

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Table des matières | 11 |
| Table des illustrations | 12 |
| Abréviations | 13 |
| Problématique | 15 |
| Chapitre 1 : Introduction | 15 |
| Sous-chapitre 1.1 : Présentation générale de la pneumocystose | 15 |
| Sous-chapitre 1.2 : Présentation de <i>Pneumocystis carinii</i> | 20 |
| Sous-chapitre 1.3 : Aspects épidémiologiques de l'infection humaine | 28 |
| Sous-chapitre 1.4 : La problématique de la primo-infection | 29 |
| Sous-chapitre 1.5 : Moyens d'étude | 30 |
| Chapitre 2 : Que sait-on de la pneumocystose spontanée du lapereau ? | 31 |
| Sous-chapitre 2.1 : Historique de la découverte de la pneumocystose spontanée | 31 |
| Sous-chapitre 2.2 : Cinétique de l'infection | 33 |
| Sous-chapitre 2.3 : Aspects épidémiologiques | 33 |
| Sous-chapitre 2.4 : Modifications biochimiques | 35 |
| Sous-chapitre 2.5 : Étude histologique | 36 |
| Sous-chapitre 2.6 : Aspects immunitaires | 38 |
| Chapitre 3 : Hypothèses sur l'histoire naturelle de la PPC du lapin | 42 |
| Sous-chapitre 3.1 : Acquisition de l'infection | 42 |
| Sous-chapitre 3.2 : Primo-infection | 42 |
| Sous-chapitre 3.3 : Persistance de l'infection et recontaminations | 43 |
| Chapitre 4 : Transposition à l'homme : dans quelle direction chercher ? | 43 |
| Sous-chapitre 4.1 : Recherche de la primo-infection humaine | 43 |
| Sous-chapitre 4.2 : Recherche des sources d'infection | 44 |
| Sous-chapitre 4.3 : Recherche des facteurs immunitaires impliqués dans la protection | 45 |
| Sous-chapitre 4.4 : Outils nécessaires | 46 |
| Chapitre 5 : Conclusion | 46 |
| Bibliographie | 47 |

Table des illustrations

Figures

| | |
|---|----|
| figure n°1 : première représentation de <i>P. carinii</i> _____ | 17 |
| figure n°2 : cycle cellulaire de <i>P. carinii</i> _____ | 23 |
| figure n°3 : arbre phylogénétique des formae speciales de <i>P. carinii</i> _____ | 32 |

Photos

| | |
|--|----|
| photo n°1 : diagnostic de la pneumocystose en microscopie optique _____ | 18 |
| photo n°2 : morphologie des différentes formes de <i>P. carinii</i> _____ | 20 |
| photo n°3 : <i>P. carinii</i> associé à un pneumocyte de type I en MET _____ | 21 |
| photo n°4 : alvéole pulmonaire parasitée par <i>P. carinii</i> en MET _____ | 27 |
| photo n°5 : aspects histologiques de la PPC _____ | 37 |
| photo n°6 : principales cellules observées lors de la PPC _____ | 38 |
| photo n°7 : phagocytose de <i>P. carinii</i> par les macrophages alvéolaires _____ | 40 |

Courbes

| | |
|---|----|
| courbe n°1 : nombre de <i>P. carinii</i> en fonction de l'âge _____ | 33 |
| courbe n°2 : nombre de <i>P. carinii</i> en fonction de la période de l'année _____ | 35 |

Tableaux

| | |
|---|----|
| tableau I : paramètres biochimiques au cours de la PPC _____ | 36 |
| tableau II : paramètres histologiques au cours de la PPC _____ | 37 |
| tableau III : expression des cytokines au cours de la PPC _____ | 42 |

Abréviations

| | |
|-----------------|---|
| ADN : | acide désoxyribonucléique. |
| ARN : | acide ribonucléique. |
| BTO : | bleu d'orthotoluidine. |
| CR : | récepteur au complément (complement receptor). |
| f. sp. : | <i>forma specialis</i> (forme spéciale). |
| HDL : | lipoprotéine de haute densité (high density lipoprotein). |
| IFN- γ : | interféron gamma. |
| IgG/M : | immunoglobuline de classe G/M. |
| IL-8/10 : | interleukine 8/10. |
| ITS : | espaceur interne transcrit (internal transcribed spacer). |
| LBA : | lavage broncho-alvéolaire. |
| LPS : | lipopolysaccharide. |
| MCP-1 : | monocyte chemoattractant protein 1. |
| MET : | microscopie électronique à transmission. |
| MGG : | May-Grünwald-Giemsa. |
| MMR : | récepteur au mannose du macrophage (macrophage mannose receptor). |
| MSG : | glycoprotéine majeure de surface (major surface glycoprotein). |
| PAS : | acide periodique – réactif de Schiff (coloration histologique). |
| PCR : | réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction). |
| PPC : | pneumonie à <i>Pneumocystis carinii</i> . |
| SCID : | immunodéficiences combinées sévères (severe combined immunodeficiency). |
| SHIV : | simian-human immunodeficiency virus (rétrovirus chimère). |
| SIDA : | syndrome d'immunodéficiences acquises. |
| SP-A/D : | protéine du surfactant de type A à D (surfactant protein). |
| Th1/2 : | réponse lymphocytaire T auxiliaire (helper) de type 1/2. |
| TNF : | facteur nécrosant les tumeurs (tumor necrosis factor). |
| VIH : | virus de l'immunodéficiences humaine. |

Problématique

Pneumocystis *carinii* est un micro-organisme fongique atypique très répandu parasitant les poumons de nombreux mammifères. Son importance clinique est liée à la pneumonie mortelle qu'il peut provoquer chez les personnes immunodéprimées. Cette infection s'est particulièrement développée à l'occasion de la pandémie de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et a longtemps représenté une cause majeure de mortalité chez les patients contaminés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Si d'importants progrès thérapeutiques ont été réalisés, la pneumonie à *P. carinii* (PPC) reste une réelle menace pour tous les individus immunodéprimés. La biologie de *P. carinii* reste largement méconnue, l'incapacité à cultiver en continu le parasite obligeant à travailler chez l'animal. Ainsi la position taxonomique de *P. carinii* est toujours incertaine, le réservoir du parasite n'est pas connu et l'histoire naturelle de la maladie est sujette à discussions. Dans la plupart des modèles de PPC, la maladie est induite par une immunodépression sévère et contrôlée, ce qui diffère nettement des conditions naturelles de contamination et ne permet donc pas l'étude de l'histoire naturelle de l'infection. Au contraire, le lapin présente une pneumocystose naturelle bénigne (en l'absence d'immunodépression) bien caractérisée et reproductible. Il constitue donc un outil de choix pour l'étude de la circulation de *P. carinii* dans un écosystème naturel et de l'histoire naturelle de la maladie. L'objectif de ce travail est de présenter cette infection naturelle et de discuter dans quelle mesure les résultats obtenus chez le lapin peuvent être extrapolés à l'infection humaine.

Chapitre 1 : Introduction

Sous-chapitre 1.1 : Présentation générale de la pneumocystose

Rappels historiques sur *P. carinii*.

La première représentation de *Pneumocystis carinii* remonte à 1909, lorsque Carlos Chagas observe dans les poumons de cobayes infectés par *Trypanosoma cruzi* ce qu'il considère comme étant des formes de schizogonie de ce protozoaire (cf. figure 1)(Chagas, 1909). Il retrouvera régulièrement ces formes dans les poumons de cobayes, singes *Callithrix*, chats et chiens expérimentalement infectés par *T. cruzi* ainsi que chez un homme mort de la maladie qui porte aujourd'hui son nom (Chagas, 1911). En 1910, Antonio Carini retrouve des formes semblables chez des rats infectés par *T. lewisi* (Carini, 1910). Mais c'est en 1912 que Pierre et Marie Delanoë démontreront la présence de ces organismes chez des rats indemnes de trypanosomes et décriront la nouvelle espèce *Pneumocystis carinii* (Delanoë et Delanoë, 1912). En 1942, van der Meer et Brug confirmeront la présence de *Pneumocystis* chez l'homme tout en soulignant la rareté [nombreux sporocystes et première description détaillée des amas de formes végétatives – déjà représentés en 1911 par Buchanan (Buchanan, 1911) – chez un enfant de trois mois mort d'une cardiopathie congénitale et ayant souffert du paludisme, et deux fois un sporocyste retrouvés pour 104 frottis de poumon examinés lors d'une étude rétrospective](van der Meer et Brug, 1942). Le pouvoir pathogène de *P. carinii* pour l'homme est apparu au cours et à la suite de la seconde guerre mondiale. Il fut alors décrit comme l'agent étiologique de « pneumonies à plasmocytes » mortelles chez les prématurés et les enfants dénutris des orphelinats d'Europe centrale (Vanék et Jírovek, 1952). Son importance en tant que pathogène croîtra ensuite

avec le développement des immunodépressions iatrogènes liées aux chimiothérapies anticancéreuses et aux greffes d'organes. Elle est cependant restée relativement faible jusqu'au début des années 1980, et seuls quelques rares travaux sont consacrés à *P. carinii* (Walzer, 1989). Ce n'est qu'avec le développement de la pandémie de SIDA que la pneumocystose a réellement commencé à retenir l'attention de la communauté médicale. En effet, la PPC est une maladie opportuniste typique, qui a trouvé chez les patients sidéens un terrain particulièrement propice à son développement. C'est d'ailleurs une épidémie de pneumocystose chez plusieurs groupes d'homosexuels américains (à New York, Los Angeles et San Francisco) en 1981 qui a conduit à la description du SIDA (Follansbee et coll., 1982 ; Gottlieb et coll., 1981 ; Masur et coll., 1981). La pneumocystose est la première infection opportuniste majeure touchant les patients sidéens. En 1982, le CDC rapportait que sur 593 cas de SIDA recensés de juin 1981 à septembre 1982, 58 % présentaient une PPC. La pneumocystose représente également la première infection inaugurant le passage au stade SIDA de l'infection par le VIH. Ainsi, sur la période 1992-1997, elle représentait 35,9 % de ces infections aux États-Unis (CDC, 1999b). Le premier traitement efficace de la pneumocystose fut dès 1958 (Ivády et Páldy, 1958) la pentamidine administrée par voie intramusculaire. L'utilisation de la même molécule en aérosols a permis par la suite de diminuer la toxicité et d'améliorer la tolérance au traitement. Le plus gros progrès thérapeutique fut l'introduction du cotrimoxazole (Hughes et coll., 1975; Hughes et coll., 1974), qui s'est révélé jusqu'ici le traitement le plus efficace de l'infection. Son utilisation à titre préventif chez les patients VIH⁺ a de plus l'avantage de participer à la prévention d'autres infections comme la toxoplasmose cérébrale et les pneumonies bactériennes (CDC, 1999a). Grâce à cette prophylaxie et à l'amélioration de la prise en charge et du traitement de l'infection par le VIH, l'incidence de la PPC est passée aux États-Unis de 108,3 à 45,5 pour 1000 personnes infectées par le VIH et par an sur la période 1992-1997 (CDC, 1999b).

