (sans Ca²⁺, ni Mg²⁺) sont effectués. Le MabK10 est une immunoglobuline de type M (IgM) de rat qui a été préalablement couplée à la biotine (la biotinylation est réalisée comme le préconise Bayer *et al.*, en 1980, par l'ester de succinimide). La biotine est révélée par la streptavidine–isothiocyanate de fluorescéine, diluée au 1/75 (Laboratoires Zymed, San Francisco, USA). Ces conjugués préparés dans une solution contenant du bleu Evans (1/500), sont au contact des parasites pendant 1h à 37°C (en chambre humide). Après 2 lavages pour ôter la fluorescéine non spécifique, les lames sont montées avec du Mowiol pour éviter une décroissance trop rapide de la fluorescence. Une fois séchées et à l'abri de la lumière, les lames peuvent être observées avec un microscope équipé pour l'épifluorescence (Axiophot, Zeiss, Allemagne) à une longueur d'onde d'excitation de 490nm et d'émission de 510nm.

3.7 Etudes ultrastructurales

A la suite de traitements réalisés sur des parasites fraîchement extraits ou de petits morceaux de poumon de souris SCID ou de rats nude, l'effet antibiotique de la toxine a pu être observé en microscopie électronique à transmission (MET).

3.7.1 Inclusion en résine hydrophobe : l'Epon®

Dans notre laboratoire, Palluault *et al.* (1992a et b) ont montré qu'une pression osmotique élevée durant la fixation préservait l'ultrastructure de *P. carinii*. En effet, les organites et le cytosol sont correctement préservés à des pressions osmotiques comprises entre 850 et 1300 mOsm.

Les parasites isolés sont fixés 1h et les petits morceaux de poumon (1–2mm³) 3h, à 4°C dans de la glutaraldéhyde (2,5%) et du tampon phosphate (Na₂HPO₄ 0,1M et NaH₂PO₄ 0,1M, pH7,5). La pression osmotique est ajustée à 850 mOsm par addition de NaCl (0,188M). Après 3 lavages de 20min dans du tampon phosphate (0,1M, pH7,5 ; NaCl 0,412M) à 4°C, les échantillons sont post-fixés 1h à température ambiante dans le même tampon contenant du tétraoxyde d'osmium (1% final). Les morceaux de poumon, comme les préparations de parasites, subissent ensuite une déshydratation dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes (allant de 70° à 100°). Les 2 derniers bains sont réalisés dans de l'oxyde de propylène.

L'imprégnation des parasites par la résine hydrophobe (Epon®) est initiée dans un mélange oxyde de propylène–Epon® (v/v) durant 12h à température ambiante, suivie de deux incubations de 3h en résine pure à 37°C. La polymérisation a lieu dans un dernier bain de résine

pendant 3 jours à 60°C.

Les coupes ultrafines sont effectuées avec un ultramicrotome (Reichert–Jung, Autriche). Elles sont recueillies sur grille membrannée (Formvar 1595E, Serva, Heidelberg, Allemagne) à un trou, avant de subir une double coloration à l'acétate d'uranyle (2% dans l'éthanol 50°) et au citrate de plomb (2,7%, m/v). L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi H-600 sous une tension de 75 KV.

3.7.2 Inclusion en résine hydrophile : London resin white (LRW)

Cette résine est préconisée pour l'immunodétection ultrastructurale. Elle permet ainsi l'immunolocalisation de la toxine sur *P. carinii*, car elle préserve les sites antigéniques à la surface des parasites.

Les échantillons pulmonaires sont fixés 2 à 4h à température ambiante dans une solution de formaldéhyde (1%), glutaraldéhyde (0,05%) en tampon phosphate (Na_2HPO_4 0,1M et NaH_2PO_4 0,1M, pH7,5) à une tonicité de 900 mOsm obtenue par addition de NaCl (0,3M) ou de saccharose (0,44M). Après 3 lavages avec le même tampon phosphate (0,1M, pH7,5) et la même pression osmotique (900 mOsm par ajout de NaCl à 0,41M), les parasites sont maintenus une nuit à 4°C dans le tampon phosphate.

La déshydratation a lieu dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes à -20°C, allant de 30° (10min à 4°C) à 70° (10min à -20°C). Les 2 bains d'éthanol à 95° se font à -20°C pendant 1h et contiennent la résine additionnée de benzoïle peroxyde (BP: 1,8%) à raison de 1 volume d'éthanol pour 2 volumes de LRW-BP.

Après 4 bains de 1h à -20°C de LRW-BP pur, la dernière préparation de 12h précède une inclusion de 1h à température ambiante dans la même résine. La polymérisation est meilleure après avoir chassé l'oxygène des échantillons par de l'argon. Elle est réalisée dans un nouveau bain de résine durant 3 jours à 37°C.

Les coupes ultrafines sont faites à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert–Jung, Autriche), et recueillies sur des grilles de nickel. L'immunolocalisation des sites récepteurs de la toxine "killer" ou du MabK10 peut être effectuée sur ces coupes.

3.7.3 Immunolocalisation de la toxine "killer" sur *Pneumocystis carinii*

La protéine A adsorbée sur des particules d'or colloïdal, est employée afin de localiser les récepteurs fixant la toxine à la surface du parasite. Ce complexe se lie sur les fragments Fc de l'anticorps primaire, le MabKT4. Pour amplifier le signal, on peut utiliser le fragment Fc d'un anticorps intermédiaire de lapin qui a une meilleure affinité pour la protéine A (Figure 10).

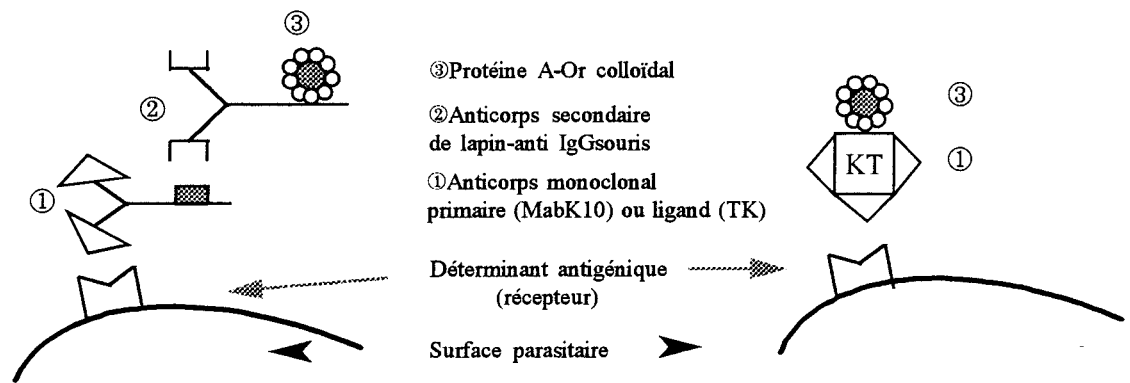


Figure 10 : Immunodétection ultrastructurale des récepteurs cellulaires de la toxine "killer" et des anticorps anti-idiotypiques à la surface de *P. carinii*.

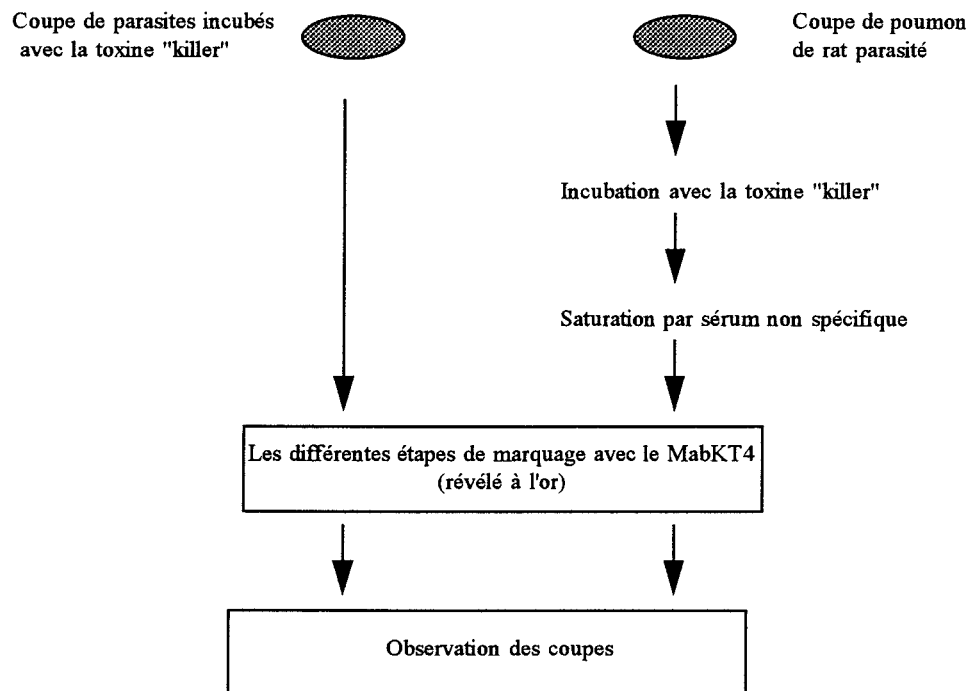


Figure 11 : Schéma d'immunolocalisation de la toxine "killer" sur *P. carinii*.

Ainsi, pour visualiser la localisation de la toxine "killer" sur le parasite, deux procédés sont utilisés : (i) en réalisant une incubation des parasites avec la toxine "killer" avant l'inclusion, (ii) en incubant, sur les coupes de poumon infectés par *P. carinii* la toxine "killer".

Dans ce 1^{er} procédé, le MabKT4 (dilué au 1/10) joue le rôle d'anticorps primaire (incubation de 90min à température ambiante). L'anticorps secondaire est un polyclonal de lapin anti-souris (IgG+IgM), dilué au 1/75, incubé pendant 90min à 37°C. Sur le fragment Fc de ce polyclonal vient se fixer la protéine A (diluée au 1/50) marquée à l'aide de particules d'or colloïdal (de taille 8nm) durant 90min. Après cette dernière incubation, les grilles sont lavées de nombreuses fois, puis contrastées à l'acétate d'uranyle aqueux à 4%.

Lorsqu'il s'agit de coupes de poumon, deux étapes supplémentaires sont ajoutées. Il s'agit de l'incubation de la toxine "killer" (90min à 25°C), puis de la saturation des sites antigéniques par la sérum albumine bovine (2%) mélangée à du PBS (Figure 11).

Dans toutes les immunodétections, le contrôle négatif est obtenu en omettant le MabKT4.

3.8 Etude statistique

Les résultats sont exprimés avec les écarts types (\pm DS). La différence du nombre de parasites est évaluée grâce au test de Student et pour établir les probabilités, nous utilisons le logiciel StatITCF. Ainsi, la probabilité (P) est considérée comme significative lorsque $P < 0,05$ (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

3-RESULTATS

Des expériences ont été entreprises pour mieux caractériser la nature biochimique de la toxine "killer" et évaluer son activité antibiotique sur des souches sensibles de levures. Puis, des études d'attachement et d'infectivité de *Pneumocystis carinii* sur la souris SCID et le rat nude ont permis de quantifier l'effet "killer" de cette toxine. Enfin, ces mêmes expériences d'attachement et d'infectivité ont servi à mesurer l'effet des anticorps monoclonaux et polyclonaux produits au cours de ce travail.

IV- PRODUCTION DE LA TOXINE "KILLER" EN MILIEU DÉFINI

Peu d'études ont été réalisées sur les toxines "killer" de *Pichia anomala*. Il est donc nécessaire dans un 1^{er} temps d'effectuer des tests pour évaluer l'activité biologique de la toxine "killer" de *P. anomala*. Cette toxine "killer" est produite de façon classique dans un milieu adapté à la croissance des champignons ou des levures : le milieu de Sabouraud. Ce milieu non défini, est utilisé à un pH de 4,6 (pH optimal d'activité de la toxine). Il est avant tout nécessaire de quantifier, de mesurer l'effet "killer" vis-à-vis de souches sensibles à la toxine essentiellement *P. anomala* K3.

4.1 Evaluation de l'activité "killer" sur milieu gélosé

La 1^{ère} évaluation est réalisée en milieu gélosé YEPDensemencé avec la souche sensible *P. anomala* K3 (3.3.4). L'effet de la toxine "killer" brute est bien visible, par la présence d'une zone d'inhibition de croissance de la souche sensible K3 (Figure 12a). Une évaluation semi-quantitative est obtenue en mesurant le diamètre d'inhibition. Plusieurs contrôles sont parallèlement réalisés pour vérifier que l'effet inhibiteur est propre à la toxine "killer":

-(i) culture en milieu de Sabouraud à pH4,6 afin de vérifier que l'inhibition obtenue n'est pas due à l'acidité du milieu (Figure 12b),

-(ii) culture dans le même milieu avec la toxine "killer" neutralisée par le MabKT4 (Figure 12c) pour contrôler la spécificité de l'effet "killer".

Des essais sont également effectués avec d'autres souches sensibles à la toxine "killer" de *P. anomala* (comme la souche 10S de *C. albicans*). Des résultats similaires sont observés avec toutefois un temps d'incubation plus long. En effet, 48h sont nécessaires pour visualiser le halo d'inhibition, alors que l'effet inhibiteur sur la souche de *P. anomala* K3 est présent après une incubation de seulement 24h.

Afin d'évaluer de manière plus précise l'effet inhibiteur de la toxine "killer" sur milieu gélosé, des dilutions limites de la toxine (contenue dans le surnageant de culture 3.3.3) sont

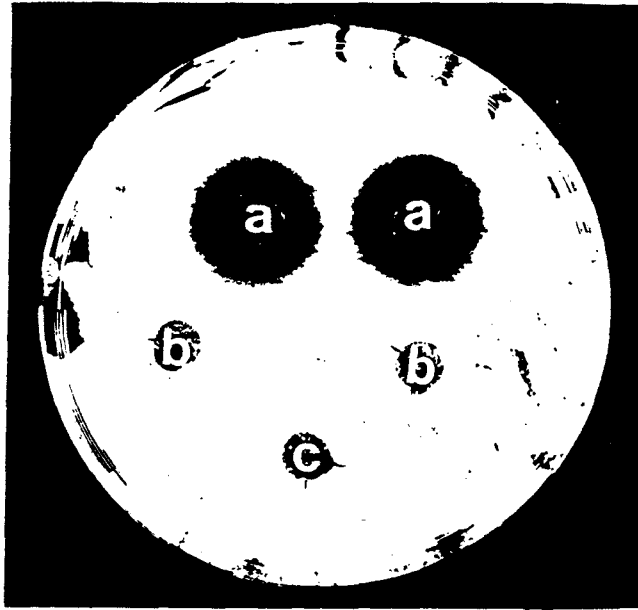


Figure 12 : Activité de la toxine "killer" de *P. anomala* sur la souche sensible *P. anomala* K3 déposée sur un milieu gélosé YEPD.

a) effet de la toxine "killer" ; b) premier contrôle avec le milieu DMEM pH4,6 ; c) contrôle de spécificité, la toxine "killer" est neutralisée par le MabKT4 (incubation préalable de la toxine "killer"+MabKT4 pendant 90min à 25°C).

Tableau 6 : Evaluation de l'activité de la toxine "killer" diluée sur la souche sensible de *P. anomala* K3.

	Activité "killer"	Diamètre d'inhibition (mm)
toxine "killer" brute, pH4,6	+++	17
toxine "killer" brute, pH7,3	-	0
toxine "killer" brute bouillie	-	0
toxine "killer" diluée, d:1/2	+++	15
toxine "killer" diluée, d:1/4	++	12
toxine "killer" diluée, d:1/8	+	10
toxine "killer" diluée, d:1/10	-	0
toxine "killer" diluée, d:1/16	-	0
toxine "killer" diluée, d:1/20	-	0

(+, ++, +++) activité croissante de la toxine "killer", (-) pas d'activité "killer" visible.

réalisées (Tableau 6). La dilution maximale efficace est une dilution au 1/8 pour un diamètre d'inhibition de 10mm sachant que le puits possède une ouverture de 8mm. Pour cette expérience, les contrôles révèlent que seule la toxine "killer" à pH acide est fonctionnelle, alors que pour la toxine "killer" produite à pH neutre ou bouillie, aucun effet n'est visible.

Ce test permet d'apprécier rapidement si une souche est sensible à la toxine "killer" de *P. anomala* K36. Toutefois, il ne donne qu'une mesure semi-quantitative de l'activité de cette toxine. Dans ces conditions, il est nécessaire de mettre au point un test plus sensible et plus précis, une méthode en milieu liquide qui permet d'évaluer l'activité "killer" de la toxine.

4.2 Evaluation de l'activité "killer" en milieu liquide

Avant tout, il faut définir le volume de toxine "killer" adéquat pour induire une inhibition de la croissance de souches sensibles. La méthode est mise au point avec la souche K3 de *P. anomala* en raison de sa sensibilité élevée à la toxine.

Ainsi, des volumes croissants de toxine "killer" (de 2 μ l à 150 μ l) sont introduits dans chaque puits en présence des levures K3 (10⁵ microorganismes/puits) et du milieu Sabouraud pour avoir un volume final de 250 μ l. En présence de différentes concentrations de toxine "killer" ajoutées au milieu, l'inhibition de croissance de K3 est proportionnelle à la concentration de la toxine. Toutefois, à partir d'environ 15 μ l de toxine par puits, l'effet antifongique de la toxine est maximal. Les différences obtenues ne sont plus significatives. Les contrôles négatifs sont : (i) des microcultures en milieu de Sabouraud, (ii) des microcultures avec de la toxine "killer" bouillie (100°C pendant 10 min, nous avons vu précédemment que la chaleur détruisait l'action de la toxine "killer"). Avec ces contrôles négatifs, aucun effet inhibiteur de la toxine "killer" n'est visible (Figure 13). Aussi, un volume de 10 μ l de toxine "killer" brute dans un volume final de 250 μ l s'est avéré suffisant pour évaluer le pouvoir inhibiteur de la toxine (Figure 13). Ce fût le volume retenu pour les expérimentations ultérieures.

Des essais sur la durée d'incubation des plaques ont également été effectués. Durant 24 à 72h, la croissance des levures augmente de manière importante. Cependant, au delà de 36h d'incubation, le nombre de levures est tel qu'il masque l'effet de la toxine "killer". Ainsi, une culture de 24h à 25°C, en utilisant la souche sensible K3, semble la plus adaptée pour ce test.

L'évaluation de l'activité de la toxine "killer" en milieu liquide se révèle être une technique qui permet de quantifier au moins comparativement l'activité d'un lot donné de toxine. Cette méthode est plus sensible et aussi rapide que l'évaluation en milieu gélosé, tout en utilisant des quantités réduites de toxine "killer".

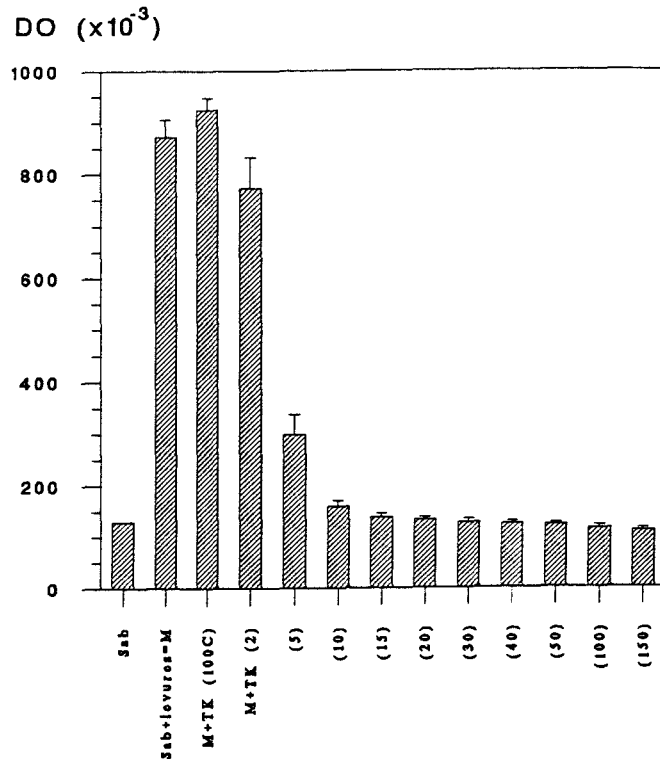


Figure 13 : Activité de la toxine "killer" de *P. anomala* en milieu liquide en fonction de la quantité de toxine déposée ($\mu\text{l/puits}$).

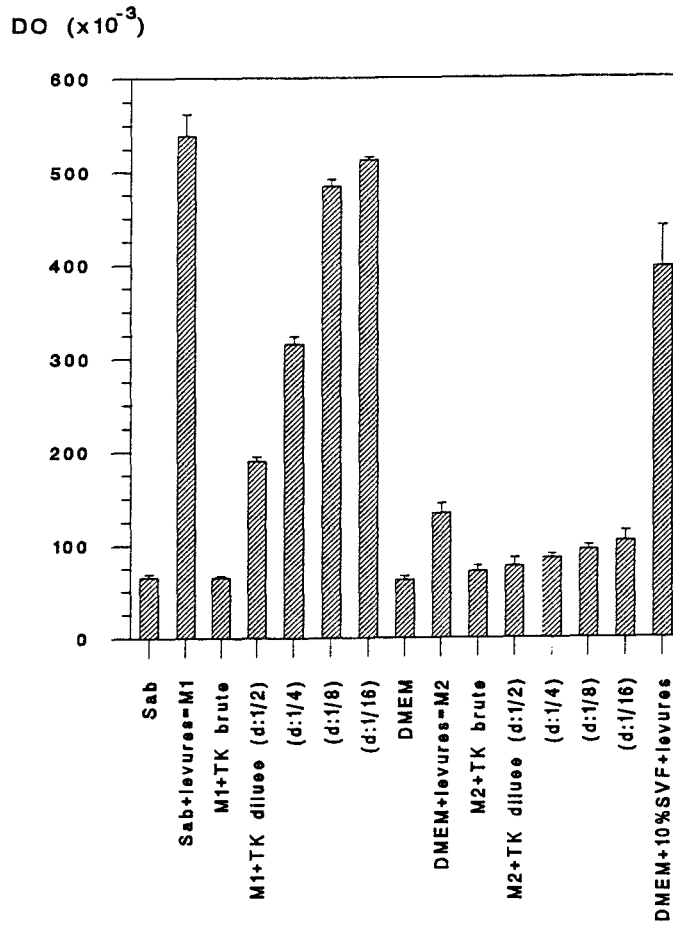


Figure 14 : Croissance de la souche K3 de *P. anomala* en milieu défini et non défini.

4.3 Activité de la toxine "killer" en milieu défini

De multiples essais pour produire la toxine "killer" en milieu défini ont été réalisés, dans un premier temps avec le DMEM seul, puis dans un deuxième temps avec du DMEM contenant des concentrations de SVF allant de 5 à 15%. Pour obtenir une activité "killer" optimale, le pH du milieu de culture, initialement de 7,2 est amené à 4,6. La température d'incubation est maintenue à 25°C. Cette activité est testée en milieu liquide.

Le milieu DMEM permet la croissance des levures de *P. anomala*. Encore fallait-il que la toxine produite dans ce milieu soit active. Pour cela, différentes levures sensibles sont utilisées, les souches M119 de *P. anomala* et 10S de *C. albicans*. Après ensemencement de la souche K36 dans les 3 milieux (Sabouraud, DMEM et DMEM plus du SVF), la toxine "killer" sécrétée est active quand l'incubation est réalisée à 25°C et à un pH4,6 (Figure 14). Toutefois, la croissance des levures est environ 4 fois inférieure en milieu DMEM sans SVF par rapport à celle obtenue dans le Sabouraud (Figure 14).

La supplémentation du SVF au DMEM favorise la croissance des levures. En effet, avec 10% de SVF, le taux de levures se rapproche de celui obtenu avec le milieu Sabouraud. Ainsi, plus la concentration en SVF est importante, plus les levures se développent. Cependant, les cellules ainsi cultivées, adhèrent fortement au fond du puits de culture et une agitation même prolongée ne parvient pas à les séparer, ce qui gêne la lecture au spectrophotomètre. Au vu de ces résultats, le milieu DMEM sera supplémenté de 10% de SVF afin de produire la toxine "killer" et de tester son activité en milieu liquide.

Par ailleurs, le milieu de culture enrichi permet une meilleure croissance des levures sensibles de *P. anomala* K3, d'environ 34% par rapport au milieu DMEM seul (Figure 14).

V- PRÉPURATION DE LA TOXINE "KILLER"

La toxine "killer" produite en Sabouraud ou DMEM, est sécrétée avec de nombreux autres métabolites provenant de la souche K36. De plus, elle est associée à des débris cellulaires. C'est pourquoi il a été envisagé de la purifier afin de la caractériser et démontrer que l'effet inhibiteur produit sur d'autres souches de microorganismes est réellement due à la toxine.

5.1 Mise au point de la méthode de prépuration en chromatographie gel-filtration

La chromatographie gel-filtration semble être la 1^{ère} étape nécessaire à la mise au point de la prépuration. Cette technique permet de maintenir la toxine "killer" à son pH optimal tout au long de la prépuration. Avant de pouvoir séparer cette toxine, des essais de précipitation de protéines contenues dans le surnageant sont réalisés en utilisant des pourcentages croissants

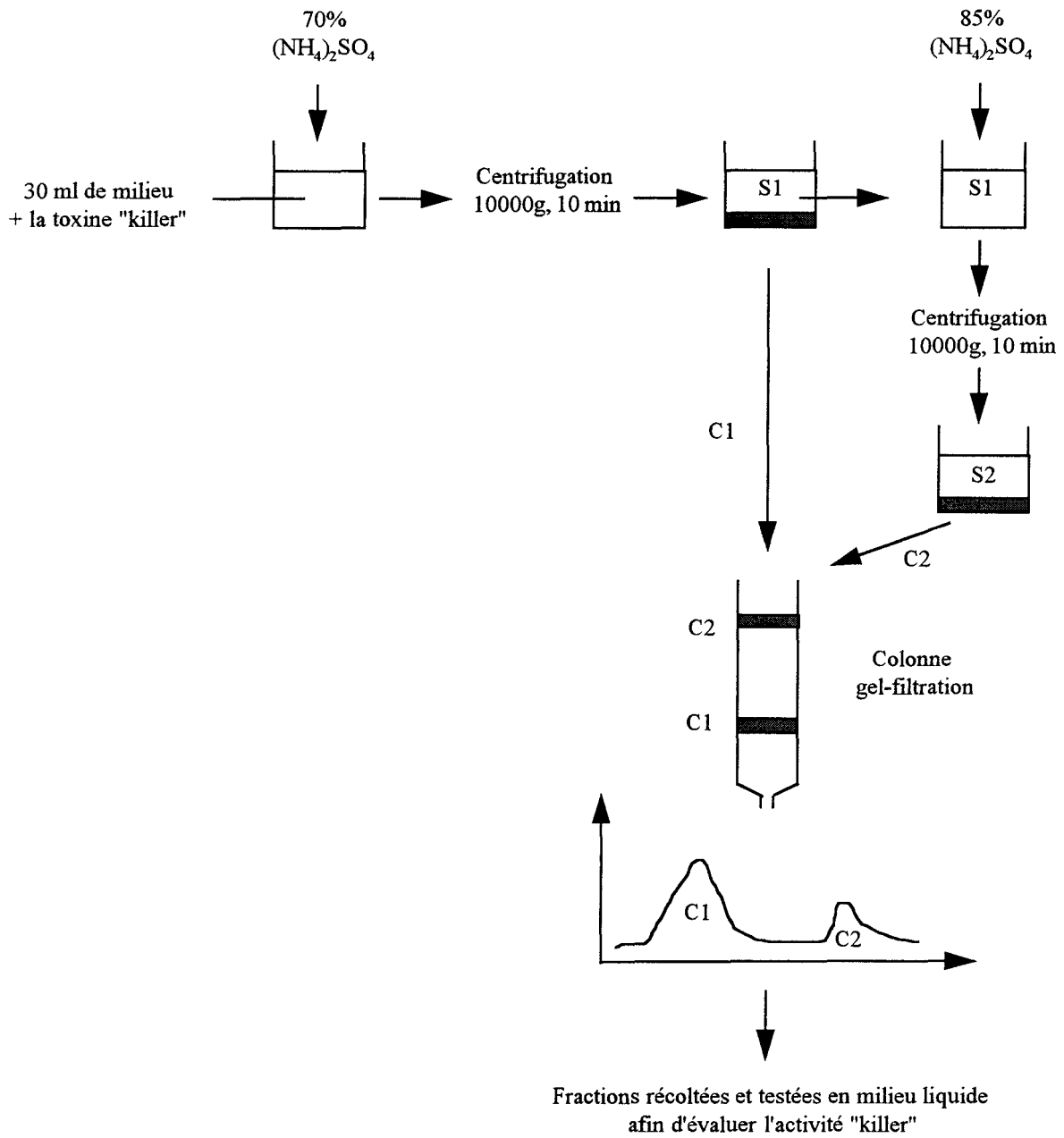


Figure 15 : Schéma de prépurification de la toxine "killer" après deux précipitations successives en sulfate d'ammonium $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$.

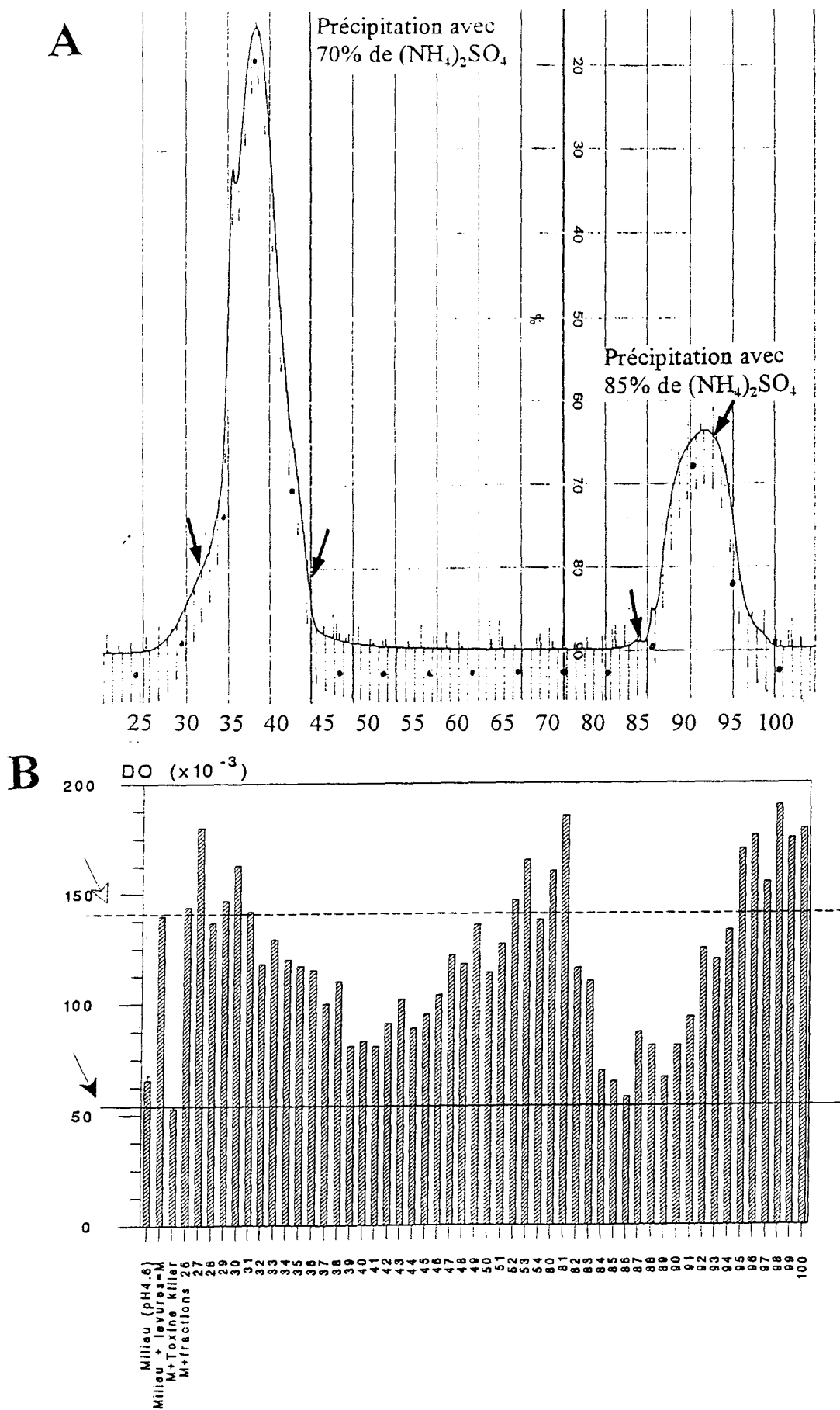


Figure 16 : Activité de la toxine "killer" en fonction de deux pourcentages en sulfate d'ammonium.

A : Courbe tracée par l'enregistreur après chromatographie gel-filtration (les flèches encadrent les fractions contenant la toxine).

B : Activité biologique de la toxine présente dans les différentes fractions (flèche noire: présence de la toxine ; flèche blanche : milieu sans toxine).

de saturation en sulfate d'ammonium.

5.1.1 Choix du pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium

Ces pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium vont de 30 à 85%. Le sulfate d'ammonium est mélangé au surnageant de culture de K36 contenant la toxine "killer". Les résultats révèlent qu'une solution de sulfate d'ammonium à 70% de saturation est nécessaire dans nos conditions expérimentales (3.3.7), pour précipiter les protéines du surnageant.

Toutefois, ne sachant si tous les métabolites cellulaires ont été précipités lors de la 1^{ère} étape, le surnageant est de nouveau précipité avec cette fois 85% de saturation en sulfate d'ammonium (Figure 15). Les protéines du culot sont récupérées après centrifugation à 10000g par un faible volume de tampon Mac Ilvain (pH4,6). La chromatographie par gel-filtration (avec un gel Aca34) des échantillons ainsi préparés permet non seulement de séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire, mais également d'éliminer les sels contenus dans l'échantillon après la précipitation en sulfate d'ammonium. Toutes les fractions éluées sont recueillies et testées en milieu gélosé ou liquide, afin de repérer les fractions contenant la toxine "killer".

Les tests d'inhibition de croissance effectués sur la souche sensible K3, montrent que même après une précipitation au sulfate d'ammonium à 85% de saturation (Figure 16B), le surnageant S2 contient encore de la toxine puisque une inhibition de croissance de K3 est encore visible en microculture. Cependant, la presque totalité des protéines se retrouvent dans le 1^{er} pic (Figure 16A) par rapport au 2^{ème} pic de moins grande amplitude. En analysant les résultats des figures 16A et 16B, l'allure des histogrammes révèle la présence de la toxine "killer" dans la presque totalité des fractions se situant au niveau des pics. Avec 85% de saturation en sulfate d'ammonium, l'activité de la toxine est très importante. Ce pourcentage de saturation s'est révélé plus efficace pour précipiter les protéines et une grande partie de toxine "killer", si l'on compare avec l'addition de 70% de saturation en sulfate d'ammonium (Figure 16B, fractions contenant la toxine "killer" 12 versus 19). Toutefois, il est important de trouver un compromis entre précipiter le maximum de protéines en augmentant le pourcentage en sulfate d'ammonium, et pouvoir resolubiliser le culot protéique après centrifugation, car plus la proportion en sulfate d'ammonium est importante, plus il est difficile de le resolubiliser, ce qui entraîne une perte de matériel. Ainsi, le pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium retenu est de 80%.

Le test biologique d'activité de la toxine en milieu liquide permet de localiser la toxine "killer" dans les fractions d'éluion (Figure 16). Ce test indique que le gel, Aca 34, ne sépare en rien les molécules produites par la souche de *P. anomala* K36. Des expériences ont donc été menées pour choisir le type de gel permettant un fractionnement plus efficace et la séparation de

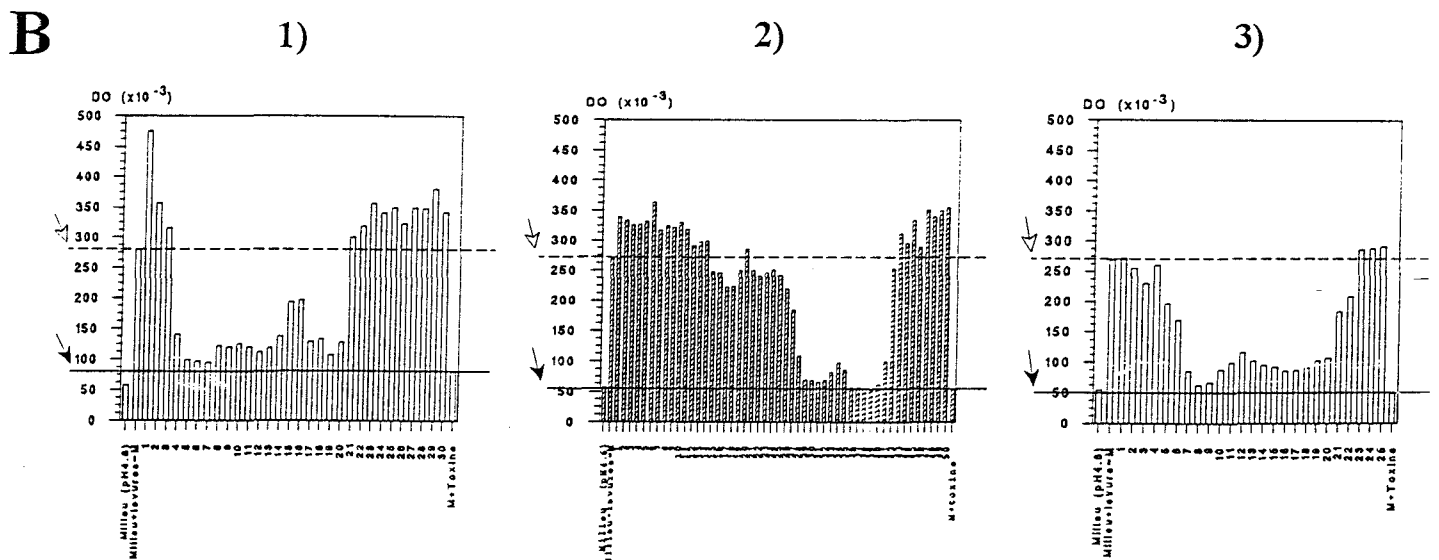
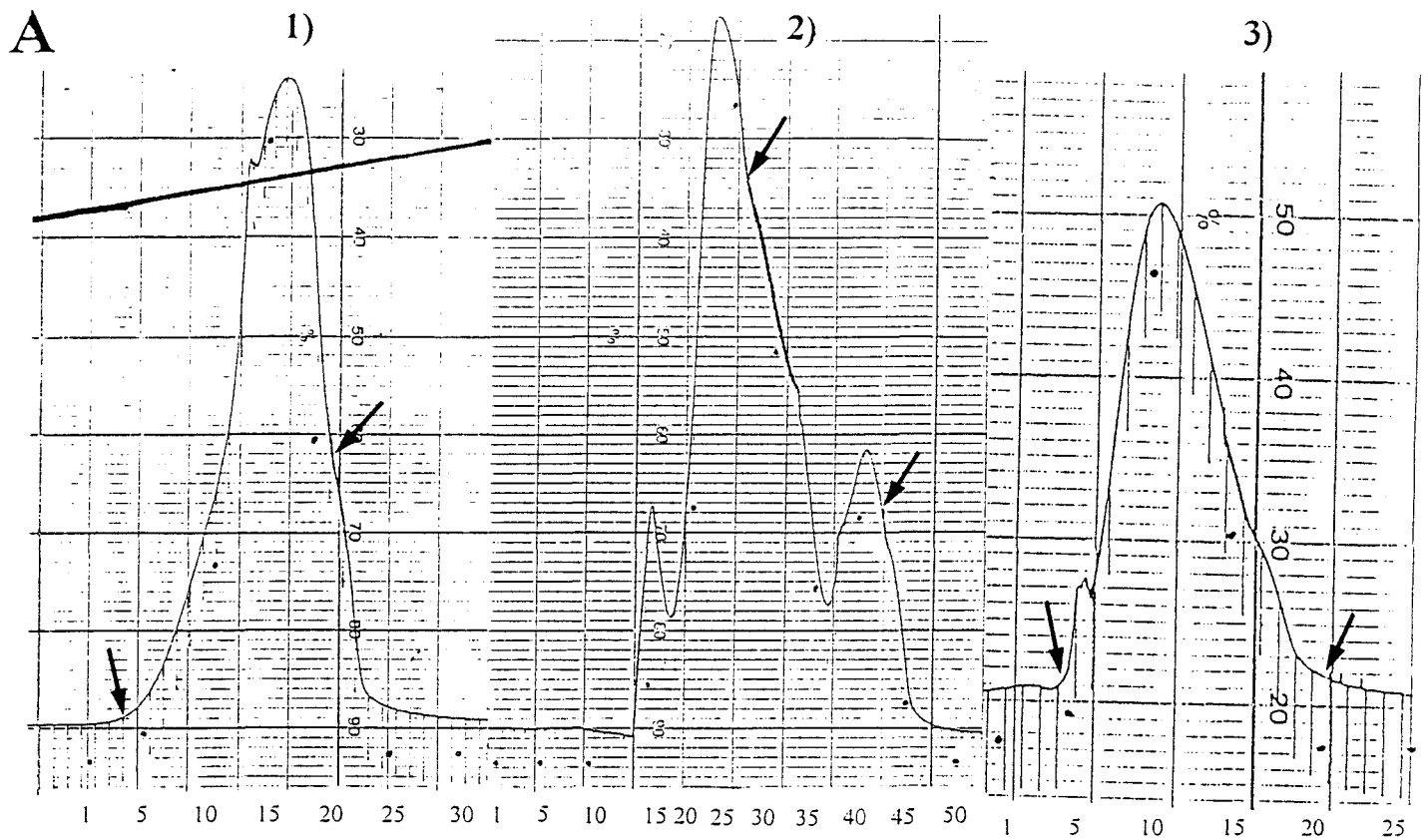


Figure 17 : Activité de la toxine "killer" recueillie après chromatographie gel-filtration.

A : Courbes tracées par l'enregistreur après passage sur différents types de colonnes.

1) colonne Aca34, 2) colonne Aca44, 3) colonne Aca54 (les fractions sont représentées par un point noir ; les flèches encadrent la zone où se trouve la toxine "killer").

B : Activité biologique de la toxine "killer" présente dans les différentes fractions après passage sur ces mêmes colonnes. 1) colonne Aca34, 2) colonne Aca44, 3) colonne Aca 54 (flèche noire : présence de la toxine ; flèche blanche : milieu sans toxine).

la toxine "killer".

5.1.2 Choix du gel de chromatographie

Ne connaissant pas le poids moléculaire de la toxine "killer" active sur *P. carinii*, plusieurs types de gel ont été testés. Ces différents gels peuvent séparer des molécules allant de 7 à 350kDa (Aca 34, 44 et 54). Dans les mêmes conditions de travail, les molécules produites par la souche K36 sont mieux séparées lorsque la colonne est remplie par le gel de type Aca 44 (Figure 17 A2), ce qui suppose que le poids moléculaire de la toxine "killer" est compris entre 10 et 130kDa (domaine de fractionnement de l'Aca 44). Cette affirmation est corroborée par le test d'activité biologique en milieu liquide (Figure 17B). En effet, sur les histogrammes 1 et 3 de la figure 17B, la presque totalité des fractions contiennent la toxine "killer". Elles sont réparties sur les pics et représentées par les fractions encadrées par les flèches (Figures 17A1 et 17A3). Par contre, il est intéressant de noter que sur la figure 17B2, seules quelques fractions possèdent une activité "killer". En étalonnant la colonne, ainsi que la chaîne chromatographique, il est possible de localiser ces fractions qui se trouvent après le pic de protéines de poids moléculaire élevé. Bien sûr les tests biologiques sont indispensables pour vérifier cet effet "killer". En général, 10 à 15 fractions contiennent la toxine "killer" prépurifiée (Figure 17B2, fractions 18 à 33). Les expériences menées ultérieurement sur la prépurification, ont donc été effectuées avec cette colonne.

Pour confirmer que la précipitation à 80% de saturation en sulfate d'ammonium est plus appropriée qu'avec 70%, des expériences avec ces 2 pourcentages ont été réalisées avec une colonne contenant de l'Aca 44. L'activité "killer" est alors présente dans le même nombre de fractions que ce soit après précipitation avec 70% ou 80% de saturation (Figure 18B). Toutefois, la différence est visible lors de la séparation des pics. En effet, le nombre de pics et donc le pouvoir séparateur est plus important avec 80% de saturation (Figure 18A). Mieux séparées, les fractions contenant la toxine "killer" sont susceptibles de posséder moins de contaminants, que sont les débris de la souche K36 ou ses métabolites ; nous pouvons dire alors que les fractions sont prépurifiées.

En somme, la prépurification sera menée avec une colonne remplie d'Aca 44 (séparant les molécules de 10 à 130kDa) après une précipitation utilisant 80% de saturation en sulfate d'ammonium.

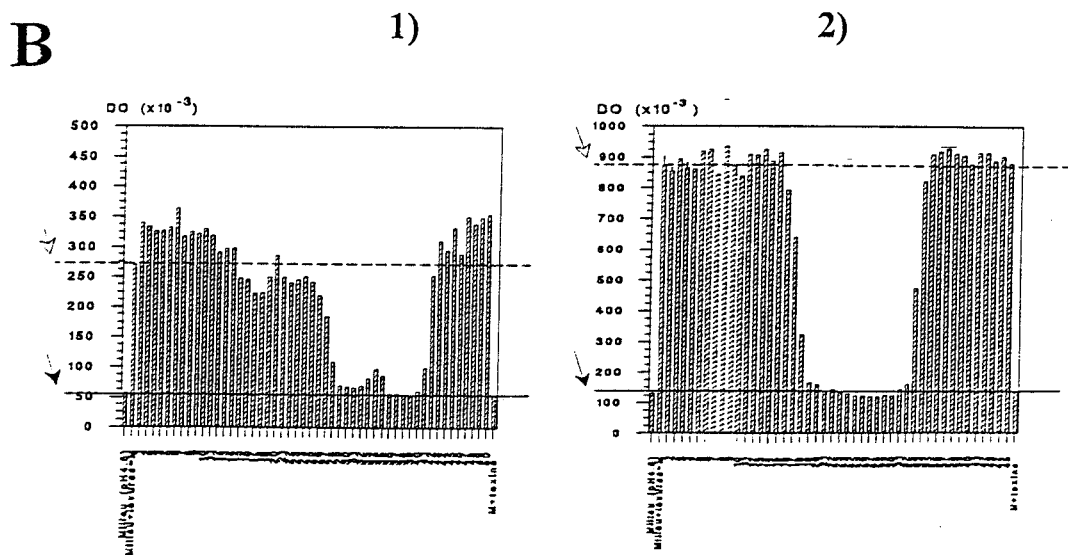
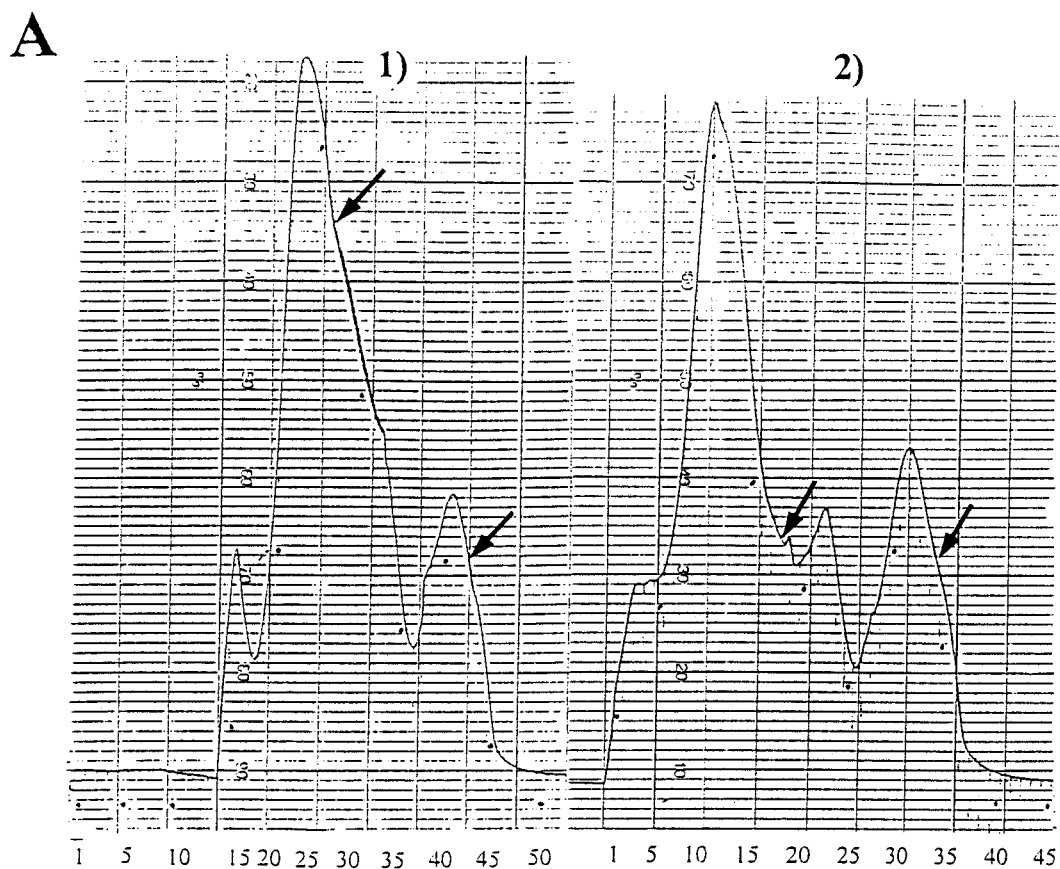


Figure 18 : Activité de la toxine "killer" recueillie après chromatographie gel-filtration sur une colonne Aca44 en fonction de deux pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium. **A :** Courbes tracées par l'enregistreur. 1) après précipitation des protéines avec 70% de saturation en sulfate d'ammonium, 2) après précipitation des protéines avec 80% de saturation en sulfate d'ammonium (les fractions sont représentées par un point noir ; les flèches encadrent la zone où se trouve la toxine "killer").

B : Activité biologique des différentes fractions en milieu liquide, après chromatographie gel-filtration. 1) après précipitation avec 70% de saturation en sulfate d'ammonium, 2) après précipitation avec 80% de saturation en sulfate d'ammonium (flèche noire : présence de la toxine ; flèche blanche : milieu sans toxine).

5.2 Contrôle électrophorétique de la toxine "killer" prépurifiée

Pour caractériser la toxine "killer" prépurifiée, une étude électrophorétique en conditions dénaturantes est réalisée. Parallèlement, les protéines de la levure K36 de *P. anomala* sont extraites et sont soumises au même traitement. Trois bandes de 64, 90 et 98kDa, sont obtenues à partir de la fraction prépurifiée par rapport au nombre important de bandes retrouvées avec l'extrait de levure. La purification est alors intéressante et a permis d'isoler 3 bandes. Après immunotransfert, en utilisant le MabKT4 marqué, aucune reconnaissance des bandes n'est visible.

VI- TEST D'ATTACHEMENT *IN VITRO* DE *P. CARINII* SUR DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES

La 1^{ère} partie du travail visait à mieux connaître la toxine "killer" de *P. anomala*. Toutefois, le but de cette étude est l'interaction entre la toxine "killer" et *P. carinii*. Il nous semblait intéressant de voir si sa croissance était inhibée par la toxine "killer" de *P. anomala*, comme le sont certaines souches sensibles de levures. Afin d'évaluer l'activité de la toxine "killer" sur *P. carinii*, la 1^{ère} étape fut de voir l'effet de la toxine sur l'attachement *in vitro* en co-culture (3.2.3 et 3.2.4) des parasites. En effet, le développement de *P. carinii in vitro* est lié, au moins en partie, à son adhésion à des cellules cibles.

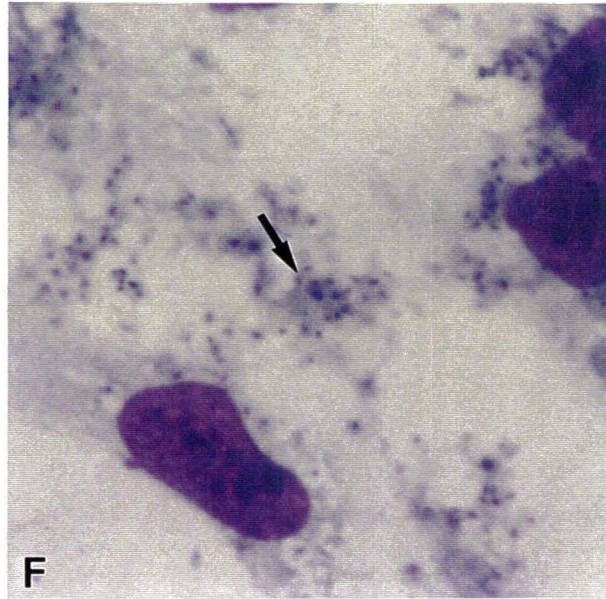
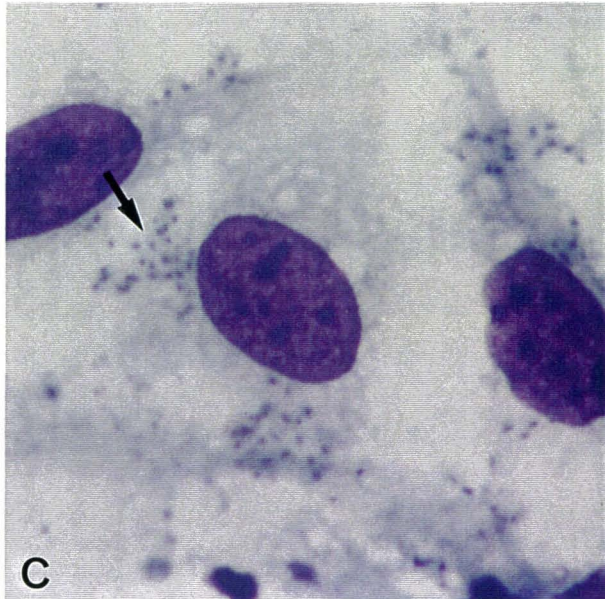
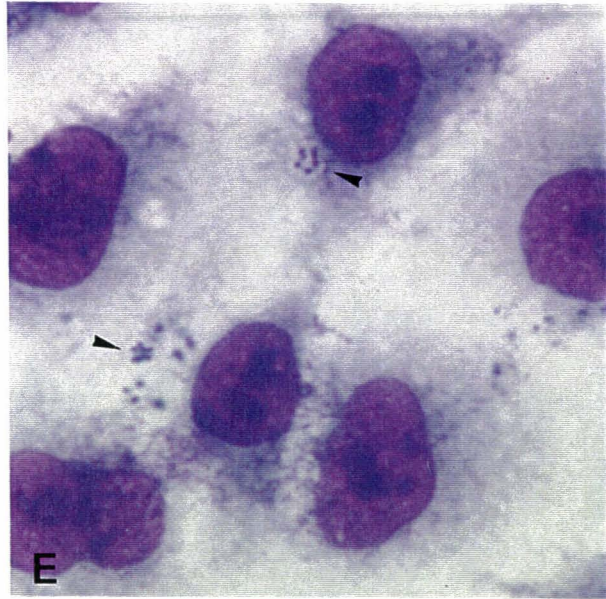
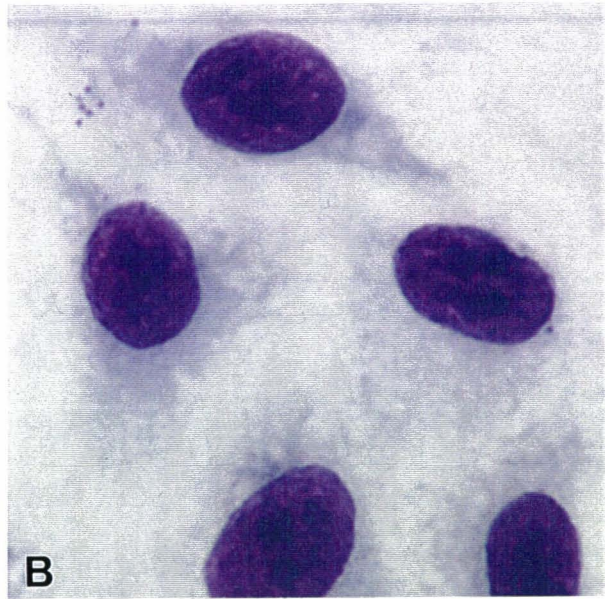
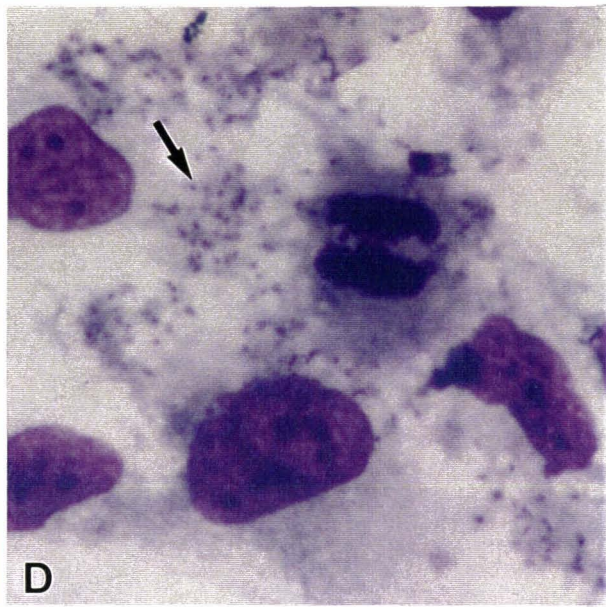
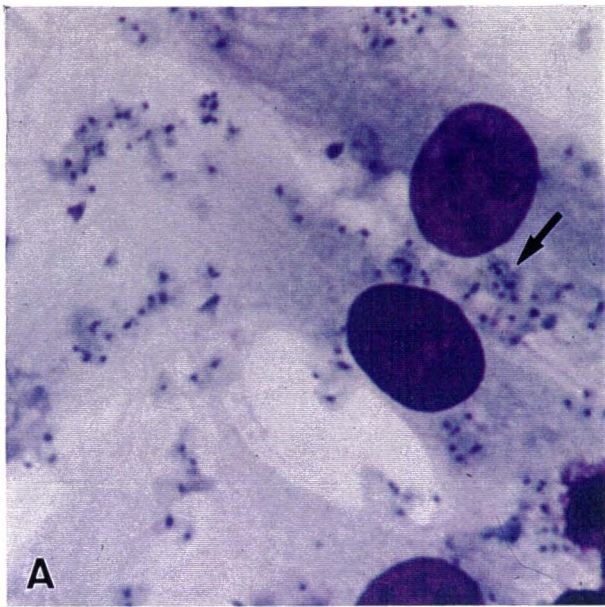
6.1 Etude cytologique

L'expérimentation est réalisée sur 2 types de lignées cellulaires :

- les cellules L2, cellules épithéliales alvéolaires de rat, produisant une matrice riche en fibronectine, permettent une bonne adhésion du parasite dans un 1^{er} temps, puis un bon développement de celui-ci dans un 2^{ème} temps. En effet, cellules et parasites sont issus du même animal.
- les cellules WI38VA13, cellules épithéliales alvéolaires d'origine humaine, dont la matrice est relativement riche en fibronectine et sur laquelle le parasite développe un attachement actif (Aliouat, 1995).

Après 24h d'incubation, les préparations (3.2.4) colorées au méthanol-Giemsa permettent de visualiser la quantité de parasites présents. La figure 19 montre les 2 lignées étudiées en parallèle. Les parasites suffisamment nombreux pour évaluer une inhibition d'attachement lorsqu'elle a lieu, sont isolés ou forment de petits groupes contenant moins d'une quinzaine de parasites (Figure 19, A et D). La différence notée entre les 2 lignées cellulaires est essentiellement morphologique, mais ne gêne en rien l'attachement de *P. carinii*. Le cytoplasme des cellules WI38VA13 s'étale moins que celui des cellules L2. C'est pourquoi, le nombre de parasites à

Figure 19 : Attachement et développement de *P. carinii* de rat cultivé sur les cellules L2 (cellules épithéliales alvéolaires de rat en **A**, **B** et **C**) et WI38VA13 (cellules épithéliales alvéolaires d'origine humaine en **D**, **E** et **F**). Les parasites ont subi une préincubation de 90min à 25°C à pH4,6 dans les milieux suivants : DMEM (**A** et **D**), toxine "killer" (**B** et **E**), toxine "killer" neutralisée avec le MabKT4 (**C** et **F**), avant d'être inoculés avec les cellules. Après 24h d'incubation, les préparations sont colorées au méthanol-Giemsa. La majorité des formes parasitaires sont des trophozoïtes (flèche) que l'on retrouve isolés ou en amas. Les kystes (tête de flèche) sont présents mais toutefois en petite nombre. Grossissement : x1100.



introduire lors du test d'attachement est de 4.10^6 par puits pour les cellules WI38VA13 au lieu de 3.10^6 pour les cellules L2. Sur les cellules L2, les parasites sont souvent isolés alors que sur les cellules WI38VA13, ils sont fréquemment groupés.

Pour visualiser l'effet "killer", les parasites fraîchement extraits sont préincubés (3.2.4), avec la toxine "killer" (Figure 19, B et E). Les témoins sont constitués du DMEM à pH4,6, ou de la toxine "killer" préincubée avec le MabKT4. Les résultats sont présentés figure 19. L'incubation de 90min à 25°C avec la toxine "killer" modifie l'attachement du parasite aux cellules épithéliales. Moins de parasites sont attachés en comparaison des parasites qui étaient incubés avec le milieu de culture seul, ou avec la toxine neutralisée par le MabKT4. Un milieu de culture à pH4,6 n'altère pas la capacité d'attachement des parasites. Ils sont bien visibles, avec leur noyau bleu-violacé et leur cytoplasme bleu (Figures 19A et 19D). L'effet sur l'attachement de *P. carinii* est réellement du à la toxine, puisque la préincubation de la toxine "killer" avec le MabKT4, ne provoque aucune diminution de l'attachement du parasite sur les lignées cellulaires. En effet, dans ce cas, le nombre de parasites attachés est comparable à celui des parasites préincubés dans le DMEM sans toxine (Figures 19, A et D versus C et F).

6.2 Quantification de l'effet de la toxine "killer"

La coloration au Giemsa permet de visualiser et de compter facilement les parasites attachés à la membrane cytoplasmique des cellules. La majorité des parasites attachés sont des trophozoïtes, les kystes bien que présents, sont en faible quantité (Figure 19E). Le but et les résultats attendus de ce test ne diffèrent pas quelque soit la lignée utilisée (Vero, L2 ou WI38VA13).

P. carinii de rat qui est préincubé dans le DMEM à pH4,6 sans toxine ou avec la toxine "killer" neutralisée par le MabKT4, se trouve attaché en très grand nombre (350.10^3 parasites environ) aux cellules Vero (Figure 20). Un résultat similaire est obtenu avec les cellules L2 ou WI38VA13. Au contraire, une inhibition marquée (34 à 45%) de l'attachement de *P. carinii* sur les cellules Vero est induite par la toxine "killer" de *P. anomala* produite soit avec le DMEM, soit avec le milieu de Sabouraud à pH4,6. L'effet inhibiteur de la toxine "killer" est bloqué par les préincubations de la molécule "killer" avec le MabKT4. Ces données montrent que la chute de l'attachement de *P. carinii* aux cellules fibroblastiques ou aux cellules épithéliales de poumon est due spécifiquement à l'action de cette toxine.

Après avoir testé l'effet "killer" de la toxine brute, des essais sont réalisés avec la toxine prépurifiée. Les résultats obtenus avec les fractions de toxine "killer" prépurifiée sont comparables à ceux observés lors des précédentes expériences. C'est-à-dire, qu'on observe une inhibition de

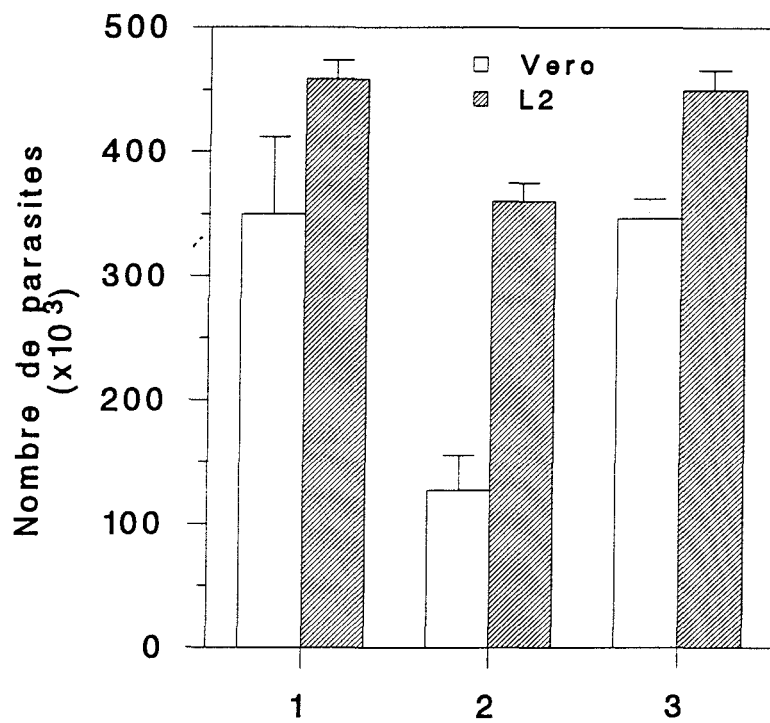


Figure 20 : Effet inhibiteur de la toxine "killer" sur l'attachement de *P. carinii* de rat sur les cellules L2 et Vero. Les parasites ont subi une préincubation de 90min à 25°C et à un de pH4,6 dans les milieux suivants : DMEM (1), toxine "killer" (2), toxine "killer" neutralisée avec le MabKT4 (3), avant d'être inoculés.

l'attachement du parasite de l'ordre de 40%.

Ces tests *in vitro* sont concluants, la toxine "killer" (brute ou prépurifiée) de *P. anomala* est active sur *P. carinii*, car elle inhibe l'attachement du parasite sur les cellules cibles. Cependant, ces tests n'ont lieu qu'en culture. Retrouverait-on des effets similaires *in vivo* ?

VII- EFFET DE LA TOXINE SUR L'INFECTIVITÉ DE *P. CARINII IN VIVO*

Les parasites sont préincubés dans un 1^{er} temps, avec la toxine "killer" de *P. anomala*, puis resuspendus dans du DMEM (37°C, pH4,6), avant d'être inoculés ainsi traités aux animaux. Car la toxine ne peut être utilisée directement *in vivo* (vue sa toxicité et son immunogénicité).

7.1 Modèles animaux

Deux modèles expérimentaux permettent de tester l'influence de la toxine "killer" sur l'infectivité de *P. carinii*. Ce sont la souris SCID ("Severe Combined Immunodeficiency") et le rat nude homozygote sous corticoïdes, 2 modèles d'infection mis au point et réalisés dans notre laboratoire. Les inoculums parasitaires sont préincubés avec ou sans la toxine "killer" (25°C, pH4,6), puis remis dans du DMEM (37°C, pH7,2) et enfin instillés par voie nasale à la souris SCID (3.1.5.1) ou par voie trachéale au rat nude (3.1.5.2). Ce dernier modèle a été amélioré en administrant la dexaméthasone 15 jours avant l'inoculation des parasites.

Des études morphologiques, ultrastructurales ainsi que la quantification des parasites sont effectuées 3 mois après l'inoculation pour la souris SCID et 40 jours pour le rat nude, période minimale pour obtenir une pneumocystose.

7.2 Etude morphologique

Les 2 modèles sont présentés en parallèle sur les figures 21 pour la souris SCID et 22 pour le rat nude. Les analyses histologiques révèlent que les poumons de souris SCID infectées avec les parasites prétraités avec du DMEM (Figures 21A et C) ou de la toxine "killer" neutralisée par le MabKT4 (Figure 21E) sont fortement parasités contrairement à ceux des souris SCID infectées par des parasites prétraités en présence de la toxine "killer" (Figures 21B et D). Les poumons des souris SCID infectés par des parasites traités avec du DMEM ou de la toxine "killer" neutralisée par le MabKT4 sont caractérisés par la présence d'exudats éosinophiles typiques, signant une pneumocystose (Figures 21A et C). Des groupes de kystes à paroi épaisse sont alignés le long de la paroi alvéolaire ou se sont développés dans la lumière des alvéoles (Figures 21C et E). Au contraire, les poumons de souris SCID infectés par des parasites traités avec de la toxine "killer"

Figure 21 : Coupes histologiques de poumons de souris SCID inoculées par voie nasale avec *P. carinii* de souris.

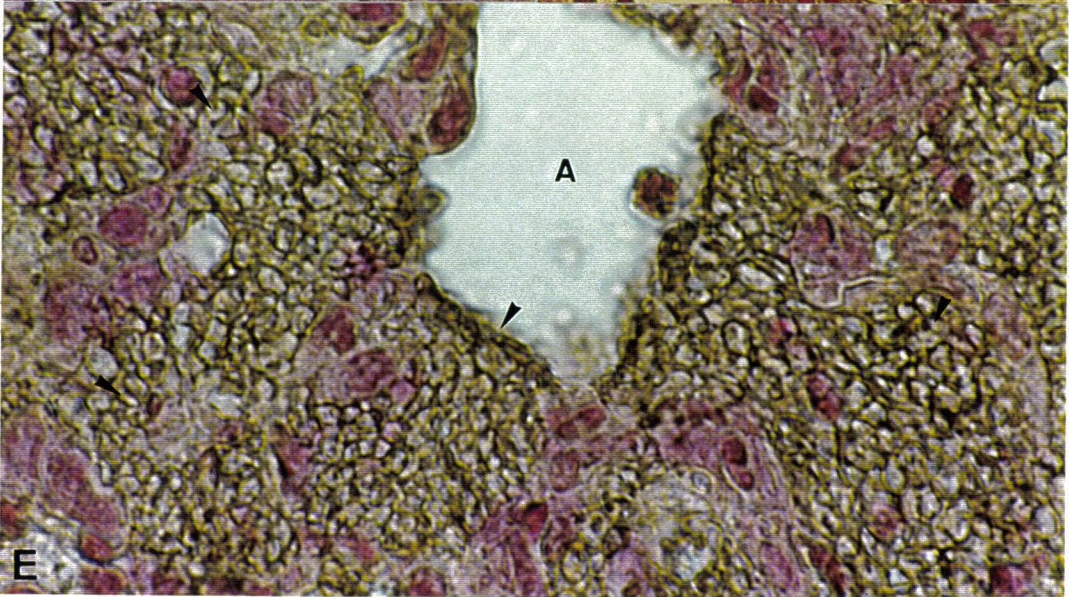
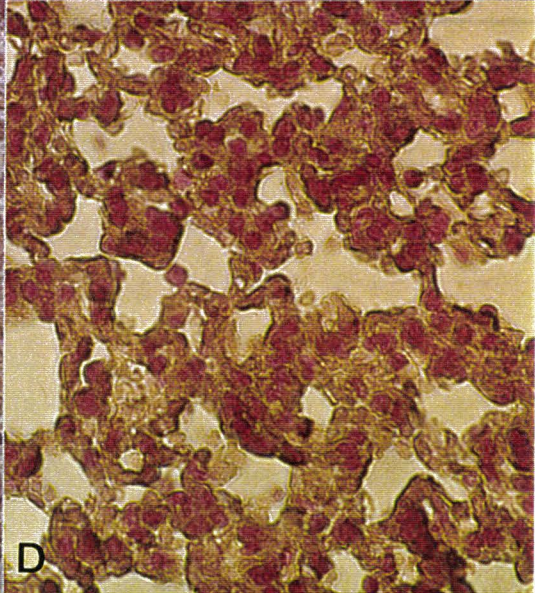
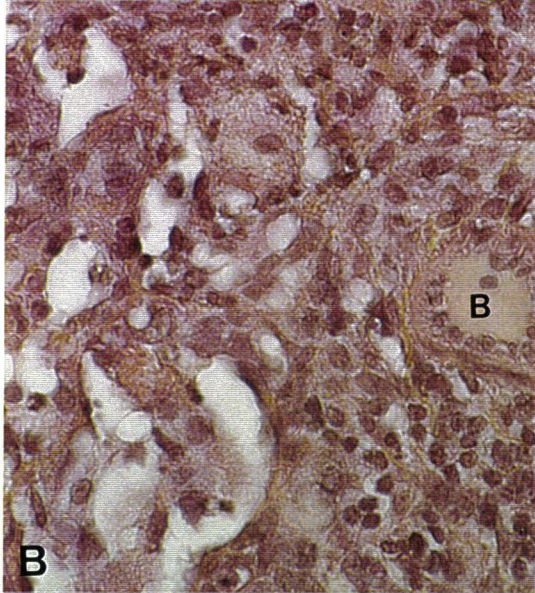
Avant inoculation, les parasites ont subi une préincubation de 90min à 25°C à pH4,6 dans les milieux suivants : DMEM (A et C), toxine "killer" (B et D), toxine "killer" neutralisée avec le MabKT4 (E). Des groupes de parasites se sont développés le long de la paroi alvéolaire ou dans la lumière de l'alvéole lorsqu'ils sont traités par du DMEM ou de la toxine "killer" neutralisée par le MabKT4 (A, C et E). Peu ou aucun parasite n'est retrouvé chez les souris inoculées avec *P. carinii* préincubé dans la toxine "killer" (B et D). Deux colorations sont utilisées, l'hémalum-éosine-safran (A et B) et le Gomori-Grocott (C, D et E). A : lumière alvéolaire, B : bronchiole, Grossissement: (A, B, C, D) x500 et E: x760.

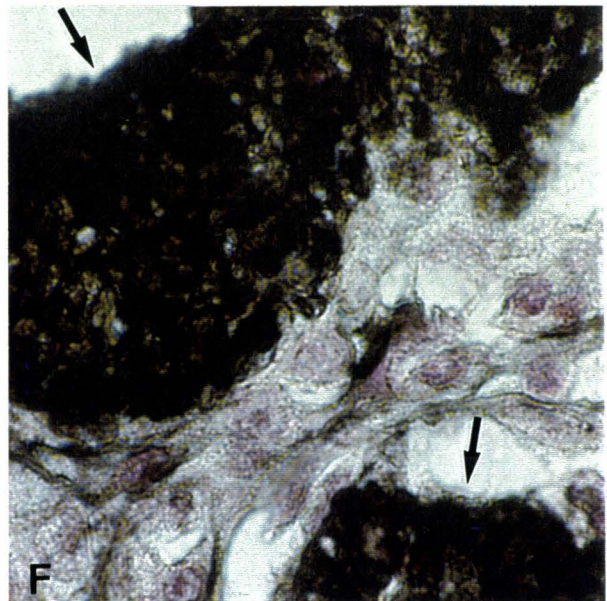
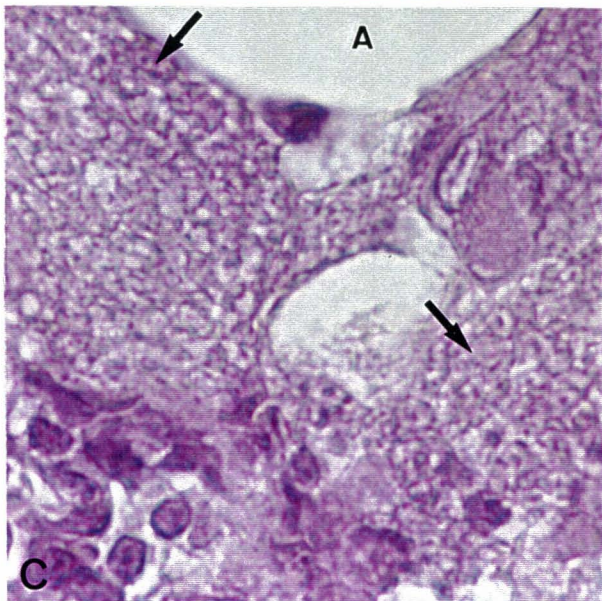
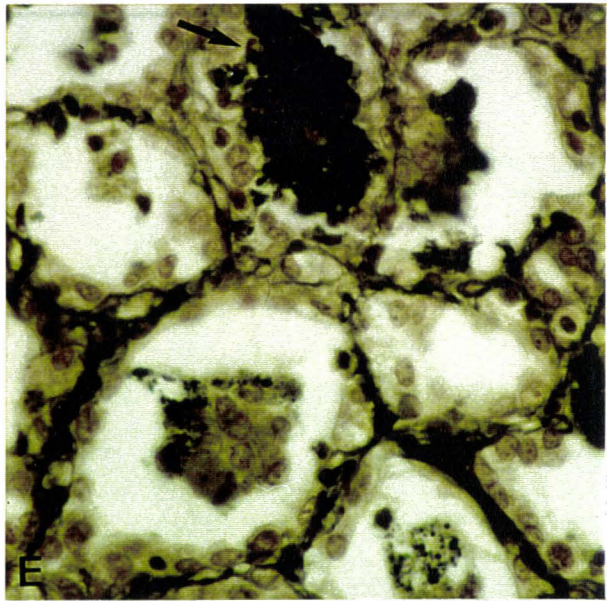
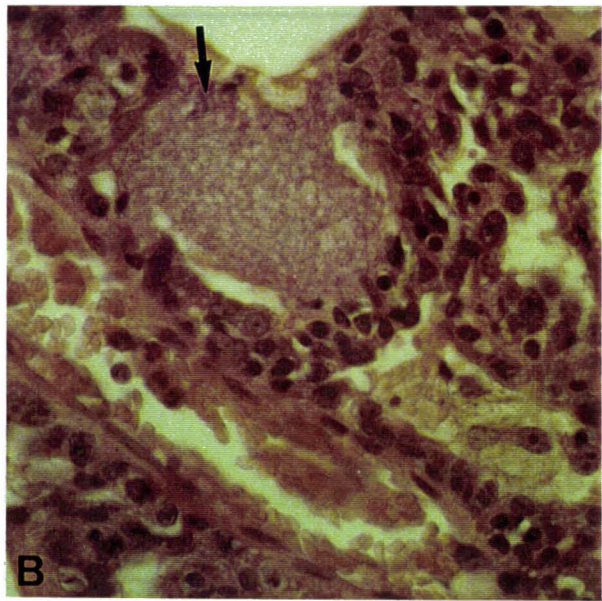
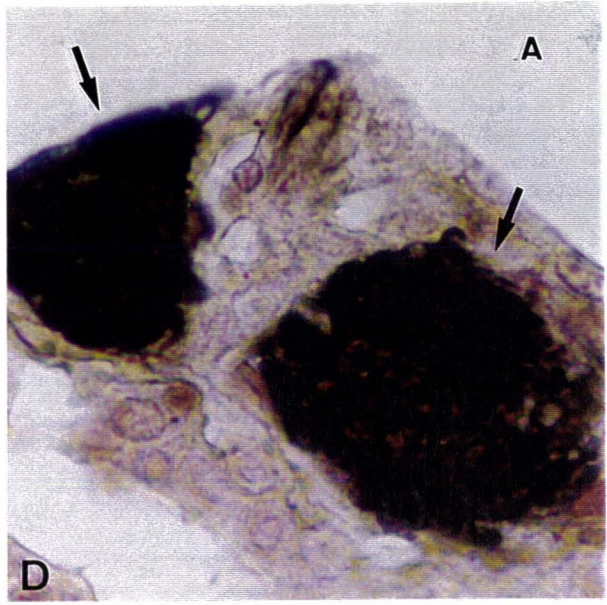
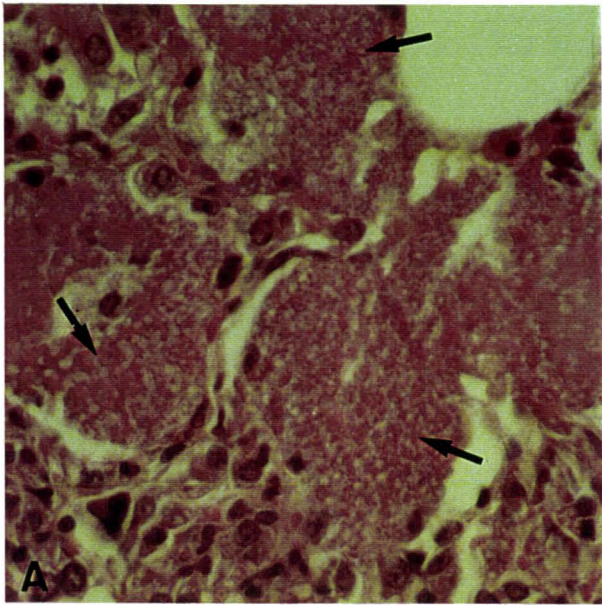
Page ci-contre

Figure 22 : Coupes histologiques de poumons de rats nude inoculés par voie nasale avec *P. carinii* de rat.