La présentation clinique de la pneumocystose humaine.

Chez les sidéens, la pneumocystose typique se présente comme une pneumonie interstitielle bilatérale souvent fébrile, avec toux sèche, tachypnée et dyspnée progressive avec cyanose. L'évolution est lente (plusieurs semaines) et le début insidieux. L'examen radiographique montre des images interstitielles diffuses non spécifiques. La localisation périhilaire prédomine. L'activité lactate déshydrogénase sérique est souvent augmentée (≥ 220 U/ml). L'analyse des gaz du sang montre une diminution de la pression partielle en oxygène, corrélée à la sévérité de la dyspnée (Leoung, 1998). Les présentations atypiques semblent se multiplier ces dernières années (Sarkar et coll., 1997). Chez les non-sidéens, la symptomatologie diffère peu, mais l'évolution est généralement plus brutale, et le diagnostic plus précoce. La mortalité semble plus élevée chez ces patients (Thomas et Limper, 1998), bien que tous les rapports n'aillent pas dans ce sens (Nevez et coll., 1999a). Les raisons de ces divergences ne sont pas connues. Les localisations extrapulmonaires sont exceptionnelles. L'administration à titre prophylactique de pentamidine en aérosol semble favoriser la dissémination du parasite. Parmi les organes les plus touchés figurent l'œil, l'oreille (Sha et coll., 1992), le foie et les organes lymphoïdes secondaires (Poblete et coll., 1989; Raviglione, 1990).

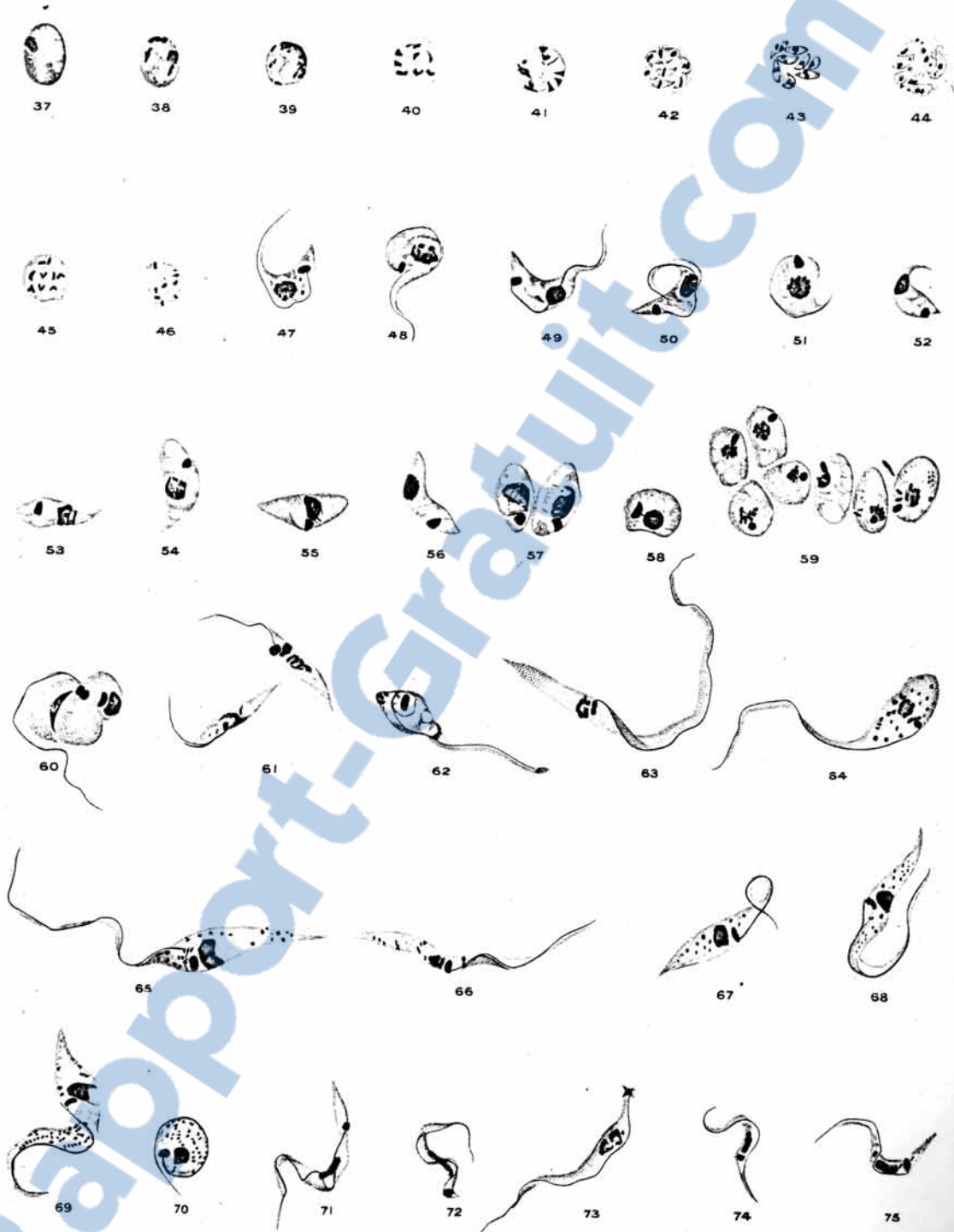


figure n°1 : première représentation de *P. carinii*. Sur cette planche parue en 1909, les dessins 37 à 46 représentent des sporocystes de *Pneumocystis* que Carlos Chagas considère à tort comme des formes de sporogonie de *Trypanozoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909).

Le diagnostic passe par la mise en évidence du parasite dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA), l'expectoration induite (moins sensible mais moins invasive) ou un prélèvement biopsique (seul prélèvement possible lors de pneu-

mocystose extrapulmonaire). *P. carinii* est mis en évidence par coloration [association d'une coloration panoptique de type Giemsa (cf. photo 1A) et d'une coloration de la paroi : bleu d'orthotoluidine (BTO, cf. photo 1B), coloration argentique de type Gomori-Grocott (cf. photo 1C) ou acide periodique, réactif de Schiff (PAS)]. Cette recherche nécessite des techniciens expérimentés. L'utilisation de techniques d'immuno-fluorescence directe permet d'augmenter à la fois la sensibilité et la spécificité. Enfin, le développement de techniques extrêmement sensibles de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) peut permettre de diminuer le recours à des techniques invasives (LBA) au profit d'autres à la fois moins désagréables pour le patient et moins coûteuses (un simple lavage oropharyngé peut suffire dans certains cas) (Lundgren et Wakefield, 1998).

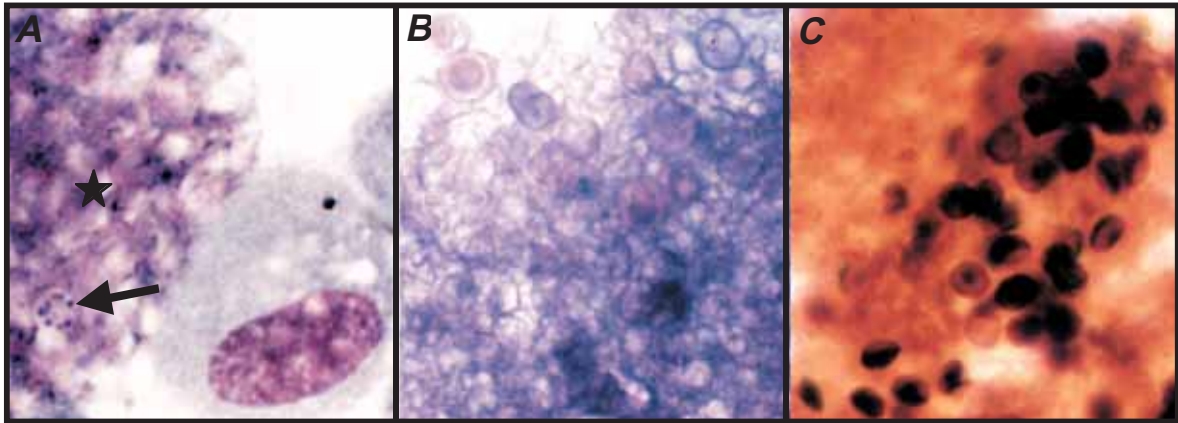


photo n°1 : *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* tel qu'il peut être observé dans un sédiment de LBA riche en parasites (Dei-Cas, communication personnelle).

A : coloration au méthanol-Giemsa. On remarque un sporocyste mature (flèche) au milieu d'un nuage de formes végétatives (étoile).

B : coloration au BTO.

C : coloration à la méthénamine d'argent de Gomori-Grocott

État actuel de la pneumonie à *P. carinii* chez l'homme.

Aujourd'hui, la pneumocystose humaine reste une affection redoutée dans tous les cas d'immunodépression sévère, en particulier les déficits de l'immunité cellulaire. Cependant, les progrès obtenus dans les thérapies antirétrovirales ainsi que la mise en place de mesures préventives systématiques pour certaines populations à risque (personnes ayant subi une transplantation d'organe, patients VIH⁺) a permis de réduire notablement l'incidence et la létalité de la pneumonie à *P. carinii* dans ces populations. Ces mesures consistent en une chimio-prophylaxie essentiellement à base de cotrimoxazole. Malheureusement, ce traitement est souvent mal toléré chez les patients VIH⁺. Voici les dernières recommandations du CDC concernant ces patients (CDC, 1999a) :

- Chez les adultes et les adolescents, la chimioprophylaxie doit être initiée dans les cas suivants : un nombre de lymphocytes T CD4⁺ inférieur à 200 μl^{-1} ou des antécédents de candidose oropharyngée. Elle est à envisager si le pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 14 %, en cas d'antécédent de maladie d'entrée en phase SIDA ou si le nombre de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 250 μl^{-1} et que le suivi de ce nombre au minimum une fois tous les trois mois n'est pas réalisable.
- Le seul produit recommandé en première intention est le cotrimoxazole, à la dose de 160 mg de triméthoprime et 800 mg de sulfaméthoxazole par jour ou à la dose de 80 mg de triméthoprime et 400 mg de sulfaméthoxazole, efficace et mieux tolérée. Un traitement à la dose de 160 mg de triméthoprime et 800 mg de sulfaméthoxazole trois fois par semaine est également envisageable.