Avant inoculation, les parasites ont subi une préincubation de 90min à 25°C à pH4,6 dans les milieux suivants : DMEM (A et D), toxine "killer" (B et E), toxine "killer" neutralisée avec le MabKT4 (C et F). Les effets des différents milieux exercés sur les parasites sont semblables à ceux trouvés chez la souris SCID. Deux colorations sont présentées parallèlement, l'hémalum-éosine-safran (A-C) et le Gomori-Grocott (D-F). A : lumière alvéolaire, Grossissement: (A, B, E) x600 et (C, D, F) x760.

Page suivante





montrent peu ou pas de *P. carinii* (Figures 21B et D).

Des images similaires sont retrouvées chez le rat nude (Figure 22). Deux colorations à l'HES et au Gomori-Grocott sont présentées en parallèle, sur la planche 22. Toutefois, les parasites retrouvés tapissant la surface alvéolaire chez la souris, sont chez le rat, plutôt au sein des alvéoles. Ils remplissent parfois la totalité de l'alvéole. La proportion de parasites retrouvés après prétraitement avec la toxine "killer" (Figure 22, B et E) est très faible par rapport à la quantité de parasites retrouvés chez le rat nude après instillation avec *P. carinii* traité avec du DMEM (Figure 22, A et D) ou de la toxine "killer" neutralisée par le MabKT4 (Figure 22, C et F).

7.3 Etude ultrastructurale

Les animaux infectés avec des parasites prétraités ou non avec la toxine "killer", conservent une bonne intégrité pulmonaire. Cette dernière s'exprime par la présence d'une phagocytose importante de parasites de tous stades (trophozoïtes, prékystes, kystes matures) par les macrophages alvéolaires (Figure 23D) et par les granulocytes neutrophiles (Figure 23E). Ces derniers montrent un cytoplasme dense avec de rares granulations typiques. En comparant l'ultrastructure de *P. carinii* de rat et de souris, aucune différence morphologique n'est visible.

Dans les poumons de rat ou de souris parasités, l'attachement de *P. carinii* a été observé au niveau des cellules épithéliales alvéolaires de type I (Figures 23A à C). Les trophozoïtes tapissent l'épithélium et parfois tout le contour alvéolaire (Figure 23A). Ils émettent de nombreux filopodes qui participent activement à l'attachement. Ces prolongements filopodiaux peuvent être très longs et fixent le parasite à l'épithélium (Figures 23B et C).

Ainsi, il est clairement établi par cette étude que peu de parasites se développent lorsqu'ils sont traités avec la toxine "killer" avant l'inoculation par rapport aux parasites traités avec du DMEM ou de la toxine "killer" neutralisée avec le MabKT4.

7.4 Quantification de l'activité de la toxine "killer"

Les résultats présentés dans le tableau 7 sont issus de 3 expériences réalisées séparément dans le temps avec au total 52 souris. Pour les rats nude 5 expériences ont été effectuées, elles ont nécessité 85 animaux.

Ces travaux sont effectués sur des animaux non porteurs latents de *P. carinii*. Lorsque *P. carinii* de souris est préincubé dans le DMEM, puis inoculé aux souris SCID, les parasites induisent une PPC sévère ($262,3 \cdot 10^6$ parasites/poumon pour l'expérience A). La préincubation

Figure 23 : Attachement et phagocytose de *P. carinii* de rat *in vivo*.

A: de nombreux trophozoïtes tapissent l'alvéole pulmonaire. **B** et **C**: trophozoïtes attachés à des pneumocytes de type I. Les filopodes (pointes de flèche) s'enfoncent parfois profondément dans le cytoplasme des pneumocytes de type I. **D** et **E**: phagocytose active d'un trophozoïte et d'un kyste par respectivement, un macrophage et un granulocyte neutrophile. **K**: kyste, **Mi**: mitochondrie, **N**: noyaux, **Nu**: nucléole, **P1**: pneumocyte de type I, **T**: trophozoïte. Trait: 0,3µm.

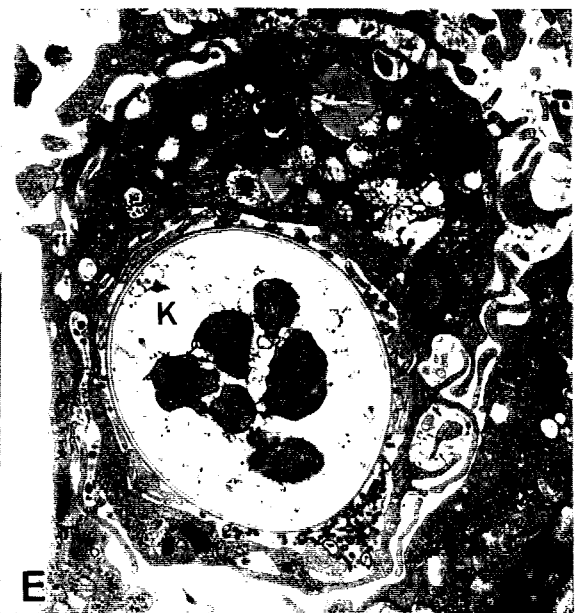
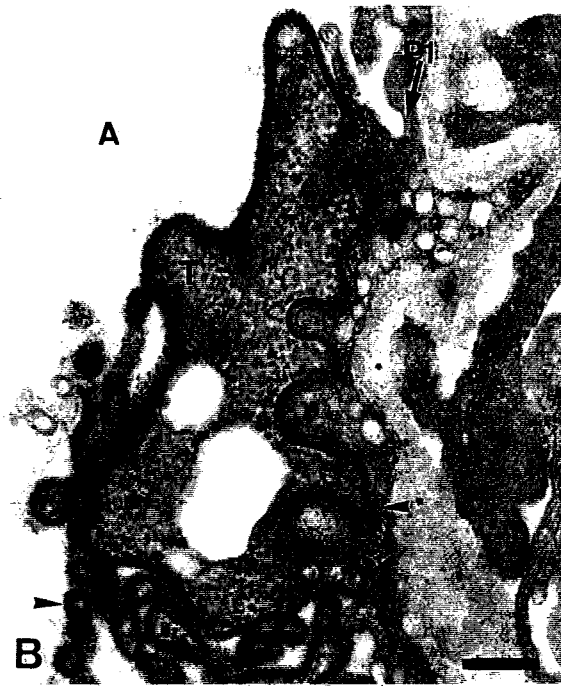
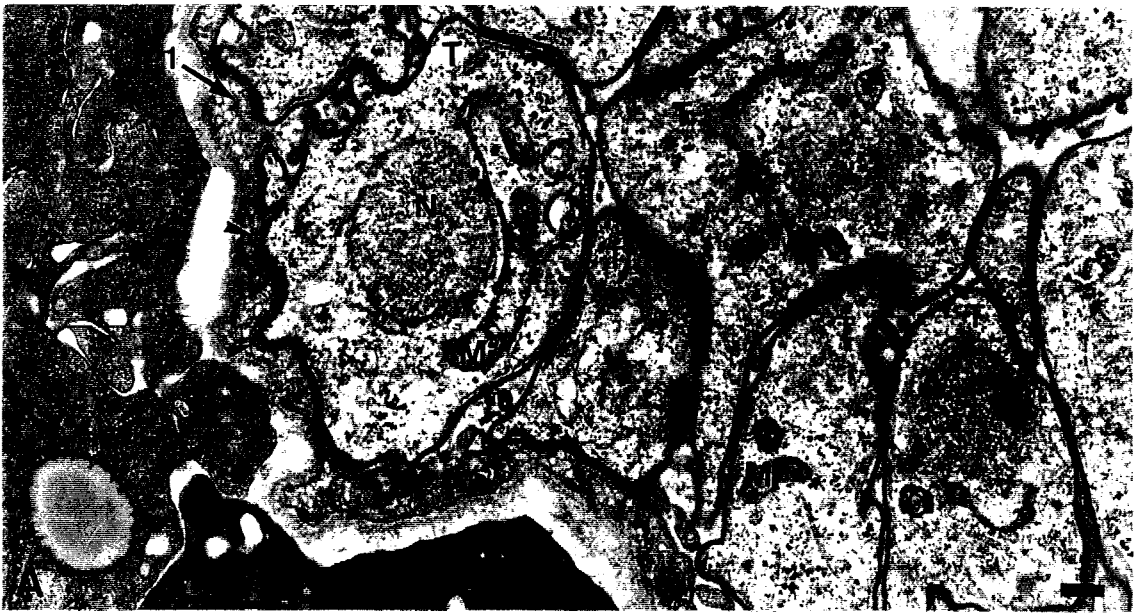


Tableau 7 : Effet inhibiteur de la toxine "killer" de *Pichia anomala* UCFC 25F sur l'infectivité de *P. carinii* de souris pour la souris SCID.

Expériences	Nombre de souris	Milieux ⁽¹⁾ de Préincubation	Trophozoïtes (x10 ⁶)	Formes à paroi ⁽²⁾ (x10 ⁶)	parasites/poumon (x10 ⁶)	Inhibition (%)	p ⁽³⁾	p ⁽⁴⁾
A	3	Contrôle	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	-	-	-
	3	DMEM	250.7 ± 30	11.6 ± 0.5	262.3 ± 30	0	-	-
	3	KT	65.3 ± 29	2.4 ± 1.1	67.7 ± 25	77.5	p<0.001	p<0.01
	3	KT + MabKT4	145.8 ± 18	4.9 ± 3	150.7 ± 90	28.9	p<0.05	-
B	5	Contrôle	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	-	-	-
	5	DMEM	227.7 ± 16	6.4 ± 0.9	234.1 ± 15	0	-	-
	5	KT	56.7 ± 20	3.7 ± 0.6	60.4 ± 20	75.0	p<0.001	p<0.05
	5	KT + MabKT4	90.4 ± 19	4.6 ± 0.9	94.9 ± 20	59.5	p<0.001	-
C	5	Contrôle	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	-	-	-
	5	DMEM	158.7 ± 16	7.4 ± 1.4	160.0 ± 15	0	-	-
	5	KT	1.5 ± 0.4	0.07 ± 0.02	1.5 ± 0.4	99.1	p<0.001	p<0.001
	5	KT + MabKT4	96.6 ± 26	4.8 ± 1.1	101.4 ± 27	37.1	p<0.01	-

⁽¹⁾ Souris "Contrôle" sont inoculées avec du DMEM sans parasite. *P. carinii* de souris est préincubé dans différents milieux : milieu de culture (DMEM) ou dans la toxine "killer" de *P. anomala* (KT) ou dans la toxine "killer" neutralisée par le MabKT4 (KT + MabKT4).

⁽²⁾ Prékystes intermédiaires, prékystes tardifs, kystes matures.

⁽³⁾ Nombre de parasites comparé au nombre de parasites préincubés dans le DMEM.

⁽⁴⁾ Le nombre de parasites préincubés avec KT est comparé au nombre de parasites préincubés avec KT + MabKT4.

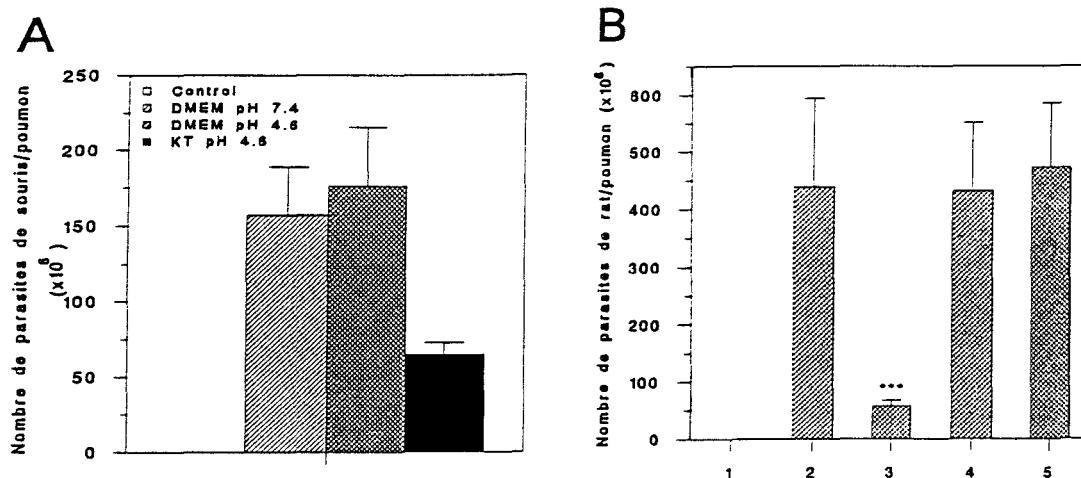


Figure 24: Effet inhibiteur de la toxine "killer" de *P. anomala* sur l'infectivité de souris SCID et de rat nude inoculés respectivement par *P. carinii* de souris et *P. carinii* de rat.

A: les parasites de souris sont préincubés dans les milieux suivants: DMEM pH7,4; DMEM pH4,6; toxine "killer" (KT) pH4,6; chez le contrôle, représenté par des souris SCID inoculées avec du DMEM sans parasites, aucune pneumocystose n'est visible. B: les parasites de rat sont préincubés dans les milieux suivants: (2) DMEM pH7,2; (3) la toxine "killer" pH4,6; (4) la toxine "killer" pH7,2; (5) toxine "killer" neutralisée par le MabKT4. (1) rats nude inoculés avec du DMEM sans parasites, aucune pneumocystose ne se développe.

du parasite dans du DMEM à pH4,6 provoque une PPC tout aussi sévère que lorsque les *P. carinii* sont traités dans le DMEM pH7,2 (Figure 24A). La spécificité de l'activité de la toxine sur *P. carinii* est attestée par l'utilisation du MabKT4 qui neutralise les propriétés "killer" de la toxine. Ainsi, le taux de parasites traités avec la toxine "killer" et le MabKT4 est d'environ $100 \cdot 10^6$ contre $1,5 \cdot 10^6$ parasites retrouvés dans le poumon infecté avec des *P. carinii* traités avec de la toxine "killer", soit une inhibition du taux de parasites due à la toxine de 99% (pour l'expérience C, Tableau 7). Ce pourcentage est tout de même exceptionnel, car pour les 2 autres expérimentations, l'inhibition de l'infectivité due à la toxine est de 76%.

Le même type d'expérience est réalisé sur le rat nude. Les résultats sont similaires à ceux obtenus chez la souris SCID, puisqu'on trouve 87% d'inhibition de l'infectivité due à la toxine "killer" sur *P. carinii* de rat (Figure 24B). Il existe donc un réel effet de la toxine, *in vivo*, sur les *P. carinii* de rat ou de souris, si toutefois les conditions d'activité de la toxine "killer" sont respectées. Cet effet est neutralisé par l'anticorps monoclonal KT4 (Figure 24B).

VIII- ACTIVITÉ DE LA TOXINE "KILLER" SUR *P. CARINII*

Après avoir montré un réel effet de la toxine "killer" sur les levures comme sur *P. carinii* *in vivo* et *in vitro*, nous avons voulu pouvoir quantifier cette activité inhibitrice. Pour cela, 2 tests de viabilité ont été adaptés et appliqués.

8.1 Test qualitatif de viabilité

Le premier est basé sur l'incorporation de 2 fluorochromes que sont l'IP et CF. Les résultats obtenus sont qualitatifs.

La figure 25A montre des parasites inoculés avec du DMEM, alors que dans les figures 25B et D, les parasites sont en présence de la toxine. Dans cette dernière préparation, une fluorescence rouge est visible, elle signe la mort de *P. carinii*. Parallèlement, l'observation en microscopie interférentielle (Figure 25C) confirme la nature parasitaire des cellules. Ainsi, la toxine de *P. anomala* a un réel effet "killer" vis-à-vis de *P. carinii*. Elle agit aussi bien sur les formes kystiques et prékystiques (Figures 25C et D) que végétatives du parasite, avec toutefois, une action plus marquée sur les trophozoïtes (Figure 25B). La figure 25B illustre la proportion possible de *P. carinii* viable après traitement avec la toxine "killer" (1 seul parasite vivant est présent).

Il faut souligner que ce double test de viabilité (CF/IP) est difficile à utiliser avec *Pneumocystis*, compte tenu de sa petite taille. De plus, il est très difficile de mesurer précisément

Figure 25 : Viabilité de *P. carinii* de rat (mise en évidence par l'incorporation de l'iodure de propidium et de la carboxyfluoresceine) en présence ou non de la toxine "killer" de *P. anomala*. **A**: parasites incubés dans du DMEM, **B**: parasites en présence de toxine "killer", un seul est vivant (vert), **C** et **D**: kyste mort de *P. carinii* préincubé avec la toxine "killer" (flèche). L'image en microscopie interférentielle confirme la nature parasitaire des cellules (**C**). Grossissement : x500.

Figure 26 : Etude ultrastructurale de *P. carinii* de rat fraîchement extrait et incubé avec de la toxine "killer" de *P. anomala*. **A**: prékyste sans toxine "killer"; **B**: kyste incubé avec la toxine : une altération importante de la membrane plasmique ainsi que des structures cytoplasmiques et nucléaires sont visibles. Cependant, les filopodes paraissent aussi nombreux et sans altération (pointes de flèche). CIK: corps intrakystique, Mi: mitochondrie, N: noyau. Trait : 0,3µm.

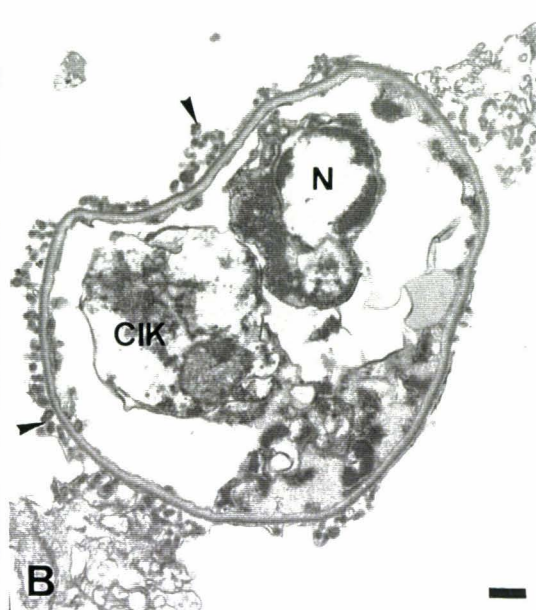
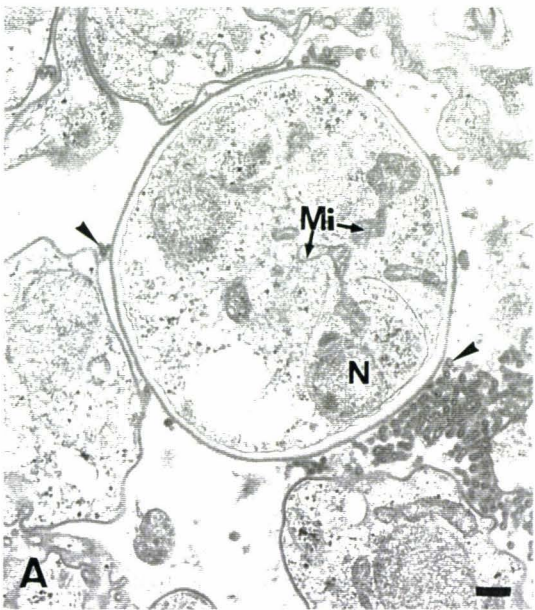
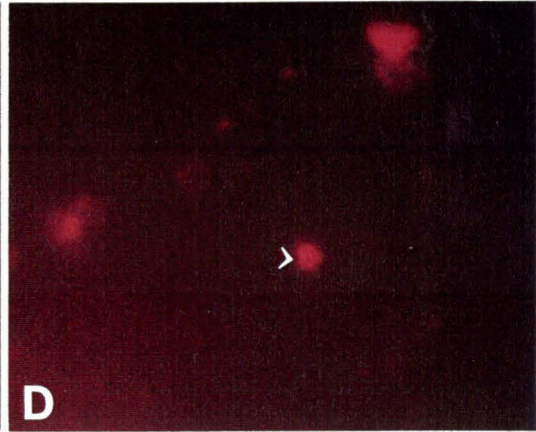
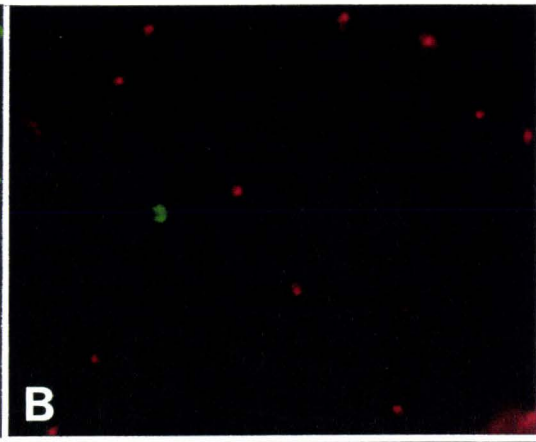
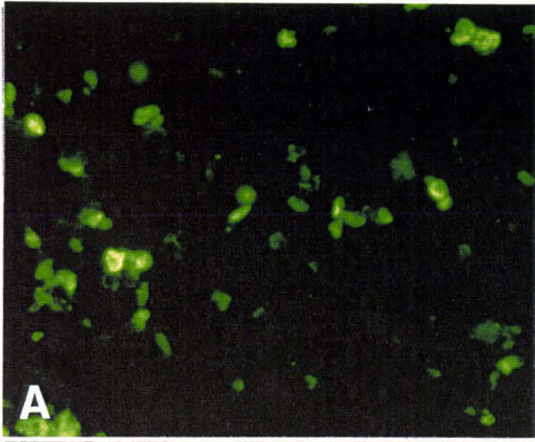


Tableau 8 : Effet de la toxine "killer" de *Pichia anomala* sur l'incorporation de l'acide para-aminobenzoïque tritié chez *Pneumocystis carinii*.

Milieu de préincubation	Agents inhibiteurs	(³ HpABA) incorporé (cpm) ^b	Effet inhibiteur ^c (%)
GMEM ^a pH7.5	aucun	19055	0
	pentamidine (50µg/ml)	1568	91
	Toxine brute (1:25)	16455	13.6
	Toxine prépurifiée (1:250)	16954	11
Tampon MacIlvain pH4.6	aucun	1195	0
	Toxine brute (1:25)	682	42.9
	Toxine brute (1:250)	1208	
	Toxine prépurifiée (1:25)	713	40.3
	Toxine prépurifiée (1:250)	1230	

^a milieu de culture équivalent au DMEM (GMEM : Glasgow's Modified Eagle Medium)

^b n = 4 essais

^c effet inhibiteur comparé au contrôle sans agent inhibiteur

la viabilité de l'échantillon. C'est pourquoi un autre test a été développé.

8.2 Test de viabilité quantitatif

Pour quantifier l'effet de la toxine "killer", un test basé sur l'incorporation de l'acide [³H]-para-aminobenzoïque (pABA) semble plus adapté. Lorsque *P. carinii* est préincubé dans du milieu GMEM (Glasgow's Modified Eagle's Medium, équivalent au DMEM) à pH7,2, l'incorporation du [³H]pABA est de 19055cpm (Tableau 8). Elle est diminuée de manière faible avec la toxine "killer" brute ou prépurifiée, tandis que l'incorporation du radioélément chez *P. carinii* en présence de pentamidine est inhibée de 91%.

En travaillant dans le milieu à pH4,6, l'incorporation du [³H]-pABA est réduite considérablement (93%). Cela implique que l'incorporation du pABA par *P. carinii* est influencée par ce pH. Mais, l'effet inhibiteur de la toxine "killer" est encore visible puisqu'à pH4,6 l'inhibition de l'incorporation du [³H]-pABA est d'environ 40 à 43% pour une toxine prépurifiée ou brute, utilisée à une dilution de 1/25 (Tableau 8).

8.3 Etude ultrastructurale

Après avoir quantifié l'effet "killer", nous avons voulu explorer l'ultrastructure du parasite après traitement par la toxine.

Une pression osmotique élevée durant la fixation et l'inclusion permet d'obtenir une structure cellulaire bien préservée. Ainsi, toute altération morphologique du parasite ne pourra être attribuée aux modes de fixation et d'inclusion. Après inclusion dans l'Epon, les formes kystiques et prékystiques incubées avec la toxine montrent des altérations importantes de la paroi cellulaire, de la membrane plasmique et des structures cytoplasmiques et nucléaires (Figure 26B). La paroi cellulaire des formes kystiques et prékystiques garde sa structure de base (couche externe dense aux électrons et couche interne peu dense) mais elle apparaît moins nette. La membrane plasmique devient diffuse et disparaît par endroits (Figure 26B). Chez les kystes matures, les corps intrakystiques demeurent reconnaissables (Figure 26B) mais montrent des plages cytoplasmiques optiquement vides et un système endomembranaire non structuré. Les noyaux gardent leur enveloppe, mais leur nucléoplasme est hypodense. Quelques noyaux sont moins atteints, mais montrent un nucléole hyperdense. Les trophozoïtes conservent une paroi cellulaire reconnaissable mais leur cytoplasme est presque complètement vide. Par contre, les filopodes sont aussi nombreux que chez le contrôle (Figure 26A) et ne semblent pas altérés (pointe de flèche, Figure 26B).

8.4 Immunolocalisation ultrastructurale

L'effet de la toxine sur les parasites est donc visible en microscopie électronique à transmission. Une question se pose cependant : où se fixe-t-elle spécifiquement sur le parasite? Pour y répondre, une étude d'immunodétection ultrastructurale en résine hydrophile (3.6.2) est réalisée pour localiser la toxine "killer" sur les parasites.

Les parasites ont été incubés *in vitro* avec la toxine, puis fixés et inclus en LRW en respectant les conditions d'hyperosmolarité pour éviter les artefacts dus à une mauvaise fixation. Les coupes ultrafines ont été incubées avec le MabKT4, puis avec la protéine-A marquée à l'or. Un marquage spécifique, présent chez les parasites préincubés avec la toxine et non décelable chez les contrôles, a été observé dans la couche hypodense de la paroi cellulaire des formes kystiques et prékystiques (Figure 27). Par contre, les trophozoïtes n'ont pas montré de marquage, peut-être à cause des altérations ultrastructurales profondes induites par la toxine et analysées dans le sous-chapitre précédent. Aucun marquage spécifique n'a été observé chez *P. carinii* incubé dans du DMEM.

IX- ACTION DES ANTICORPS ANTI-IDIOTYPES SUR *P. CARINII*

La toxine "killer" de *P. anomala* s'avère être potentiellement capable d'enrayer le développement de la PPC. Cependant, la toxine comme nous l'avons vu, n'est active qu'à une température de 25°C, à un pH de 4,6 et est immunogène. Elle n'est donc pas utilisable *in vivo*.

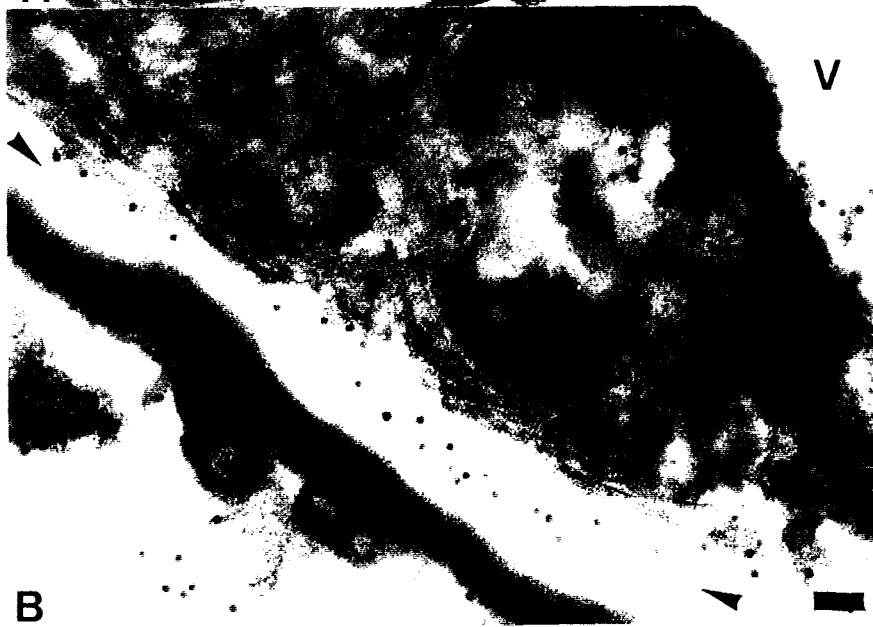
En revanche, il est possible d'envisager l'utilisation d'anticorps anti-idiotypes reproduisant l'activité biologique de la toxine, obtenus par immunisation avec un anticorps anti-toxine. Ces anticorps anti-idiotypes sont actifs à 37°C et à un pH de 7,2.

9.1 Production d'un anticorps monoclonal anti-idiotype

Dans le but de produire des anticorps monoclonaux anti-idiotypes, des rats ont été immunisés avec le MabKT4 (qui neutralise l'action de la toxine). Après plusieurs injections, le rat est sacrifié et sa rate est prélevée pour obtenir les lymphocytes. La fusion entre les cellules de myélome et les lymphocytes spléniques peut avoir lieu (3.4.3). Sur 220 hybridomes, 8 ont été sélectionnés car leur surageant inhibe la croissance des levures sensibles (Souche K3 de *P. anomala*). L'hybridome n°356 est le plus actif et est cloné. Après sélection sur des levures sensibles K3 et *C. albicans* 10S, un clone produisant un anticorps monoclonal anti-idiotypique, nommé MabK10 est sélectionné. Les différents tests d'attachement *in vitro* et d'infectivité *in vivo* seront réalisés maintenant avec le MabK10.

Figure 27 : Immunolocalisation ultrastructurale de la toxine "killer" sur *P. carinii* de rat.

A et B: les parasites sont préincubés avec la toxine "killer", un marquage (encadré par des pointes de flèches) est présent dans la couche hypodense de la paroi cellulaire des formes kystiques. CIK: corps intrakystique, N: noyau, V: vacuole. Trait: 0,3 μ m.



9.2 Activité *in vitro* d'anticorps anti-idiotypiques

Après avoir sélectionné cet anticorps monoclonal contre les souches sensibles de levures, nous nous sommes attachés à le tester contre *Pneumocystis* en utilisant les différentes méthodes d'attachement sur les cellules WI38VA13 et d'infectivité chez le rat nude.

9.2.1 Etude morphologique

Le MabK10 est dans un 1^{er} temps préincubé avec les parasites. Puis *P. carinii* est lavé et inoculé dans des cultures de cellules épithéliales pulmonaires d'origine humaine. Tout cela pour être dans les mêmes conditions et pouvoir comparer l'effet du MabK10 à celui de la toxine "killer".

Le MabK10 induit un effet inhibiteur sur l'attachement de *P. carinii* (Figure 28). En effet, sur les cellules WI38, les parasites qui se trouvent dans le milieu de culture seul (Figure 28A) s'attachent en nombre important par rapport à ceux préincubés avec le MabK10 (Figure 28B). Cet effet est complètement inversé lorsque les parasites sont préincubés avec le complexe MabK10–MabKT4 (Figure 28C). Ces résultats impliquent que non seulement le MabK10 mime l'activité antibiotique de la toxine "killer" témoignant d'une éventuelle conservation épitopique, mais que le MabKT4 neutralise aussi cet anticorps monoclonal, montrant ainsi la spécificité de l'effet "killer".

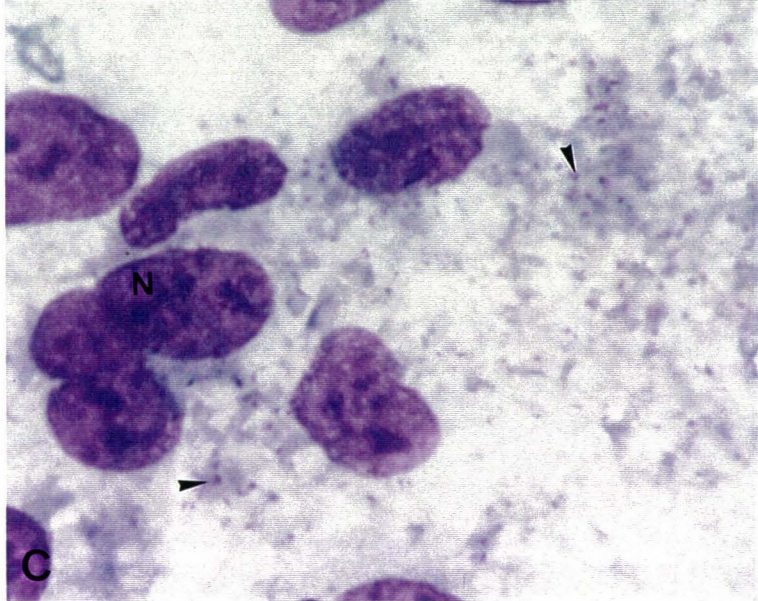
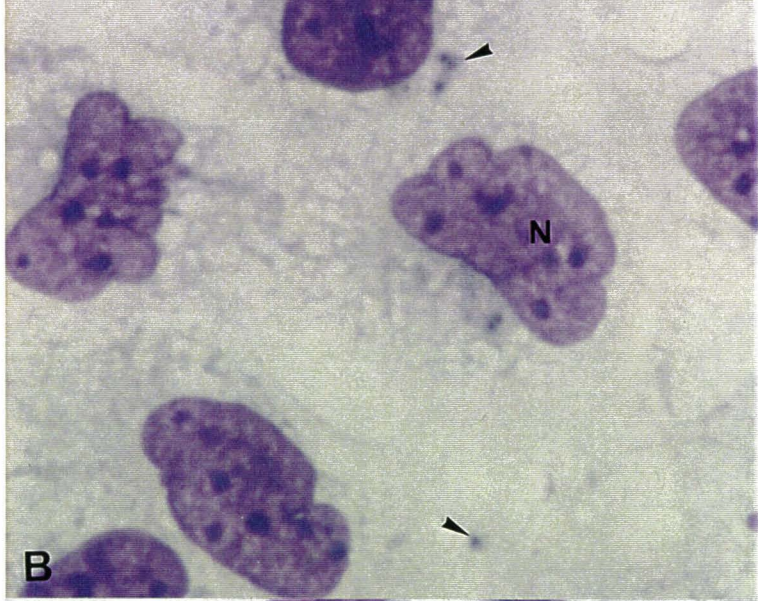
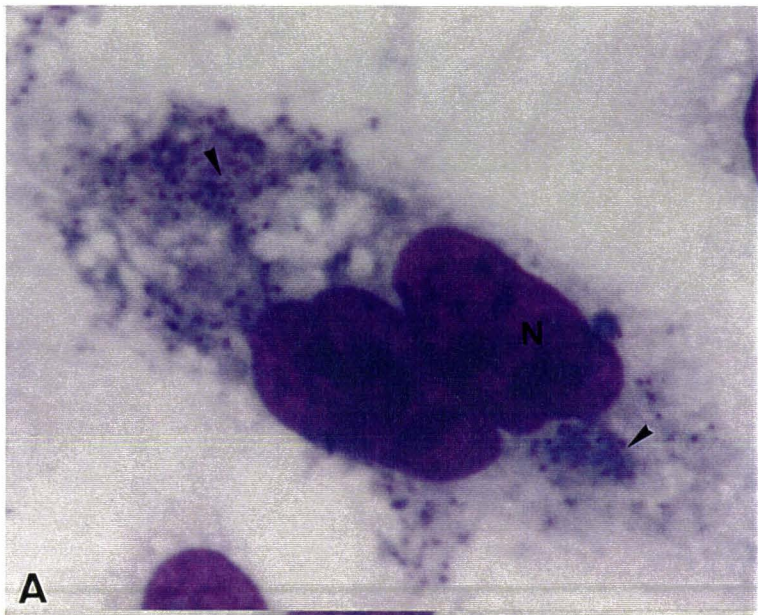
9.2.2 Effet de l'anticorps monoclonal anti-idiotypique sur *P. carinii* en co-culture

Le test d'attachement réalisé avec la lignée WI38VA13 révèle une inhibition de l'attachement du parasite aux cellules cibles par le MabK10. Cette inhibition est de l'ordre de 53% par rapport au contrôle représenté par *P. carinii* incubé avec le DMEM. Cet effet inhibiteur est dû au MabK10 puisque lorsqu'il est en présence du MabKT4, nous retrouvons un taux de parasites attachés élevé (Figure 29).

9.2.3 Effet d'anticorps anti-idiotypiques naturels humains sur *P. carinii*

L'équipe du Pr Polonelli (Italie) avec laquelle nous collaborons, a pu isoler des anticorps anti-idiotypiques provenant de patientes atteintes de candidose vaginale. La purification de ces anticorps a été réalisée sur une colonne d'affinité sur laquelle est fixée le MabKT4. Ces anticorps humains présentant une image complémentaire du MabKT4 sont des anti-idiotypes. Cette équipe a testé ces anticorps anti-idiotypiques humains contre *C. albicans in vitro*. Ils se sont avérés posséder certaines propriétés de la toxine "killer". Ils inhibent le développement des levures et ils

Figure 28 : Inhibition de l'attachement de *P. carinii* de rat par l'anticorps monoclonal anti-idiotypique (MabK10) sur des cellules WI38VA13 (cellules épithéliales alvéolaires d'origine humaine). Les parasites ont subi une préincubation de 90min à 37°C à un pH7,2 dans les milieux suivants: DMEM (A), MabK10 (B), MabK10 neutralisé par le MabKT4 (C) avant d'être inoculés avec les cellules. Après 24h d'incubation, les préparations sont colorées au méthanol-Giemsa. Le MabK10 induit un effet inhibiteur sur l'attachement des parasites, peu de trophozoïtes sont présents (pointes de flèches). Grossissement : x1100.



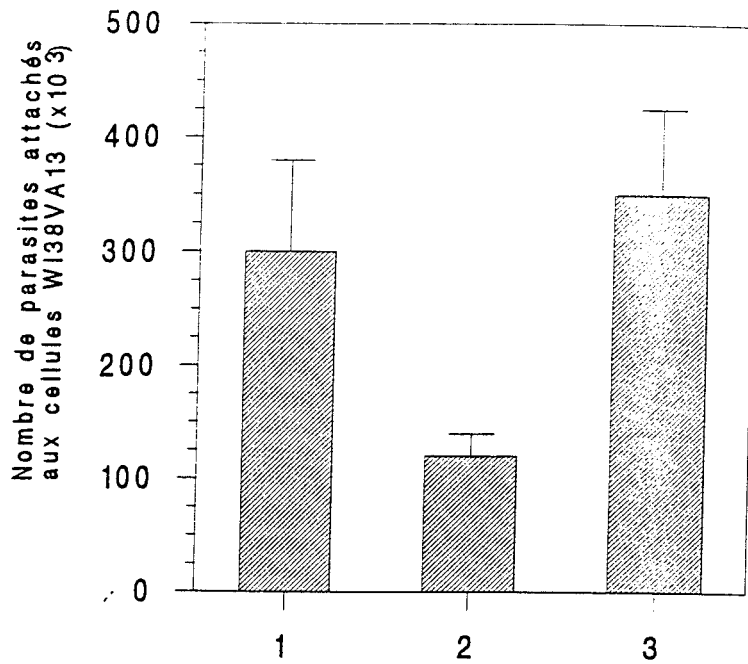


Figure 29 : Effet inhibiteur de l'anticorps monoclonal anti-idiotype MabK10, sur l'attachement de *P. carinii* de rat en co-culture avec les cellules WI38VA13. Avant inoculation des parasites sur les cellules, ceux-ci sont préincubés avec différents milieux : (1) DMEM, pH7,2; (2) MabK10; (3) MabK10 neutralisé par le MabKT4.