Aujourd'hui, la pneumocystose touche 40 % des sidéens, elle est l'infection signalant le passage au stade SIDA dans 25 % des cas et la mort survient dans 10 % des cas. Un rapport récent provenant d'un hôpital français (Yousfi et coll., 1999) indique une augmentation relative de la PPC inaugurale depuis la mise en place de la trithérapie, passant de 47,5 à 82,1 %. La méconnaissance de l'épidémiologie de l'infection limite la possibilité de mise en place de mesures de prophylaxie sanitaire efficaces, même si de plus en plus d'arguments tendent à conforter l'hypothèse d'une transmission directe de malade à personne sensible, voire l'intervention de personnes non sensibles dans la propagation de l'infection (Dumoulin et coll., 2000 ; Leigh et coll., 1993). Le problème posé par l'intolérance au cotrimoxazole conduit à la recherche d'alternatives thérapeutiques. Les molécules actuellement utilisables sont la dapsonne, associée ou non au triméthoprime, l'atovaquone, l'association clindamycine–primaquine et le trimétrexate. Tous ces traitements restent moins efficaces que le cotrimoxazole, mais d'autres molécules prometteuses sont en cours de développement (échinocandines et pneumocandines notamment). Dans les régions tropicales et équatoriales, l'incidence de la PPC parmi les sidéens était généralement considérée comme plus faible que dans les régions tempérées. Cependant, si la tuberculose reste la première infection opportuniste frappant les sidéens d'Afrique sub-saharienne, il apparaît aujourd'hui que l'incidence de la pneumocystose était sous-estimée. La différence entre régions serait donc moindre que ce que l'on pensait. Les raisons de cette différence sont par ailleurs inconnues (Hughes, 1998 ; Russian et Kovacs, 1995).

La pneumocystose animale.

P. carinii a été retrouvé dans les poumons de très nombreuses espèces de mammifères. Le parasite a notamment été décrit chez différents mammifères sauvages ne présentant pas de signes de maladie : lapin, musaraigne, taupe, campagnol et différents autres petits rongeurs (Mazars et coll., 1997b), ainsi que chez des animaux domestiques (chien, chat, poulain, porcelet, cobaye)(Bille-Hansen et coll., 1990 ; Chagas, 1909 ; Cho et coll., 1999 ; Whitwell, 1992). Lors de ces observations, le nombre de parasites était faible (parfois il a simplement été détecté par PCR) ou les animaux étaient naturellement immunodéprimés [poulain atteint de déficience immunitaire combinée sévère (SCID)] ou malnutris (chien). L'exception étant le porcelet chez qui il semble que *P. carinii* puisse occasionnellement provoquer des infections transitoires mais ayant des répercussions sur la croissance lors de stress. Ces infections ont causé des problèmes dans plusieurs élevages au Danemark (Bille-Hansen et coll., 1990). De l'ADN de *Pneumocystis* a également été retrouvé dans les poumons de dix-huit espèces de primates non humains et des sporocystes ont été détectés dans les poumons de cinq espèces de singes du nouveau monde (Demanche *et al.*, 2001). Le champignon est également responsable de pneumonies mortelles chez des macaques infectés par un virus chimère SHIV (simian-human immunodeficiency virus), ce qui constitue un modèle de PPC humaine (ce n'est généralement pas le but recherché par les équipes travaillant sur ce virus !)(Durand-Joly *et al.*, 2000). La souris, le rat et le furet sont les animaux les plus souvent utilisés comme modèles de PPC (Dei-Cas et coll., 1998). L'infection active est obtenue par l'administration prolongée (6 à 12 semaines) de fortes doses de corticostéroïdes à des animaux de colonies naturellement infectées ou par l'inoculation (intra-nasale ou intra-trachéale) du parasite à des animaux naturellement immunodéprimés (souris SCID et rats *nude* principalement). Le lapin domestique, *Oryctolagus cuniculus*, quant à lui, possède la particularité de présenter une pneumocystose spontanée, systématique, intense mais le plus souvent asymptomatique et spontanément résolutive vers la fin de son premier mois d'existence.

Sous-chapitre 1.2 : Présentation de *Pneumocystis carinii*

Morphologie.

Toutes les formes connues de *Pneumocystis carinii* sont retrouvées dans les poumons de mammifères (et exceptionnellement dans d'autres organes). La forme la plus abondante est une forme végétative, uninucléée, amébiforme, mesurant 2 à 8 μm (cf. photo 2A). Sa paroi n'est pas colorée par les colorants des sucres complexes (BTO, méthénamine d'argent). Elle apparaît composée d'une couche dense aux électrons en microscopie électronique à transmission (MET, cf. photo 2C). Cette paroi présente de nombreux prolongements cytoplasmiques filamenteux, étroitement associés aux pneumocytes de type I dans le poumon (cf. photo 2B et photo 3). L'autre forme est un sporocyste, comportant à maturité huit spores (cf. photo 2D). Les sporocystes immatures comportent un nombre variable de noyaux, plus ou moins bien individualisés. La paroi de ces formes comporte une deuxième couche, interne à la couche dense aux électrons décrite chez les formes végétatives, qui est peu dense aux électrons (cf. photo 2F), et est colorable par les colorants des sucres complexes (cf. photos 2E).

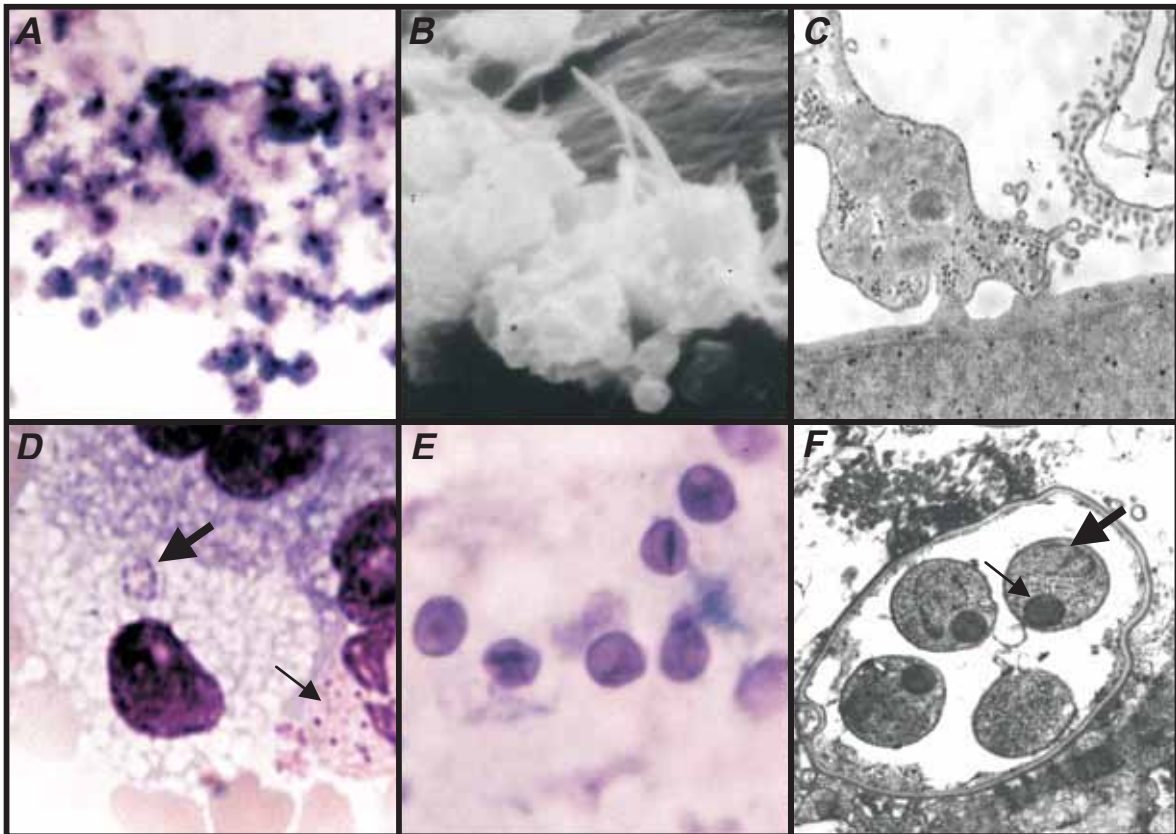


photo n°2 : aspects morphologiques de *P. carinii* en microscopie optique et électronique (Dei-Cas, communication personnelle et Dei-Cas et Aliouat, 2000).

A : formes végétatives de *Pneumocystis* de rat obtenues par culture sur monocouche de cellules de type épithélial alvéolaire de rat de la lignée L2 et colorées au méthanol-Giemsa

B : formes végétatives de *Pneumocystis* de rat adhérant à des cellules L2 en culture, observées en microscopie électronique à balayage.

C : forme végétative de *Pneumocystis* de rat adhérant à une cellule de type épithélial alvéolaire humaine de la lignée A549 en culture, observée en MET.

D : empreinte de poumon de lapin parasité par *Pneumocystis carinii*, colorée au méthanol-Giemsa. On remarque un sporocyste mature à 8 noyaux (flèche épaisse) et quelques formes végétatives (flèche fine).

E : homogénat de poumon de lapin parasité par *Pneumocystis carinii*, coloré au BTO, montrant plusieurs sporocystes.

F : sporocyste mature de *Pneumocystis carinii* observé en MET montrant quatre spores. On remarque le noyau (flèche épaisse) et la mitochondrie (flèche fine) de ces spores.

L'utilisation de techniques de fixation à pression osmotique élevée (Palluault et coll., 1992) a permis de mieux visualiser l'ultrastructure interne du parasite. *Pneumocystis carinii* comporte l'ensemble des organites classiquement observés dans une cellule eucaryote : une mitochondrie unique, volumineuse, comportant des crêtes d'abord tubulaires chez la forme végétative et devenant lamellaires lors de la formation du sporocyste (Palluault et coll., 1992) ; un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi bien développés ; un système d'endosacculaires membranaires.

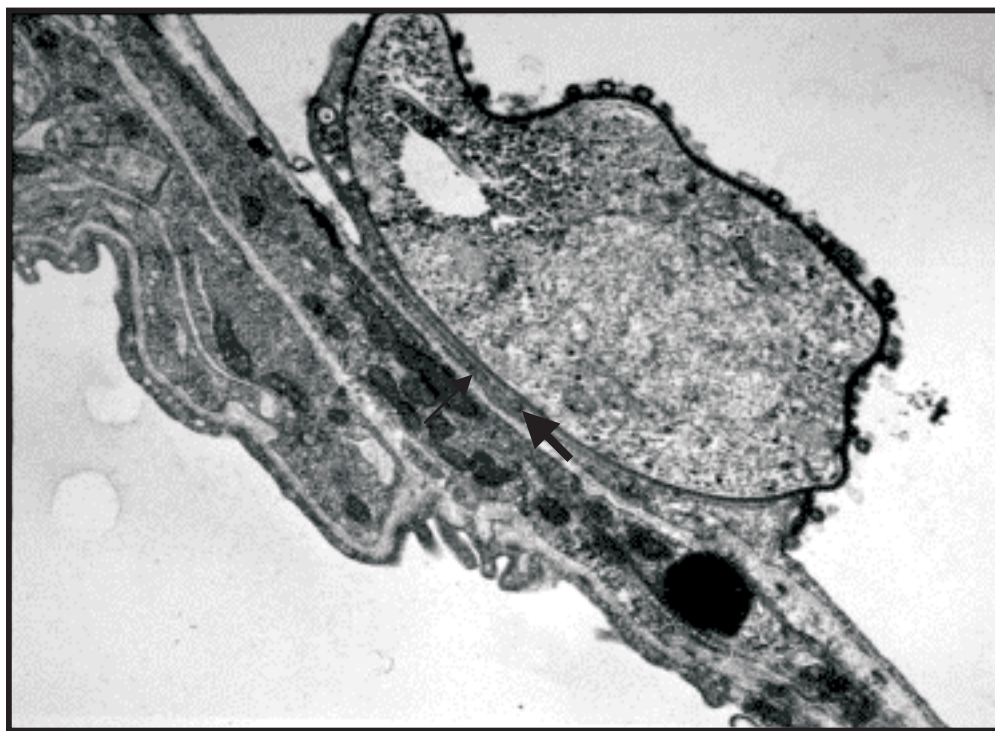


photo n°3 : forme végétative de *P. carinii* étroitement associée à un pneumocyte de type I, observée en MET (Dei-Cas, communication personnelle). On remarque les prolongements cytoplasmiques (flèche épaisse) et la persistance de la membrane plasmique de la cellule de l'hôte (flèche fine).

Position taxonomique.

La position taxonomique de *P. carinii* a longtemps été discutée. Au vu de sa morphologie, il a d'abord été considéré comme un protozoaire [Les Delanoë (1912) le rapprochaient *a priori* des coccidies, sans être affirmatifs], bien que l'hypothèse fongique soit très tôt envisagée (Vavra et Kučera, 1970).

Les arguments allant dans le premier sens étaient la morphologie amiboïde des formes végétatives, l'absence de croissance sur les milieux usuels de culture fongique, la sensibilité à certains médicaments actifs sur les protozoaires (sulfamides, pentamidine, pyriméthamine) et la résistance aux antifongiques courants (polyènes, azoles), l'absence d'ergostérol dans la membrane. Parmi les protozoaires, *Pneumocystis carinii* a été rattaché à différents groupes : amibes (« trophozoïtes » amiboïdes, kystes à huit noyaux), coccidies, cryptosporidies (Euzéby, 1987, p 328), et ce malgré l'absence de complexe apical observable.

En faveur de la thèse fongique, on peut citer les affinités tinctoriales du parasite, liées à la composition de sa paroi cellulaire, riche en β -glucanes et en α -mannanes et contenant de la chitine, certaines communautés antigéniques avec des champignons (Lundgren et coll., 1992), ainsi que des observations ultrastructurales contestables lorsque des techniques de fixation adaptées sont utilisées (Palluault et coll., 1992). Mais si la nature fongique de *P. carinii* est maintenant largement acceptée, c'est essentiellement du fait de l'accumulation d'arguments moléculaires. Ces arguments moléculaires ont également conduit Eriksson en 1994 à classer *P.*

carinii dans une nouvelle famille (*Pneumocystidaceae*) d'un nouvel ordre (*Pneumocystidales*) des *Ascomycota* (Eriksson, 1994). Les séquences des gènes suivants ont conduit à cette nouvelle classification : ARN_r 18S, 5,8S, 26S et 5S, facteur de transcription IID, ATPase de la membrane plasmique, β -tubuline, facteur d'élongation 3, thymidylate synthétase, dihydrofolate réductase et calmoduline. Cette classification n'a cependant pas encore reçu une acceptation générale parmi les spécialistes de la biologie moléculaire de *Pneumocystis*. En effet, certaines séquences, notamment dans l'ADN mitochondrial, rapprochent *P. carinii* des *Basidiomycota* (Wakefield et coll., 1992). Au vu de ces données moléculaires et des nombreux caractères morphologiques et biologiques atypiques du parasite, on pourrait considérer qu'il appartient à un groupe de champignons distinct de ceux qui sont décrits à ce jour. Pour ce travail, nous avons donc décidé d'adopter une nomenclature fongique pour les différentes formes de *P. carinii*, plutôt que la nomenclature la plus largement utilisée jusqu'il y a peu et tirée du monde des protozoaires, mais sans utiliser de termes spécifiques aux ascomycètes : formes végétatives plutôt que trophozoïtes, sporocystes – vésicule sporogène fermée ne s'ouvrant qu'à maturité pour libérer des amas de spores (Euzéby, 1992, p 12), ce qui correspond à la morphologie observée chez *Pneumocystis* – et spores, mais pas asques et ascospores, plutôt que kystes et corps intrakystiques.

Le développement des techniques de typage de *P. carinii* au cours des années 1990 a permis de mettre en évidence au sein de l'espèce une hétérogénéité plus importante que ce que l'on supposait jusque-là. De plus, cette hétérogénéité apparaissait liée à l'espèce de l'hôte du parasite : les différentes souches de *P. carinii* infectant une même espèce hôte montrent des divergences génétiques et isoenzymatiques très inférieures à celles observées entre des organismes infectant des espèces différentes (Dei-Cas et coll., 1994). Des expériences d'infection croisée ont confirmé l'absence de développement du parasite obtenu à partir d'un hôte donné chez un hôte d'une autre espèce (Aliouat et coll., 1994). En 1994, à Cleveland, il a été décidé de revoir la nomenclature de l'espèce *Pneumocystis carinii*. L'état des connaissances a été jugé encore insuffisant pour justifier la création de nouvelles espèces au sein du genre *Pneumocystis* [En 1976 pourtant, Frenkel avait déjà proposé la nouvelle espèce *P. jiroveci* pour désigner les parasites de l'homme (Frenkel, 1976)]. On a donc décidé l'utilisation de *formae speciales* nommées en fonction du genre de l'hôte. Aujourd'hui on distingue : *P. carinii* f. sp. *carinii*, *P. carinii* f. sp. *ratti*, *P. carinii* f. sp. *rattus-secundi*, *P. carinii* f. sp. *rattus-terti* et *P. carinii* f. sp. *rattus-quarti* tous les six chez le rat, *P. carinii* f. sp. *hominis* chez l'homme, *P. carinii* f. sp. *oryctolagi* chez le lapin, *P. carinii* f. sp. *muris* chez la souris, *P. carinii* f. sp. *mustelae* chez le furet, *P. carinii* f. sp. *suis* chez le porc et *P. carinii* f. sp. *macacae* chez le macaque rhésus. On discute maintenant de l'opportunité d'élever certaines de ces *formae speciales* les mieux caractérisées au rang d'espèce (notamment *P. carinii* f. sp. *muris*, *P. carinii* f. sp. *hominis*, voire *P. carinii* f. sp. *oryctolagi*), *P. carinii* f. sp. *carinii* servant de type à l'espèce *P. carinii*. On peut déjà faire deux remarques. D'une part, certaines *formae speciales* ne sont définies que sur une séquence nucléique (en l'occurrence celle qui code la grande sous-unité de l'ARN ribosomal mitochondrial). Or malgré la valeur phylogénétique de ce gène, on peut s'interroger sur l'intérêt de donner un rang taxonomique à chaque clone de *Pneumocystis* porteur d'un nouvel allèle. D'autre part, le Code International de la Nomenclature Botanique (Code de Tokyo) précise dans la note 3 de son article 4 : en classant des parasites, surtout des champignons, les auteurs qui n'attribuent pas de rang spécifique, subs spécifique ou variétal aux taxons reconnaissables par leurs caractères physiologiques mais à peine ou pas du tout par leurs caractères morphologiques, peuvent distinguer, à l'intérieur de l'espèce, des formes spéciales (*formae speciales*), caractérisées par leur adaptation à des hôtes différents, mais dont la nomenclature n'est pas réglée par les dispositions de ce Code (version française par H. M. Burdet). Peut-on encore parler d'adaptation à des hôtes différents quand on décrit six

formae speciales chez le même hôte ? Il devient donc plus que nécessaire d'au moins préciser à nouveau les règles de nomenclature des *Pneumocystis*.

Biologie.

Le cycle cellulaire de *P. carinii* reste très mal connu. L'existence d'une multiplication sexuée aboutissant à la formation du sporocyste repose sur l'observation en 1984 par Matsumoto et Yoshida de complexes synaptonémaux dans des sporocystes immatures du parasite (Matsumoto et Yoshida, 1984). Cette observation a conduit ces auteurs à proposer un cycle hypothétique de multiplication, cycle dont une version un peu modifiée a été publiée par Yoshida en 1989 (cf. figure 2)(Yoshida, 1989). Ce cycle reste admis par la plupart des auteurs à ce jour. Une multiplication asexuée des formes végétatives associée à une reproduction sexuée conduisant à la formation d'un sporocyste à huit spores (ou asque) correspond bien à ce que l'on attend d'un ascomycète, famille à qui *P. carinii* a été rattaché sur base d'arguments essentiellement moléculaires (Eriksson, 1994). La récente mesure des taux de croissance des différentes formes du parasite en culture (Aliouat et coll., 1999) ne remet pas non plus en cause ce cycle.