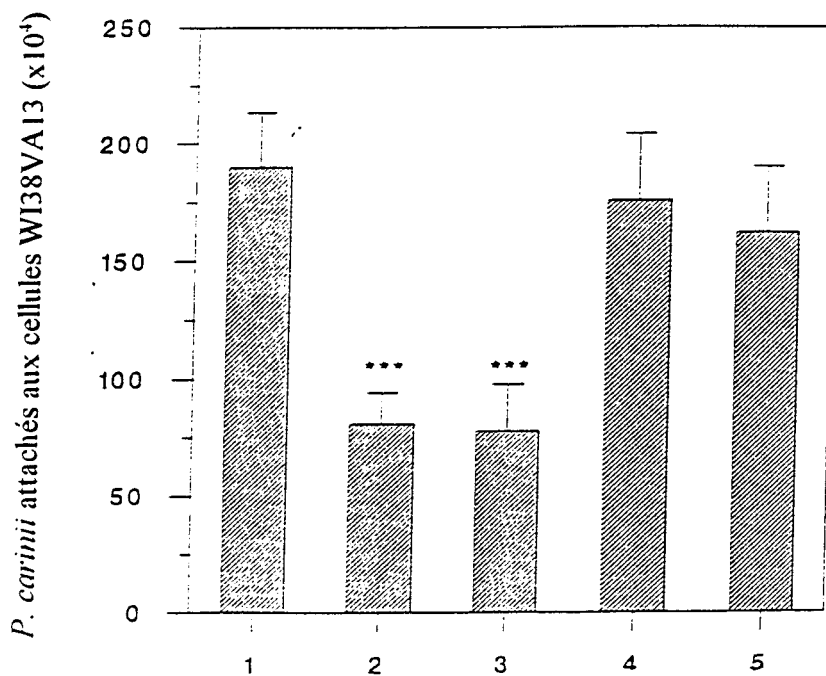


Figure 30 : Effet inhibiteur d'anticorps humains anti-idiotypes provenant de deux patientes sur l'attachement de *P. carinii* de rat en co-culture avec les cellules WI38VA13. Les différents milieux de préincubation des parasites sont: (1) DMEM, pH7,2; (2) anticorps humains anti-idiotypes provenant de la patiente A; (3) anticorps humains anti-idiotypes provenant de la patiente B; (4) anticorps humains sans effet "killer" = contrôle ; (5) anticorps humains anti-idiotypes neutralisés par le MabKT4. *** P<0,001, le nombre de parasites est comparé au contrôle.

sont neutralisés par le MabKT4. Une forte homologie moléculaire apparaît entre *P. carinii* et les levures, il est donc important pour nous de savoir si un effet similaire est visible sur *P. carinii*.

Des anticorps anti-idiotypiques purifiés chez 2 patientes (A et B) ont été testés contre *P. carinii*. Ils induisent une inhibition marquée et significative de l'attachement de *P. carinii* aux cellules WI38 VA13 (Figure 30). Par contre, aucun effet inhibiteur n'est observé lorsque les parasites sont traités avec du DMEM ou avec le contrôle négatif contenant d'autres anticorps humains non inhibiteurs provenant de sécrétion vaginale non retenus sur colonne d'affinité (contrôle fluide vaginal-négatif). Le taux d'inhibition obtenu lorsque les parasites sont traités avec les anticorps anti-idiotypiques est de 54% pour la patiente A et de 55,5% pour la patiente B, en les comparant avec les parasites traités avec le contrôle fluide vaginal-négatif (Figure 30). La spécificité de l'activité de ces anticorps anti-idiotypiques humains est attestée par la neutralisation avec le MabKT4.

9.3 Activité *in vivo* des anticorps anti-idiotypiques

Des expériences ont alors été entreprises chez les rats nude. Dans un 1^{er} temps, la préincubation des parasites dans différents milieux est maintenue, pour nous permettre de comparer ces expériences avec celles réalisées avec la toxine "killer". Les parasites sont ensuite injectés par voie trachéale aux rats nude comme cela a été décrit précédemment (3.1.6.2).

9.3.1 Effet des anticorps anti-idiotypiques avant l'installation de la pneumocystose

La figure 31 montre que les parasites incubés avec des anticorps humains n'ayant pas d'activité "killer", induisent une pneumocystose sévère chez le rat nude ($[246 \pm 45] \cdot 10^6$ parasites/animal). Au contraire, lorsque *P. carinii* est traité avec des anticorps anti-idiotypiques, l'infectivité de *P. carinii* pour les rats diminue ($[63,5 \pm 17] \cdot 10^6$ parasites/animal). Par rapport au contrôle, le pourcentage d'inhibition est de 74% lorsque les parasites sont traités avec les anticorps anti-idiotypiques (Figure 31). L'inhibition de l'infectivité est neutralisée par le MabKT4 ($[206 \pm 6,8] \cdot 10^6$ parasites/animal).

Il est donc intéressant maintenant d'essayer de traiter avec le MabK10 des rats nude atteints de pneumocystose.

9.3.2 Effet des anticorps anti-idiotypiques sur la pneumocystose en évolution

Dans cette optique, les rats nude sont inoculés par voie trachéale après 15 jours

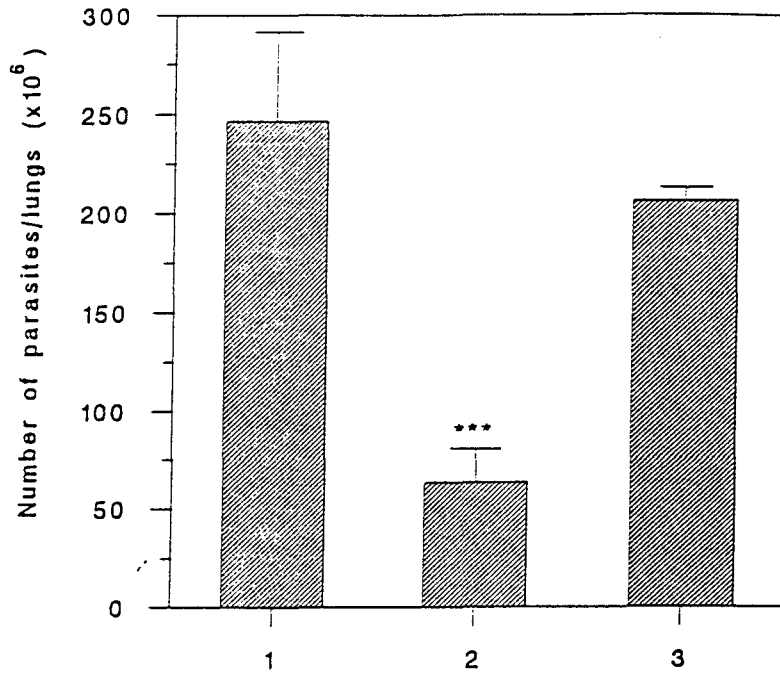


Figure 31 : Effet inhibiteur des anticorps humains anti-idiotypes sur l'infektivité des parasites de rat inoculés chez le rat nude. Les différents milieux de préincubation des parasites sont: (1) anticorps humains sans effet "killer" provenant de fluides vaginaux, il correspond au contrôle; (2) anticorps humains anti-idiotype provenant de la patiente A; (3) anticorps humains anti-idiotypes neutralisés par le MabKT4. ***P<0,001, le nombre de parasites est comparé au contrôle.

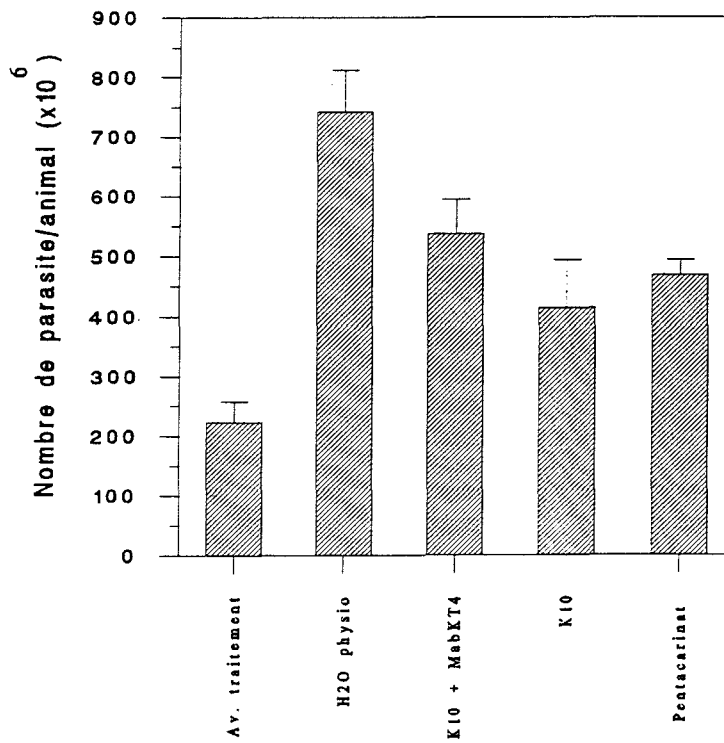


Figure 32 : Effet de l'anticorps monoclonal anti-idiotype sur une pneumocystose en évolution.

d'administration de corticoïdes. Trente jours plus tard (les rats sont toujours sous corticoïdes), 1 animal par lot est sacrifié pour vérifier le nombre de parasites présents dans leur poumon. Ils développent tous une pneumocystose. Alors 2 fois par semaine durant 3 semaines, les rats sont traités par nébulisation d'eau physiologique, de MabK10 (2mg/kg), de MabK10 neutralisé par le MabKT4 ou pentamidine (2mg/kg). Après ces 6 traitements, les animaux sont sacrifiés et leurs parasites comptés.

Les résultats sont reportés sur la figure 32. Le traitement des rats nude par aérosol avec le MabK10 induit une diminution du taux de parasites présents dans les poumons de l'animal par rapport au taux de *P. carinii* retrouvé lorsque les animaux sont traités avec le MabK10 neutralisé par le MabKT4. Cette diminution sans être significative est comparable à celle observée lorsque les animaux sont traités avec la pentamidine (Figure 32).

9.4 Immunolocalisation du MabK10 sur *C. albicans* et *P. carinii*

En voyant cet effet, assez comparable à celui rencontré dans les autres tests *in vivo*, nous avons voulu savoir où agissait le MabK10.

Les figures 33 et 34 montrent les sites de fixation du MabK10 sur *C. albicans* (Figure 33) et sur *P. carinii* (Figure 34). Sur *C. albicans*, il est clair que cet anticorps ne se localise que sur les tubes germinatifs (Figures 33B et C). Au niveau du contrôle (Figure 33A) aucun marquage n'est visible.

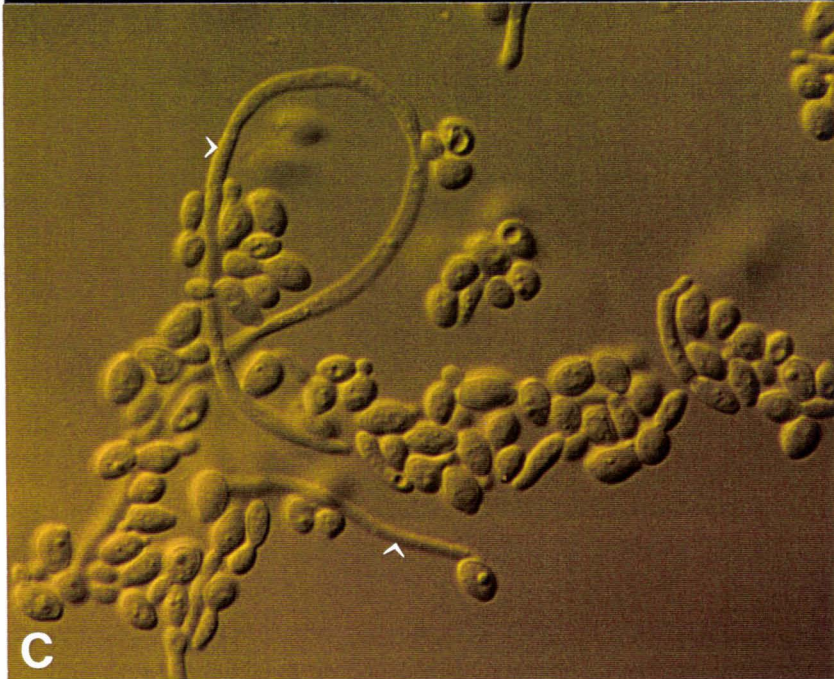
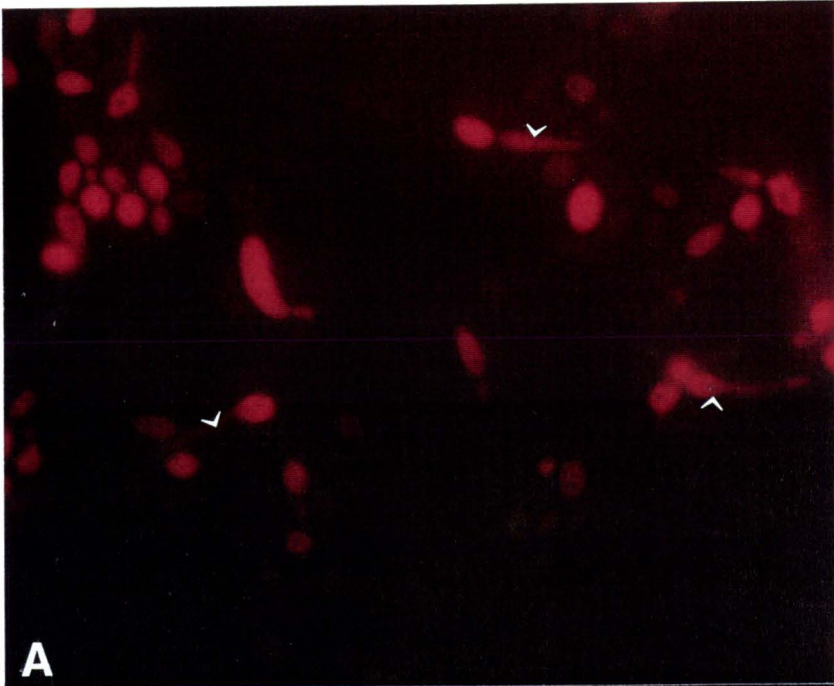
Pour *P. carinii*, la localisation du MabK10 a été plus difficile à mettre en place. En effet, les 1^{ers} essais ont été réalisés sur des parasites fraîchement extraits. Aucun marquage spécifique n'était alors visible. D'autres tests ont été effectués avec des parasites de culture, dépourvus de débris qui pourraient gêner la lecture (Figure 34). Dans ce cas, les kystes ou les prékystes, plus faiblement marqués que les trophozoïtes (Figures 34E et F). Les formes kystiques portent un marquage probablement pariétal (pointe de flèche, Figure 34C et D). Les images en microscopie interférentielle témoignent de la nature parasitaire des structures marquées (Figure 34C et E).

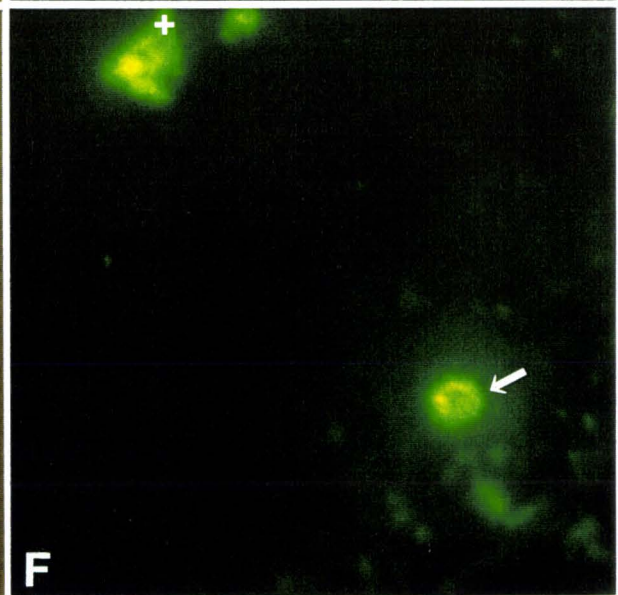
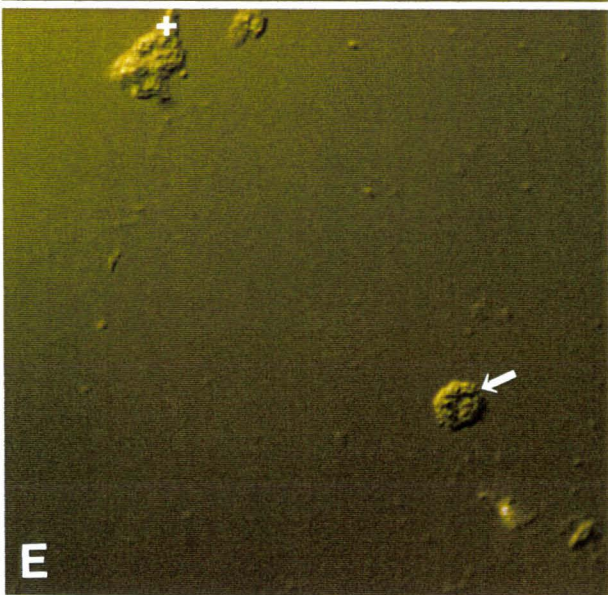
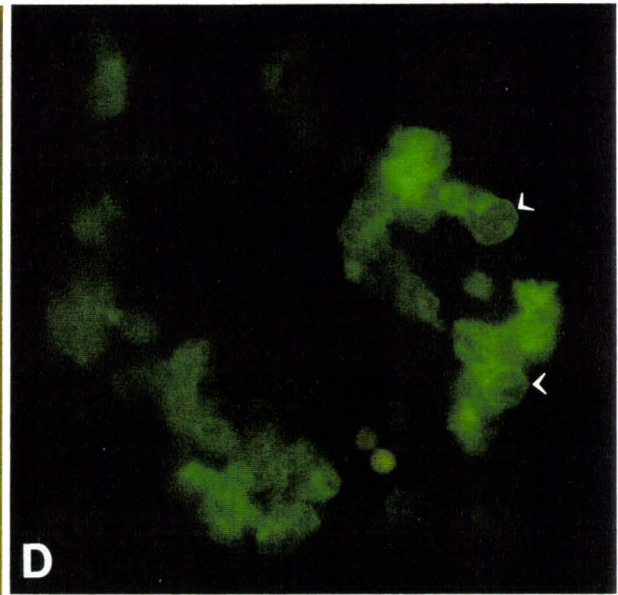
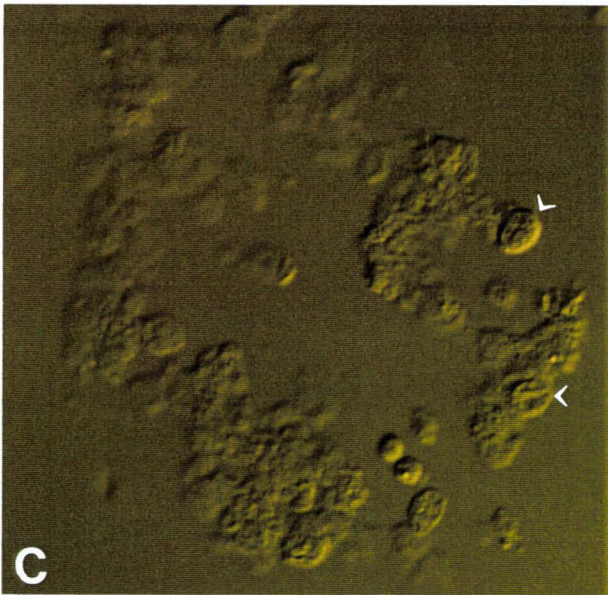
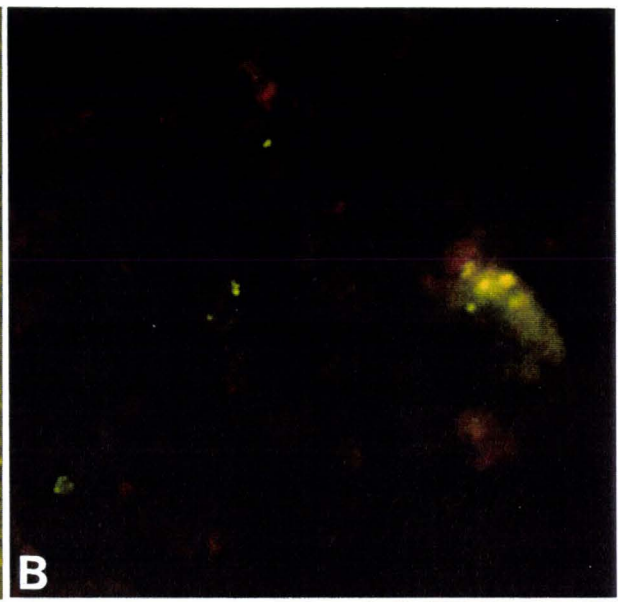
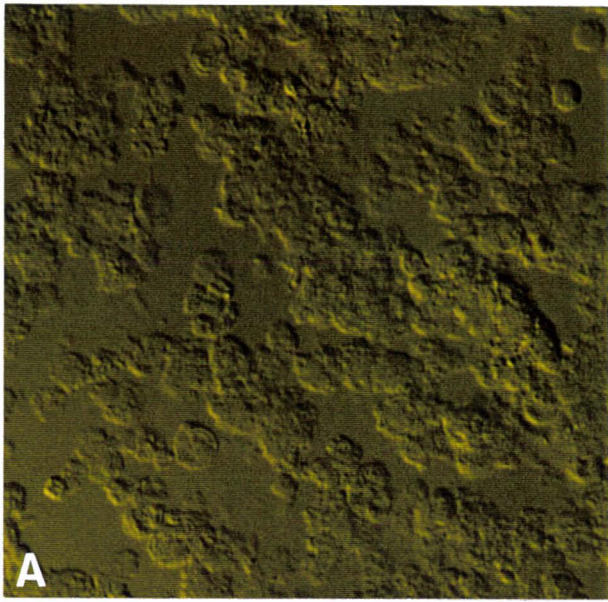
Figure 33 : Immunolocalisation de l'anticorps monoclonal anti-idiotypique (MabK10) sur *C. albicans*. **A**: contrôle sans aucun marquage (que ce soit au niveau des levures, ou du tube germinatif (flèche)); **B** et **C**: le site de fixation du MabK10 sur *C. albicans* se localise uniquement sur les tubes germinatifs (pointes de flèche). Grossissement :x600.

Page ci-contre

Figure 34 : Immunolocalisation de l'anticorps monoclonal anti-idiotypique (MabK10) sur *P. carinii* de rat provenant de culture. **A** et **B**: contrôle sans aucun marquage en dépit de la présence des parasites, confirmée par les images en microscopie interférentielle. **C-F**: les sites de fixation du MabK10 sur *P. carinii* a lieu aussi bien sur les formes kystiques (**D**, pointes de flèche) que sur les formes végétatives (**F**). Le trophozoïte (flèche) ou les groupes de trophozoïtes (+) sont plus marqués que les kystes. La microscopie interférentielle réalisée en parallèle témoigne de la nature parasitaire des structures marquées (**A**, **B**, **E**). Grossissement :x600.

Page suivante





4-DISCUSSION ET CONCLUSION

Les protocoles thérapeutiques actuels pour lutter contre la PPC sont peu nombreux et peuvent entraîner des effets secondaires importants. *P. carinii*, même s'il est sensible à l'action de drogues anti-protozoaires comme le sulfaméthoxazole-triméthoprime ou la pentamidine, reste un microorganisme difficile à combattre. Les agents antifongiques, quant à eux, sont généralement inefficaces, bien que les échinocandines et papulocandines, inhibiteurs de la synthèse des β -1-3-glucanes, aient montré *in vivo* un certain effet à l'encontre du parasite (Bartlett *et al.*, 1996).

De nouvelles stratégies doivent être envisagées pour le traitement et la prévention de la PPC chez ces patients. Il est donc important de caractériser les molécules qui s'avèrent capables d'interférer avec la relation hôte-parasite en inhibant l'attachement de *Pneumocystis* aux cellules épithéliales alvéolaires et donc l'infectivité chez deux modèles animaux que sont la souris SCID et le rat nude.

Sur le plan fondamental, comme *P. carinii* est classé parmi les champignons microscopiques, il était judicieux d'étudier l'activité des toxines antifongiques sur ce parasite. Nous avons choisi d'étudier plus particulièrement l'activité de la toxine "killer" de *P. anomala* en raison de son large spectre antibiotique et parce que nous possédions un anticorps monoclonal capable d'inhiber spécifiquement son activité antibiotique. En effet, comme la souche "killer" de *P. anomala* est potentiellement capable de sécréter plusieurs molécules antibiotiques, cet anticorps monoclonal, le MabKT4, s'est avéré un outil indispensable pour identifier la toxine.

X- INTERACTIONS MOLÉCULAIRES ENTRE *P. CARINII* ET LA TOXINE "KILLER" DE *P. ANOMALA*

10.1 Prépurification de la toxine "killer" de *P. anomala*

Un travail fondamental de caractérisation biochimique de la toxine "killer" a été nécessaire. Bien qu'elle fut utilisée comme un marqueur pour biotyper des souches de champignons lors d'infections nosocomiales (Polonelli *et al.*, 1983), cette toxine n'était pas véritablement caractérisée biochimiquement. Dans nos expériences, l'évaluation de l'activité "killer" sur milieu gélosé donne des résultats semi-quantitatifs et proportionnels à la quantité de toxine introduite dans chaque puits (100 μ l). Dans ces conditions, l'inhibition pouvait être considérée comme faible (Figure 12). C'est pourquoi, l'évaluation de l'activité antifongique de la

toxine "killer" en milieu liquide est apparue un test appréciable de part sa rapidité. En effet, 24h d'incubation suffisent pour visualiser l'inhibition de croissance de souches de levures sensibles. De plus, une sensibilité importante et l'utilisation de quantités plus faibles de toxine "killer" (10 μ l de surnageant contenant la toxine, Figure 14) font que ce test a été utilisé tout au long de notre étude vis-à-vis de la souche sensible K3 de *P. anomala*, pour contrôler l'activité antibiotique de la toxine brute (Figure 13), de la toxine prépurifiée (Figure 18), ou encore, des anticorps anti-idiotypes. Le fait de pouvoir travailler avec des quantités minimales de "drogues" est important, car lors de la purification de la toxine "killer", les quantités recueillies sont assez faibles et l'évaluation de l'activité biologique de la toxine prépurifiée n'aurait pu être réalisée par la méthode en milieu gélosé.

Après avoir mis au point le test évaluant l'activité antifongique de la toxine "killer", notre second objectif fût d'adapter la culture de la souche K36 (productrice de la toxine "killer") à se développer en milieu défini. En effet, le but de cette étude est de définir l'interaction entre la toxine "killer" de *P. anomala* et *P. carinii*. Même si la culture continue de *P. carinii* n'est pas encore disponible, il est possible de produire des parasites viables et infectieux pendant 8 jours de culture (Aliouat *et al.*, 1995) en milieu défini (le milieu DMEM). C'est pourquoi, afin de faire agir cette toxine sur des lignées cellulaires en milieu défini, nous avons envisagé de développer la production de la toxine "killer" de *P. anomala* (K36) dans ce milieu (Figure 14).

Suivant ces améliorations, la toxine "killer" est produite en milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF. Elle est aussi active que celle produite en milieu non défini (Figure 14). Même dans ce milieu, qui est en réalité semi-défini puisque supplémenté avec du SVF, elle se trouve parmi de nombreux métabolites provenant de la souche K36. La caractérisation de la toxine "killer" est réalisée après prépurification par chromatographie gel-filtration. La fraction renfermant le surnageant prépurifié s'est révélée active en milieu liquide contre la souche K3. Elle est utilisée pour l'analyse électrophorétique. Seules 3 bandes sont visibles suggérant qu'une ou plusieurs des 3 bandes visualisées pourraient correspondre à des protéines impliquées dans l'activité toxique. Cependant, en dépit de plusieurs essais d'immuno-marquage avec le MabKT4, aucune de ces 3 bandes n'a été reconnue par l'anticorps. L'hypothèse qui expliquerait l'absence de marquage est la suivante: lors de la manipulation, la fixation de la protéine native sur la feuille de nitrocellulose modifie la conformation tridimensionnelle de la protéine. La conformation spatiale de l'épitope pourrait être modifiée empêchant toute reconnaissance par le MabKT4.

Cailliez *et al.* (1993) rapportent que la production de la toxine "killer" de *P. anomala* n'est pas affectée en présence de tunicamycine, ce qui est en faveur d'une activité "killer" due à la partie protéique de la toxine. Les 3 bandes électrophorétiques individualisées peuvent correspondre à: (i) des protéines à activité toxique dont les poids moléculaires sont 64, 90 et 98kDa, puisque la même fraction est active contre le parasite, (ii) la toxine sous forme polymérique où du fait de la dénaturation de la protéine, elle s'est dissociée et migre suivant son poids moléculaire. Des exemples de toxines "killer" dimériques sont rapportés dans la littérature, comme celle de *Ustilago maydis* (Koltin, 1988), (iii) plusieurs toxines, (iv) la toxine peut être présente, mais associé à d'autres protéines se trouvant dans le sumageant. Les résultats de Polonelli *et al.* (1987), obtenus après extraction des protéines totales de *P. anomala* afin de caractériser 2 anticorps monoclonaux (MabKT1 et MabKT4), montrent la présence de 2 bandes de 92 et 115kDa reconnues en immuno-blots par MabKT1 et très faiblement par le MabKT4. Ce qui explique notre difficulté à mettre en évidence la toxine avec le MabKT4 par immunomarquage. Quant aux bandes retrouvées dans notre analyse électrophorétique de la fraction active, celles de 90 et 98kDa pourraient correspondre avec celles décrites par Polonelli *et al.* (1987), mais nous ne pouvons pas l'affirmer.

10.2 *In vitro*

L'attachement de *Pneumocystis* aux cellules pulmonaires est une phase cruciale dans la physiopathogénie de la pneumocystose. A l'heure actuelle, aucune drogue n'a pour cible cette interaction. En utilisant les systèmes de co-culture, nos travaux ont montré que la toxine "killer" de *P. anomala* peut inhiber de manière significative (40%) l'attachement et le développement du parasite sur différentes lignées cellulaires épithéliales alvéolaires de rat ou sur des fibroblastes de rein de singe vert (Séguy *et al.*, 1994). D'autres auteurs corroborent ces résultats puisque Merali *et al.* (1991) en faisant agir une drogue, l'artémisine (dérivée du quinghaosu) sur *P. carinii* en culture axénique, obtient une diminution de l'attachement du parasite de 63% après 24h de culture. Ses résultats sont comparables à ceux obtenus lorsque *P. carinii* se trouve en présence de pentamidine (Merali *et al.*, 1991). De nombreux autres travaux relatent l'effet de toxines "killer" vis-à-vis d'autres microorganismes. Ils décrivent une inhibition de la croissance des levures sensibles comme c'est le cas pour la toxine "killer" de *Zygosaccharomyces bailii* contre *S. cerevisiae* et *Candida glabrata* (Radler *et al.*, 1993) ou de la toxine "killer" de *P. anomala* contre *C. albicans* (Polonelli *et al.*, 1991) ou encore de la toxine "killer" de *Williopsis mrakii* contre

Candida spp (l'inhibition est de 34 à 66%, Hodgson *et al.*, 1995). Il est rapporté aussi une inhibition de l'adhésion d'*Entamoeba histolytica* aux globules rouges de 48%, lorsque les amibes sont préincubées dans une suspension de *Saccharomyces boulardii* (Rigothier *et al.*, 1994).

Cette méthode *in vitro* est particulièrement intéressante pour évaluer l'activité "killer" de la toxine sur *P. carinii*. Elle présente l'avantage d'être rapide, comparée aux expérimentations menées *in vivo*. De plus, elle permet d'apprécier l'effet de la drogue aussi bien sur les trophozoïtes que sur les kystes (Figure 19). Un inconvénient est le système de préincubation indispensable des parasites avec la toxine "killer". En effet, la toxine "killer" de *P. anomala* n'est active de manière optimale qu'à pH4,6 et à une température de 25°C. Ainsi, des contrôles d'acidité ont été réalisés tout au long de cette étude. En effet, des levures sensibles ont été soumises au milieu de culture à pH4,6, mais sans toxine "killer" (Tableau 6). Ces témoins n'ont pas montré d'inhibition de croissance des levures due à l'acidité du milieu (Aliouat *et al.*, 1993). De même, en réitérant l'expérience avec cette fois *P. carinii*, il est clairement établi que le milieu de culture à pH4,6 dans nos conditions de travail, n'induit pas de diminution du pouvoir infectieux de l'inoculum parasitaire lorsque les parasites sont inoculés chez la souris SCID (Figure 24).

Plusieurs questions se posent alors. Comment agit la toxine "killer" de *P. anomala* ? Engendre-t-elle quantitativement sur *P. carinii*, un effet comparable à celui rencontré avec des souches de levures sensibles ? Inhibe-t-elle seulement l'attachement des parasites aux cellules cibles par un simple encombrement stérique, ou a-t-elle un réel effet sur la viabilité de *P. carinii*? Agit-elle préférentiellement sur une forme parasitaire particulière ?

Pour répondre à ces interrogations, 2 tests de viabilité sont réalisés au cours de ce travail. L'immunofluorescence montre sans ambiguïté que la toxine "killer" se fixe aussi bien sur les formes végétatives que sur les formes kystiques (Figure 25). Le test d'incorporation du [³H]-pABA indique que la viabilité des parasites est diminuée par la toxine "killer". Il faut cependant discuter l'application de ce test à *P. carinii* en présence de toxine. Car nos observations indiquent qu'un pH de 4,6 affecte l'incorporation du [³H]-pABA. Il est à souligner que même dans ces conditions la toxine "killer" inhibe de manière significative (environ 40%) la viabilité des parasites (Tableau 8). Ces données confirment que la toxine de *P. anomala* a un réel effet "killer" vis-à-vis des parasites et expliquent les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*.

L'utilisation des tests *in vitro*, implique deux restrictions importantes. D'une part, les isolats parasitaires provenant de modèles animaux autres que le rat, sont difficilement, voire non cultivables. D'autre part, l'utilisation de ce modèle, même s'il nous permet de constater l'influence de la toxine sur l'attachement du parasite, permet difficilement d'affirmer l'existence d'un véritable effet antibiotique. De plus, en utilisant une source animale, le rat, comme réservoir de parasites, nous négligeons l'hétérogénéité génétique de *P. carinii*, rapportée en fonction de l'hôte (Sinclair *et al.*, 1991 ; Wakefield *et al.*, 1992 ; Mazars *et al.*, 1995). Sachant qu'une même toxine pouvait être active ou non sur des souches différentes de levures, il est intéressant de savoir si des isolats de *P. carinii* provenant d'hôtes différents étaient tous sensibles à l'effet "killer". Il fallait vérifier ces résultats observés *in vitro*, sur 2 modèles animaux pour lever le biais possible introduit par l'hétérogénéité génétique du parasite en fonction de l'hôte.

10.3 *In vivo*

Le rat et la souris soumis à une administration prolongée de corticoïdes développent une pneumocystose en trois mois. Les animaux étant naturellement infectés par *P. carinii*, l'inoculation n'est pas nécessaire mais les infections obtenues sont souvent peu reproductibles. En effet, la pneumocystose de la souris est souvent peu intense et très variable d'un animal à l'autre. Les études 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 donc été utilisés: la souris SCID et le rat nude.

Les souris SCID ont été instillées par voie nasale avec une suspension de parasites viables provenant de souris. L'anesthésie, en inhibant le réflexe de déglutition, permet à la totalité des parasites d'atteindre les poumons. La fiabilité et la reproductibilité de ce modèle, permettent d'obtenir des infections intenses 40 jours après inoculation.

Les rats nude ont été inoculés avec *P. carinii* de rat. L'anatomie des voies aériennes supérieures du rat est très différente de celle de la souris et ne permet pas ou très difficilement, à une suspension parasitaire instillée par voie nasale d'atteindre les poumons de l'animal. C'est pourquoi, nous avons inoculé les parasites directement par voie trachéale. 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 relative pour *P. carinii* à proliférer dans le

poumon de l'animal. Afin d'atténuer les défenses non spécifiques, nous avons administré des corticoïdes aux rats nude. 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. 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.

Ces deux modèles animaux permettent d'obtenir des infections intenses et reproductibles. Le nombre de parasites retrouvés dans les poumons le sont en très grande quantité, permettant ainsi d'apprécier une diminution du taux de parasites, donc de l'infectivité, après incubation des parasites avec certaines drogues. Bien sur, la finalité du travail n'est pas d'obtenir une éradication complète de *P. carinii*, mais d'apprécier si une molécule est capable d'engendrer un effet antibiotique sur *P. carinii*. C'est ce que nous voyons lorsque les parasites sont préincubés avec la toxine "killer" de *P. anomala*. La diminution du taux de parasites est significativement importante aussi bien chez la souris SCID que le rat nude (Figures 21 et 22). Le pourcentage d'inhibition de l'infectivité est de 75 à 99% chez la souris SCID (Séguy *et al.*, 1996) et de 87% chez le rat nude (Tableau 7 et Figure 24B respectivement). En obtenant une activité "killer" de la toxine de *P. anomala* à la fois sur *P. carinii* de rat et de souris, on peut penser qu'en dépit d'une hétérogénéité génétique de *P. carinii*, la toxine "killer" restera efficace sur du *P. carinii* humain.

XI- INTERACTIONS ENTRE *P. CARINII* ET LES ANTICORPS ANTI-IDIOTYPES



11.1 Anticorps monoclonaux anti-idiotypes

Puisque la toxine "killer" de *P. anomala* ne peut être utilisée *in vivo* comme agent thérapeutique, en raison des conditions de pH et de température pour lesquelles elle est active, une nouvelle stratégie de recherche a été envisagée. Des anticorps anti-idiotypes produits contre l'anticorps monoclonal anti-toxine (MabKT4) et mimant les propriétés biologiques de la toxine, ont été produits. Ces anticorps anti-idiotypes devraient posséder les activités antibiotiques de la toxine fongique de *P. anomala*. De cette manière, le MabKT4, capable de neutraliser les propriétés "killer" de la toxine, a été utilisé comme immunogène pour induire la production d'anticorps anti-idiotypes. Un des hybridomes obtenus a permis la production d'un anticorps

monoclonal anti-idiotype, le MabK10, capable d'agir sur la croissance de levures sensibles à la toxine. De plus, le MabKT4 neutralise le MabK10, prouvant ainsi la spécificité de son action. Les résultats obtenus après préincubation des parasites avec le MabK10 lors des tests d'attachement, montrent que cet anticorps monoclonal inhibe l'adhésion des parasites aux cellules alvéolaires. Il mime donc l'action de la toxine "killer" témoignant d'une éventuelle conservation épitopique. Toutefois, nous ne savons pas où se localisent spécifiquement ces anticorps anti-idiotypes ou même la toxine "killer". Est-ce qu'un stade parasitaire est plus sensible qu'un autre à l'effet "killer"?

Par immunofluorescence indirecte, la toxine "killer" se fixe à la fois sur les kystes et les trophozoïtes de *P. carinii* (Aliouat *et al.*, 1993). Un marquage pariétal, régulier, est visible aussi sur *P. carinii* incubé avec le MabK10 (Figure 34) et également retrouvé sur les tubes germinatifs de *C. albicans* (Figure 33). Plus précisément, sur *P. carinii*, la toxine "killer" de *P. anomala* est localisée en ultrastructure dans la couche intermédiaire hypodense de la paroi kystique (Figure 27). Ce résultat mérite d'être discuté car ces dernières années, la paroi kystique de *Pneumocystis* a fait l'objet de plusieurs études qui sont résumés par Ruffolo (1994). La couche dense externe du kyste contiendrait de la chitine et la couche hypodense interne (ou intermédiaire si l'on considère la membrane plasmique comme 3^{ème} couche), serait riche en glucanes. Une activité α -1,4 D glucane synthétase importante est rapportée chez *P. carinii* par Williams *et al.* (1991). De plus, des évidences immunologiques de la présence de β -1,3 glucanes à la surface des parasites, ont récemment été décrites (Nollstadt *et al.*, 1994). Ainsi, la localisation de la toxine au niveau de la couche interne hypodense du kyste suggère que le ou les récepteurs spécifiques de cette molécule existent dans cette couche, riche en β -1,3 glucanes. Sachant que la toxine "killer" de *P. anomala* et les anticorps anti-idiotypes sont aussi actifs contre *C. albicans* (Polonelli *et al.*, 1994, 1996), il est probable que ces récepteurs soient de nature transphylétique.

11.2 Les anticorps anti-idiotypes naturels humains

L'existence d'anticorps anti-idiotypes humains est venue de l'hypothèse suivante : si des personnes atteintes de candidoses produisent des anticorps dirigés contre les antigènes de surface de ces levures ; si les souches de *Candida* sont sensibles à l'activité antibiotique de la toxine "killer" de *P. anomala*, il est probable que certains anticorps humains soient des anticorps anti-récepteur des toxines "killer". Il a été démontré expérimentalement que des anticorps anti-

idiotypes produits contre le MabKT4, exerçaient une activité "killer" contre *Candida* (Polonelli *et al.*, 1993). Par conséquent, parmi les anticorps de ces patients se trouvent des anticorps anti-idiotypes, ayant une activité antibiotique potentielle contre les souches sensibles à la toxine.