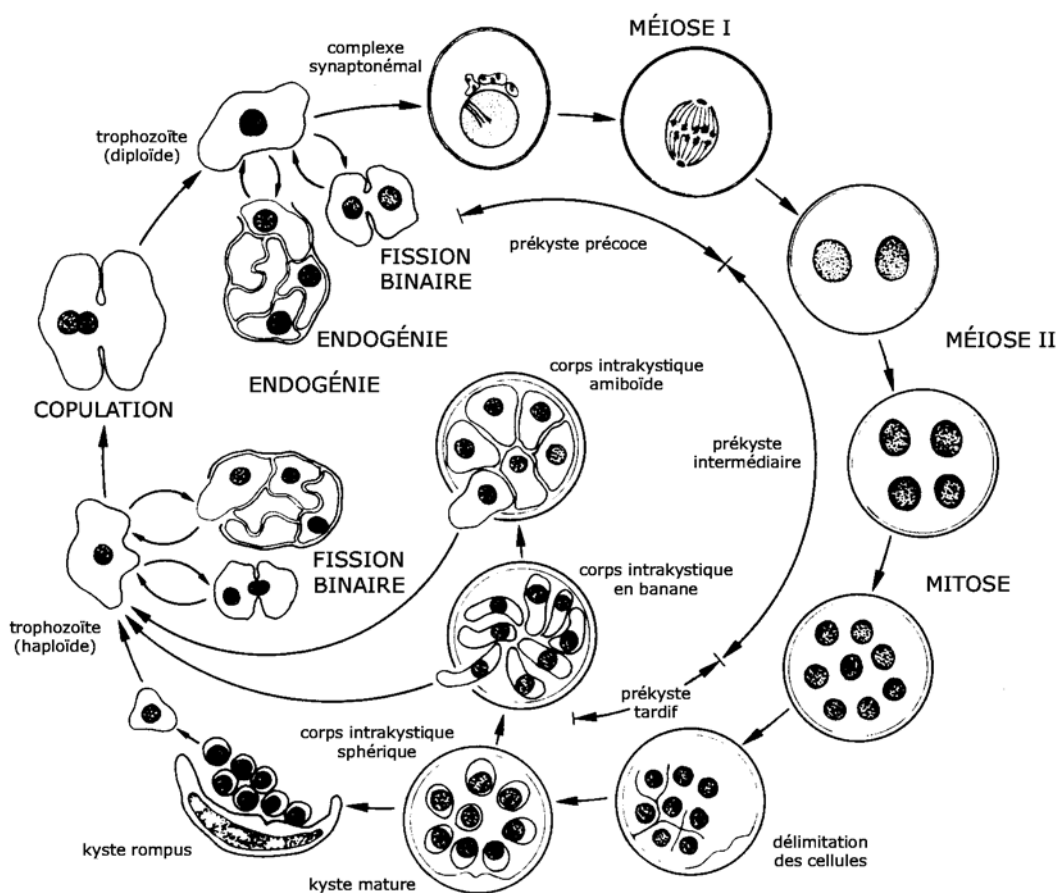


figure n°2 : cycle cellulaire de *P. carinii* dans l'alvéole (Yoshida, 1989). La nomenclature des formes de *Pneumocystis* est celle utilisée par Yoshida : trophozoïte pour les formes végétatives et prékyste (précoce, intermédiaire et tardif) ou kyste pour les sporocystes, en fonction de leur degré de maturité.

Le système de culture continue récemment décrit (Merali et coll., 1999) permettra peut-être de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse sans réelle alternative depuis quinze ans. Ces deux formes sont retrouvées *in vivo* dans l'alvéole pulmo-

naire. Les formes végétatives sont le plus souvent étroitement associées aux pneumocytes de type 1 par l'intermédiaire de leurs prolongements filamenteux, mais restent extracellulaires. Il n'a été constaté en MET aucune fusion membranaire entre les deux types cellulaires (cf. photo 3). *P. carinii* ne montre en outre aucune tendance invasive et ne quitte que rarement la lumière alvéolaire. L'intervention de différentes molécules d'adhésion a été mise en évidence, notamment l'interaction de la glycoprotéine majeure de surface (MSG) de *P. carinii* avec la fibronectine et la vitronectine (Limper et coll., 1993 ; Pottratz et coll., 1991). Par contre, les relations trophiques que *P. carinii* entretient avec son hôte restent inconnues.

Pour ce qui est de la survie ou de la multiplication de *P. carinii* en-dehors de son hôte, très peu de données sont disponibles. Des expériences de PCR sur filtres ont permis de détecter de l'ADN de *Pneumocystis* dans les chambres de patients atteints de PPC (Bartlett et coll., 1994), ainsi que dans la campagne anglaise (Wakefield, 1994). Le volume d'air filtré était de 1 m³ dans le premier cas et très supérieur dans le second. Ces expériences rendent compte de la présence probable de *P. carinii* dans l'environnement (bien qu'elles ne démontrent pas la présence d'organismes complets et viables), mais sans que l'on puisse préjuger de la durée de viabilité de ces organismes en dehors de leur hôte, et encore moins parler de l'existence d'une forme libre de l'organisme. Cependant la pneumocystose est très fréquente dans les populations sensibles et la séroconversion des enfants très précoce [près de 100 % avant deux ans d'après Meuwissen et coll., 1977 (Meuwissen et coll., 1977)], ce qui laisse supposer une importante circulation du parasite. Or *P. carinii* est très rarement retrouvé dans le poumon en-dehors des épisodes de pneumocystose (recherche nécropsique par immunofluorescence ou PCR), ce qui restreint le réservoir humain aux seuls malades, peu nombreux (Millard et Heryet, 1988 ; Peters et coll., 1992). L'association d'une grande fréquence de contact avec l'organisme et d'un réservoir humain très limité laisse supposer l'existence d'un réservoir extra-humain. Or l'ensemble des arguments moléculaires et des expériences d'infection croisée effectuées vont dans le sens d'un sténoxénisme étroit, voire d'un holoxénisme, des différentes *formae speciales* de *P. carinii* (Dei-Cas, 2000). L'existence d'un réservoir animal (ou en tout cas mammalien) semble donc peu probable. Il est donc possible qu'un réservoir environnemental non mammalien de *P. carinii* existe, que celui-ci soit biotique ou non. Il reste cependant totalement inconnu à l'heure actuelle.

Le mode de transmission de *P. carinii* le mieux connu reste la transmission aérienne d'un individu infecté à un individu réceptif. Celle-ci est très rapide et efficace : une souris SCID infectée peut transmettre le parasite à au moins vingt de ses congénères en moins de 24 heures (Soulez et coll., 1991). Récemment on a pu montrer, toujours chez la souris, qu'un individu non immunodéprimé donc non réceptif pouvait servir de vecteur du parasite entre un individu infecté et un individu réceptif (Dumoulin et coll., 2000). Cette observation peut avoir des conséquences importantes, notamment en ce qui concerne les mesures à prendre pour protéger des individus sensibles en milieu hospitalier où peuvent être hébergés des individus atteints de pneumocystose, en particulier vis-à-vis du personnel soignant. L'autre mode de transmission démontré semble jusqu'ici n'être fréquent que chez le lapin. Il s'agit d'une transmission transplacentaire qui survient même chez des individus non immunodéprimés et qui constitue l'infection primaire à *P. carinii* dans cette espèce (Céré et coll., 1997a).

Aspects immunologiques.

Comme il a déjà été signalé, la séroconversion vis-à-vis de *P. carinii* est précoce et fréquente. La majorité des individus porte donc des anticorps anti-*Pneumocystis*. Chez les patients VIH⁺, on observe le plus souvent une chute du taux d'anticorps anti-*P. carinii* (Peglow et coll., 1990). Ce taux remonte généralement après un épi-

sode de PPC, avec production d'immunoglobulines de classe M (IgM) puis d'IgG. Cependant cette réponse reste faible par rapport à celle qui peut être observée chez des individus VIH⁻, même immunodéprimés (Elvin et coll., 1994). Chez la souris, on a observé que l'absence de lymphocytes B empêchait la résolution de la pneumocystose expérimentale. De même l'immunisation active ou passive protège l'animal de l'infection (Gigliotti et Hughes, 1988 ; Harmsen et coll., 1995). Les anticorps dirigés contre la MSG ont été les mieux étudiés, et ils ne sont pas protecteurs (Gigliotti et coll., 1998). Parmi les antigènes immunodominants, un antigène de 45-55kDa chez le rat (35-45 kDa chez l'homme) semble jouer un rôle majeur dans l'induction d'une immunité humorale efficace (Smulian et coll., 2000). Des expériences chez la souris ont montré qu'un taux d'anticorps protecteur pouvait être maintenu même au cours de l'immunodépression, laissant entrevoir des perspectives vaccinales pour les populations à risque. Par contre, l'orientation Th1 ou Th2 de la réponse anticorps chez cet animal n'influence pas la résolution de l'infection (Garvy et coll., 1997). Par ailleurs, on peut noter que la MSG est un antigène variable (Edman et coll., 1996). En effet, le génome de *P. carinii* contient plusieurs centaines de copies du gène de la MSG, mais un seul site d'expression. Des phénomènes de recombinaison permettent au champignon d'exprimer successivement plusieurs allèles du gène. Cette variation antigénique permettrait au parasite d'échapper plus facilement à un système immunitaire déjà incapable de développer une réponse anticorps performante.

En ce qui concerne l'immunité cellulaire, différents éléments montrent l'importance des lymphocytes T CD4⁺ : le risque de survenue d'une PPC chez les individus VIH⁺ est inversement proportionnel au taux de ces lymphocytes, devenant élevé en dessous de 200 mm⁻³ (Montgomery, 1989). Chez l'animal, les animaux SCID, athymiques ou déplétés en lymphocytes T CD4⁺ à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique sont sensibles à l'infection. Les mécanismes impliqués ne sont pas connus, mais l'intervention des lymphocytes T CD8⁺ n'est pas nécessaire (Harmsen et Stankiewicz, 1990). Ces cellules pourraient être impliquées dans l'activation des lymphocytes B et l'induction de la production d'anticorps, ainsi que dans l'activation des macrophages. On a montré chez le rat que ces derniers intervenaient au moins dans la phase précoce du contrôle de l'infection (Limper et coll., 1997), mais en l'absence de réponse immune spécifique ils ne suffisent pas à éliminer le parasite, comme le montre la sensibilité d'animaux présentant une activité macrophagique non altérée : animaux SCID, athymiques ou déplétés en lymphocytes T CD4⁺.

Aspects histologiques de la PPC.

La PPC se traduit par une inflammation du parenchyme pulmonaire présentant des caractères histologiques communs à l'ensemble des espèces étudiées (Creusy et coll., 1996). Le tissu pulmonaire présente une congestion diffuse. Les cloisons interalvéolaires sont épaissies et il existe un infiltrat constitué essentiellement de cellules mononucléées. Les pneumocytes de type II voient leur nombre et leur taille augmenter. On observe une augmentation du nombre de macrophages actifs. Différentes formes de *P. carinii* sont présentes dans les alvéoles et des images de parasites phagocytés par les macrophages alvéolaires et plus ou moins dégradés ne sont pas rares. Quelques organismes se retrouvent également entre les cellules épithéliales ou dans l'interstitium, sans que l'on puisse affirmer qu'il existe une pénétration active du parasite à travers l'épithélium alvéolaire.

Cependant des différences marquées existent entre les différents modèles et l'homme. Ainsi, chez le rat Wistar sous corticoïdes, la fibrose collagène est modérée, l'infiltrat diffus et le matériel éosinophile spumeux en « nids d'abeille » caractéristique est plus ou moins abondant.

Chez la souris sous corticoïdes, là aussi, la fibrose collagène est modérée et l'infiltrat diffus. Le matériel éosinophile est retrouvé à la surface de l'épithélium

alvéolaire, et les colorations comme le PAS, le BTO ou la coloration de Gomori-Grocott permettent de mettre en évidence des parasites peu nombreux accolés à l'épithélium alvéolaire.

Chez la souris SCID, si l'infiltrat est ici aussi diffus et si la fibrose collagène reste modérée, le matériel éosinophile comble l'alvéole. La microscopie électronique à transmission montre que ce matériel est constitué essentiellement de *P. carinii*, sans exsudat ni débris cellulaires. Quelques parasites sont retrouvés dans la lumière des bronchioles dont l'épithélium montre des foyers d'hyperplasie.

Chez le patient sidéen, la fibrose collagène est intense, et les lésions alvéolaires sont majeures, avec nécrose, formation de cavités et présence de membranes hyalines à la surface de l'alvéole. L'infiltrat, diffus, est riche en granulocytes neutrophiles, et quelques éosinophiles sont parfois observés. Les pneumocytes de type II sont hyperplasiés. Le matériel éosinophile, constitué de nombreux *Pneumocystis* libres ou en amas, comble les alvéoles. L'épithélium bronchiolaire présente parfois des zones d'atrophie et de desquamation.

À l'opposé de ce tableau cataclysmique, les lésions observées chez le lapin au sevrage sont beaucoup plus discrètes : la congestion est faible, la fibrose collagène absente. L'infiltrat, au sein duquel dominant les plasmocytes, présente un aspect nodulaire caractéristique, et des éosinophiles, bien que peu nombreux, sont présents de manière constante. Les parasites, en moins grand nombre que dans les autres espèces, sont adhérents à l'épithélium alvéolaire, libres dans la lumière bronchiolaire ou phagocytés. Enfin, le matériel éosinophile spumeux n'est observé que dans les cas les plus sévères.

Quelques éléments de physiopathologie.

Les formes végétatives de *P. carinii* apparaissent intimement associées aux pneumocytes de type I. Les prolongements filamenteux du parasite pénètrent profondément dans le cytoplasme de ces cellules, qui émettent à leur tour des excroissances au niveau des zones en contact avec *Pneumocystis* (Creusy et coll., 1996 ; Dei-Cas et coll., 1991, cf. photo 4). Cependant, on n'observe pas de solution de continuité de la membrane plasmique de la cellule hôte, qui reste intacte et toujours distinguable de la paroi cellulaire du champignon. Par contre, la MET permet de mettre en évidence de nombreuses petites vésicules intracytoplasmiques dans les cellules épithéliales alvéolaires, à proximité des zones de contact avec les pneumocystes (Nielsen et Settnes, 1991). Elles pourraient jouer un rôle dans la nutrition du parasite. Ces vésicules, observées dans les poumons de rats traités aux corticoïdes, n'ont pas été retrouvées dans les cellules L2 lors de co-culture avec *P. carinii* (Aliouat et coll., 1993). L'attachement de *P. carinii* aux cellules épithéliales *in vitro* suppose que le parasite et la cellule-cible soient vivants [la congélation ou la fixation par le formol de *P. carinii* préalablement au test d'adhésion ou le traitement par la pentamidine, qui tue le parasite, ainsi que la fixation préalable des cellules-cibles par le formol inhibent l'adhésion (Aliouat *et al.*, 1993)]. La première étape de cet attachement fait intervenir la fibronectine et la vitronectine (Limper *et al.*, 1993 ; Pottratz et Martin., 1990). On sait que la MSG de *Pneumocystis carinii* fixe la fibronectine (Pottratz *et al.*, 1991) et augmente l'expression des intégrines α_5 (qui portent des récepteurs à la fibronectine) à la surface de cellules A549 en culture (Pottratz *et al.*, 1994). De plus l'aptitude de différentes lignées cellulaires à permettre l'attachement et la croissance de *P. carinii in vitro* semble liée à la quantité de fibronectine qu'elles expriment (Aliouat, 1995). Le cytosquelette du parasite intervient également dans l'attachement, comme le montre l'inhibition partielle de cet attachement par la cytochalasine B, qui inhibe la polymérisation de l'actine. Par contre, l'intégrité du cytosquelette de la cellule hôte n'est pas indispensable (Aliouat *et al.*, 1993).

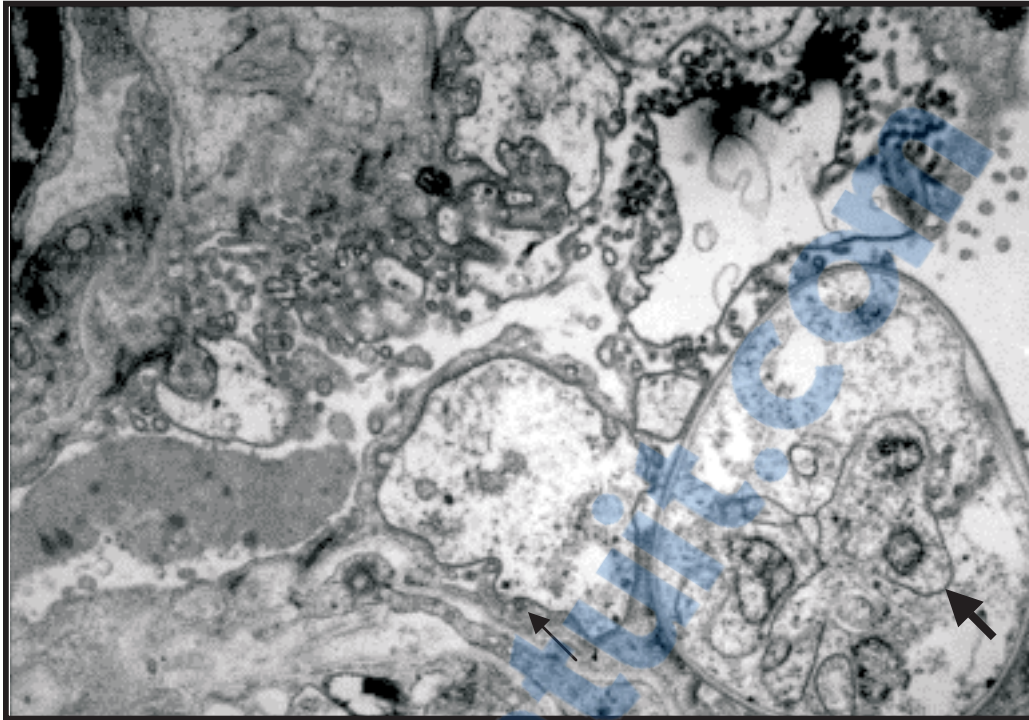


photo n°4 : alvéole pulmonaire parasitée par *P. carinii* en MET (Dei-Cas, communication personnelle). On remarque un sporocyste avec plusieurs spores en train de se différencier autour des noyaux (flèche épaisse) et plusieurs formes végétatives adhérant aux pneumocytes de type I et émettant de nombreux prolongements filamenteux (flèche fine).

Au cours de la PPC, le surfactant pulmonaire est profondément altéré. Ces altérations apparaissent très précocement au cours de l'infection, avant même que le parasite ne soit détectable dans le LBA (Aliouat et coll., 1998 ; Escamilla et coll., 1992). Chez le sidéen, les changements comprennent une augmentation des quantités de protéines hydrophiles [SP-A et SP-D (Limper et coll., 1995 ; Phelps et Rose, 1991)] ainsi qu'une diminution des quantités de phospholipides, avec réduction des diacylglycérophospholipides et de la phosphatidylcholine et une augmentation de la proportion de lysophosphatidylcholine (Escamilla et coll., 1993 ; Escamilla et coll., 1992 ; Hoffman et coll., 1992). Des changements similaires ont été observés chez le rat sous corticoïdes (mais les corticoïdes eux-mêmes ont des effets importants sur la composition du surfactant), la souris SCID et le lapin au sevrage (Aliouat et coll., 1998 ; Phelps et coll., 1996 ; Sheehan et coll., 1986). Le caractère précoce de ces changements, en l'absence d'inflammation observable et alors que le nombre de parasites est encore faible, semble indiquer un rôle direct de *P. carinii* sur le métabolisme du surfactant (Aliouat et coll., 1998). Cependant, plus tardivement au cours de l'infection, la transsudation plasmatique, induite par l'inflammation et l'augmentation de la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire due au parasite (Yoneda et Walzer, 1981), joue également un rôle dans les modifications observées, qui ne sont d'ailleurs pas spécifiques de la PPC (Phelps, 1995). *In vitro*, l'adjonction de surfactant artificiel (dipalmitoylphosphatidylcholine) ou semi-naturel (phospholipides et protéines hydrophobes) à une culture de *P. carinii* sur cellules L2 (*cf. infra*) inhibe le développement du parasite (Aliouat et coll., 1998). Chez le rat, Eijking et coll. ont pu obtenir une nette amélioration de la fonction respiratoire au cours de la PPC par administration de surfactant en aérosol (Eijking et coll., 1991).