L'équipe du Pr. Polonelli a pu isoler des anticorps anti-idiotypes provenant de patientes ayant contracté une candidose vaginale. Ces anticorps ont été purifiés sur une colonne d'affinité sur laquelle était fixé le MabKT4. Cette équipe les a testé contre *C. albicans in vitro*. Ils se sont avérés posséder certaines propriétés de la toxine "killer". Ils inhibent le développement des levures et ils sont neutralisés par le MabKT4 (Polonelli *et al.*, 1994). L'homologie probable concernant les molécules pariétales entre *P. carinii* et les levures pourrait laisser supposer que ces anticorps aient un effet inhibiteur similaire sur le développement de *P. carinii*. Ce que nous avons d'ailleurs vérifié par l'expérience suivante.

Des anticorps anti-idiotypes purifiés à partir de fluides vaginaux de 2 patientes, induisent tous les deux une inhibition marquée et significative (55,5%) de l'attachement de *P. carinii* aux cellules WI38 VA13 (Figure 30). Cette inhibition est comparable à celle observée lorsque la toxine "killer" est testée sur *P. carinii* cultivé sur d'autres lignées cellulaires (Aliouat *et al.*, 1993 ; Séguy *et al.*, 1994). De plus, lorsque ces anticorps anti-idiotypes naturels sont neutralisés par le MabKT4, l'effet inhibiteur induit sur l'attachement du parasite est significativement réduit ($p < 0,001$). Ces données indiquent que ces anticorps anti-idiotypes ont une affinité pour la région idiotypique du MabKT4. Il est difficile de déterminer si cette affinité résulte d'une complémentarité parfaite entre les 2 molécules. Les anticorps anti-idiotypes humains inhibent aussi l'infectivité des parasites inoculés chez le rat nude.

Après avoir montré un effet antibiotique du MabK10 sur *P. carinii*, il était intéressant d'évaluer son activité sur une PPC en évolution. Car dans les expériences précédentes, les parasites sont traités avant l'installation de la pneumocystose, avant son développement. Quelle serait l'efficacité d'un traitement direct avec le MabK10 sur la pneumocystose déjà bien établie ? Pour répondre à cette interrogation, des rats nude atteints de pneumocystose sont traités par nébulisation avec le MabK10.

11.3 Traitement de la pneumocystose

Les barrières physico-chimiques qui empêchaient l'utilisation de la toxine "killer", n'existent pas avec le MabK10. Ainsi, des rats nude sous corticoïdes inoculés par voie trachéale avec *P. carinii* développent une pneumocystose 30 jours après inoculation. Ils subissent un

traitement par nébulisation du MabK10. Au total, 6 nébulisations sont effectuées. Les résultats révèlent que le MabK10 induit une inhibition de l'infectivité équivalente à celle obtenue lorsque les rats sont traités avec la pentamidine (Figure 32). Toutefois, si la comparaison se fait mole à mole, le MabK10 (IgM) est environ 3000 fois plus actif que la pentamidine. Ce premier résultat est encourageant, il faut poursuivre en augmentant la dose de traitement (quantité de MabK10 qui nous faisait défaut lors de la première expérience).

De nombreux auteurs ont montré l'efficacité de la nébulisation de pentamidine pour prévenir des atteintes pulmonaires, surtout chez des patients VIH + (Chein *et al.*, 1992 ; Hughes, 1995 ; Sepkowitz, 1995) mais aussi chez les patients non infectés par le VIH (Kovacs *et al.*, 1989a). En effet, ce traitement permet un accès direct des microorganismes à la drogue, dans le poumon, car les solutions sont pulvérisées en microgouttelettes et pénètrent profondément, jusqu'aux alvéoles. Cependant, des problèmes comme la taille des particules nébulisées, la température, ou la régularité du débit nébulisé, peuvent survenir lors du calibrage de l'appareil nébuliseur, provoquant alors des erreurs sur les doses inhalées (Taylor *et al.* 1993). De plus, la chimioprophylaxie à la pentamidine n'est pas sans risque. Indépendamment des effets secondaires, elle favorise une dissémination des parasites dans l'organisme induisant des pneumocystoses extrapulmonaires, principalement dans le foie et les reins (Oz *et al.*, 1996).

Ces données révèlent l'intérêt potentiel d'une approche anti-idiotypique dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre la pneumocystose. Néanmoins, afin de diminuer tout effet secondaire, des peptides recombinants (constitués uniquement des parties hypervariables reliées entre elles par une séquence peptidique inerte) sont préparés par l'équipe du Pr L. Polonelli. Ils ont montré une activité anti-*C. albicans* significative (communication personnelle). Dans le cadre d'une collaboration entre les deux équipes, un peptide recombinant a été testé contre *P. carinii*. Ce recombinant induit une diminution significative et plus intense (47%) de l'attachement du parasite sur la lignée WI38VA13 comparativement au test réalisé en présence de la toxine "killer".

XII- PERSPECTIVES

Les perspectives de ce travail concernent les domaines biotechnologique, immunoprophylactique et thérapeutique.

Le large spectre de l'activité anti-microbienne de la toxine "killer" de *P. anomala*, active contre des organismes procaryotes et eucaryotes, et le fait que des anticorps anti-idiotypiques mimant son activité, sont produits naturellement chez l'homme (Polonelli *et al.*, 1993), indiquent que le ou les récepteurs pour cette molécule sont ubiquistes, présents chez de nombreux microorganismes pathogènes phylogénétiquement distants. Sur le plan biotechnologique, l'identification de ce ou ces récepteurs transphylétiques, qui sont en fait de nouvelles cibles thérapeutiques, permettrait de concevoir de nouvelles molécules antimicrobiennes efficaces contre une large gamme de pathogènes.

Ce type de principes thérapeutiques est nécessaire à l'heure actuelle, notamment chez les patients immunodéprimés, en particulier chez ceux infectés par le VIH. En effet, une molécule efficace en même temps contre plusieurs agents opportunistes diminuerait les effets secondaires associés à la prise simultanée de plusieurs médicaments et augmenterait l'adhésion des patients aux protocoles thérapeutiques et chimioprophylactiques.

Ces recherches devraient conduire à des nouvelles stratégies immunoprophylactiques fondées sur le phénomène "killer". L'immunisation avec le MabKT4 a protégé des souris contre la candidose systémique; le degré de protection était corrélé avec les taux sériques des anticorps anti-idiotypiques (Polonelli *et al.*, 1993). Ainsi, bien que la PPC survienne en général dans un contexte d'intense dépression immunitaire, il est envisageable que les patients à risque (receveurs de greffes d'organe, de traitements anti-néoplasiques ou infectés par le VIH) puissent bénéficier d'une immunoprotection idiotypique active (Fagerberg *et al.*, 1994 ; Reinsberg, 1995) avant de se trouver en état d'immunosuppression extrême (cascade idiotypique de Jerne).

En final, les outils de biologie moléculaire donnent une plus grande liberté quant à la possibilité de produire des peptides recombinants. Ils seront synthétisés artificiellement et posséderont une meilleure identité idiotypique (Amzel *et al.*, 1994). De plus, étant parfaitement définis, ils n'induiront pas d'effet secondaire indésirable comme pourrait le faire certaine drogue. Ces recombinants sont déjà largement utilisés pour combattre d'autres agents infectieux (Ulmer *et al.*, 1993) comme les virus (Salk *et al.*, 1993), les bactéries pathogènes et les parasites. On peut également les retrouver pour des traitements ou en prévention lors de cancer (Agostini *et al.*, 1995).

En somme, l'activité anti-*Pneumocystis* de la toxine "killer" produite par *P. anomala* et des anticorps anti-idiotypiques monoclonaux ou recombinants mimant son action, indique que des nouvelles stratégies de prévention et thérapeutiques fondées sur le phénomène "killer"

Discussion

méritent d'être sérieusement explorées. L'identification et la caractérisation des récepteurs transphylétiques pour ces molécules antimicrobiennes émergentes sont des objectifs immédiats, essentiels pour avancer dans ce programme, et constituent les défis technologiques auxquels nous sommes confrontés à l'heure actuelle.

5-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

Zupan (V), Lacale-Masmonteil (T), 1993. Le surfactant pulmonaire : de la physiopathologie à la thérapeutique. *Méd. Sci.*, 9, 277-287.

6-ARTICLES

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

E M Aliouat¹, J C Cailliez^{1,2}, N Séguy¹, E Dei-Cas^{1,3}, L Polonelli⁴, M Gerloni⁴, S Conti⁴ and D Camus^{1,3}

¹I.N.S.E.R.M. (U. 42), 369, rue Jules Guesde, 59651 Villeneuve d'Ascq; ²Faculté Libre des Sciences, 13 rue de Toul, 59046 Lille; ³Centre Hospitalier Régional et Universitaire, 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France; ⁴Istituto 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 uncertain¹⁻³. 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 fungus⁴⁻⁸.

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 cells⁹.

Yeast killer toxins are naturally secreted molecules characterized by a specific antimicrobial activity, directed against a large panel of congeneric and, sometimes, intergeneric species¹⁰. 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 nature¹¹. Second, killer toxins have previously been used as epidemiological markers for intraspecific differentiation of opportunistic yeasts¹². 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^{12,13}. Because *P. carinii* is known to be susceptible to a small number of antimicrobial agents which frequently induce unwanted effects¹⁴, 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* infection¹⁵, were administered prednisolone metasulfobenzoate (Houdé Laboratories, France), in the drinking water (40 mg l⁻¹) for 9–12 weeks. Female Wistar rats were administered dexamethasone (Merck, Sharp and Dohme Chibret, France) in the drinking water (2 mg l⁻¹) for 6–9 weeks¹⁶. 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)¹⁷ and RAL-555, a Giemsa-like staining (Soc. RAL, France)¹⁸. Infected lungs were cut into 1 mm³ 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 NH₄Cl 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 stain¹⁹. 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 Yoshida²⁰ correlated with the light microscopic aspect of each stage². 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 3.10⁶ parasites) was added in each well. Plates were incubated at 37° C in an atmosphere of 5% CO₂. 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-Giemsa¹⁹. 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 phenotype¹⁰. 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 activity²¹. 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 3.10⁶ ml⁻¹ *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 described²². 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

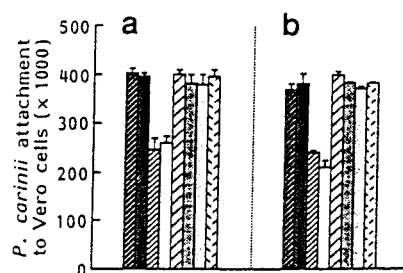


Figure 1. Inhibitory effect of the *Pichia anomala* UCSC 25F killer toxin on the attachment of rat-derived *Pneumocystis carinii* to Vero cells. Before the attachment assay (see text) the parasites were preincubated 1 h (a) or 2 h (b) with the killer toxin (KT) either in Dulbecco minimum essential medium 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.

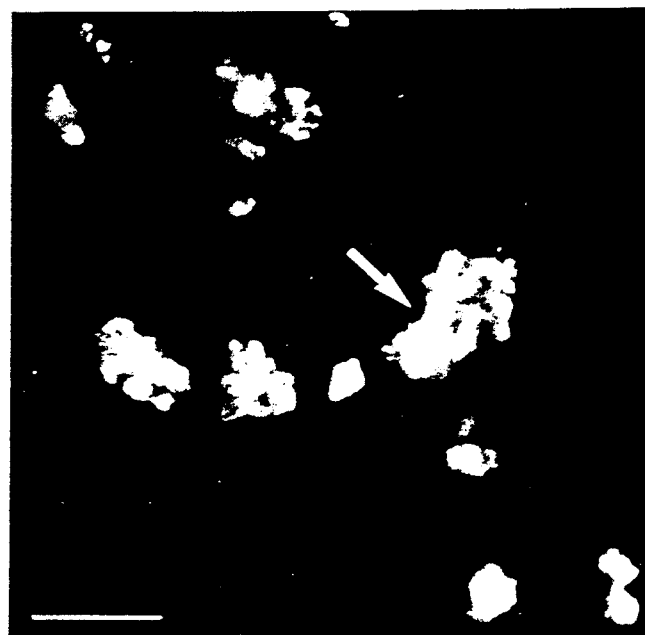


Figure 2. Detection of the *Pichia anomala* UCSC 25F killer toxin on rat-derived *Pneumocystis carinii* trophozoites by indirect immunofluorescence assay, using the anti-*P. anomala* killer toxin monoclonal antibody (Mab KT4) and FITC-conjugated anti-mouse antibodies. The living parasites were incubated with the killer toxin for 1 h at 25° C. Trophozoite clusters (arrows) are intensively stained. Bar = 5 μ 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.^{10,23}, 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 made¹⁰. 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 toxin²¹, 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 strain²¹. 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^{3,9}. 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 attach³, 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*)^{12,13}. 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 strain¹³. 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) microorganisms¹⁰. In so far as there are no reports on the effect of yeast killer toxins on protozoan organisms^{13,24}, 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 infections²⁵. 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 cells¹². 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 conditions²⁶.

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 antibiobodies²⁶. 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^{12,13}. 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 receptors¹².

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- β -glucan synthesis inhibitors. *Proc Nat Acad Sci US* 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

TOXLET 02953

Toxic action of ethylene oxide on pulmonary cells (L132) cultured under aerobic conditions

Nathalie Seguy, Hartmut F. Hildebrand and Jean-Marie Haguenoer

Institut de Médecine du Travail, CERESTE, Lille (France)

(Received 23 November 1992)

(Revision received 26 February 1993)

(Accepted 2 March 1993)

Key words: Ethylene oxide; Cell line (L132); Lactate dehydrogenase; Adenosine triphosphate

SUMMARY

In environmental health, inhalation is the most prominent route of ethylene oxide (EO) exposure. In the current study, human embryonic pulmonary epithelial cells (L132 cell line) were exposed to EO following a prior adaptation to atmospheric conditions. A comparative study between two EO exposure conditions (0.07 and 0.18 g/m³ gas injections) was carried out after a 1-h incubation. Whereas control cells were exposed to a pure air stream. The EO cytotoxicity was established by electron microscopy and LDH and ATP determinations after 1, 3, 6 and 24 h following the exposure. The ultrastructural examination revealed a remarkable vacuolisation of the exposed cells leading to cell death. In spite of this modification, the number of mitochondria and the content of endoplasmic reticulum increased in the L132 cells. For both exposure concentrations LDH was released into the extracellular milieu. In the presence of the high EO concentration, LDH activity increased with respect to the post-exposure time involving alteration of the membrane and permeability. For low EO exposure, ATP synthesis was significantly increased after 1 h of post-exposure ($P < 0.01$) and decreased to normal levels after 6 h. For the high EO concentration, however, ATP continually increased with respect to the post-exposure time. This indicates cellular stimulation and suggests the activation of a defense mechanism. This study shows a direct EO cytotoxicity on L132 cells cultured in atmospheric conditions.

INTRODUCTION

Ethylene oxide (EO) is a strong insecticide, bactericidal and germ-destroying agent. For these reasons, it is widely used for the disinfection and sterilization of thermosen-

Correspondence to: H.F. Hildebrand, Institut de Médecine du Travail, Laboratoire de Toxicologie Professionnelle, Faculté de Médecine, 1 Place de Verdun, F-59045 Lille Cedex, France.

sitive materials, particular surgical instruments and materials, drugs and cosmetics, fruits and foods. Consequently, many workers engaged in the EO production [1] and in the sterilization of materials [2] are exposed to this agent. The appearance of various biological incidences has generated a lot of follow-up and epidemiological studies dealing with the different pathologies: ophthalmologic [3], cutaneous [4], neurologic [5,6], and respiratory [7]. These findings have been confirmed by animal experiments [8,9], where non-neoplastic lesions significantly increased in adrenal glands, lungs, spleen, and in the nasal cavity [8]. In addition, evidence has been reported for the EO carcinogenic and mutagenic effects by *in vivo* studies on exposed workers [1,10-12], and experimental animals [8,9,13,14], as well as by *in vitro* tests on different human cell lines [15,16].

The toxic mechanism of this compound is, however, still unknown, and to our knowledge, important investigations assessing the toxicity of EO on specific cells in culture do not exist. Since lung is the dominant organ of exposure, we initiated this study to determine the *in vitro* effects of EO on human embryonic pulmonary epithelial cells (L132 cell line). In contrast to more traditional monolayer experiments, in the current study we used an aerobiosis culture system where cells grow under physiological respiratory conditions [17,18]. The cellular behaviour in response to the aggression of this compound was assessed by electron microscopy and by the determination of lactate dehydrogenase (LDH) and intracellular adenosine triphosphate (ATP), indicators of cellular integrity and of the cellular reserve energy status, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Ethylene oxide is a $10 \pm 0.5\%$ dilution in CO_2 ('Stéroxal', CFPO, Paris, France).

Cell culture

L132 cell line derived from normal human embryonic lung epithelium (ATCC-CCL5) were used. Cells were cultured in plastic bottles in MEM 2011 medium (Eurobio, Paris, France) supplemented with 5% fetal calf serum.

For experimental conditions, cells were cultured according to the biphasic cell culture method described by Voisin et al. [17,18]. Cells (10^5) were layered on a porous cellulose triacetate membrane (Millipore GS, $0.22 \mu\text{m}$, Paris, France). This membrane was placed in a Petri dish at the surface of a reservoir filled with MEM 2011 medium supplemented with 10% fetal calf serum. Under these conditions, cells were in direct air contact without a liquid medium interface. In all studies, cells were incubated in a special chamber (ReCon: Thermo Cell Controller 3015 N, Stadthagen, Germany) under pure and controlled air mixture: 21% O_2 , 5% CO_2 , 74% N_2 (CFPO, Rouen, France).

Ethylene oxide exposure

EO was introduced into the chamber by a three-way valve. The flux was regulated to expose cells to 0.07 g/m³ and 0.18 g/m³. EO concentrations were controlled in each experiment on samples collected in carbon filter tubes (Orbo 78, Supelco) followed by gas phase chromatography coupled to an electron capture detector (Shimadzu GC-9A, column: CP-WAX 52-CV, 25 m, 0.32 mm and vector gas: azote).

Prior to EO treatment, a 24-h period of growth was chosen to allow good adherence of cells to the membrane. Cells were then exposed to EO for 1 h. Ultrastructural studies and ATP determinations were carried out 1, 3 and 6 h after the end of EO exposure, LDH determinations after 1, 3 and 6 h (high dose) and 1, 3, and 24 h (low dose).

Electron microscopy

Cells were fixed with membranes (Millipore GS, 0.22 μm) for 20 min in 2.5% glutaraldehyde in MEM medium without fetal calf serum [19]. After two washes in MEM medium, cells were post-fixed for 20 min in 1% OsO₄ in sodium phosphate buffer (pH 7.2). Other staining techniques have been carried out, but only the above-described method gave some suitable results. After dehydration in graded ethanol, small membrane samples were embedded in Epicote. Thin sections were cut on an LKB Ultratome III and examined on uncoated copper grids with a ZEISS 10 CR electron microscope at an accelerating voltage of 60 kV.

Intracellular ATP determination

Intracellular ATP was evaluated through bioluminescence using the luciferin-luciferase reaction system (on Lumac 3 M Biocounter M 2010 A), on a Lumac Perstop Kit (Lumac System AG Basel, Switzerland) [17,20]. The analysis was carried out on a cellular extract: 10³ cells in 100 μl Krebs buffer. Results are expressed in μg ATP per 10⁶ cells.

A minimum of nine separate experiments was carried out for each concentration and post-exposure time.

LDH determination

LDH was performed following the standard method by measuring the absorption (340 nm) of NAD⁺ released during the reaction at 30°C (LDH Standard 10 Kit, Biomérieux, Lyon, France) [21]. LDH was determined in cellular lysate and in the culture medium. After calculation of the activity units/10⁶ cells, results are expressed in percentage of the ratio:

$$\frac{\text{extracellular LDH}}{\text{extracellular LDH} + \text{intracellular LDH}} \times 100$$

This ratio extracellular/total LDH is the most objective way to evaluate damage of cell integrity induced by a toxic agent [22]. A minimum of six separate experiments was carried out for each concentration and post-exposure time.

Statistical analysis

All results are expressed as mean values \pm standard deviation (SD). All statistical comparisons between control and exposed groups were made using the Dunnett-*t* test. $P < 0.05$ was considered as significant.

RESULTS

Electron microscopy

The ultrastructural study of control cells (Fig. 1) revealed an irregular shape owing to the presence of pseudopodia and microvilli on the cell surface. The cytoplasm contained multiple mitochondria and a well-developed endoplasmic reticulum. Some liposomes were also observed.

Cells exposed to low EO concentrations were examined after different post-exposure times. They displayed a very smooth cell surface without pseudopodia or microvilli (Figs. 2 and 3). The endoplasmic reticulum was still well-developed and the number

of mitochondria was not decreased. After 1 h post-exposure time, however, mitochondrial hypertrophy with characteristic dilation of cristae (Fig. 2) became apparent. An additional vacuolization became evident after 6 h post-exposure time (Fig. 3).

No other major ultrastructural modifications were observed in cells exposed to the high EO concentration.

Shape and size of nuclei of exposed cells did not change with respect to control cells.

Intracellular ATP determination

The intracellular ATP level seemed dependent on the EO concentration and the post-exposure time (Fig. 4).

In cells exposed to the low EO dose, the ATP synthesis significantly increased (with respect to controls) after 1 h (2.51 vs. 0.96 $\mu\text{g}/10^6$ cells) and 3 h (2.04 vs. 1.16 $\mu\text{g}/10^6$ cells) post-exposure ($P < 0.01$). After 6 h post-exposure, the ATP content was similar to controls.

In contrast, the high EO concentration also significantly stimulated ATP synthesis, but ATP content was higher after 6 h (4.35 vs. 1.48 $\mu\text{g}/10^6$ cells, $P < 0.001$) than after 1 h post-exposure (1.76 vs. 0.96 $\mu\text{g}/10^6$ cells, $P < 0.01$). Thus, both concentrations produced a cell-activating effect, depending on the exposure time.

LDH activity

For both concentrations and exposure times, intracellular LDH activity did not show significant changes in exposed cells with respect to controls. The cytotoxic effect was objectively estimated by the ratio of extracellular LDH/total LDH and expressed as its percentage.



Fig. 1. L132 control cell grown in aerobic culture conditions for 48 h. Note the presence of mitochondria (M), a well developed endoplasmic reticulum (er) and some liposomes (L). N, nucleus. $\times 15\ 200$.

The time-course study showed that the LDH leakage depends on the post-exposure time (Fig. 5). An immediate, statistically significant cytotoxic effect with respect to controls was noted for the low EO concentration after 1 h post-exposure (36.3% vs. 22.3%. $P < 0.05$). This effect was diminished after 3 h and 24 h post-exposure, the difference no longer being significant.

In contrast to the low dose, the high EO concentration does not produce any LDH leakage or activating effect.



Fig. 2. L132 cell after 1 h post-exposure to 0.07 g/m^3 EO. Note the presence of multiple mitochondria, some of which are hypertrophied (arrows). CM, culture membrane. $\times 18\ 000$.

DISCUSSION

The EO doses which were applied in the current study have been chosen to be within the range of EO concentrations to which sterilizing operators are exposed to by inhalation [12,23,24]. Indeed, these concentrations produce, *in vitro*, in epithelial lung cells (L132 cell line) morphological, ultrastructural, and biochemical alterations. The exposed cells generally exhibit a higher content of organelles such as endoplasmic reticulum and mitochondria. In addition, cell injury is evidenced by the decrease of the microvilli frequency and by the appearance of mitochondrial hypertrophy.

The higher content of cytoplasmic organelles in exposed cells is certainly required for a better repair of the membrane alterations, such as it has been described for the same cell type exposed to soluble nickel salts [25]. Nevertheless, the primary defense effect is reduced by a greater cytotoxic effect, which is shown by the appearance of numerous small vesicles, probably of Golgi origin.

A similar activating and cytotoxic effect is also observed on the biochemical level. For low EO concentration, we noted a rapid and significant release of LDH indicating a loss of cellular integrity, *i.e.*, membrane perturbation and cellular lysis [26,27]. This is accompanied with an increase of intracellular ATP (by comparison with the controls), which indicates a simultaneous cell activation [28]. For longer post-expo-

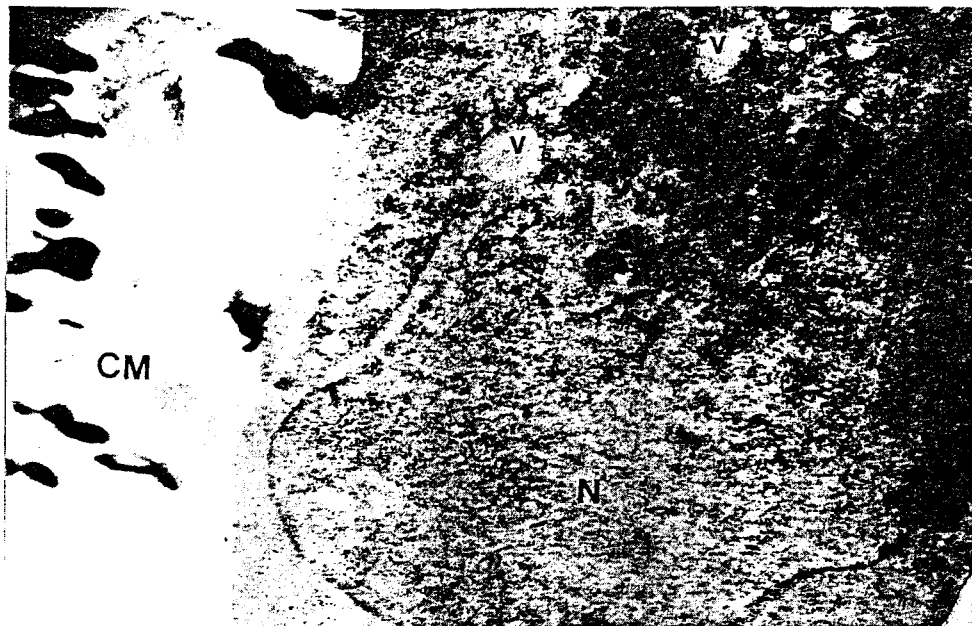


Fig. 3. L132 cell after 6 h post-exposure to 0.07 g/m^3 EO. Note the high number of mitochondria and the beginning of vacuolization (V). Arrows indicate hypertrophic mitochondria. N, nucleus; CM, culture membrane. $\times 14\ 400$.

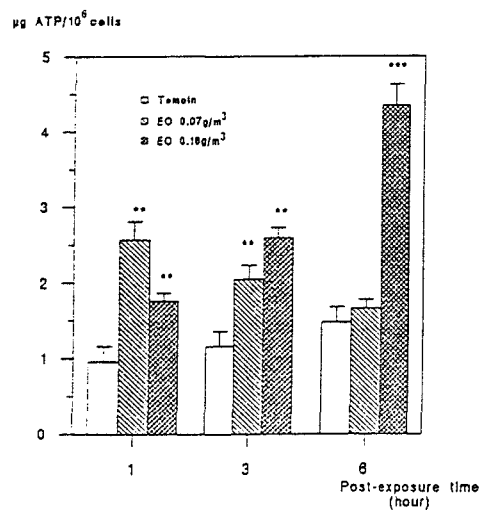


Fig. 4. Determination of intracellular ATP in cells exposed to ethylene oxide (EO). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ with respect to controls.

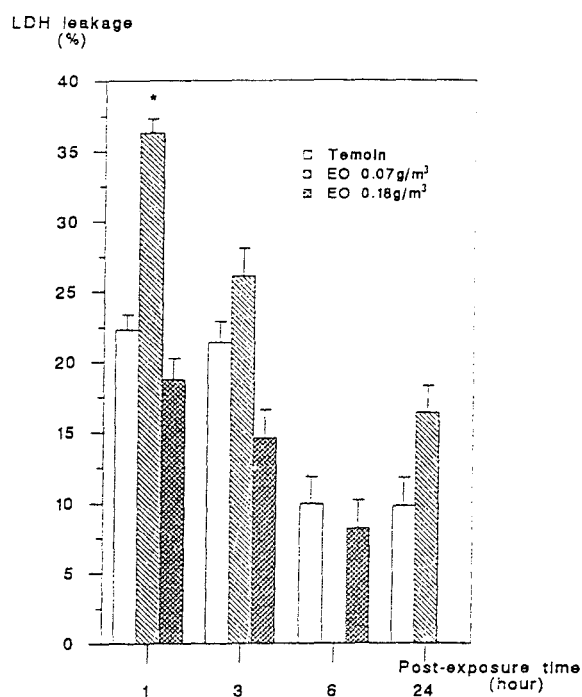


Fig. 5. LDH leakage of exposed cells expressed as the ratio (%) extracellular LDH/total LDH. * $P < 0.05$ with respect to controls.

sure, we found normal values of LDH and ATP. This means that cells consume ATP immediately after its synthesis to counteract the EO toxicity. Thus they resist the exposure effects.

For the high concentration, intracellular ATP content increased with respect to the exposure time. Under these conditions, ATP synthesis is increased without simultaneous consumption, which shows the incapacity of cells to recover from exposure effects.

The ATP increase is also confirmed by the morphological study, revealing a general increase of the mitochondria number. The presence of hypertrophic mitochondria is not contradictory to this observation, since morphologically intact mitochondria are always present in a greater number in exposed cells than in control cells.

LDH leakage, is not significantly affected by the high EO dose. A similar phenomenon may probably occur with other oxidative gases such as ozone. The cytotoxic effect is, however, confirmed at the ultrastructural level (present results).

Very few experimental studies have been carried out with EO. To our knowledge, only Pero et al. [15] have performed similar investigations with human lymphocytes. An immediate cytotoxic effect of EO was related to the EO concentrations applied producing a decrease of cell viability. In addition, these authors have also shown

evidence for cellular recovery with respect to the prolongation of post-exposure time. The current study confirms the cytotoxic and activating effects of EO on a more physiological experimental model, which is adaptation of human epithelial lung cells to aerobic culture conditions. Also, we used lower concentrations, representing the realistic exposure at the work place.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank A.S. De-Saint-Mahieu for her technical assistance in adjusting EO measurements, A. Plockyn for expert photographic work, and J. Patou-Kerr for her help in the English revision of the manuscript. This work was supported by grants from the University of Lille II, and the French Ministry of Research and Technology (Departement: Homme, Travail et Technologie, contract No. 89 D 0039) and from the CERESTE (GIP 'Santé-Travail-Ergonomie').

REFERENCES

- 1 Hogstedt, L.C., Rohlen, O., Berndtsson, B.S., Axelson, O. and Ehrenberg, L. (1979) A cohort study of mortality and cancer incidence in ethylene oxide production workers. *Br. J. Med.* 36, 276-280.
- 2 Bryant, H.E., Visser, N.D. and Yoshida, K. (1989) Ethylene oxide sterilizer use short-term symptoms amongst workers. *J. Soc. Occup. Med.* 39, 101-106.
- 3 Valter, I., Mercier, J.F., Bastien, D., Charles, P. and Haguenoer, J.M. (1989) Evaluation de l'exposition professionnelle à l'oxyde d'éthylène dans la région du Nord. *Cah. Med. Trav.* 26, 59-64.
- 4 Shupack, J.L., Andersen, S.P. and Romano, S.J. (1981) Human skin reactions to ethylene oxide. *J. Lab. Clin. Med.* 98, 723-729.
- 5 Schroeder, J.M., Hoheneck, M., Weis, J. and Deist, H. (1985) Ethylene oxide polyneuropathy: clinical follow-up with morphometric and electron microscopic findings in a sural nerve biopsy. *J. Neurol.* 232, 83-90.
- 6 Klees, J.E., Lash, A., Bowler, R.M., Shore, M. and Becker, C.E. (1990) Neuropsychologic 'impairment' in a cohort of hospital workers chronically exposed to ethylene oxide. *Clin. Toxicol.* 28, 21-28.
- 7 Gross, J.A., Haas, M.L. and Swift, T.R. (1979) Ethylene oxide neurotoxicity: report of four cases and review of the literature. *Neurology* 29, 978-983.
- 8 Lynch, D.W., Lewis, T.R., Moorman, W.J., Burg, J.R., Groth, D.H., Khan, A., Ackerman, L.J. and Cockrell, B.Y. (1984) Carcinogenic and toxicologic effects of inhaled ethylene oxide and propylene oxide in F344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 76, 69-84.
- 9 Snellings, W.M., Weil, C.S. and Maronpot, R.R. (1984) A two-year inhalation study of the carcinogenic potential of ethylene oxide in Fischer 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 75, 105-117.
- 10 Thiess, M., Schwegler, H., Fleig, I. and Stocker, W.G. (1981) Mutagenicity study of workers exposed to alkylene oxides (ethylene oxide, propylene oxide) and derivatives. *J. Occup. Med.* 23, 343-347.
- 11 Sarto, F., Cominato, I., Pinton, A.M., Brovedani, P.G., Faccioli, C.M., Bianchi, A.G. and Levis, A.G. (1984) Cytogenetic damage in workers exposed to ethylene oxide. *Mutat. Res.* 138, 185-195.
- 12 Laurent, C., Frederic, J. and Leonard, A.Y. (1984) Sister chromatid exchange frequency in workers exposed to high levels of ethylene oxide, in a hospital sterilization service. *Int. Arch. Occup. Environ.* 54, 33-43.
- 13 Generoso, W.M., Cain, K.T., Krishna, M., Sheu, C.W. and Gryder, L. (1980) Heritable translocation and dominant-lethal mutation induction with ethylene oxide in mice. *Mutat. Res.* 73, 133-142.
- 14 Yagger, J.W. (1987) Effect of concentration-time parameters on sister chromatid exchanges induced in rabbit lymphocytes by ethylene oxide inhalation. *Mutat. Res.* 182, 343-352.

- 15 Pero, R.W., Widegren, B., Hogstedt, B. and Mitelman, F. (1981) In vivo and in vitro ethylene oxide exposure of human lymphocytes assessed by chemical stimulation of unscheduled DNA synthesis. *Mutat. Res.* 83, 271-289.
- 16 Sarto, F., Tomanin, R., Giacomelli, L., Iannini, G. and Cupiraggi, A.R. (1990) The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose and mouth: application to occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide. *Mutat. Res.* 244, 345-351.
- 17 Voisin, C., Aerts, C., Jakubczak, E. and Tonnel, A.B. (1977) La culture cellulaire en phase gazeuse. Un nouveau modèle expérimental d'étude in vitro des activités des macrophages alvéolaires. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* 13, 69-82.
- 18 Voisin, C., Aerts, C., Tonnel, A.B., Houdret, J.L. and Ramon, P. (1975) Mise en survie en phase gazeuse et reconstitution in vitro du micro-environnement naturel des macrophages alvéolaires. *Pathol. Biol.* 23, 453-459.
- 19 Hildebrand, H.F., Collyn D'Hooghe, M., Shirall, P., Bailly, C. and Kerckaert, J.P. (1990) Uptake and biological transformation of NiS and Ni₃S₂ by human embryonic pulmonary cells (L132) in culture. *Carcinogenesis* 11, 1943-1950.
- 20 MacElroy, W.D. and Seliger, H.H. (1963) The chemistry of light emission. *Adv. Enzymol.* 25, 119.
- 21 Mathieu, M., Arthur, Y., Aubry, C., Bailly, M., Braun, J.P., Bretauiere, J.P., Kohuu, K., Lalegerie, P., Maire, I. and Peynet, J. (1982) Recommendations pour la mesure de la concentration catalytique de la lactate déshydrogénase dans le sérum human (+30°C). *Ann. Biol. Clin.* 40, 87-164.
- 22 Arsalane, K., Hildebrand, H.F., Martinez, R., Wallaert, B. and Voisin, C. (1992) Ultrastructural and biochemical changes in alveolar macrophages exposed to nickel hydroxy carbonate. *Sci. Total Environ.*, in press.
- 23 Kuzuhara, S., Kanazava, I., Nakanishi, T. and Egashira, T. (1983) Ethylene oxide polyneuropathy. *Neurology* 33, 377-380.
- 24 Steenland, K., Stayner, L., Greife, A., Halperin, W., Hayes, R., Hornung, R. and Nowlin, S. (1991) Mortality among workers exposed to ethylene oxide. *N. Engl. J. Med.* 324, 1402-1407.
- 25 Collyn D'Hooghe, M., Kerckaert, J.P., Herlant-Peers, M.C. and Hildebrand, H.F. (1983) Biologic effects of nickel compounds on human embryonic pulmonary cells in culture. In: M. Anke, W. Baumann, H. Braunlich and Chr. Bruckner, 4th International Symposium on Trace Elements. Jena, pp. 45-52.
- 26 Hinman, L., Stevens, V.A. and Matthany, G.E.E. (1980) Elastase and lysosyme activities in human alveolar macrophage. Effects of cigarette smoking. *Am. Rev. Resp. Dis.* 121, 263-271.
- 27 Pasanen, J.J., Gustafsson, J.E., Kalliomaki, P.L., Tossavainen, A. and Jarvisalo, J.O. (1985) Cytotoxic effects of four types of welding fumes on macrophages in vitro: a comparative study. *J. Toxicol. Environ. Health* 18, 143-152.
- 28 Arsalane, K., Aerts, C., Wallaert, B., Voisin, C. and Hildebrand, H.F. (1992) Effects of nickel hydroxycarbonate on alveolar macrophage functions. *J. Appl. Toxicol.* 12, 285-290.

Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* Killer ToxinNATHALIE SÉGUY,¹ EL MOUKHTAR ALIOUAT,¹ EDUARDO DEI-CAS,¹ LUCIANO POLONELLI,¹ DANIEL CAMUS,¹ JEAN-CHARLES CAILLIEZ²¹U42 INSERM, BP 39, 59651 Villeneuve d'Ascq and ²F.L.S., Univ. Catholique de Lille, France, ³Ist. 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) antiidiotypic 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 (5×10^6 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 (30×10^6 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

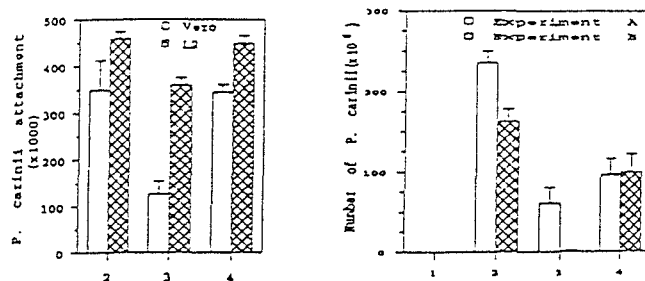


Fig.1. a) Inhibitory effect of the PaKT on the attachment of rat-derived *P. carinii* to Vero and L2 cells. b) Activity of the PaKT on the infectivity of mouse-derived *P. carinii* to the SCID mice (controls (1) were mice inoculated with DMEM without parasite. Samples of *P. carinii* were preincubated 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 antiidiotypic antibodies (antiIDs) were produced by immunization of rabbits with mAb KT4. These antiIDs 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 antiIDs possessing killer properties. It was the first report of immunoprotection using the properties of killer toxin-like antiIDs 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 antiIDs. The protective role of antiIDs 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, Ouassii 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, Bocconeri M, Gerloni M, Morace G, Magliani W, Chezzi C, Cassone A. *J. Immunol.* (1994) 152: 3175.

Killer toxin secretion through the cell wall of the yeast *Pichia anomala*

Jean-Charles Cailliez,^{1,3} Cristina Cantelli,² Nathalie Séguy,¹ Stefania Conti,² Mara Gerloni,² Giulia Morace⁴ & Luciano Polonelli²

¹Unité 42, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villeneuve d'Ascq, France; ²Istituto di Microbiologia, Università Degli Studi di Parma, Italia; ³Faculté Libre des Sciences, Institut Catholique de Lille, France; ⁴Istituto di Microbiologia, Università Cattolica di Sacro Cuore, Roma, Italia

Received 23 June 1993; accepted in revised form 16 December 1993

Abstract. A secreted killer toxin was detected through the cell wall of *Pichia anomala* cells by ultrastructural immunodetection with a specific monoclonal antibody (MAb KT4). MAb KT4 was successively detected by colloidal gold labeled streptavidin and biotinylated anti-mouse F(ab')₂ antibodies. The antigenic determinants of the toxin were localized throughout the cytoplasm and the cell wall of killer yeast cells. The Lowicryl K4M-immunogold method gave very satisfactory results and showed that the killer toxin was somewhat concentrated in the yeast cell wall layers before being exported into the medium. In agreement with previous reports, the binding of MAb KT4 suggested that the *P. anomala* killer toxin secretion did not result from a homogeneous diffusion across the yeast cell wall.