Chez le patient sidéen, la PPC se traduit à la fois par une insuffisance respiratoire progressive et des lésions inflammatoires intenses. Il est donc logique de penser que ces phénomènes inflammatoires ont une incidence sur la fonction respiratoire. Cette participation de l'inflammation à la physiopathologie de la PPC a été récemment vérifiée chez la souris (Wright et coll., 1999). Dans les modèles où l'inflammation est importante (souris déplétée en lymphocytes T CD4⁺ ou souris

SCID reconstituée), on observe une diminution de la compliance du poumon et une hypoxie, alors que dans les modèles où cette inflammation est faible ou inexistante (souris déplétée à la fois en lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ou souris SCID), la compliance pulmonaire et la fonction respiratoire sont préservées malgré le développement de l'infection. D'ailleurs, chez l'homme, l'administration de corticoïdes au cours de PPC d'intensité moyenne à sévère permet d'obtenir une amélioration de la fonction pulmonaire beaucoup plus rapide que lors de l'utilisation d'anti-infectieux seuls.

P. carinii in vitro.

Toutes les tentatives de culture de *P. carinii* sur les milieux usuels, et en particulier les milieux couramment utilisés en mycologie, ont échoué. La co-culture de ce champignon avec une lignée cellulaire permet dans le meilleur des cas d'obtenir une certaine croissance du parasite les premiers jours, mais après deux à trois repiquages (soit environ une semaine), les parasites commencent à mourir. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des parasites de rat et des lignées de cellules épithéliales alvéolaires murines (L2 par exemple) ou humaines (comme les A549), en milieu minimum essentiel additionné de dix à vingt pour cent de sérum de veau fœtal, à 35-37°C sous atmosphère enrichie à 5 % de CO₂ (Atzori et coll., 1998). Des résultats à peu près comparables ont récemment été obtenus avec des parasites de souris (Beck et coll., 1996). Les cultures à court terme sont déjà largement utilisées par certaines équipes (Atzori *et al.*, 1998) pour obtenir de grandes quantités de parasites débarrassés des contaminants issus du poumon de l'hôte. Chez le lapin, une technique de culture d'explants pulmonaires parasités permet de maintenir la viabilité des parasites pendant au moins vingt et un jours (Dei-Cas et coll., 1989). Malheureusement cette technique ne résout pas le problème de la séparation du parasite d'avec le tissu pulmonaire et elle est de fait restée peu utilisée. Récemment, la culture continue de *P. carinii* issu de rat a pu être obtenue par une équipe, ce qui constitue, si l'expérience peut être reproduite, un progrès considérable pour l'étude de *P. carinii* (Merali et coll., 1999). Cette culture est réalisée en plaque de culture à six puits, sur membrane recouverte de collagène, dans un milieu enrichi de différents facteurs de croissance (putrescine). La culture pourrait être repiquée indéfiniment, le parasite est infectieux pour le rat et résiste à la congélation. Ce système de culture pourrait fonctionner également pour des parasites d'origine humaine.

Sous-chapitre 1.3 : Aspects épidémiologiques de l'infection humaine

Importance du statut immunitaire.

La PPC a d'abord été décrite chez de jeunes enfants dénutris, des prématurés ou des enfants atteints de déficit immunitaire congénital. Dans ces trois cas, l'existence de déficits immunitaires est patente et touche souvent l'ensemble des composantes du système immunitaire. À partir des années 1970, ce sont les immunodépressions iatrogènes (chimiothérapie anti-cancéreuse ou traitement contre le rejet de greffes d'organes) qui ont été à l'origine de la plupart des cas de PPC. Ici aussi, l'immunodéficience est importante et souvent générale (avec l'utilisation de fortes doses de corticostéroïdes par exemple). Cependant l'utilisation de nouveaux traitements comme la ciclosporine, qui cible plus spécifiquement les lymphocytes T, ne réduit pas réellement le risque de PPC, qui apparaît donc lié avant tout aux déficits de l'immunité à médiation cellulaire. Et cela s'est vu confirmé par le fait que la PPC a explosé avec la pandémie de SIDA, qui affecte surtout les lymphocytes T CD4⁺ (mais aussi les macrophages). Quelques cas de PPC chez des patients

ne présentant pas d'immunodépression apparente ont néanmoins exceptionnellement été signalés (Cano et coll., 1993).

Voies de transmission du parasite.

Chez l'homme, la seule voie de transmission communément admise est la voie aérienne. La voie transplacentaire a été évoquée dans un cas de PPC active chez la mère sidéenne (Mortier et coll., 1995) mais semble pour le moins rare. L'existence de petites « épidémies » hospitalières de PPC montrant le même type de parasite chez différents patients ayant été en contact les uns avec les autres suggère le rôle important des malades dans la transmission de l'infection et le caractère éventuellement nosocomial de la PPC (Laing, 1999 ; Touzet et coll., 2000). Des recherches par immunofluorescence ou par PCR de *P. carinii* dans les poumons de personnes mortes d'autres causes n'ont pas permis de mettre en évidence le parasite (Millard et Heryet, 1988 ; Peters et coll., 1992). Il semble donc que la présence du parasite chez des individus immunocompétents soit exceptionnelle ce qui est en défaveur du rôle de ces individus dans la transmission de l'infection. Cependant des résultats récents obtenus chez la souris ont montré qu'un individu immunocompétent pouvait abriter le parasite de manière transitoire et servir de vecteur de l'infection d'un individu infecté à un individu sensible (Dumoulin et coll., 2000). Les études menées pour tenter de découvrir un rôle du personnel hospitalier dans la transmission du parasite n'ont pour l'instant pas permis d'aboutir aux mêmes conclusions, à une exception près (Lidman et coll., 1997 ; Vargas et coll., 2000). Récemment, on a décrit le portage occasionnel, mis en évidence par PCR dans le liquide de LBA, de *P. carinii* chez des individus immunodéprimés VIH⁺ ou VIH⁻, en l'absence de tout signe de PPC (même après un suivi de plusieurs mois). Ces individus, qualifiés de porteurs, pourraient avoir un rôle épidémiologique non négligeable dans l'environnement hospitalier (Nevez et coll., 1999a).

Une autre question importante qui se pose vis-à-vis des patients faisant une PPC est la persistance de l'infection après la guérison clinique. En particulier, un second épisode de PPC chez un patient donné constitue-t-il une réactivation d'une infection latente ou résulte-t-il d'une infection *de novo* ? Le développement du typage de *Pneumocystis carinii* par séquençage de fragments génomiques amplifiés par PCR a permis d'apporter un début de réponse. En effet, ce typage a permis de montrer que dans la majorité des cas, la souche de *P. carinii* isolée lors du second épisode est différente de celle qui a été isolée lors du premier épisode, en particulier lorsque les deux épisodes sont séparés de plus de quatre mois. Dans la majorité des cas, le deuxième épisode de PPC résulte donc d'une nouvelle infection indépendante de celle ayant donné lieu au premier épisode. Cependant, dans quelques cas, le type retrouvé est le même lors des deux épisodes. On peut donc avoir affaire à une recontamination avec un parasite de la même souche ou à une réactivation d'une infection restée latente depuis le traitement du premier épisode. La plus grande fréquence de ces cas lorsque les deux épisodes sont rapprochés laisse penser que le parasite peut persister un certain temps après traitement et l'on pourrait dans ce cas parler de rechute (Latouche et coll., 1997b).

Sous-chapitre 1.4 : La problématique de la primo-infection

Si la source de l'infection à *Pneumocystis carinii* reste mal connue, on sait depuis longtemps que la présence d'anticorps circulants vis-à-vis de *P. carinii* est fréquente. Ces anticorps apparaissent avant l'âge de quatre ans chez la grande majorité des enfants, que ce soit de ce côté-ci de l'Atlantique ou aux Etats-Unis (Meuwissen et coll., 1977 ; Pifer et coll., 1978). Ces anticorps se retrouvent jusqu'à l'âge adulte. Il semble donc y avoir un contact précoce de l'homme avec *P. carinii*, contact immunisant a- ou paucisymptomatique – les infections respiratoires béni-

gnes sont fréquentes chez le petit enfant, et l'étiologie en est rarement recherchée. Les conséquences de cette primo-infection ne sont pour l'heure pas connues. Quelle est l'importance de l'immunité acquise au cours de cette primo-infection dans la résistance future à une pneumocystose clinique ? Quels sont les mécanismes immunitaires mis en jeu lors de cet épisode ? Que devient le parasite après le développement de la réponse immunitaire ? Autant de questions aujourd'hui sans réponse, et malgré tout essentielles à la compréhension de l'histoire naturelle de la pneumocystose humaine. Il semble simplement que l'on ne retrouve pas le champignon chez l'adulte en dehors des épisodes de PPC évolutive. Quelle est alors la source, le réservoir de l'infection. Un développement asymptomatique et limité dans le temps chez les jeunes enfants suffit-il à assurer une circulation du parasite expliquant la fréquence de la PPC dans certaines populations ? Il semble aujourd'hui que devant les limites pratiques du travail sur l'être humain, la pneumocystose spontanée du lapereau soit le seul modèle permettant d'aborder ces questions.

Sous-chapitre 1.5 : Moyens d'étude

Possibilités d'étude chez l'homme.