Key words: *Pichia anomala*, Ultrastructural immunodetection, Yeast killer toxin secretion

Abbreviations: G15 – gold particles of 15 nm; IEM – immunoelectron microscopy; IFA – immunofluorescence assay; MAb – monoclonal antibody; PBS – phosphate buffered saline; SAM/F(ab')₂ – sheep antibodies anti-mouse F(ab')₂; SBB – Sabouraud buffered broth

Introduction

The cell wall of yeast species constitutes a dynamic barrier between the cytoplasm and the external environment. Intimately involved in the shape of the yeast cell, this multi-layered structure also plays a fundamental role in the antigenicity [1] and secretion of enzymes and glycoproteins [2–4]. As in other yeast species [5, 6], the mechanism of intracellular transport and secretion of *Pichia anomala* glycoproteins is unclear, especially through the cell wall [7]. The aim of the present study was to reveal the ultrastructural localization of a killer toxin which is secreted by the yeast *P. anomala*.

A strain of *P. anomala* (UCSC 25F) has been selected for the wide antimicrobial activity of its toxin. A monoclonal antibody (MAb KT4) was then produced against these secreted killer molecules [8]. It was used, in a preliminary study, to visualize the synthesis and secretion sites of the killer toxin from the cytoplasm to the yeast cell wall [9]. MAb KT4 was shown to be a mouse immunoglobulin G producing a sharp precipitin band in a double immunodiffusion procedure in the reaction with the crude extract of the *P. anomala* killer toxin [8]. Moreover, this monoclonal antibody neutralized the in vitro killer activity of the toxin against sensitive yeast strains [8].

The present study was undertaken to extend

previous observations concerning the first visualization of the *P. anomala* killer toxin secretion sites by using a monoclonal antibody (MAb KT4) [9] and an immunofluorescence assay. This permitted us to describe the secretion of the killer toxin. It revealed a heterogeneous distribution of the toxin secretion sites at the yeast surface, appearing like a 'punctuated' fluorescence. Daughter cells and young buds were often less recognized by MAb KT4 in comparison with their mother cells or mature blastoconidia. These immunodetections were performed on live yeast cells held in buffered suspension to confirm that the 'punctuated' labeling was not an artefact due to a distortion of the cell's shape by having been dried on glass slides. In this work, immunocytochemical assays were performed to confirm the results of our first study and particularly to better visualize the secretion sites of the killer toxin through the *P. anomala* cell wall.

Methods

Strain and growth conditions. *Pichia anomala* UCSC 25F was the strain selected in this study to produce killer toxin [8]. Cells were maintained in sterile distilled water and subcultured routinely in Sabouraud buffered broth (SBB) pH 4.6 (Difco Laboratories, Detroit, MI). Production of the secreted killer toxin was obtained in SBB at pH 4.6 after 24 h of incubation at room temperature. Secretion of killer toxin was ascertained by conventional well assays against recognized sensitive yeast strains [8]. Yeast killer cells were centrifuged and washed three times in phosphate buffered saline 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 (PBS) before being fixed and embedded in K4M Lowicryl resin (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, Germany).

Fixation procedure and Lowicryl embedding. *P. anomala* UCSC 25F cells, cultivated for 24 h at 28 °C in SBB, pH 4.6, were harvested and washed twice in PBS. They were then fixed in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 2.5% para-

formaldehyde and 0.5% glutaraldehyde for one night at 4 °C. The cells were centrifuged and washed twice in PBS before being incubated for 1 h at 4 °C in PBS containing 50 mM NH₄Cl. After centrifugation, the pelleted cells were progressively dehydrated for 10 min at 4 °C in 30% ethanol, for 10 min at -20 °C in 50, 75, 95 and 100% ethanol. They were then immersed twice for 1 h at -20 °C in a series of mixtures of 50, 75 and 95% (v/v) K4M Lowicryl in ethanol. Finally, samples were immersed in pure K4M Lowicryl resin three times for 1 h at -20 °C, overnight at 4 °C. The polymerization of K4M Lowicryl resin was performed by ultraviolet illumination for 2 days at 4 °C. Ultrathin sections of 100 nm were realized with a LKB ultramicrotome and collected on Formvar-coated nickel grids [10].

Immunogold detection on ultrathin sections. The grids were floated for 1 h at room temperature upside down on liquid drops of PBS containing 2% BSA placed on wide Parafilm sheets, in Petri dishes. They were then incubated for 1 h at 37 °C in MAb KT4 ascitic fluid at dilutions ranging from 1/50 to 1/500 in PBS containing 0.2% BSA (PBS-BSA). The sections were washed 3 × 5 min in PBS-BSA at room temperature before being incubated for 1 h at 37 °C with biotinylated sheep anti-mouse F(ab')₂ antibodies (biotin-SAM/F(ab')₂, Amersham International) diluted 1/50 in PBS-BSA. Further washings in PBS-BSA were followed by a third incubation of 1 h in streptavidin conjugated with gold particles of 15 nm size (G15-streptavidin, Amersham International) diluted 1/50 in PBS-BSA. Controls were incubated either without MAb KT4 [8] or only with G15-streptavidin to evaluate, respectively, the non-specific fixation of biotin-SAM/F(ab')₂ and G15-streptavidin. After three washings in PBS and one in demineralised water, the sections were stained at 4 °C in a dark room with 4% uranyl acetate in water. Excess stain was removed with filter paper. The grids were air dried and observations were performed on a Philips EM 300 electron microscope.

Results and discussion

The localization of the *P. anomala* toxin, which was first realized on ultrathin sections of killer cells embedded in Araldyte resin, had already shown the binding of MAb KT4 to cytoplasmic components but had failed to clearly detect the toxin in the yeast cell wall. A weak labeling was found in the cell wall of killer cells frozen in liquid nitrogen but it was not sufficient to permit us to describe the secretion of the toxin. These first experiments showed no binding or binding of very few gold particles within the yeast cell wall [9].

Because of these results, the immunodetection procedure was changed. The *P. anomala* killer cells were embedded in K4M Lowicryl resin and electron micrographs of the toxin localization were made by using successively MAb KT4, biotinylated SAM/F(ab')₂ and gold-conjugated streptavidin. The MAb KT4 bound to both cytoplasmic and cell wall components, showing the presence of common antigens distributed among intracellular and wall structures (Fig. 1a). The labeling density varied from cell to cell, but for each of them, it seemed that overall binding of MAb KT4 was concentrated to killer toxin antigens associated with the cell wall (Fig. 1b). In control experiments, when MAb KT4 or biotinylated anti-mouse antibodies were omitted, a negligible binding of gold particles (ranging from 1 to 5 particles per cell) to the sections was observed, but without particular ultrastructural localization. This background labeling most probably corresponded to a weak fixation of streptavidin to some yeast cell components (data non shown).

The binding of MAb KT4 to cytoplasmic components indicated the presence of the toxin or some preformed (pro)toxin antigens in intracellular compartments. It also indicated that at least some intracellular antigenic components were preserved during both the fixation and the K4M Lowicryl embedding procedure. In this respect, the yeast *P. anomala* showed some similarities with *Candida albicans* [4, 11] and *Aspergillus fumigatus* [12] where glycoproteins have been found in the cytoplasm by using specific MAbs or

polyclonal antibodies. However, contrary to these last antibodies, MAb KT4 was directed against the protein part of the secreted glycoproteins. It is then interesting to observe that ultrastructural immunodetections, using different antibodies directed against either protein or polysaccharide antigens, can give comparable labelings [13, 14]. Another important finding we made is that the Lowicryl-immunogold procedure gave more satisfactory quantitative labeling of the killer toxin than did ultracytosections or Araldite sections. Although the cell ultrastructure was less preserved in Lowicryl embedding, the antigenic sites of the yeast killer toxin were better recognized by MAb KT4.

Although a precise quantification of MAb KT4 immunogold labeling was not attempted, the immunolabeling presented here gave qualitative results and suggested that the killer toxin was accumulated in all the cell wall layers before being secreted in the medium (Figs. 1b & 1c). Moreover, the heavy labeling observed in the cell wall was compatible with the IFA results, showing that *P. anomala* cells were able to produce large amounts of killer toxin. Concerning the cytoplasmic labeling, further studies should be performed to know if it corresponds to an accumulated form of the toxin or to a protoxin in the process of biosynthesis.

Although no significant labeling was observed which could be associated with the 'punctuated' MAb KT4 fixation described using the IFA [15], we observed that MAb KT4 fixation was not homogeneous in the outer-layer of the cell wall (Fig. 1c, arrows). Some linear distributions of gold particles were observed through the cell wall, which could be associated with 'preferential secretion ways' of the killer toxin (Fig. 1d, arrow). However, these linear labelings were quite few to be really significant.

Conclusion

From the data presented here, it is possible that the secreted killer toxin accumulated in the cell



Fig. 1. Ultrastructural immunolabeling with MAb KT4 reacting with biotinylated sheep anti-mouse $F(ab')_2$ and G1 5-streptavidin (gold particles of 15 nm) on ultrathin sections of *Pichia anomala* UCSC 25F cells previously embedded in K4M Lowicryl resin. (a): The labeling was found in the cytoplasm, in the vacuole (v) and in the yeast cell wall (cw); (m): mitochondria; (b): The binding of MAb KT4 appeared mainly to occur in the cell wall; (c): A great number of gold particles were found in the inner layers of the *Pichia anomala* cell wall (CW). Gold particle aggregates showed that surface antigenic sites were not homogeneously distributed in the outer layers of the yeast cell wall (arrows); (d): Linear distribution of gold particles could be observed across the *Pichia anomala* cell wall (arrow), from the cytoplasm to the yeast cell surface. Bar = 0.5 μ m.

wall before being secreted into the medium. However, its precise localization through the different layers of the cell wall is not really clear. Moreover, IEM following embedding in K4M Lowicryl seems to be a suitable assay to localize the antigenic determinants of the yeast killer toxin at the ultrastructural level. The heterogeneous fixation of MAb KT4 could suggest that the toxin secretion did not result from homogeneous diffusion across the yeast cell wall but involved some undefined surface areas. However, the accumulation of gold particles could also be interpreted as a slower rate of the toxin secretion through the cell wall than through the cytoplasm.

We are now engaged in the production of the *P. anomala* killer toxin in synthetic medium in order to perform its purification by gel filtration and affinity chromatography. When produced in synthetic medium, the *P. anomala* killer toxin will be radiolabeled for further studies such as biochemical analyses of secretion mechanisms at cellular and molecular levels.

Acknowledgments

This study was supported by the research program of the Economic European Community 'Cooperative European Research on *Candida albicans* Cellular Biology and Pathogenicity' (contract number SCI 0361 EDB), the National Research Council (CNR) Target Projects 'Biotechnology and Bioinstrumentation', 'Prevention and Control of Disease Factors' (contract number 91.00121.41/115.15897) and by il Ministero della Sanità, Istituto Superiore di Sanità Progetto A.I.D.S. (1990), Roma, Italy.

References

1. Hernando FL, Cailliez JC, Trinel PA, Faille C, Mackenzie DWR, Poulain D. Qualitative and quantitative differ-

- ences in recognition patterns of *Candida albicans* protein and polysaccharide antigens by human sera. *J Med Vet Mycol* 1993; 31: 219-26.
2. Farley PC, Sheperd MG, Sullivan PA. The cellular location of proteases in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1986; 132: 3235-38.
3. Ferro-Novick S, Novick P, Field C, Scheckman R. Yeast secretory mutants that block the formation of active cell surface enzymes. *J Cell Biol* 1984; 98: 35-43.
4. Li R., Cutler JE. A cell surface/plasma membrane antigen of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 455-64.
5. Andaluz E, Guillen A, Larriba G. Preliminary evidence for a glucan receptor in the yeast *Candida albicans*. *Biochem J* 1986; 240: 495-502.
6. Elorza MV, Rico H, Gozalbo D, Sentandreu R. Cell wall composition and protoplast regeneration in *Candida albicans*. *Anton Leeuw* 1983; 49: 457-69.
7. Cailliez JC, Poulain D. Les mécanismes de la glycosylation et leur importance dans le transport intracellulaire et la sécrétion des glycoprotéines des levures. *J Mycol Med* 1992; 2: 202-9.
8. Polonelli L, Morace G. Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1986; 25: 460-62.
9. 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.
10. Cailliez JC, Boudrissa A, Mackenzie DWR, Poulain D. Evaluation of a gold-silver staining method for detection and identification of *Candida* species by light microscopy. *Eur J Clin Microbiol* 1991; 9: 886-91.
11. Cailliez JC, Poulain D. Analyse cytologique de l'expression d'un épitope porté par les glycoprotéines excrétées par *Candida albicans*. *Ann Inst Past Microbiol* 1988; 139: 171-88.
12. Hearn VM, Latgé JP, Prevost MC. Immunolocalization of *Aspergillus fumigatus* mycelial antigens. *J Med Vet Mycol* 1991; 29: 73-81.
13. Cailliez JC, Poulain D, Mackenzie DWR, Polonelli L. Cytological immunodetection of yeast glycoprotein secretion. *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 452-59.
14. Poulain D, Cailliez JC, Dubremetz JF. Secretion of glycoproteins through the cell wall of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol* 1989; 50: 94-99.
15. Cailliez JC, Cantelli C, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Morace G, Polonelli L. *Pichia anomala* killer toxin secretion in the presence of tunicamycin. *J Med Vet Mycol* 1993; 31: 337-42.

Address for correspondence: Dr Jean-Charles Cailliez, Unité 42, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Domaine du Certia, 369 rue Jules Guesde, F-59651 Villeneuve d'Ascq, France
Phone: (33-20) 91 14 62; Fax: (33-20) 05 91 72

The Yeast Killer Phenomenon: a Hypothetical Way to Control *Pneumocystis carinii* Pneumonia

J.C. CAILLIEZ[†], N. SÉGUY^{*}, E.M. ALIOUAT^{*}, L. POLONELLI[‡], D. CAMUS^{*} and E. DEI-CAS^{*}

^{*} Unité 42 INSERM, 369 Rue Jules Guesde, B.P. 39, 59651, Domaine du CERTIA, Villeneuve d'Ascq, France. [†] Faculté Libre des Sciences, Institut Catholique de Lille, France. [‡] 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 antiidiotypic 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 β -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.*

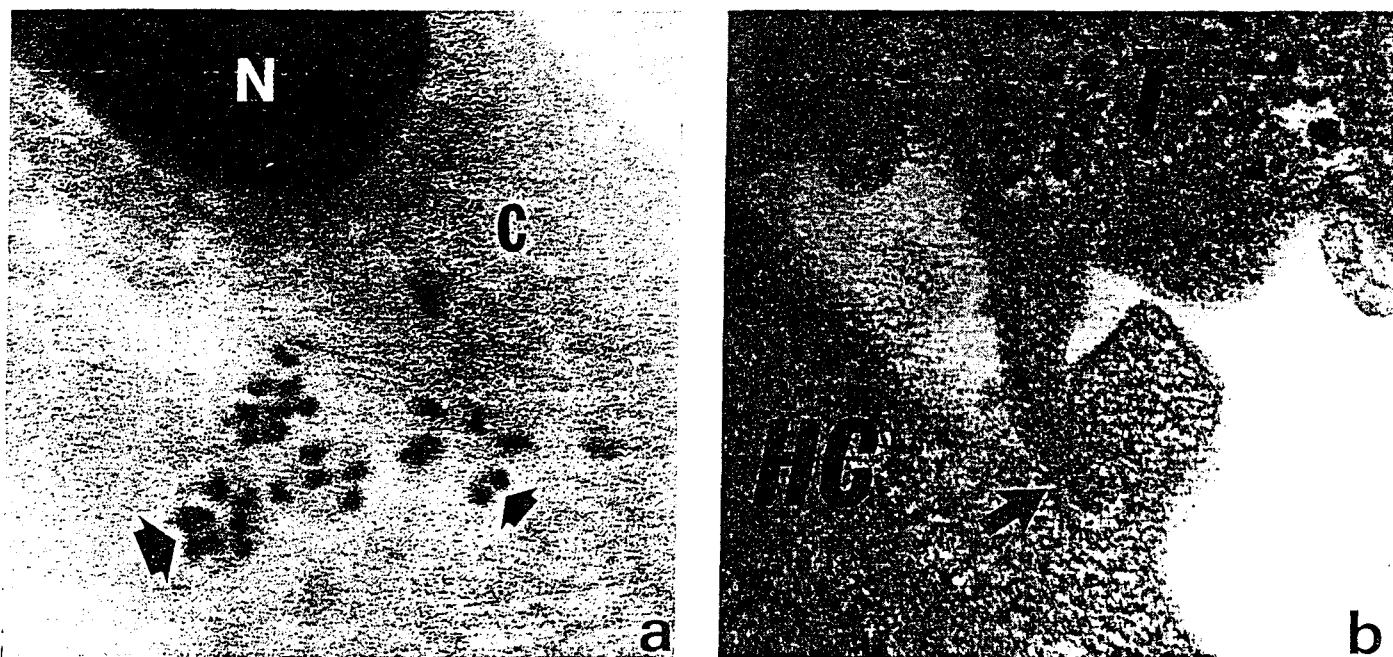


Fig. 1 In vitro attachment of rat *Pneumocystis carinii* to Vero cells. (1a) Precystic, cystic (big arrow) and trophozoite (small arrow) forms were found attached to the target cells. Preparations were stained with methanol-Giemsa. N: nucleus; C: cell surface. (1b): in vitro attachment of a rat *P. carinii* 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 β 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 β -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 'antibodies' 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 'antibodies' (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.

'Antibodies' 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 idiotype 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 idiotype 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?

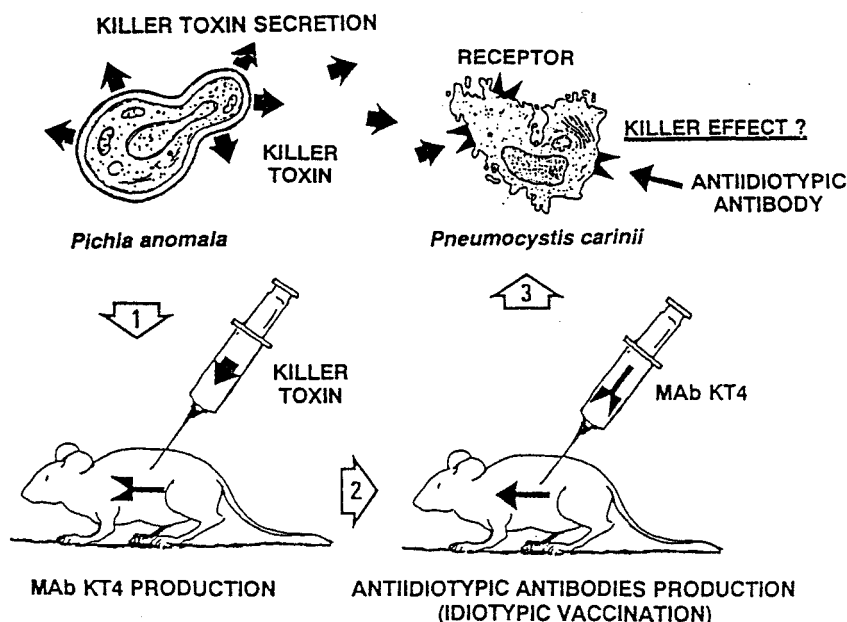


Fig. 2 The network system of the *Pichia anomala* killer phenomenon and its application to idiotype vaccination. 1: The *Pichia anomala* secreted killer toxin has been used to produce a monoclonal antibody (mAb KT4); 2. mAb KT4 was used as an idiotype vaccine to produce antiidiotypic antibodies; 3. The 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 *Ustilomyces* 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, Ouaisi 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, Seğuy 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 phénomène du '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, Seğuy 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, Puvanesarajah 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.

ORIGINAL PAPER

Nathalie Séguy · Jean-Charles Cailliez
Luciano Polonelli · Eduardo Dei-Cas · Daniel Camus

Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on *Pneumocystis carinii* infectivity to the SCID mouse

Received: 8 May 1995 / Accepted: 28 June 1995

Abstract A *Pichia anomala* killer toxin has been demonstrated to have a specific inhibitory effect on the in vitro attachment of *Pneumocystis carinii*. The results presented herein show that this yeast toxin is also effective against *P. carinii* infectivity in reducing parasite colonization in the lungs of SCID mice. The specificity of this inhibitory effect was controlled using a monoclonal antibody neutralizing the killer properties of the yeast toxin.

Introduction

Pneumocystis carinii is an opportunistic eukaryotic microorganism responsible for pneumonia in immunocompromised individuals, including those affected by the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Patients suffering from *P. carinii* pneumonia (PCP) are usually treated with pentamidine or antifolates (Walker and Masur 1994). Since these patients frequently develop adverse reactions to these drugs, active and less toxic therapeutic agents capable of controlling *P. carinii* infections are needed. To date, evaluations for effective drugs have been performed in animal models or cell cultures to evaluate the effect of antimicrobial agents on *P. carinii* trophozoites and cysts. However, little is known about the relative efficacy and toxicity of the different drugs in the treatment of PCP, yet such information is really important in the development of new forms of therapy.

Yeast killer toxins have been found among many yeast genera such as *Saccharomyces*, *Ustilago*, *Kluyveromyces*, *Candida*, and *Pichia* (Polonelli et al. 1991b). The

killer effect has been defined as a specific interaction between a killer yeast strain and a sensitive target microorganism, leading to the death of the latter, following the fixation and antimicrobial activity of a secreted toxin. Yeast killer toxins may be effective against unrelated groups of eukaryotic (yeast, hyphomycetes, algae) and prokaryotic microorganisms. Closer relationships have been shown between yeast killer toxins and bacteriocins that have often been considered as belonging to similar molecular models. Studies have stressed the biological interest of the yeast killer phenomenon (Polonelli et al. 1986), mainly with regard to the modalities of the toxin fixation on specific cell-wall receptors of sensitive yeast cells.

In this work, a killer toxin secreted by a yeast strain of *P. anomala* was selected for its antibiotic properties against a large panel of yeast and bacteria strains (Polonelli et al. 1991b). The *P. anomala* toxin has been shown to have an inhibitory effect on the in vitro attachment of rat-derived *P. carinii* to Vero cells (Aliouat et al. 1993a). We report herein that the same toxin is also active against *P. carinii* infectivity to the SCID mouse.

Materials and methods

Obtention and quantification of *Pneumocystis carinii* organisms

Corticosteroid-treated outbred white mice were used as the source of parasites. They were given prednisolone metasulfobenzoate (Houde, France) in their drinking water (40 mg/l) for 9–12 weeks. Animals were housed in a conventional room of our laboratory animal facilities and were given standard food (UAR, France) and water ad libitum. The parasite extraction and quantification procedures were performed as previously described (Aliouat et al. 1993a, b).

Production of the *Pichia anomala* killer toxin

A standard suspension of 5×10^8 *P. anomala* UCSC 25F yeast killer cells, grown for 24 h at 25°C on Sabouraud agar (Diagnostic Pasteur, France; Cailliez et al. 1992), was inoculated into a 100-ml flask of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, pH 4.6)

N. Séguy · J.-C. Cailliez (*)¹ · E. Dei-Cas² · D. Camus²
Unité 42 INSERM, Domaine du CERTIA, 369 rue Jules Guesde,
B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq, France; Fax: (33) 20 05 91 72

L. Polonelli
Istituto di Microbiologia, Università Degli Studi di Parma, Parma,
Italia

Present addresses:

¹ Faculté Libre des Sciences, Université Catholique, Lille, France
² Centre Hospitalier Régional Universitaire, Lille, France

Table 1 Inhibitory effect of the *Pichia anomala* UCFC 25F killer toxin on the infectivity of mouse-derived *Pneumocystis carinii* to SCID mice

Experiment	Number of mice	Preincubation medium ^a	Trophozoites ($\times 10^6$)	Walled forms ^b ($\times 10^6$)	Total parasites/lung ($\times 10^6$)	Inhibition (%)	<i>P</i> ^c	<i>P</i> ^d
A	3	Control	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	—	—	—
	3	DMEM	250.7 \pm 30	11.6 \pm 0.5	262.3 \pm 30	0	—	—
	3	KT	65.3 \pm 29	2.4 \pm 1.1	67.7 \pm 25	77.5	<0.001	<0.01
	3	KT+mAb KT4	145.8 \pm 18	4.9 \pm 3	150.7 \pm 90	28.9	<0.05	—
B	5	Control	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	—	—	—
	5	DMEM	227.7 \pm 16	6.4 \pm 0.9	234.1 \pm 15	0	—	—
	5	KT	56.7 \pm 20	3.7 \pm 0.6	60.4 \pm 20	75.0	<0.001	<0.05
	5	KT+mAb KT4	90.4 \pm 19	4.6 \pm 0.9	94.9 \pm 20	59.5	<0.001	—
C	5	Control	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	—	—	—
	5	DMEM	158.7 \pm 16	7.4 \pm 1.4	160.0 \pm 15	0	—	—
	5	KT	1.5 \pm 0.4	0.07 \pm 0.02	1.5 \pm 0.4	99.1	<0.001	<0.001
	5	KT+mAb KT4	96.6 \pm 26	4.8 \pm 1.1	101.4 \pm 27	37.1	<0.01	—

^a Control mice were inoculated with DMEM without parasites. *P. carinii* organisms were preincubated either in the culture medium (DMEM) or in the *P. anomala* killer toxin (KT) or in the *P. anomala* killer toxin neutralized by mAb KT4 (KT+mAb KT4)

^b Intermediate precyst, late precyst, mature cyst

^c The parasite number was compared with that of parasites preincubated in DMEM

^d The numbers of parasites preincubated with KT were compared with those of parasites preincubated with KT+mAb KT4

supplemented with 5% fetal calf serum (complete DMEM). After incubation for 48 h at 25° C, the yeast suspension was centrifuged and the supernatant, containing the yeast killer toxin, was filtered through 0.22- μ m filters.

In vivo effect of the killer toxin on *P. carinii* infectivity

Freshly extracted *P. carinii* organisms (1.2×10^8 cells/ml) were incubated for 90 min at 25° C in the following media: complete DMEM, pH 4.6 (DMEM); *P. anomala* killer toxin in complete DMEM, pH 4.6 (KT); and killer toxin that had been incubated for 90 min at 25° C with mAb KT4 (KT+mAb KT4). Mab KT4 is a monoclonal antibody that has been shown to neutralize specifically the *P. anomala* UCSC 25F killer toxin activity (Polonelli and Morace 1986). Parasites were then centrifuged before being resuspended in complete fresh DMEM, pH 7.4 (Séguy et al. 1994). The same protocol was carried out in three consecutive experiments (A, B, and C) including a total of 52 animals (Table 1).

Severe combined immunodeficient (SCID) mice (Iffa-Credo, France) of both sexes were used at 5 weeks of age as recipient animals in all experiments. For assessment of the infective power of *P. carinii* samples, which were preincubated in the different preincubation media, SCID mice were anesthetized and nasally inoculated with 3×10^7 *P. carinii* organisms per animal (Aliouat et al. 1993c). All animals were killed at 40 days postinoculation and their lungs were quickly removed. Parasites were extracted and counted as previously described (Aliouat et al. 1993b). The total numbers of parasites extracted per lung are reported in Table 1.

Results were expressed as mean values \pm SD. Differences in parasite numbers were evaluated using Student's test ($P < 0.05$ was considered as significant). Moreover, for evaluation of the PCP extension, lung histology sections from one animal of each experimental series were stained with methenamine silver or hematoxylin-eosin and examined.

Results

Three distinct experiments (A, B, and C) were carried out consecutively with three distinct mouse-derived *Pneumocystis carinii* isolates. Table 1 shows that in the three experiments, parasites incubated in DMEM in-

duced severe pneumocystosis in SCID mice (from 160.0×10^6 to 262.8×10^6 parasites/lung in experiments C and A, respectively) as compared with parasites pretreated with the killer toxin (KT). The specificity of the toxin activity on *P. carinii* was attested by the finding that the parasite numbers in mice inoculated with KT-treated *P. carinii* organisms were significantly lower than those recorded in mice inoculated with KT+mAbKT4-treated parasites (1.53×10^6 versus 101.4×10^6 parasites in experiment C). The inhibition of *P. carinii* infectivity was not due to the acidity of the KT preincubation medium because parasites preincubated in complete DMEM, pH 4.6, induced a pneumocystosis as severe as that induced by parasites preincubated in DMEM, pH 7.4.

Histological examination showed extended PCP in the lungs of SCID mice infected with parasites pretreated with DMEM or KT+mAbKT4, whereas those of SCID mice infected with KT-pretreated parasites showed only mild infection. In the lungs of SCID mice infected with parasites pretreated with DMEM or KT+mAbKT4 an eosinophilic exsudate typical of PCP was observed. With silver impregnation, clusters of typical ovoid, thick-walled *P. carinii* cysts were observed lined along the alveolar wall or developing in the alveolar septum (sometimes completely filling the alveolar lumen). Parasites were also found in the bronchiolus lumen. In contrast, the lungs of SCID mice infected with parasites pretreated with KT showed fewer clusters, if any.

Discussion

The present results show that the *Pichia anomala* killer toxin has an inhibitory effect on the infectivity of *Pneumocystis carinii*. These data are consistent with the inhibitory effect of the toxin on the in vitro attachment of

P. carinii to target cells (Aliouat et al. 1993a). The *P. anomala* killer toxin activity against *P. carinii* was significantly reduced by the neutralizing properties of mAb KT4 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, and $P < 0.001$ in experiments A, B, and C, respectively). The differences observed between the three experiments were explained by the difficulty in obtaining *P. carinii* isolates with a standard infectious power. Although the numbers of parasites per inoculum were the same, differences were recorded in the severity of infection among the control groups of the three experiments. Then, we could deduce the existence of variations in the viability of inoculated cystic and trophozoite forms. Regardless, the preincubation of *P. carinii* with KT markedly decreased the parasite numbers in mouse lungs. The killer toxin induced an inhibition of 75% and 99% in experiments B and C, respectively, in relation to the growth of parasites preincubated in DMEM ($P < 0.001$).

Since marked molecular affinities have been reported between *P. carinii* and fungi (Stringer et al. 1992; Wakefield et al. 1992), antifungal molecules could represent a real area of interest in therapeutic assays against *P. carinii* infections. Attempts have been made to use yeast toxins in the experimental treatment of yeast infections (Polonelli et al. 1990). However, the drawback of this treatment was the limited availability of the effective antifungal properties of the natural toxins in vivo and, obviously, the induction of adverse effects in the host. Recently, anti-idiotypic antibodies possessing the killer properties of the original *P. anomala* toxin were produced (Polonelli et al. 1991a). They were effective in decreasing systemic candidiasis in mice and in reducing colonization by *Candida albicans* in rat vaginal epithelium (Polonelli et al. 1993, 1994). These observations strengthen the concept of an anti-idiotypic antibody strategy against fungal infections or pneumocystosis (Cailliez et al. 1994).

Acknowledgements The authors express their appreciation to Ms. Chantal Mullet, U42 INSERM, Villeneuve d'Ascq, for her technical assistance. They are grateful to Ms. July Patou-Kerr for her help with the English revision of the manuscript. This work was supported by the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) and was developed in the framework of a European Economic Community BIOMED-1 Concerted Action (BMH1-CT94-1118). One of the authors (N.S.) was awarded a grant from the ANRS (94635).

References

- Aliouat EM, Cailliez JC, Séguy N, Dei-Cas E, Polonelli L, Gerloni M, Conti S, Camus D (1993a) Inhibitory effect of a yeast killer toxin to the in vitro *Pneumocystis carinii* attachment. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 5:102-106
- Aliouat EM, 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 EM, Mazars E, Dei-Cas E, Cesbron JY, Camus D (1993c) Intranasal inoculation of mouse, rat or rabbit-derived *Pneumocystis* to SCID mice. *J Protozool Res* 3:94-98
- Cailliez JC, Gerloni M, Morace G, Conti S, Cantelli C, Polonelli L (1992) Ultrastructural immunodetection of a *Pichia anomala* killer toxin: a preliminary study. *Biol Cell* 75:19-23
- Cailliez JC, Séguy N, Aliouat EM, Polonelli L, Camus D, Dei-Cas E (1994) The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Med Hypotheses* 43:167-171
- Polonelli L, Morace G (1986) Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 25:460-462
- Polonelli L, Lorenzini R, De Bernardis F, Morace G (1986) Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathology* 96:103-108
- Polonelli L, Fanti F, Conti S, Campani L, Gerloni M, Castagnola M, Morace G, Chezzi C (1990) Detection by immunofluorescent anti-idiotypic antibodies of yeast killer toxin cell wall receptors of *Candida albicans*. *J Immunol Methods* 132:205-209
- Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Castagnola M, Morace G, Chezzi C (1991a) "Antibodies": antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. *J Med Vet Mycol* 29:235-242
- Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Chezzi C, Morace G (1991b) Interfaces of the yeast killer phenomenon. *CRC Crit Rev Microbiol* 18:47-87
- Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Morace G, Cailliez JC (1993) Imaging of the yeast killer phenomenon. In: Marasca B, Kobayashi G, Yamaguchi H (eds) *Proceedings of the NATO workshop Molecular biology and its application to medical mycology*, vol 69. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 141-148
- Polonelli L, De Bernardis F, Conti S, Boccanera M, Gerloni M, Morace G, Magliani W, Chezzi C, Cassone A (1994) Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* 152:3175-3182
- Séguy N, Aliouat EM, Dei-Cas E, Polonelli L, Camus D, Cailliez JC (1994) Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* killer toxin. *J Euk Microbiol* 41:109S
- Stringer JR, Edman JC, Cushion MT, Richards FF, Watanabe J (1992) The fungal nature of *Pneumocystis carinii*. *J Med Vet Mycol* 30:271-278
- Wakefield AE, Peters SE, Banerji S, Bridge PD, Hopkin JM (1992) *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. *Mol Microbiol* 6:1903-1911
- Walker RE, Masur H (1994) Current regimens of therapy and prophylaxis. In: Walzer PD (ed) *Pneumocystis carinii* pneumonia. Marcel Dekker, New York, pp 439-466

Review

***Pneumocystis carinii*: an atypical fungal micro-organism**

J. C. CAILLIEZ,* N. SÉGUY, C. M. DENIS,* E. M. ALIOUAT, E. MAZARS, L. POLONELLI,†
D. CAMUS‡ & E. DEI-CAS‡

Unité 42 INSERM, 369 rue Jules Guesde, BP 39, 59651 Villeneuve d'Ascq, France; *Faculté Libre des Sciences, Université Catholique de Lille, 13 rue de Toul, 59046 Lille, France; †Istituto di Microbiologia, Università Degli Studi di Parma, Via A. Gramsci 14, 43100 Parma, Italia; and ‡Faculté de Médecine, Centre Hospitalier Universitaire de Lille, 1 Place Verdun, 59045 Lille, France

The purpose of this review is to assist mycologists in having a better understanding of *Pneumocystis carinii* and the disease that it causes. Now considered to be a fungus, *P. carinii* is unusual in its life cycle and relationship with the host. *P. carinii* pneumonia (PCP) pathogenesis, immunology and host defence mechanisms are examined, as well as epidemiological and control strategies. Most pneumocystosis' pathophysiological changes result from the parasite's attachment and proliferation in the lungs, resulting in a filling of the alveoli with masses of the micro-organism. Pathological changes include an increase in alveolar capillary membrane permeability and injury to the alveolar epithelium, which may be mediated by the release of degradative enzymes from the pathogen. A host response takes place by hypertrophy, and hyperplasia involving type II epithelial alveolar cells. *P. carinii* interacts with pulmonary surfactants by binding to the hydrophilic proteins A and D, and by modifying their phospholipid composition. Alveolar macrophages and CD4⁺ T cells play a key role in the host's defence against *Pneumocystis*. The epidemiology of PCP remains poorly understood. Airborne transmission has been established, but the actual infective form and its source remains unknown. Studies concerning *P. carinii* genetic diversity have shown that the parasite polymorphism is related, at least partially, to the host species. A strong host-species specificity in *P. carinii* has been found. From an epidemiological perspective, there appears to be no animal reservoir for the agent of human PCP. Thus, this disease should not be considered to be zoonotic. Although a significant decrease in the incidence of pneumocystosis has been obtained when employing chemoprophylaxis, anti-*P. carinii* drugs are not completely successful, often inducing deleterious side-effects. For these reasons, new prophylactic and therapeutic strategies need to be developed. One approach could be based on the anti-*P. carinii* effect of yeast killer toxins and antibiotic anti-idiotypic antibodies.

Keywords control, *Pneumocystis carinii*, pneumocystosis, transmission

Fungal nature of *Pneumocystis carinii*

Pneumocystis carinii was discovered by Carlos Chagas in 1909. In Brazil, he discovered cystic forms in the lungs of guinea pigs and humans that were infected by *Trypano-*

soma cruzi. Chagas believed that these forms were cystic stages of *Trypanosoma* [1]. In 1912, *P. carinii* was observed in the lungs of infected rats living in Paris, which were described as a new micro-organism by Delanöe and Delanöe [2]. They named the organism *P. carinii* in honour of Antonio Carini, an Italian biologist who described the parasite in the lungs of rats infected by *Trypanosoma lewisi* that he had studied in Brazil [3].

Correspondence: Dr J. C. Cailliez, Unité 42 INSERM, BP 39, 369 rue Jules Guesde, 59651 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: (33).20.47.25.73; Fax: (33).20.05.91.72.

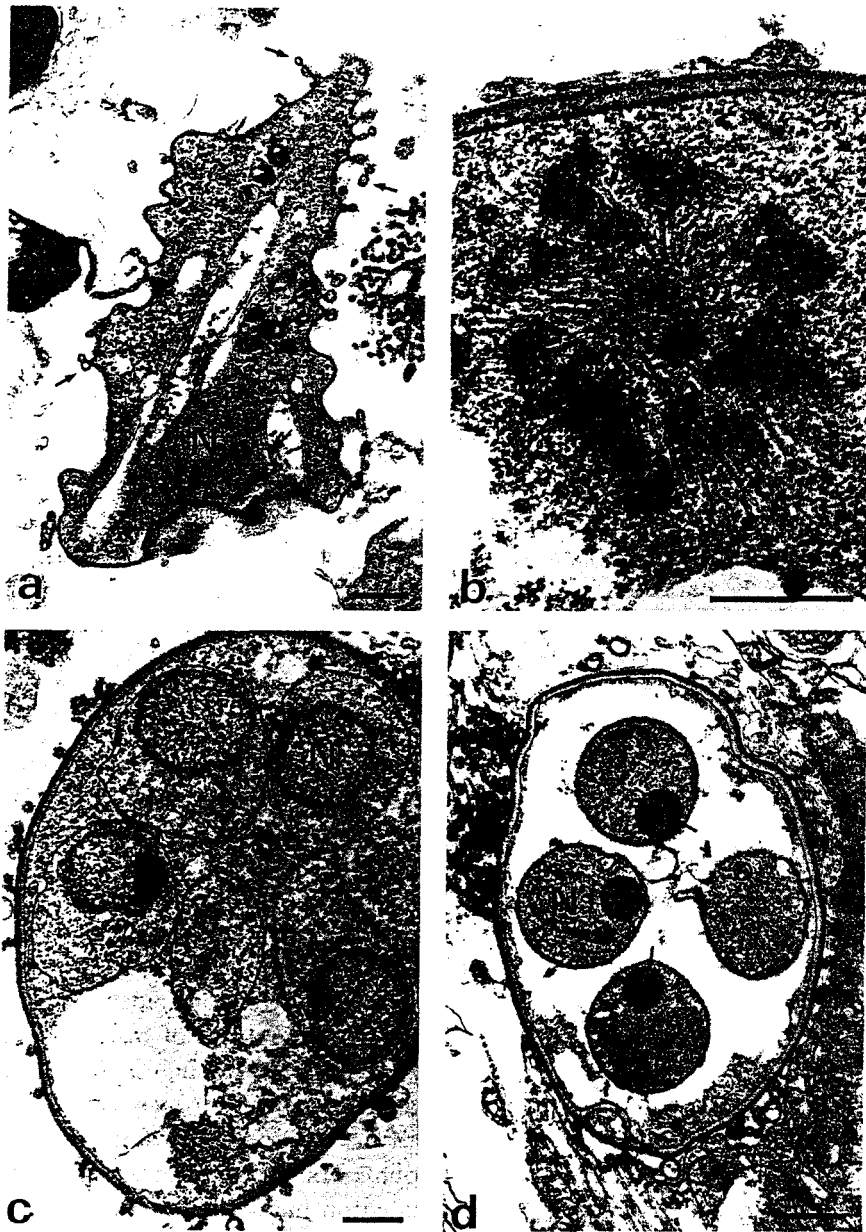


Fig. 1 Life cycle of *Pneumocystis carinii*. The ultrastructure of parasite stages are shown by transmission electron microscopy. (a) Section of a trophozoite with filopodia (arrows). The unique nucleus (N) is clearly visible in the cytoplasm. (b) Mitotic stage of an early precystic form showing individualized chromosomes. (c) Section of an intermediate precyst. The nucleus (N) of intracystic bodies are easily observed. (d) Section of a mature cyst showing four intracystic bodies with well preserved rough endoplasmic reticulum, mitochondria (arrows) and nucleus (N). Bars = 1 μ m.

Subsequently, most authors placed *Pneumocystis* among the protozoa based on its morphology and response to antiprotozoal drugs [4].

All of the known growth stages of *P. carinii* are found in the lungs of the host. In Fig. 1, the characteristic stages of the parasite, an amoeboidal mononucleate trophozoite (Fig. 1a), a precyst (Fig. 1b and c) and a mature cyst containing intracystic bodies that will evolve into trophozoite forms (Fig. 1d) can be seen.

In the past 6 years, analysis of its nucleic acids has led to *P. carinii* being reclassified as a member of the Kingdom Fungi [5–8]. Sequence similarities between

P. carinii 16S-like rRNA and yeast rRNA have been reported [9, 10]. Likewise, the study of several continuous mitochondrial genomic gene sequences have shown homologies with fungal gene sequences [11]. More recently, an ATPase gene of *P. carinii* has been cloned and sequenced [12]. The level of identity between the predicted *P. carinii* pump peptide and fungal proton pump peptide sequences exceeded 66%. The H⁺ pump from the protozoan *Leishmania* spp. is only 34% identical in amino acid sequence. According to studies of 5S rRNA sequences, *P. carinii* has been designated as a primitive fungus belonging to the Phylum Chytridomycota (e.g. *Phlyctochytrium*

irregulare) or Zygomycota (e.g. *Basidiobolus magnus* [13]. However, analysis of 18S rRNA gene sequences suggests that *P. carinii* has affinities with ascomycetous fungi such as *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* [9,10,14]. Sequence analysis of the conserved eukaryote- β tubulin gene also suggested that *P. carinii* is an ascomycetous fungus [15]. In contrast, using primers targeted to the mitochondrial rRNA gene, *P. carinii* was suggested to belong to the ustomycetous red yeasts (e.g. *Rhodotorula glutinis* or *Sporidiobolus pararoseus*) [7].

Moreover, the *P. carinii* genes of two important enzymes, thymidylate synthase (TS) and dihydrofolate reductase (DHFR), were found to be located on different chromosomes [16,17]. As in non-protozoan organisms, *P. carinii* TS and DHFR activities reside in two polypeptide chains, clearly distinct and monofunctional [16]. In all protozoans studied to date, these two enzymatic activities exist in one bifunctional protein, which is coded by the same gene [18].

Finally, *P. carinii* and some fungi share common epitopes for specific antibodies [19]. Currently, the general consensus is that *P. carinii* is a fungus related to ascomycetous yeasts such as *S. cerevisiae*. Regardless of its classification, *P. carinii* remains a unique parasitic micro-organism in that it possesses important features that distinguish it from other fungi.

***Pneumocystis carinii* transmission by airborne route**

P. carinii is a pathogenic eukaryotic micro-organism that causes severe interstitial pneumonia in immunosuppressed mammals [3]. Patients treated with immunosuppressed drugs as well as immunocompromised patients infected by the human immunodeficiency virus (HIV), are particularly prone to developing *P. carinii* pneumonia (PCP). The nosocomial transmission of *P. carinii* to HIV-uninfected immunocompromised patients has been suggested [20–23] in the hospital setting.

The epidemiology of PCP remains poorly understood. Airborne transmission has been clearly established [3,24], but the actual infective form and its source causing human infections remain unknown. From animal experiments, particularly using murine hosts, it has been demonstrated that the airborne route is the mode of *P. carinii* transmission. Corticosteroid-treated germ-free rats developed PCP when housed with rats infected with *P. carinii* [3]. In these experiments, it was shown that germ-free rats did not become infected from unsterilized drinking water or feed. Non-infected SCID mice developed PCP following exposure to outbred mice having corticosteroid-induced PCP [25]. A single infected mouse was sufficient to infect at least

20 SCID mice during a single contact day. Recently, the airborne transmission of simian-derived *P. carinii* to simian immunodeficiency virus (SIV)-infected *Rhesus macaques* has been reported. Recipient and donor monkeys were maintained in separate rooms which shared a common ventilation system [26]. It is believed that *P. carinii* can be transmitted among humans in a similar manner.

P. carinii-free SCID mice can be infected by intranasal inoculation of *P. carinii* that have been harvested from parasitized mouse lungs [27]. In a similar manner, non-infected nude rats will develop PCP after intratracheal inoculation of the parasites originating from the lungs of infected rats [28,29].

Most investigators induce *Pneumocystis* infections in animals by administering corticosteroids to laboratory rodents. Exposure to infected animals is usually not needed. This suggests that highly infective forms of *Pneumocystis* are present in the environment. It has not been established where the fungus normally occurs in the environment and how the host acquires it.

Putative airborne reservoir for pneumocystosis

The presence of *P. carinii* trophozoite or cyst forms in the air has not been demonstrated. However, the detection in air samples of DNA gene sequences that are identical to those of *P. carinii* suggests that the parasite is probably located in the immediate environment. *P. carinii* DNA has been detected in room air samples where infected rats, or human patients, with PCP were present [30]. DNA sequences identical to both rat- and human-derived *P. carinii* have been detected in air samples collected in rural Oxfordshire, UK [31].

Only a limited amount of information is known about the influence of environmental factors on the viability and infectivity of *P. carinii*. Infective stages derived from the lungs of infected hosts could be resistant to destruction or inactivation by environmental factors, remaining potentially infectious for long periods. However, some evidence suggests that *P. carinii* rapidly loses its infectious ability outside of the host [3,32]. This is contrary to the belief that *Pneumocystis* can be acquired from environmental sources. *P. carinii* transmission probably involves a relatively close contact with a *P. carinii* infected host.

***Pneumocystis carinii* attachment to host cell**

Adherence of *P. carinii* to type I pneumocytes appears to be the first step in the initiation of infection. Ultrastructural studies have shown a close *in vitro* attachment of trophozoites and cystic forms to cells growing in monolayer cultures [29,33–36]. These observations suggested that *P. carinii*-host cell interactions are required

for parasite proliferation. The host cell may provide nutrients and stimulate the synthesis of parasite molecules involved with *P. carinii* growth and proliferation [33]. Interdigitation and membrane blurring between the parasite and the host cell have been described. Filopodia appear at the surface of trophozoites, allowing the parasite to anchor itself to the host cell. *In vivo*, close contact between the surface of filopodia and type I pneumocytes are routinely observed. Similar *in vitro* interactions have been demonstrated when *P. carinii* attaches itself to a variety of culture cells [33,34,37]. Filopodia have been shown to penetrate the host cell cytoplasm without disruption of the plasmalemma [29,34,37,38]. *In vitro*, rat-derived *P. carinii* cells were not able to proliferate in some cell lines [33]. The proliferation of *P. carinii* seems to occur when adhesion to host cells occurred, apparently following surface molecular interactions. However, *P. carinii* is able to grow *in vitro* without feeder cells [39,40].

P. carinii surface molecules have been demonstrated to be involved in the attachment process of the parasite to the host cell. As in other fungi where cell wall receptors interact with host proteins such as fibronectin, laminin or fibrinogen [41], cell surface molecules of *P. carinii* may play the same role in parasite binding to the host cell. Previous data have demonstrated that fibronectin is a mediator of *P. carinii* attachment to host cells [37,42]. Specific fibronectin-binding receptors in a major surface glycoprotein (MSG) were detected at the surface of the parasite [42]. Attachment to lung epithelial cells appears to be mediated by fibronectin-binding integrins [43]. Variation in the glycosylation process of *P. carinii* surface antigens (like MSG from human *P. carinii*) may influence the host-parasite relationships. A recent work has demonstrated that MSG consists of more than one form of glycoprotein, each having different binding affinities to the lectin concanavalin A [44]. The identification of parasite surface molecules which mediate *P. carinii* attachment to lung cells should provide insight into the pathogenesis of PCP. The genes coding for the family of MSG glycoproteins, which play a major role in parasite adhesion, have been cloned and sequenced from several *P. carinii* strains [45,46].

***Pneumocystis carinii* genetic diversity**

P. carinii MSG gene sequences differ in different strains studied from the same host species, and even within the same host. Other gene sequences were found to be different in human and animal isolates of *P. carinii* [47-49]. Some variable gene sequences, molecular karyotypes obtained by using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) [50,51] or isoenzyme profiles obtained by Multi-locus Enzyme Electrophoresis (MEE) have been used

as strain markers [48,52]. Genotypic or phenotypic markers have revealed a significant genetic diversity in the natural populations of *Pneumocystis*. Such markers are being used in research programmes dealing with PCP epidemiology.

Coinfection with distinct *Pneumocystis carinii* strains

Pulsed field gel electrophoresis studies have shown that coinfection with many *P. carinii* strains may occur [50,51, 53]. Two distinct types of rat-derived *P. carinii* (named prototype and variant) were detected in the infected lungs of the same animal [54]. Four distinct karyotype patterns were identified among the prototype forms indicating that there may be even a greater genetic diversity among these forms than had been previously considered [55]. It has been shown that prototype and variant forms of rat-derived *P. carinii* can be phenotypically distinguished by their immunoreactivities to specific polyclonal and monoclonal antibodies [56]. Moreover, immunoblotting analyses and T cell proliferation assays have revealed differences in *P. carinii* MSGs of isolates obtained from different rat strains [57]. Two genetically distinct strains of *P. carinii* were identified in infected ferret lungs [58]. Point mutations or deletions in *P. carinii* conserved DNA regions were found among *P. carinii* isolates from the same host species based on experiments performed with both rat- and human-derived parasites [59].

Host species specificity of *Pneumocystis carinii*

Studies regarding *P. carinii* diversity using TS gene or isoenzyme markers have shown that genetic diversity of parasite isolates is related, at least partially, to the host species [48,52]. Prior to 1993, it had not been established whether *P. carinii* from a given host species was able to infect other host species. Parasites harvested from different host species (rat, mouse or rabbit) were inoculated into SCID mice or nude rats as a means to compare their relative infectivity [28]. Both SCID mice inoculated with mouse-derived *P. carinii* and nude rats inoculated with rat-derived *P. carinii* developed PCP. No parasites were found in the lungs of SCID mice inoculated with rat- or rabbit-derived *P. carinii* or in lungs of nude rats infected with mouse- or rabbit-derived *P. carinii*. Likewise, other investigators have shown that SCID mice were unable to support the growth and replication of ferret-derived *P. carinii* [60]. PCP in SCID mice or nude rats inoculated with simian-derived *P. carinii* has not been observed [61]. These findings demonstrate a strong host species specificity in rat-, mouse-, rabbit-, ferret- and simian-derived

P. carinii. From an epidemiological point of view, they suggest that there is no animal reservoir for the agent of human PCP, and that this disease should not be considered a zoonosis.

Different 'species' of *Pneumocystis*

P. carinii has been isolated from a wide variety of unrelated mammalian hosts to include human, monkey, rat, mouse, ferret, rabbit, swine, horse, guinea pig, goat, shrew, sloth, dog, cat, sheep, marmoset and vole [4]. Morphologic, antigenic and genomic differences have been reported among *P. carinii* strains from some of these hosts. Ultrastructurally, rabbit-derived *P. carinii* organisms could be distinguished from mouse-derived ones: their filopodia were clearly thicker and less numerous than those of mouse parasites [62]. However, morphological features are usually insufficient to distinguish *P. carinii* organisms from rats, mice or humans. The principal reports of specific differences between these *Pneumocystis* strains were made by immunological or molecular methods [7,15,48,52,63–68]. Data obtained by using these methods have shown that different host species are infected with genetically different *Pneumocystis* populations, imply that multiple *Pneumocystis* species and/or strains may exist. The *Pneumocystis* host species specificity, which has been found through cross infection experiments [27,28,60,69], is consistent with genetic data and supports the existence of different *Pneumocystis* species or varieties, at least in terms of host species.

Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*

At the Third Workshop on Opportunistic Protists in Cleveland, Ohio, USA, 24–29 June 1994, a consensus nomenclature for *Pneumocystis* was proposed [70]. Current data regarding genetic diversity in *Pneumocystis* were considered to be insufficient to distinguish speciation from clonal variation. Therefore, the following names were proposed to standardize the designation of the different types of *Pneumocystis* organisms found in the most commonly infected mammalian hosts (sp. f. refers to special form, after D. L. Hawksworth *et al.*, 1983 *Dictionary of the Fungi*, 7th edn, CAB International, Kew):

Pneumocystis carinii sp. f. *carinii* Rat (prototype)

Pneumocystis carinii sp. f. *rattus* Rat (variant)

Pneumocystis carinii sp. f. *hominis* Human

Pneumocystis carinii sp. f. *mustelae* Ferret

Pneumocystis carinii sp. f. *muris* Mouse

Pneumocystis carinii sp. f. *equi* Horse

Pneumocystis carinii sp. f. *suis* Pig

Pneumocystis carinii sp. f. *oryctolagi* Rabbit

Pneumocystis carinii pneumonia pathogenesis

Studying the pathogenesis of *P. carinii* infections remains important for the development of new therapies and management approaches, even though the interplay of the parasite and host is complex. Unfortunately, data regarding the early phases of *P. carinii* infection are rare. The attachment of *P. carinii* to epithelial alveolar cells is probably a critical step in PCP pathogenesis. After making contact with the type I alveolar epithelial cell, the trophozoite extends filopodia into the host cell cytoplasm. Exchanges between *P. carinii* and the host cells could be facilitated by an activation of the plasmalemmal vesicular system of the host cell; actually, numerous vesicles have been observed in the host cell cytoplasm next to the attachment area [34,71]. Most PCP pathophysiological changes result from parasite attachment and proliferation with filling of the alveoli with masses of cells of the pathogen. The first impairment would be an increase of the alveolar-capillary membrane permeability related to the parasite attachment [4]. Subsequently, an injury to the alveolar epithelium occurs, ultimately leading to denudation of the basement membrane. Host cell injury could be mediated by the release of degradative enzymes from the parasite [72,73]. Then, a host reparative response takes place by hypertrophy and hyperplasia of type II epithelial alveolar cells [4], which will differentiate into type I cells. Moreover, *P. carinii* interacts with pulmonary surfactants by binding to hydrophile surfactant proteins A (SP-A) and D (SP-D), and by modifying the surfactant composition. The mannose moieties of *P. carinii* MSG bind SP-A [158] or SP-D [159]. The consequences of these interactions are not known. The surfactant phospholipid rate decreases during PCP [74–77]. *P. carinii* could directly inhibit the phosphatidylcholine secretion by type II epithelial cells [78].

Immunology and host defence

The host immune response to *P. carinii* has been recently reviewed [68,73]. Alveolar macrophages and CD4⁺ T cells play a key role in the defence of the host against *Pneumocystis*. *Pneumocystis* MSG is a chemotactic factor for normal human monocytes. Macrophagic mannose receptor [79], fibronectin [80] and probably the complement receptor of the macrophage are involved in the adherence of *P. carinii* to this cell. However, *P. carinii* binding to the macrophage does not result always in either activation of this cell or parasite phagocytosis. In some experimental systems, the internalization and degradation of the parasite does not take place without the presence of anti-*P. carinii* serum [81]. Complement is not essential but could enhance antibody-mediated phagocytosis and free-oxygen radical production. Rabbits develop

spontaneous PCP at weaning [82,83] and rabbit alveolar macrophages are able to produce free-oxygen radicals following stimulation with rabbit *P. carinii* (Dridba *et al.*, 1995, 35th ICAAC Congress, San Francisco, USA). *P. carinii* is also able to elicit an oxidative burst in normal rat [84]. The parasite appears to possess superoxide dismutase but lacks catalase activity [85]. Therefore, it would be susceptible to hydrogen peroxide-dependent killing mechanisms. *P. carinii* induces nitric oxide secretion by alveolar macrophages by stimulating the L-arginine-dependent pathway [86].

T cells play an important role in the host cellular immune response to *Pneumocystis*. AIDS patients often develop PCP when their CD4⁺ T cell counts fall to 200/mm³ or lesser. A specific T cell proliferation response has been demonstrated in animals [87,88] and healthy humans previously exposed to *P. carinii* [89]. In contrast, the proliferative response is less marked in HIV-infected individuals, and it was not detected in patients with advanced AIDS. Adoptive transfer of splenic T cells has decreased the parasite burden in *nul/nul* mice with PCP, mediated a delayed type hypersensitivity (DTH) reaction in normal recipients, and reduced the number of *P. carinii* parasites in infected tissues [90,91]. IFN- γ , produced primarily by activated CD4⁺ T cells, activates macrophages. Aerosolized IFN- γ induced activation of mononuclear cells and alveolar macrophages, resulted in marked reduction of PCP extension in CD4-depleted mice [92]. Systemic administration of IFN- γ was also effective against PCP in rats [68]. In PCP, IFN- γ could increase superoxide or NO production and activate macrophages for TNF- α release [68,88]. Alveolar macrophages from immunocompetent humans, or from HIV-infected patients with PCP, exhibited increased spontaneous TNF- α release when exposed to *Pneumocystis* [68,93,94]. The role of TNF- α was not clearly established [95], and no specific TNF- α receptor has been identified on *P. carinii* [73]. However, anti-TNF- α antibodies inhibited the clearance of *P. carinii* [73,88,96]. IL-1 and IL-6 could play a mediator role in the host defence against *P. carinii* [97–99]. The secretion of IL-1 is reduced in HIV-1 infected macrophages, possibly favouring the PCP development [68]. CD4⁺ T cells, but not CD8⁺ T cells, have been found to be essential for resistance to *P. carinii* pneumonitis in Balb/c mice depleted of CD4⁺ T cells, or in SCID mice reconstituted with splenic cells from immunocompetent mice [100–102]. However, infusions of thymus or spleen cells depleted of B cells did not resolve PCP in SCID mice [100]. Therefore, T cells do not seem to function alone in the host defence against *P. carinii* [68,88].

Specific humoral immunity may play a role against *P. carinii*. Healthy individuals often develop antibodies against *P. carinii* by the age of two years [73,103]. IgG as well as IgA bind to the cyst wall and membranous

structures of *P. carinii* [104]. A significant clearing of PCP was obtained in *P. carinii* infected SCID mice when administered hyperimmune serum [101]. Moreover, the administration of anti-MSG monoclonal antibodies reduced infection in corticosteroid-treated ferrets and rats [105]. Interestingly, an IgE-mediated allergy to *P. carinii* has been reported in AIDS patients [106].

***Pneumocystis carinii* infections and deep mycoses**

Although the fungal nature of *P. carinii* is usually agreed on, PCP is rarely compared with deep fungal diseases. Nevertheless, it seems reasonable to compare *P. carinii* infections with deep seated mycoses. Some fungal diseases are caused by filamentous saprophytic species which become yeast-like when invading the host. That is the case of dimorphic fungi such as *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* [107]. As in PCP, deep mycoses are primarily pulmonary processes because the pathogens enter through the respiratory tract. Unlike PCP, these mycoses are not transmitted from one infected host to another. In PCP, nasal or intratracheal inoculation of parasites leads to pulmonary lesions in non-latently infected animals (SCID mice or nude rats). In immunosuppressed hosts (patients or animal models), PCP seems to result from an exogenous source of *P. carinii* infection, but it might also develop from a latent asymptomatic *P. carinii* lung infection. In an experiment where *P. carinii* antibody-positive rats without PCP symptoms were placed in air-filtered containers prior to being immunosuppressed, they all developed PCP [6], thus, suggesting that reactivation of latent parasites can induce infection. On the contrary, other observations suggest that immunosuppressed susceptible humans develop PCP from widespread exogenous sources [108].

In deep mycoses, dissemination of the fungus commonly occurs from the lungs to other organs. Similarly, *P. carinii* is able to disseminate from infected lungs to induce secondary visceral lesions. Pulmonary *P. carinii* lesions may be unapparent when extrapulmonary lesions are detected as reported in deep mycoses having a respiratory origin.

From a pathologist's perspective, PCP and deep mycoses are quite distinct. They induce different pathological changes in the infected host. Dimorphic fungi may elicit focal granulomatous reactions, fibrocaceous pulmonary nodules or abscess formation. In contrast, in PCP, the most typical histopathological changes consist of diffuse foamy, honeycombed eosinophilic exudate in the alveolar spaces, and infiltration with macrophages [109].

Finally, *P. carinii* shows strong host species specificity, whereas, other fungi do not, with the exception of dermatophytes [107].

Extrapulmonary pneumocystosis

In the last ten years, an increased number of extrapulmonary pneumocystosis (EP) cases have been reported [110]. Most EP cases were found in AIDS patients having PCP treated by aerosolized pentamidine. Lymph nodes, spleen, kidneys, liver, heart and bone marrow were the most commonly infected organs. However, the pathogenesis of EP is not yet understood [111]. We do not know whether EP results from an infection in which the virulence of *P. carinii* is higher than normal, or when there is an unusual evolution of the pulmonary infection. The pathogen can disseminate by haematogenous and/or lymphatic means.

In our laboratory, the frequency of EP in rodent models was investigated [112]. The most common site of EP was the heart in rats and SCID mice. The frequency of EP is probably higher than what we have found. The frequency of EP in humans is probably also underestimated, owing to the possible existence of subclinical EP and a low sensitivity of available diagnostic tools. A significant number of cases of EP without symptoms of PCP have been reported in the literature; no correlation between EP frequency and PCP extension seems to exist. The trend for *P. carinii* to disseminate from infected lungs to extrapulmonary sites should not be considered as a general rule. Highly infective strains were unable to induce infections when introduced into the bloodstream of animals. Parasites, which were able to infect SCID mouse or nude rat by the airborne route, lost their infectivity via the bloodstream [112]. Although hosts were severely immunosuppressed, blood or serum non-specific factors could inhibit the virulence of the parasite, as has been reported in other parasitic or fungal infections. For instance, *Trypanosoma cruzi* virulence is inhibited by both seric high-density and low-density lipoproteins [113]. In the same way, non-specific seric factors could be involved in the host response against *Candida albicans* infections [107].

P. carinii DNA has been detected in the sera of immunosuppressed rats during active PCP [114] and in the sera of HIV-infected patients with PCP [115]. The detection of *P. carinii* DNA in these sera, however, was not correlated with the presence of viable parasites in the bloodstream. Only one study reported the recovery of *P. carinii* organisms by culture from blood samples [116].

Potential vertical transmission of pneumocystosis

Vertical transmission of *P. carinii* has been suspected for a long time in humans [117]. In contrast, *P. carinii* infections have not been documented to occur through the

placenta in SCID mice [118]. Rabbits are an interesting model to investigate vertical transmission of *Pneumocystis*. We have reported that almost all untreated young rabbits are spontaneously and heavily infected by *P. carinii* at weaning (28-day-old rabbits) [83], but we do not know when nor how *P. carinii* infects them. We have reported *P. carinii* infections in 7-day-old rabbits [119], and we are attempting to detect parasites in rabbit placenta and fetuses by using PCR and *in situ* hybridization techniques.

Drugs against pneumocystosis

The drugs of choice for treating PCP remain trimethoprim-sulphamethoxazole (TMP-SMZ) or pentamidine which are also used in primary and secondary prevention of the disease in HIV-infected patients [120]. The TMP-SMZ combination often caused unwanted effects in these patients. Epiroprim, another folic acid inhibitor, has a significant effect against both *P. carinii* and *Toxoplasma gondii* in mice [121]. About 20% of HIV-infected patients receiving primary or secondary chemoprophylaxis will develop PCP [122]. Aerosolized pentamidine can promote atypical pulmonary and/or extrapulmonary *P. carinii* infections. Antifungal drugs have been demonstrated to be of little use. *P. carinii* is resistant to amphotericin B which may be explained by the absence of ergosterol in the pathogen's cell membrane [123]. Other antifungal therapeutic agents, echinocandins and papulocandins, cyclic lipopeptide β -1,3 glucan synthesis inhibitors, are effective *in vivo* against *P. carinii* [124]. Recently, new semi-synthetic pneumocandins have been found to have a high anti-*P. carinii* activity in immunocompromised rats [125]. Less effective than TMP-SMZ and pentamidine, atovaquone, a hydroxynaphthoquinone that is apparently microbicidal to *P. carinii*, is useful in mild-to-moderate cases of PCP [126,127]. Other agents, such as clarithromycin-SMZ, have been found to be effective against PCP in rats [128]. Deferoxamine mesylate, an iron-chelating drug, is active *in vitro* and *in vivo* against *P. carinii* but very high doses are needed for rat or mouse PCP [129,130]. Comprehensive analyses of folate antagonists, primaquine, clindamycin and other agents used to control PCP were recently published in the second edition of the P. D. Walzer's book: *Pneumocystis carinii Pneumonia* [131-133].

New strategies to control PCP

The development of new anti-*P. carinii* strategies remains a priority. Present research includes the identification of new metabolic targets and the study of the 'yeast killer

phenomenon'. The characterization of *P. carinii* specific metabolic targets has led to the study of key enzymes involved in the cell wall synthesis, and the investigation of carbohydrate, aromatic amino acids, sterol and antioxidant molecules.

The study of the phosphomannose isomerase of the pathogen, an enzyme involved in the synthesis of the cell wall compounds, is being developed [134]. The potential of *P. carinii* cell wall biosynthetic pathways as a chemotherapeutic target site is being explored using β -1,3 glucan inhibitors [124,125].

P. carinii dwells in the alveolar microenvironment, which is rich in phospholipids, where it could incorporate exogenous lipids [135,136]. Moreover, evidence for the *de novo* lipid synthesis of many lipid components by *P. carinii* has been discovered. For instance, *P. carinii*, like the rust fungi, can synthesize the unusual fatty acid *cis*-9, 10-epoxy stearate methyl ester [137]. The absence of this molecule in the host makes it a potential chemotherapeutic target [138]. Isoprenoid metabolism has also been investigated. The cellular concentration of CoQ (ubiquinone) in the parasite was found at the lower end of the range of values typically reported for aerobic microorganisms, suggesting that *P. carinii* metabolism may not be strictly aerobic [135]. The main homologue of ubiquinone in normal rat lung is CoQ9, whereas *P. carinii* contains high CoQ10 concentrations with lower concentrations of CoQ9. In the parasite, the benzoquinone ring could be synthesized via the shikimic acid pathway. The *AROM* locus, which is involved in the aromatic amino acid synthesis in *P. carinii*, has been cloned and sequenced [58,139]. As the shikimic acid pathway is absent in mammals, it could be a potential chemotherapeutic target.

Cholesterol constitutes about 78% of the total sterols in *P. carinii* [135]. The parasite should be able to uptake directly cholesterol from the host lung. It is interesting that *P. carinii*, like other fungi, does not have ergosterol in the cell membranes. Moreover, *P. carinii* contains some C₂₈ and C₂₉ sterols (ergost-7-en-3-ol, ergostadien-3-ol, stigmast-7-en-3-ol, stigmastadien-3-ol), undetected in the host lung and probably synthesized by the parasite. These minor sterols could have a metabolic role, and therefore, be used as a therapeutic target.

Some evidence of parasite superoxide dismutase exists [85]. The alveolar environment is rich in molecular oxygen as well as in reactive oxygen moieties originating from activated alveolar macrophages or polymorphonuclear cells. Therefore, the *P. carinii* enzymatic mechanisms to evade oxygen radical-generating systems can be considered as potential chemotherapeutic targets.

Finally, because the attachment of *P. carinii* to alveolar cells is an essential event in PCP development [140,141], a control strategy based on attachment inhibition could be

designed. Unfortunately, no therapeutic drugs that can inhibit parasite attachment are known. For this reason, we are developing in our laboratory a new strategy to PCP control by using yeast killer toxins and antibiotic anti-idiotypic antibodies.

Effect of a *Pichia anomala* killer toxin (PaKT) on *Pneumocystis carinii*

PaKT is a yeast toxin secreted by a killer strain of *Pichia anomala*. PaKT was selected because of its wide antibiotic spectrum against unrelated pathogenic micro-organisms including bacteria and pathogenic fungi [142]. Moreover, its activity can be neutralized by a monoclonal antibody (mAb KT4) and anti-idiotypic antibodies (antiIds) produced against mAb KT4 are able to mimic the *in vitro* killer effect of PaKT. The PaKT secretion sites were localized in the cell wall of the killer yeast strain by using mAb KT4 in immunofluorescence assay and immunoelectron microscopy [143–146]. The susceptibility of *P. carinii* to PaKT has been investigated [147–149]. Rat-derived *P. carinii* cystic forms and trophozoites were preincubated either with PaKT or control buffers before being added to monolayer Vero cells or L2 lung cell cultures. Our results showed that PaKT induced a marked inhibitory effect on the *P. carinii in vitro* attachment. Similar data were obtained with mouse-derived parasites. As the inhibitory effect of PaKT was neutralized by mAb KT4 [150], the decrease in *P. carinii in vitro* attachment was due to the specific antimicrobial activity of the killer toxin.

In vivo experiments were developed to establish if PaKT could inhibit the parasite's infectivity in SCID mice. Parasites were preincubated in either PaKT, PaKT neutralized by mAb KT4 or control buffers. SCID mice were nasally exposed with different pretreated parasites, and then sacrificed 40 days later. The results indicated that the PaKT inhibited parasite infectivity in SCID mice [149]. Although it is too early to affirm the existence of a real killer effect, *P. carinii* infectivity appeared to be clearly sensitive to PaKT activity. The decrease of *P. carinii in vitro* attachment and the inhibition of the parasite virulence in SCID mice was the result of either the death of parasite or an inhibitory effect of the PaKT on *P. carinii* adhesion mechanisms.

PaKT-like anti-idiotypic antibodies and idiotypic immunization

As PaKT could not be used as a systemic antibiotic, new molecules have been produced by applying the anti-idiotypic network theory [151]. It is possible to cause

rabbit antiIDs with PaKT antimicrobial properties. These antiIDs were demonstrated to be able to inhibit the *in vitro* growth of yeast, thus, mimicking the antimicrobial properties of the PaKT [152,153].

We are developing new preventive and therapeutic strategies directed against pathogenic micro-organisms susceptible to PaKT. The reliability of this approach is attested by two recent studies. The administration of mAb KT4 to syngenic mice induced a significant protection against lethal inocula of *C. albicans* cells in relation to *in vivo* elicitation of antiIDs [154]. This was the first report of antimicrobial protection (idiotypic vaccination) using the properties of killer toxin-like antiIDs which presumably acted *in vivo* as antibiotics. A significant protection against candidal vaginitis was obtained in mAb KT4-vaccinated female rats [155].

Finally, a new molecular approach has been initiated. Nucleotide primers have been used to amplify DNA sequences corresponding to the variable domains of mouse immunoglobulin light and heavy chains [156], thus allowing the DNA encoding the antiIDs 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.

Conclusions

In recent years, *P. carinii* has been classified as a member of the Kingdom Fungi, essentially on the basis of genomic studies. However, this fungal micro-organism remains atypical with respect to its phenotypic features, its biological life cycle, its relationships with the host and its susceptibility and resistance to most antifungal drugs.

Knowledge of the life cycle of *P. carinii* is limited by the lack of a continuous *in vitro* culture system. Although we are able to infect animals with *P. carinii* isolates, we do not know the infective stage involved in the natural transmission of the parasite. DNA sequences similar to those of *P. carinii* have been found in air samples. However, lung forms of the parasite seem to survive only for a short time in the environment.

P. carinii taxonomy and phylogeny remain important goals as a means to clarify environmental sources of the pathogen and generate high-performance methods to *in vitro* culture. The development of a continuous culture system might give a better understanding of the biology and life-cycle of *P. carinii*, thus improving methods for the evaluation of anti-*P. carinii* drugs, leading to new therapies and prophylaxis against PCP. In this area, the sensitivity of *P. carinii* to the antibiotic activity of the PaKT and the protective effect of mAb KT4 idiotypic

vaccination suggests that the yeast killer phenomenon could be used as a method to control PCP [157]. PCP could be prevented in transplant recipient or leukaemia patients by idiotypic vaccination carried out before the iatrogenous induction of immunosuppressed states. 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. Above all, the yeast killer phenomenon which has led to the obtention of recombinant peptides with antifungal activity might be used in a new therapeutic way.

Acknowledgements

We thank Mrs Chantal Mullet, Miss Karine Guyot and Mr Philippe Delcourt, U42 INSERM, Villeneuve d'Ascq, France, for their valuable technical assistance. We thank Dr Derek Sullivan, School of Dental Science, University of Dublin, Ireland, for the critical reading of the manuscript. Our investigations were supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS, reference no. 94635), the Centre Hospitalier Régional de l'Université de Lille (reference 93-11) and developed in the framework of the European Union 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' (reference no. PL941118).

References

- 1 Chagas C. Nova tripanomiazaea humana. Ueber eine neue Trypanomiasis des Menschen. *Memoria Instituto Oswaldo Cruz* 1909; 1: 159.
- 2 Delanoe P, Delanoe M. Sur les rapports des kystes de *Carinii* du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. *Comp Rend Acad Sci Paris* 1912; 155: 658-60.
- 3 Hughes WT. *Pneumocystis carinii Pneumonitis*, 2 vols. Boca Raton, FL: CRC Press, 1987.
- 4 Walzer PD (ed.) *Pneumocystis carinii Pneumonia*, 2nd edn, revised and expanded. New York: Marcel Dekker, 1994.
- 5 Cushion MT, Harmsen A, Matsumoto Y, et al. Recent advances in the biology of *Pneumocystis carinii*. *J Med Vet Mycol* 1994; 32 (Suppl. 1): 217-28.
- 6 Stringer JR, Edman JC, Cushion MT, Richards FF, Watanabe J. The fungal nature of *Pneumocystis carinii*. *J Med Vet Mycol* 1992; 30 (Suppl. 1): 271-8.
- 7 Wakefield AE, Peters SE, Banerji S, Bridge PD, Hopkin JM. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. *Mol Microbiol* 1992; 6: 1903-11.
- 8 Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1992; 60: 4140-5.
- 9 Edman JC, Kovacs JA, Masur H, et al. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 1988; 334: 519-22.

- 10 Stringer SL, Stringer JR, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp Parasitol* 1989; **68**: 450-61.
- 11 Pixley FJ, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol* 1991; **5**: 1347-51.
- 12 Meade JC, Stringer JR. Cloning and characterization of an ATPase gene from *Pneumocystis carinii* which closely resembles fungal H⁺ ATPases. *J Eukaryotic Microbiol* 1995; **42**: 298-307.
- 13 Watanabe JI, Hori H, Tanabe K, Nakamura Y. 5S ribosomal RNA sequence of *Pneumocystis carinii* and its phylogenetic association with 'Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group'. *J Protozool* 1989; **36**: 16S-18S.
- 14 Stringer SL, Hudson K, Blase MA, et al. Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. *J Protozool* 1989; **36**: 14S-16S.
- 15 Li J, Edlind T. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* based on β -tubulin sequence. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 97S.
- 16 Edman U, Edman JC, Lundgren B, Santi DV. Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidilate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6503-7.
- 17 Lundgren B, Cotton R, Lundgren JD, Edman JC, Kovacs JA. Identification of *Pneumocystis carinii* chromosomes and mapping of five genes. *Infect Immun* 1990; **58**: 1705-10.
- 18 Krungkrai J, Webster HK, Yuthavong Y. Folate and cobalamin metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 1990; **6**: 388-91.
- 19 Lundgren B, Kovacs JA, Nelson NN, et al. *Pneumocystis carinii* and specific fungi have a common epitope, identified by a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 391-5.
- 20 Chanock S. Evolving risk factors for infectious complications of cancer therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993; **7**: 771-93.
- 21 Chave JP, David S, Wauters JP, 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**: 927-32.
- 22 Santiago-Delpin EA, Mora E, Gonzalez ZA, Morales-Otero LA, Bermudez P. Factors in an outbreak of *Pneumocystis carinii* in a transplant unit. *Transplant Proc* 1988; **20** (1 Suppl. 1): 462-5.
- 23 Walzer PD. *Pneumocystis carinii*: New clinical spectrum? *New Engl J Med* 1991; **324**: 263-5.
- 24 Frenkel JK, Good JT, Shultz JA. Latent *Pneumocystis* infection of rats, relapse and chemotherapy. *Lab Invest* 1966; **15**: 1559-77.
- 25 Soulez B, Palluault F, Cesbron JY, et al. Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice. *J Protozool* 1991; **38**: 123S-125S.
- 26 Vogel P, Miller CJ, Lowenstine LL, Lackner AA. Evidence of horizontal transmission of *Pneumocystis carinii* pneumonia in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Infect Dis* 1993; **168**: 836-43.
- 27 Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, Cesbron JY, Camus D. Intranasal inoculation of mouse, rat or rabbit-derived *Pneumocystis* in SCID mice. *J Protozool Res* 1993; **3**: 94-8.
- 28 Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, et al. *Pneumocystis* cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **42**: 71S.
- 29 Aliouat EM, Dei-Cas E, Billaut P, Dujardin L, Camus D. *Pneumocystis carinii* organisms from *in vitro* culture were highly infectious to the nude rat. *Parasitol Res* 1995; **81**: 82-5.
- 30 Bartlett MS, Lee CH, Lu JJ, et al. *Pneumocystis carinii* detected in air. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 75S.
- 31 Wakefield AE. Detection of DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* in samples of ambient air. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 116S.
- 32 Ito M, Kuramochi T, Hioki K, Nomura T. Effects of environmental factors and disinfectants on the survival of *Pneumocystis carinii* outside the host. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 91S.
- 33 Bartlett MS, Goheen MP, Lee CH, et al. Close association of *Pneumocystis carinii* from infected rat lung with culture cells as shown by light and electron microscopy. *Parasitol Res* 1994; **80**: 208-15.
- 34 Dei-Cas E, Jackson H, Palluault F, et al. Ultrastructural observations on the attachment of *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *J Protozool* 1991; **38**: 205S-207S.
- 35 Murphy MJ, Pifer LL, Hughes WT. *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *Am J Pathol* 1977; **86**: 387-401.
- 36 Pifer LL, Hughes WT, Murphy MJ. Propagation of *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *Pediatr Res* 1977; **11**: 305-16.
- 37 Aliouat EM, Dei-Cas E, Ouaisi A, et al. *In vitro* attachment of *Pneumocystis carinii* from mouse and rat origin. *Biol Cell* 1993; **77**: 209-17.
- 38 Henshaw NG, Carson JL, Collier AM. Ultrastructural observations of *Pneumocystis carinii* attachment to rat lung. *J Infect Dis* 1985; **151**: 181-6.
- 39 Cushion MT, Ebbets D. Growth and metabolism of *Pneumocystis carinii* in axenic culture. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 1385-94.
- 40 Tegoshi T, Yoshida Y. New system of *in vitro* cultivation of *Pneumocystis carinii* without feeder cells. *J Protozool* 1989; **36**: 29S-31S.
- 41 Tronchin G, Bouchara JP, Annaix V, Robert R, Senet JM. Fungal cell wall adhesion molecules in *Candida albicans*. *Eur J Epidemiol* 1991; **7**: 23-33.
- 42 Pottratz ST, Paulsrud J, Smith JS, Martin WJ. *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by pneumocystis gp120, a fibronectin binding protein. *J Clin Invest* 1991; **88**: 403-7.
- 43 Pottratz ST, Weir AL, Wisniowski PE. *Pneumocystis carinii* attachment increases expression of fibronectin-binding integrins on cultured lung cells. *Infect Immun* 1994; **62**: 5464-9.
- 44 Lundgren B, Kovacs JA, Mathiesen L, Nielsen JO, Lundgren JD. IgM response to a human *Pneumocystis carinii* surface antigen in HIV-infected patients with pulmonary symptoms. *Scand J Infect Dis* 1993; **25**: 515-20.
- 45 Wada M, Kitada K, Saito M, Egawa K, Nakamura Y. cDNA sequence diversity and genomic clusters of major surface glycoprotein genes of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 1993; **168**: 979-85.
- 46 Wright TW, Simpson-Haidaris PJ, Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG. Conserved sequence homology of cysteine-rich regions in genes encoding glycoprotein A in *Pneumocystis carinii* derived from different host species. *Infect Immun* 1994; **62**: 1513-19.
- 47 Dei-Cas E, Mazars E, Aliouat EM, et al. Infection sources, reservoir and transmission of pneumocystosis. In: Ozel MA and Alkan MZ (eds) *Parasitology for the 21st Century*. Wallingford: CAB International, 1996: 175-86.
- 48 Mazars E, Ödberg-Ferragut C, Dei-Cas E, et al. Polymorphism of the thymidilate synthase gene of *Pneumocystis carinii* from different host species. *J Eukaryot Microbiol* 1995; **42**: 26-32.

- 49 Stringer JR, Stringer SL, Zhang J, *et al.* Molecular genetic distinction of *Pneumocystis carinii* from rats and humans. *J Eukaryot Microbiol* 1993; **40**: 733–41.
- 50 Cushion MT, Zhang J, Kaselis M, *et al.* Evidence for two genetic variants of *Pneumocystis carinii* coinfecting laboratory rats. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 1217–23.
- 51 Cushion MT, Kaselis M, Stringer SL, Stringer JR. Genetic stability and diversity of *Pneumocystis carinii* infecting rat colonies. *Infect Immun* 1993; **61**: 4801–13.
- 52 Mazars E, Ödberg-Ferragut C, Durand I, *et al.* Genomic and isoenzymatic markers of *Pneumocystis* from different host species. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 104S.
- 53 Weinberg GA, O'Gara MJ, Cushion MT. Coinfection of rats with genetically diverse forms of *Pneumocystis carinii* demonstrated by *P. carinii* inosine monophosphate dehydrogenase gene polymorphism. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 119S.
- 54 Hong ST, Steele PE, Cushion MT, *et al.* *Pneumocystis carinii* karyotypes. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 1785–95.
- 55 Weinberg GA, Dykstra CC, Durant PJ, Cushion MT. Chromosomal localization of 20 genes to five distinct pulsed field gel karyotypic forms of rat *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 117S.
- 56 Vasquez J, Smulian AG, Linke MJ, Cushion MT. Antigenic differences among genetically distinct types of rat-derived *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 114S.
- 57 Andrews RP, Theus SA, Cushion MT, Walzer PD. Comparison of the antigenic recognition of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* isolated from different rat strains. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 72S.
- 58 Banerji S, Lugli EB, Wakefield AE. Identification of two genetically distinct strains of *Pneumocystis carinii* in infected ferret lungs. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 73S.
- 59 De Luca A, Ortona E, Margutti P, *et al.* Different amplification efficiency and nucleotide sequence variation in various *Pneumocystis* isolates from humans and rats. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 85S.
- 60 Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG, Haidaris PJ. *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. *Infect Immun* 1993; **61**: 2886–90.
- 61 Furuta T, Fujita M, Mukai R, *et al.* 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* 1993; **79**: 624–8.
- 62 Dei-Cas E, Mazars E, Ödberg-Ferragut C, *et al.* Ultrastructural, genomic, isoenzymatic and biological features make it possible to distinguish rabbit *Pneumocystis* from other mammal *Pneumocystis* strains. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 84S.
- 63 Baur NL, Paulsrud JR, Bartlett MS, Smith JW, Wilde CE. *Pneumocystis carinii* organisms obtained from rats, ferrets and mice are antigenically different. *Infect Immun* 1993; **61**: 1315–19.
- 64 Edlind TD, Bartlett MS, Weinberg GA, Prah GN, Smith JW. The β -tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol* 1992; **6**: 3365–73.
- 65 Fletcher LD, Berger LC, Peel SA, *et al.* Isolation and identification of six *Pneumocystis carinii* genes utilizing codon bias. *Gene* 1993; **129**: 167–74.
- 66 Gigliotti F. Host species-specific antigenic variation of mannose-sylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 1992; **165**: 329–36.
- 67 Hughes WT, Gigliotti F. Nomenclature for *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 1988; **157**: 432–3.
- 68 Smulian AG, Walzer PD. The biology of *Pneumocystis carinii*. *Crit Rev Microbiol* 1992; **18**: 191–216.
- 69 Furuta T, Ueda K. Intra- and interspecies transmission and antigenic difference of *Pneumocystis carinii* derived from rat and mouse. *Jpn J Exp Med* 1987; **57**: 11–17.
- 70 *Pneumocystis* Workshop. Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 121S.
- 71 Settnes OP, Nielsen MJ. Host–parasite relationship in *Pneumocystis carinii* infection: activation of the plasmalemmal vesicular system in type I alveolar epithelial cells. *J Protozool* 1991; **38**: 174S–176S.
- 72 Breite WM, Bailey AM, Martin WJ. *Pneumocystis carinii* chymase is capable of altering epithelial cell permeability. *Am Rev Resp Dis* 1993; **147**: 33 (abstract).
- 73 Su TH, Martin WJ. Pathogenesis and host response in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Annu Rev Med* 1994; **45**: 261–72.
- 74 Escamilla R, Prevost MC, Hermant C, *et al.* Surfactant analysis during *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. *Chest* 1992; **101**: 1558–62.
- 75 Escamilla R, Prevost MC, Cariven C, *et al.* Bronchoalveolar lavage phospholipid abnormalities in HIV-infected patients. *Eur Respir J* 1993; **6**: 1301–7.
- 76 Kernbaum S, Masliah J, Alcindor LG, Bouton C, Christol D. Phospholipase activities of bronchoalveolar lavage fluid in rat *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Br J Exp Pathol* 1983; **64**: 75–80.
- 77 Sheehan PM, Stokes DC, Yeh YY, Hughes WT. Surfactant phospholipids and lavage phospholipase A2 in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am Rev Resp Dis* 1986; **134**: 526–31.
- 78 Rice WR, Singleton FM, Linke MJ, Walzer PD. Control of type II cell function by *Pneumocystis carinii*. *Am Rev Resp Dis* 1993; **147**: 35 (abstract).
- 79 Ezekowitz RAB, Williams DJ, Koziel H, *et al.* Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 1991; **351**: 155–8.
- 80 Pottratz ST, Martin WJ. Mechanism of *Pneumocystis carinii* attachment to cultured rat alveolar macrophages. *J Clin Invest* 1990; **86**: 1678–83.
- 81 Masur H, Jones TC. The interaction *in vitro* of *Pneumocystis carinii* with macrophages and L cells. *J Exp Med* 1978; **147**: 157–70.
- 82 Dei-Cas E, Soulez B, Pälluault F, Charet P, Camus D. *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. *Méd/Sci* 1990; **6**: 517–25.
- 83 Soulez B, Dei-Cas E, Charet P, *et al.* The young rabbit: a non-immunosuppressed model for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Infect Dis* 1989; **160**: 355–6.
- 84 Hidalgo HA, Helmke RJ, German VF, Mangos JA. *Pneumocystis carinii* induces an oxidative burst in alveolar macrophages. *Infect Immun* 1992; **60**: 1–7.
- 85 Pesanti EL. *Pneumocystis carinii*: oxygen uptake, antioxidant enzymes and susceptibility to oxygen-mediated damage. *Infect Immun* 1984; **44**: 7–11.
- 86 Sherman MP, Loro ML, Wong VZ, Tashkin DP. Cytokine- and *Pneumocystis carinii*-induced L-arginin oxidation by murine and human pulmonary alveolar macrophages. *J Protozool* 1991; **38**: 234S–236S.
- 87 Fisher DJ, Gigliotti F, Zauderer M, Harmsen AG. Specific T cell response to a *Pneumocystis carinii* surface glycoprotein (gp120) after immunization and natural infection. *Infect Immun* 1991; **59**: 3372–6.

- 88 Theus SA, Linke MJ, Andrews RP, Walzer PD. Proliferative and cytokine responses to a major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1993; **61**: 4703-9.
- 89 Hagler DN, Deepe GS, Pogue CL, Walzer PD. Blastogenic responses to *Pneumocystis carinii* among patients with human immunodeficiency (HIV) infection. *Clin Exp Immunol* 1988; **74**: 7-13.
- 90 Furuta T, Ueda K, Fujiwara K, Yamanouchi K. Cellular and humoral immune responses of mice subclinically infected with *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1985; **47**: 544-8.
- 91 Graves DC, Li XH, Paiva WD. Delayed-type hypersensitivity response in mice to *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 1991; **38**: 49S-52S.
- 92 Beck JM, Liggitt HD, Brunette EN, et al. Reduction in intensity of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice by aerosol administration of gamma interferon. *Infect Immun* 1991; **59**: 3859-62.
- 93 Krishnan VL, Meager A, Mitchell DM, Pinching AJ. Alveolar macrophages in AIDS patients. Increased spontaneous tumour necrosis factor-alpha production in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Exp Immunol* 1990; **80**: 156-60.
- 94 Tamburrini E, De Luca A, Ventura G, et al. *Pneumocystis carinii* stimulates *in vitro* production of tumor necrosis factor-alpha by human macrophages. *Med Microbiol Immunol* 1991; **180**: 15-20.
- 95 Koziel H, Armstrong MYK, Arena C. Tumor necrosis factor: does not affect viability of *Pneumocystis carinii*. *Am Rev Resp Dis* 1993; **147**: 34 (abstract).
- 96 Chen W, Havell EA, Harmsen AG. Importance of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in host resistance against *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 1992; **60**: 1279-84.
- 97 Chen W, Havell EA, Moldawer LL, et al. Interleukin-1: an important mediator of host resistance against *Pneumocystis carinii*. *J Exp Med* 1992; **176**: 713-18.
- 98 Chen WX, Havell EA, Gigliotti F, Harmsen AG. Interleukin-6 production in a murine model of *Pneumocystis carinii* pneumonia: relation to resistance and inflammatory response. *Infect Immun* 1993; **61**: 97-102.
- 99 Pesanti EL. Interaction of cytokines and alveolar cells with *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *J Infect Dis* 1991; **163**: 611-16.
- 100 Harmsen AG, Stankiewicz M. Requirement of CD4⁺ cells in resistance to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J Exp Med* 1990; **172**: 937-45.
- 101 Roths JB, Sidman CL. Both immunity and hyper responsiveness to *Pneumocystis carinii* result from transfer of CD4⁺ but not CD8⁺ T cells into severe combined immunodeficiency mice. *J Clin Invest* 1992; **90**: 673-8.
- 102 Shellito J, Suzara VV, Blumenfeld W, et al. A new model of *Pneumocystis carinii* infection in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *J Clin Invest* 1990; **85**: 1686-93.
- 103 Meuwissen JHE, Tauber I, Leeuwenberg AD, Beckers PJ, Sieben M. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J Infect Dis* 1977; **136**: 43-49.
- 104 Blumenfeld W, Mandrell RE, Jarvis GA, McLeod Griffiss JM. Localization of host immunoglobulin G to the surface of *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1990; **58**: 456-63.
- 105 Gigliotti F, Hughes WT. Passive immunoprophylaxis with specific monoclonal antibody confers partial protection against *Pneumocystis carinii* pneumonitis in animal models. *J Clin Invest* 1988; **81**: 1666-8.
- 106 Pedersen M, Nielsen PB, Permin H, et al. Type I reactions directed against *Pneumocystis carinii* in AIDS patients. *APMIS* 1989; **97**: 120-4.
- 107 Dei-Cas E, Vernes A. Parasitic adaptation of pathogenic fungi to mammalian hosts. *CRC Crit Rev Microbiol* 1986; **13**: 173-218.
- 108 Peters SE, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for *Pneumocystis carinii* in post mortem lungs by DNA amplification. *J Pathol* 1992; **166**: 195-8.
- 109 Walzer PD. Immunopathogenesis of *Pneumocystis carinii* infection. *J Lab Clin Med* 1991; **118**: 206-16.
- 110 Raviglione MC. Extrapulmonary pneumocystosis. The first 50 cases. *Rev Infect Dis* 1990; **12**: 1127-38.
- 111 Dei-Cas E, Cailliez JC, Palluault F, et al. Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent? *Eur J Epidemiol* 1992; **8**: 460-70.
- 112 Denis CM, Cailliez JC, Aliouat EM, et al. Does *Pneumocystis carinii* remain infectious in the bloodstream? *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 86S.
- 113 Pereira M, Norrby SR. Discussion of paper presented by C. Gitler. In: McAdam KPWJ (ed.) *New Strategies in Parasitology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989: 95-8.
- 114 Sepkowitz K, Schluger N, Godwin T, et al. DNA amplification in experimental pneumocystosis. Characterization of serum *Pneumocystis carinii* DNA and potential *P. carinii* carrier states. *J Infect Dis* 1993; **168**: 421-6.
- 115 Tamburrini E, Mencarini P, De Luca A, et al. Detection of *Pneumocystis* DNA in serum and circulating cells is not a good diagnosis marker for pneumocystosis in HIV patients. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 112S.
- 116 Contini C, Romani R, Manganaro M, Sorice F, Delia S. Tissue-culture isolation of *Pneumocystis carinii* from peripheral blood of AIDS patients with PCP. *AIDS* 1993; **7**: 1137-8.
- 117 Bazaz GR, Manfredi OL, Howard RG, Claps AA. *Pneumocystis carinii* pneumonia in three full-term siblings. *J Pediatr* 1970; **76**: 767-9.
- 118 Ito M, Tsugane T, Kobayashi K, et al. Study on placental transmission of *Pneumocystis carinii* in mice using immunodeficient SCID mice as a new animal model. *J Protozool* 1991; **38**: 218S-19S.
- 119 Dei-Cas E, Soulez B, Palluault F, et al. La pneumocystose chez le lapin. *Proceedings of the Vth Journées*. Paris: Recherche Cunicole (INRA), 1990, vol. I, pp. 34/1-34/9.
- 120 Kovacs JA, Allegra CJ, 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**: 312-20.
- 121 Mehlhorn H, Dankert W, Hartman PG, Then RL. A pilot study on the efficacy of epiropim against developmental stages of *Toxoplasma gondii* and *Pneumocystis carinii* in animal models. *Parasitol Res* 1995; **81**: 296-301.
- 122 Saah AJ, Hoover DR, Peng Y, et al. Predictors for failure of *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis. *JAMA* 1995; **273**: 1197-202.
- 123 Kaneshiro ES, Ellis JE, Zhou LH, et al. Isoprenoid metabolism in *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 93S.
- 124 Schmatz DM, Romancheck M, Pittarelli L, et al. Treatment of *Pneumocystis carinii* with 1,3-glucan synthesis inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5950-4.
- 125 Schmatz DM, Powles MA, McFadden D, et al. New semi-synthetic pneumocandins with improved efficacies against *Pneumocystis carinii* in the rat. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 1320-3.
- 126 Haile LG, Flaherty JF. Atovaquone: a review. *Ann Pharmacother* 1993; **27**: 1488-94.
- 127 Spencer CM, Goa KL. Atovaquone: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in opportunistic infections. *Drugs* 1995; **50**: 176-96.

- 128 Alder J, Mitten M, Shipkowitz N, *et al.* Treatment of *Pneumocystis carinii* infection by combination of clarithromycin and sulphamethoxazole. *J Antimicrob Chemother* 1994; **33**: 253-63.
- 129 Merali S, Chin K, Grady RW, Weissberger L, Clarkson AB. Response of rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia to continuous infusion of deferroxamine. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 1442-4.
- 130 Weinberg GA. Iron chelators as therapeutic agents against *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 997-1003.
- 131 Hughes WT. Hydroxynaphthoquinones. In: Walzer WD (ed.) *Pneumocystis carinii Pneumonia*, 2nd edn, revised and expanded. New York: Marcel Dekker, 1994: 603-13.
- 132 Polsen DC, Kovacs JA, Lipschik GY. Folate antagonists in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. In: Walzer PD (ed.) *Pneumocystis carinii Pneumonia*, 2nd edn, revised and expanded. New York: Marcel Dekker, 1994: 26: 545-60.
- 133 Queener SF, Black JR, Bartlett MS, Smith JW. Primaquine, other 8-aminoquinolines, and clindamycin. In: Walzer PD (ed.) *Pneumocystis carinii Pneumonia*, 2nd edn, revised and expanded. New York: Marcel Dekker, 1994; **28**: 585-602.
- 134 Chung V, Wakefield AE, Kinsman OS, Jackson HC. DNA amplification of a portion of the phosphomannose isomerase (PMI) gene in *Pneumocystis carinii*-enriched extracts. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 82S-83S.
- 135 Guo Z, Kaneshiro ES. Phospholipid composition of *Pneumocystis carinii* and effects of methylprednisolone immunosuppression on rat lung lipids. *Infect Immun* 1995; **63**: 1286-90.
- 136 Palluault F, Slomianny C, Soulez E, Dei-Cas E, Camus D. High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embedding. *Parasitol Res* 1992; **78**: 437-44.
- 137 Ellis JE, Reilly MH, Kaneshiro ES. Identification of an epoxy fatty acid in *Pneumocystis carinii* lipids. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 87S.
- 138 Kaneshiro ES, Ellis JE, Jayasimhulu K, Beach DH. Evidence for the presence of 'metabolic sterols' in *Pneumocystis*: identification and initial characterization of *Pneumocystis carinii* sterols. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 78-85.
- 139 Banerji S, Wakefield AE, Allen AG, *et al.* The cloning and characterization of the AROM gene of *Pneumocystis carinii*. *J Gen Microbiol* 1993; **139**: 2901-14.
- 140 Itatani CA, Marshall GJ. Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* *in situ* and from bronchoalveolar lavage. *J Parasitol* 1988; **74**: 700-12.
- 141 Limper AH, Martin WJ. *Pneumocystis carinii*: inhibition of lung cell growth mediated by parasite attachment. *J Clin Invest* 1990; **85**: 391-6.
- 142 Polonelli L, Morace G, Conti S, *et al.* Conceptions et perspectives du phénomène 'killer' chez les levures. *J Mycol Méd* 1991; **1**: 284-95.
- 143 Cailliez JC, Poulain D, Mackenzie DWR, Polonelli L. Cytological immunodetection of yeast glycoprotein secretion. *Eur J Epidemiol* 1992; **8**: 452-9.
- 144 Cailliez JC, Gerloni M, Morace G, *et al.* Ultrastructural immunodetection of a *Pichia anomala* killer toxin: a preliminary study. *Biol Cell* 1992; **75**: 19-23.
- 145 Cailliez JC, Cantelli C, Conti S, *et al.* *Pichia anomala* killer toxin secretion in the presence of tunicamycin. *J Med Vet Mycol* 1993; **31**: 337-42.
- 146 Cailliez JC, Cantelli C, Séguy N, *et al.* Killer toxin secretion through the cell wall of the yeast *Pichia anomala*. *Mycopathologia* 1994; **126**: 173-7.
- 147 Aliouat EM, Cailliez JC, Séguy N, *et al.* Inhibitory effect of a yeast killer toxin to the *in vitro* *Pneumocystis carinii* attachment. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 1993; **5**: 102-6.
- 148 Séguy N, Aliouat EM, Dei-Cas E, *et al.* Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* killer toxin. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**: 109S.
- 149 Séguy N, Cailliez J-C, Polonelli L, Dei-Cas E, Camus D. Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on the *Pneumocystis carinii* infectivity to the SCID mouse. *Parasitol Res* 1996; **82**: 114-16.
- 150 Polonelli L, Morace G. Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1987; **5**: 460-2.
- 151 Polonelli L, Conti S, Gerloni M, *et al.* Imaging of the yeast killer phenomenon. In: Maresca B, Kobayashi GS, Yamaguchi H, eds. *Molecular Biology and its Application to Medical Mycology*. Berlin: Springer, 1993; 141-8.
- 152 Polonelli L, Fanti F, Conti S, *et al.* Detection of immunofluorescent anti-idiotypic antibodies of yeast killer toxin cell wall receptors of *Candida albicans*. *J Immunol Methods* 1990; **132**: 205-9.
- 153 Polonelli L, Conti S, Gerloni M, *et al.* 'Antibodies': antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. *J Med Vet Mycol* 1991; **29**: 235-42.
- 154 Polonelli L, Lorenzini F, De Bernardis F, *et al.* Idiotypic vaccination: immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. *Scand J Immunol* 1993; **37**: 105-10.
- 155 Polonelli L, De Bernardis F, Conti S, *et al.* Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* 1994; **152**: 3175-82.
- 156 Orlandi R, Gussow DH, Jones PT, Winter G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3833-7.
- 157 Cailliez JC, Séguy N, Aliouat EM, *et al.* The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Med Hypotheses* 1994; **43**: 167-71.
- 158 Zimmerman PE, Voelker DR, McCormack FX, Paulsrud JR, Martin WJ. 120-kDa surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* is a ligand for surfactant protein A. *J Clin Invest* 1992; **89**: 143-9.
- 159 O'Riordan DM, Standing JE, Kwon KY, *et al.* Surfactant protein D interacts with *Pneumocystis carinii* and mediates organism adherence to alveolar macrophages. *J Clin Invest* 1995; **95**: 2699-710.

Inhibitory Effect of a *Pichia anomala* Killer Toxin on the Viability of Rat-derived *Pneumocystis carinii*.

HELEN C. JACKSON,¹ NATHALIE SÉGUY,² ELAIN Mc KILLIGIN,¹ EDUARDO DEI-CAS,^{2,3}

LUCIANO POLONELLI,⁴ JEAN-CHARLES CAILLIEZ^{2,4}

¹CAT Ltd, Cambridgeshire, U.K., ²U42 INSERM, Villeneuve d'Ascq, France, ³CHR, Fac. Med., Lille, France, ⁴Univ. Parma, Italy, ⁵FLS, Université Catholique, Lille, France

Although a significant decrease in the incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia has been obtained by chemoprophylaxis, anti-*Pneumocystis* drugs could be significantly improved. The effect of a *Pichia anomala* killer toxin (*PaKT*) on the parasite has been investigated. *PaKT* is a yeast killer toxin selected for its wide antibiotic spectrum against intergeneric microorganisms. This toxin can be neutralized by a monoclonal antibody (mAb KT4) [3]. In previous experiments, *PaKT* has been shown to have a specific inhibitory effect on the *in vitro* attachment of *P. carinii* to fibroblastic cells [1]. Moreover, *PaKT* was effective in reducing *P. carinii* colonization in lungs of SCID mice [4]. In these experiments, it was unclear if the inhibition of the attachment was due to the death of the parasite or to a specific inhibitory effect of *PaKT* on the adhesion mechanisms of *P. carinii*. For these reasons, a direct effect of *PaKT* on *P. carinii* viability has been explored in the present work by examining the ability of *PaKT* to inhibit the uptake of a folate precursor, radiolabelled para-aminobenzoic acid (³H)pABA.

MATERIALS AND METHODS. A suspension of 5×10^8 *P. anomala* cells (ATCC 96603) grown for 24 h at 25 C on Sabouraud agar, was inoculated into 100 ml flask of DMEM, pH 4.6 supplemented with 5% fetal calf serum. After 48 h at 25 C, the yeast suspension was centrifuged and the supernatant, containing the crude *PaKT*, was filtered through a 0.22 μ m filter. The crude *PaKT* was then precipitated in 80% sat. ammonium sulfate. The precipitated *PaKT* was centrifuged and the pellet was suspended in Mac Ilvain's buffer at pH 4.6 (citric acid 0.1 M, disodic phosphate 0.2 M). The *PaKT* was deposited in an AcA 44 gel-filtration column (Ultragel, IBF). The killer activity of the crude *PaKT* and each collected AcA 44 fraction were evaluated against sensitive yeast strains by growth inhibition assay in liquid Sabouraud, pH 4.6 at 25 C in microtitre plates. The neutralizing effect of mAb KT4 was used as a specific control of the *PaKT* killer activity. The killer fractions were pooled and named purified *PaKT*.

P. carinii organisms were isolated by density gradient centrifugation from a lung homogenate derived from a single rat as previously described. The density of *P. carinii* nuclei in the extract was adjusted to give a density of 5×10^7 nuclei/ml in the final assay. Samples of parasite inoculum were plated onto blood and Sabouraud's dextrose agar to control any contamination of parasite isolate. These plates were incubated for 48 hours at 37 C.

P. carinii organisms were exposed to *PaKT* in Glasgow's Modification of Eagle's Medium (GMEM) at either pH 7.5 (which is optimal for *P. carinii* viability) or in Mac Ilvain's buffer, pH 4.6 (which provides optimal conditions for *PaKT* activity). A 1 in 25 or in 250 dilution of either the crude or the purified *PaKT* was added to the resuspended *P. carinii* and incubated for 90 min at 25 C in 96-well plates. Control incubations in each medium without *PaKT* were carried out in the same plate. *P. carinii* organisms were harvested and washed in Hank's balanced salt solution by centrifugation of the microtitre plate. Parasites were resuspended in GMEM and their viability was determined by measuring the uptake of a radiolabelled precursor of folate biosynthesis. Thus, [³H] pABA (specific activity 50 Ci/mmol) was added to give a final concentration of label in each well of 5 μ Ci/ml and the uptake medium was further supplemented by the addition of 7,8 dihydro-D-neopterin at a final concentration of 100 μ M. Pentamidine isethionate at a final concentration of 50 μ g/ml was added to a series of wells which contained parasites that had not been exposed to *PaKT*: this killed the *P. carinii* cells and acted as non-viable *P. carinii* cell control in the viability assay. The samples were incubated overnight at 37 C in air with 5% CO₂. Following incubation, the parasites were harvested and washed free of unincorporated label with neutral phosphate buffer saline. Incorporated label was measured by liquid scintillation counting. The mean counts incorporated under each of the incubation conditions was derived from a minimum of quadruplicate wells in the same plate.

Table 1: Effet of *Pichia anomala* killer toxin on the incorporation of [³H]para-aminobenzoic acid into *Pneumocystis carinii*.

Preincubation medium	Inhibitory agent	(³ HpABA) mean (cpm)	inhibitory effect (%)
GMEM pH7.5	none	19055	-
	pentamidine	1568	91
	crude <i>PaKT</i> (1:25)	16455	13.6
	purified <i>PaKT</i> (1:250)	16954	11
Mac Ilvain's Buffer pH4.6	none	1195	-
	crude <i>PaKT</i> (1:25)	682	42.9
	crude <i>PaKT</i> (1:250)	1208	
	purified <i>PaKT</i> (1:25)	713	40.3
	purified <i>PaKT</i> (1:250)	1230	

RESULTS AND DISCUSSION. No bacterial or fungal contaminants were cultured from the primary parasite inoculum indicating that the [³H] pABA incorporation was due to the presence of *P. carinii*. The mean uptake of label by *P. carinii* organisms pre-incubated in GMEM without exposure to *PaKT* was 19055 cpm: this represents only 1-2% incorporation of the total label, which is typical of primary isolates under these conditions. The optimal conditions of *PaKT* activity have been obtained at pH 4.6 with a 25-28 C temperature. As expected at approaching neutral pH, the addition of *PaKT* had negligible effect on the uptake of label when compared to the inhibitory effect of the positive control (pentamidine isethionate). This standard anti-*P. carinii* agent inhibited uptake of the label by just over 91%. Pre-incubation of organisms from the same isolate in Mac Ilvain's buffer reduced the uptake of the radiolabel to around 6% of that achieved under the optimal incubation conditions at pH 7.5. The mean count incorporated was 1195 cpm in Mac Ilvain's buffer. This indicates that the pABA uptake by *P. carinii* is compromised severely by lowering the pH. Nevertheless, it has been reported that the *P. carinii* viability is not compromised after incubation in these low pH conditions: they are still able to attach to culture cells or to infect animals [1]. In this work, an inhibitory effect of the *PaKT* was evident: pre-incubation of parasites with a 1:25 dilution of *PaKT* resulted in around a 40% inhibition of uptake of the label but this inhibitory effect was not detectable following a further 1 in 10 dilution of *PaKT*. These data suggest that the *PaKT* has a real killer effect on the viability of *P. carinii* which could explain the similar percentage loss of attachment of parasites to fibroblast cells in the presence of the *PaKT*. In the last years, the killer phenomenon has been defined as a potential way to control *P. carinii* infection by using antiidiotypic antibodies (antilds) mimicking the antibiotic properties of the *PaKT* [2]. These antilds, produced against the mAb KT4 variable domain, mimic the *in vitro* killer effect of the *PaKT*. Since *P. carinii* is sensitive to the *PaKT*, the ability of antilds to mimic the killer activity of the secreted *PaKT* could prove to be a useful tool in the control of parasite development in its host. The [³H]pABA assay will be useful for evaluating the killer properties of antilds against *P. carinii* since these molecules are effective under physiological conditions which is not the case for *PaKT*. [supported by the ANRS (ref. n° 94635) and the BIOMED-1 ECA (ref. n° PL941118)].

- Aliouat EM, Cailliez JC, Séguy N, Dei-Cas E, Polonelli L, Gerloni M, Conti S, Camus D. *Serodiagnosis Immunotherap. Infec. Dis.* (1993) 5: 102.
- Cailliez JC, Séguy N, Aliouat EM, Polonelli L, Camus D, Dei-Cas E. *Med. Hyp.* (1994) 43: 167.
- Polonelli L, Morace G. *J. Clin. Microbiol.* (1986) 5: 460
- Séguy N, Cailliez JC, Polonelli L, Dei-Cas E, Camus D. *Parasitol. Res.* (1996) 82: 114.

In Vitro Decrease of Rat-derived *Pneumocystis carinii* Attachment Induced by Human Natural Yeast Killer Toxin-like Antiidiotypic Candidacidal Antibodies

NATHALIE SÉGUY,^{1*} LUCIANO POLONELLI,² STEFANIA CONTI,² EDUARDO DEI-CAS,^{1,3} DANIEL CAMUS,^{1,3} JEAN-CHARLES CAILLIEZ^{1,4}

¹U42 INSERM, BP 39, Villeneuve d'Ascq, ²Ist. Microbiol., Univ. Parma, Italia, ³C.H.U.R., Fac. Med. Lille, France, ⁴F.L.S., Univ. Catholique de Lille, France.

Since anti-*Pneumocystis* drugs are not fully successful and often induce deleterious side effects, new prophylactic and therapeutic antimicrobial strategies against *Pneumocystis* must be developed. In our laboratory, the inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin (*PaKT*), related to the occurrence of specific cell wall receptors, on the in vitro attachment and the infectivity of mouse- and rat-derived *P. carinii* was shown [5,1]. A *PaKT*-neutralizing monoclonal antibody (mAb KT4) was used to control the specificity of the *PaKT* activity.

Yeast killer toxin-like candidacidal antiidiotypic antibodies have been produced by immunization with the *PaKT* receptor-like mAbKT4 idiotype (idiotypic vaccination). Moreover, human natural secretory yeast killer toxin-like anti-receptor antibodies (KTAbs) have been purified from vaginal fluid of patients infected with *Candida* [3]. Then, KTAbs mimicked the candidacidal properties of *PaKT*. In the present work, the in vitro effect of *PaKT* (at 25 C and pH4.6) on rat-derived *P. carinii* attachment to fibroblasts (Vero cells) was studied in comparison with the one of KTAbs (at 37 C and pH7.2) on human epithelial alveolar cells (WI38 VA13 subline 2RA).

MATERIALS AND METHODS. Corticosteroid-treated Wistar rats were used as source of parasites. They were administered dexamethasone in the drinking water (2 mg/ml for 6-9 weeks). Extraction and quantitation of parasites were performed as previously described [1].

A suspension of *Pichia anomala* (ATCC n°96603) yeast killer cells (5×10^8 cells/ml) was inoculated into 100 ml flask of Sabouraud medium, pH4.6. After 48 h at 25 C, the yeast suspension was centrifuged and the supernatant containing the *PaKT* was filtered [5]. The purification of human KTAbs has been described recently [3]. Briefly, natural KTAbs, present in the vaginal fluid of women afflicted by candidal vaginitis, were purified by mAbKT4-affinity chromatography. The candidacidal activity of purified KTAbs was controlled by using an in vitro colony forming unit assay with *C. albicans* strains sensitive to the killer activity of *PaKT*. Moreover, the candidacidal in vivo activity of these KTAbs was also confirmed in a rat vaginitis model where these antibodies were able to confer a significant anticandidal protection in animals in which they were passively transferred [2]. In the present study, KTAbs from patients were used [3].

For the in vitro experiments, WI38 VA13 subline 2RA (ECACC n°85062512) and Vero (ECACC n°84113001) cells were used to evaluate the parasite attachment [4]. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biowhitaker) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum on glass coverslips placed in the wells of 24-well flat bottom plates (Costar). When cell monolayer cultures were subconfluent, the medium was removed and 1ml suspension of 4×10^6 parasites in DMEM, pH7.2 was added in each well. Before being incubated with cultured cells, *P. carinii* organisms were treated for the *PaKT* evaluation during 90 min at 25 C in one of the following media : DMEM, pH4.6; *PaKT*, pH4.6; *PaKT*, pH4.6 neutralized by mAbKT4 (*PaKT*+mAbKT4). For the KTAbs evaluation, rat-derived *P. carinii* organisms were treated for 90 min at 37 C in the following media: DMEM, pH7.2; KTAbs in DMEM (KTAbs immunopurified from infected patients); KTAbs neutralized by mAbKT4; antibodies from the vaginal fluid which were not fixed by the mAbKT4 chromatography (KTAbs-negative). The last 2 media were used to control the specificity of the KTAbs killer activity by using the neutralizing properties of mAbKT4. After washing in DMEM, pH7.2, treated parasites were incubated on the cell cultures. After incubation of the plates in an atmosphere of 5% CO₂ at 37 C for 24h, coverslips were washed three times with phosphate buffer at 37 C to eliminate unattached and dead parasites. Attached *P. carinii* were microscopically detected and counted using methanol-Giemsa staining (Reactifs RAL).

RESULTS AND DISCUSSION. The *PaKT* produced a marked inhibitory effect (40 %) on the rat-derived *P. carinii* attachment to Vero cells (Fig. 1A). Similar results have been obtained with mouse-derived parasites [5]. The inhibitory effect of *PaKT* on the *P. carinii* attachment was blocked by a preincubation of *PaKT* with mAbKT4. These data were confirmed by in vivo experiments, in which *P. carinii* nasally infected-mice received parasite inocula pretreated with *PaKT* [5]. Present results showed that the decrease of *P. carinii* attachment to fibroblasts or lung epithelial cells was due to a specific inhibitory effect induced by *PaKT*. KTAbs, immunopurified from vaginal fluids of patients with candidosis, induced a significant marked inhibition of *P. carinii* attachment to WI38 VA 13 cells (Fig. 1B). The inhibition level obtained with KTAbs (55 %) was evaluated in comparison with that obtained with KTAbs-negative.

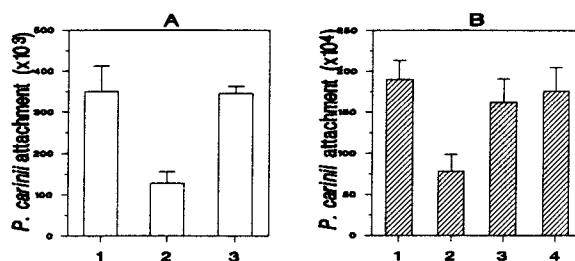
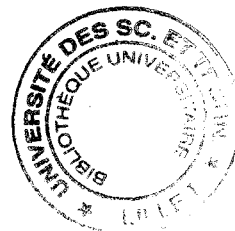


Fig. 1A) Inhibitory effect of *PaKT* on the attachment of rat-derived *P. carinii* to Vero cells (Parasites were treated with : DMEM (1); *PaKT* (2); *PaKT*+mAbKT4 (3)). B) Inhibitory effect of KTAbs on the attachment of *P. carinii* to WI38VA13 cells (Parasites were treated with : DMEM (1); KTAbs (2); KTAbs mAbKT4 (3); KTAbs-negative (4)).

The KTAbs inhibitory effect was controlled by using the neutralizing properties of mAb KT4, since the internal image of KTAbs was able to bind mAbKT4 by the idiotype region. One major advantage in the use of KTAbs is the possibility of working in physiological conditions. *PaKT* and KTAbs are both active against *C. albicans* [3,2], suggesting that the killer activity of these compounds is depending on transphyletic receptors. Moreover, the injection of mAbKT4 to syngeneic mice induced a significant protection against lethal inocula of *C. albicans* cells [2]. This protection was related to the in vivo elicitation of KTAbs possessing killer properties. Thus, functional criteria strongly suggest that KTAbs bear a molecular conformation representing the *PaKT* active site and owing the antigenic expression of *PaKT* receptors at the surface of *Candida* or *Pneumocystis* microorganisms. This idiotypic approach lead us to envisage new therapeutic strategies against pneumocystosis. [Supported by ANRS (France), ref. n° 94635 and BIOMED-1 ECA (ref. n° PL941118)].

1. Aliouat EM, Cailliez JC, Séguy N, Dei-Cas E, Polonelli L, Gerloni M, Conti S, Camus D. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease* (1993) 5: 102.
2. Polonelli L, De Bernardis F, Conti S, Boccanera M, Gerloni M, Morace G, Magliani W, Chezzi C, Cassone A. *J. Immunol.* (1994) 152: 175.
3. Polonelli L, De Bernardis F, Conti S, Boccanera M, Magliani W, Gerloni M, Cantelli C, Cassone A. *J. Immunol.* (1996) 156: 1880.
4. Séguy N, Aliouat EM, Dei-Cas E, Polonelli L, Camus D, Cailliez JC. *J. Euk. Microbiol. Suppl.* (1994) 41: 109.
5. Séguy N, Cailliez JC, Polonelli L, Dei-Cas E, Camus D. *Parasitol. Res.* (1996) 82: 114.

Etude de la sensibilité de *Pneumocystis carinii* vis-à-vis d'une toxine de *Pichia anomala* et des anticorps anti-idiotypes mimant son action



Résumé

Pneumocystis carinii est un microorganisme eucaryote responsable de pneumopathie (PPC) grave chez les patients atteints du SIDA ou d'autres états d'immunodépression. Cette PPC peut être fatale en absence de traitement. L'habitat du parasite est l'alvéole pulmonaire où il s'attache étroitement aux pneumocytes de type I. Cet attachement jouerait un rôle clé dans le déclenchement et dans la physiopathologie de la PPC. A l'heure actuelle, les molécules connues qui inhibent cet attachement ne sont pas utilisables en thérapeutique.

Une toxine "killer" synthétisée par la levure *Pichia anomala* possède des propriétés antimicrobiennes contre une large variété d'espèces pathogènes. Le but de cette étude est de montrer d'une part l'effet de cette toxine sur *Pneumocystis carinii* et d'autre part de produire des anticorps monoclonaux anti-idiotypes qui miment son activité.

La toxine "killer" de *P. anomala* s'avère capable d'interférer dans l'interaction entre *Pneumocystis* et les cellules cibles en inhibant son attachement *in vitro*. De plus, dans les deux modèles animaux utilisés dans ce travail (souris SCID et le rat nude inoculés respectivement par voie nasale ou trachéale avec *P. carinii* traité auparavant avec la toxine), une diminution de l'infectivité du parasite a été induite par la toxine. Toutefois, du fait de la toxicité, de l'immunogénicité de la toxine "killer" et de ses paramètres d'activité optimale (température de 25°C et pH4,6), elle ne peut être utilisée directement comme agent thérapeutique. C'est pourquoi, l'étape suivante de ce travail, a été de produire un anticorps monoclonal anti-idiotype qui possède les mêmes propriétés que la toxine, mais actif à 37°C et à pH7,2. Un traitement local anti-*P. carinii* par nébulisation d'anticorps monoclonal anti-idiotype chez des rats nude qui font une pneumocystose a donc été tenté. Les premiers résultats sont encourageants, puisqu'ils montrent que ce traitement inhibe le développement parasitaire et suggère que l'anticorps monoclonal anti-idiotype a une action directe contre le parasite et non pas simplement sur son attachement.

La microscopie électronique à transmission a révélé la localisation des sites de fixation de la toxine sur le parasite qui se trouve dans la couche peu dense aux électrons de la paroi kystique.

Des peptides recombinants mimant l'activité de la toxine "killer" de *P. anomala* ont été produits. Des tests préliminaires *in vitro*, montrent que ces peptides agissent comme la toxine ou les anticorps monoclonaux.

L'activité anti-*Pneumocystis* de la toxine "killer" de *P. anomala* et des anticorps anti-idiotypes mimant son action, indique que de nouvelles stratégies de prévention et thérapeutiques fondées sur le phénomène "killer" méritent d'être explorées. L'identification et la caractérisation des récepteurs transphylétiques pour ces molécules à large spectre antimicrobien sont des objectifs essentiels pour avancer dans ce programme.