En l'absence de système de culture de *P. carinii* f. sp. *hominis* (même à court terme), les études chez l'homme se font *in vivo* (ou « *in morti* »). Parmi les premières études menées chez l'homme figurent la description clinique de la PPC et son étude histologique sur les patients qui en sont morts. Toujours sur les cadavres, des recherches ont été menées pour tenter de découvrir le parasite dans les poumons d'individus morts de causes sans rapport avec *P. carinii*. Les résultats – négatifs – de ces études confortent la thèse selon laquelle *P. carinii* ne persiste pas dans le poumon après une infection (Millard et Heryet, 1988 ; Peters et coll., 1992). Les autres études chez l'homme ayant eu un impact important sur la connaissance de l'épidémiologie de la maladie sont les études sérologiques. Ce sont elles notamment qui ont permis de mettre en évidence la primo-infection (Meuwissen et coll., 1977 ; Pifer et coll., 1978). Enfin, différentes techniques de prélèvement permettent de récupérer des parasites d'origine humaine à des fins expérimentales. Le typage de ces parasites a déjà donné lieu à des avancées dans le cadre de l'épidémiologie (Hauser et coll., 2001 ; Latouche et coll., 1997a ; Lu et coll., 1994), et des tentatives de culture sont en cours. Selon Merali et coll. (Merali et coll., 1999), la technique de culture axénique en continu qu'ils ont décrite pour *P. carinii* de rat fonctionne également avec *P. carinii* f. sp. *hominis*. Si ces résultats sont confirmés, cela constituerait le plus gros progrès jamais obtenu dans le développement d'outils d'étude de la pneumocystose humaine. Le développement de techniques de détection et de typage très sensibles comme la PCR facilite beaucoup ces travaux en permettant le recours à des techniques moins invasives que le LBA (possible uniquement lorsque des impératifs cliniques le justifient), comme le lavage oropharyngé

Les modèles animaux.

Les principaux modèles utilisés pour étudier la PPC sont basés sur des rongeurs fortement immunodéprimés (Dei-Cas et coll., 1998). On utilise essentiellement :

- le rat (de souche Wistar ou Sprague-Dawley le plus souvent) traité pendant huit à douze semaines avec de fortes doses de corticostéroïdes (par exemple 2 mg de dexaméthasone par litre d'eau de boisson). Ces animaux, provenant de colonies naturellement infectées par *P. carinii* développent spontanément une infection intense. Ces animaux sont la principale source des parasites uti-

lisés pour les études *in vitro* et pour l'infection de rats naturellement indemnes. Les études menées chez ces animaux sont limitées par les très nombreux effets métaboliques et immunologiques des corticoïdes.

- le rat *nude*, athymique, inoculé par voie intratrachéale. Chez ces animaux, l'infection est mieux maîtrisée et plus constante, surtout si l'on ajoute une faible dose de corticoïdes (0,8 mg de dexaméthasone par litre d'eau de boisson). Ce modèle est couramment utilisé pour les tests thérapeutiques.
- la souris (souvent de souche balb/c), traitée aux corticoïdes, comme source de parasites pour la souris.
- la souris SCID et de nombreux mutants spécifiques ont été beaucoup utilisés pour l'étude du rôle de telle ou telle composante de la réponse immune.

En plus de ces modèles courants, le furet et le singe ont été utilisés pour différentes expériences de typage. Le porcelet présente assez régulièrement une pneumocystose clinique qui a posé problèmes dans plusieurs élevages au Danemark (Bille-Hansen et coll., 1990). Cependant, le caractère inconstant de cette infection ainsi que la rareté des installations expérimentales capables d'accueillir des porcs limitent l'intérêt de ce modèle. De plus le caractère clinique marqué de cette primo-infection la différencie nettement de celle observée chez l'homme.

Intérêt du lapin.

Le lapin a été proposé il y a de nombreuses années comme modèle d'infection à *P. carinii* (Sheldon, 1959). Cependant, c'est l'existence, mise en évidence en 1989, d'une primo-infection à *P. carinii* spontanée, constante et massive chez cette espèce qui en fait l'intérêt particulier.

Chapitre 2 : Que sait-on de la pneumocystose spontanée du lapereau ?

Sous-chapitre 2.1 : Historique de la découverte de la pneumocystose spontanée

Pneumocystis chez le lapin.

Pneumocystis carinii a été découvert très tôt dans les poumons de lapins (*Oryctolagus cuniculus*) comme d'autres mammifères (Carini et Maciel, 1916). Dès 1959, Sheldon propose l'utilisation du lapin comme hôte pour l'étude de *P. carinii* (Sheldon, 1959). Il infecte par voie nasale des lapins traités ou non à la cortisone avec du broyat de poumon d'homme ou de lapin contenant *P. carinii* bouilli ou non. Et déjà il observe que le développement du parasite n'est pas lié à sa présence ou son absence dans l'inoculum, ou à l'espèce dont provient ce dernier, mais à l'administration éventuelle de cortisone. Il constate en effet un développement parasitaire important (mesuré par un score histologique) chez les animaux traités à la cortisone et une charge parasitaire faible ou nulle chez les animaux non traités, quel que soit l'inoculum. Il conclue donc à la réactivation d'une infection préexistante.

Par la suite, le lapin restera peu utilisé, au profit du rat. Malgré tout, Goyot et coll. remarqueront en 1984 que *P. carinii* extrait de lapin constitue un meilleur antigène pour le titrage des sérums humains que l'antigène *P. carinii* extrait de rat (à une époque où l'on ne soupçonne pas la diversité génétique des *Pneumocystis* infectant des espèces différentes)(Goyot et coll., 1984). Depuis, les études génétiques ont montré que *P. carinii* f. sp. *hominis* est plus proche de *P. carinii* f. sp. *oryctolagi* que des *formae speciales* murines pour la quasi-totalité des locus étudiés (cf. figure 3)(Wakefield, 1998b).

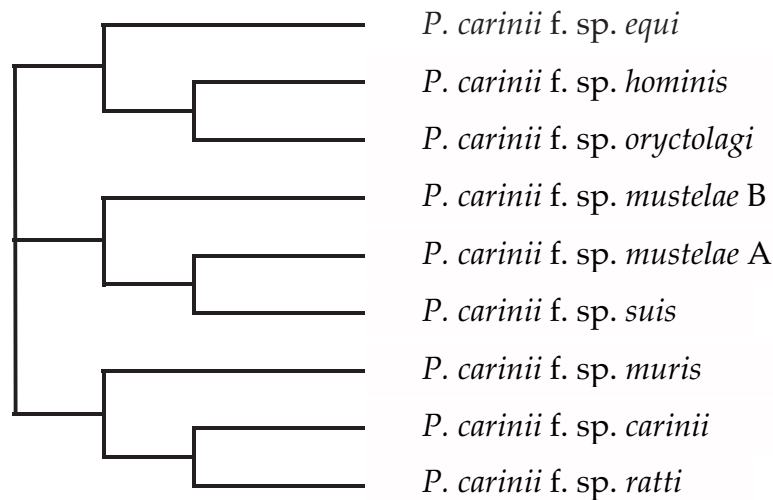


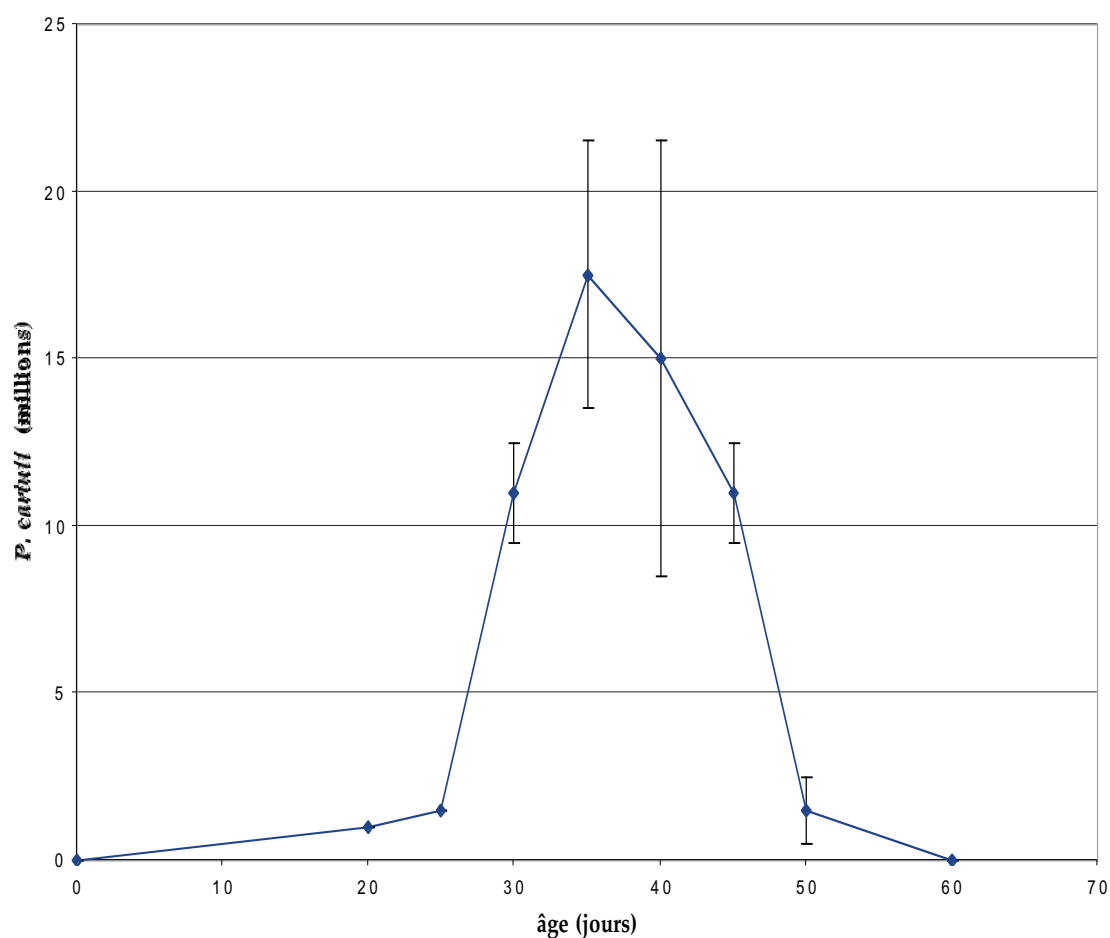
figure n°3 : arbre phylogénétique, construit selon la méthode du « Neighbour-Joining » en utilisant la séquence de l'ARN de la grande sous-unité ribosomale mitochondriale, de neuf *formae speciales* de *P. carinii* (la longueur des branches ne correspond pas à une distance génétique). On remarque la proximité de *P. carinii* f. sp. *oryctolagi* avec *P. carinii* f. sp. *hominis* (d'après Wakefield, 1998b).

En 1988, Soulez et coll. redécouvrent l'intérêt du lapin comme modèle de pneumocystose et source de *Pneumocystis* (Soulez et coll., 1988). Dei-Cas et coll. mettent au point une méthode de culture d'explants pulmonaires de lapin permettant de conserver les parasites viables et non altérés (pour autant que l'on puisse en juger par microscopie électronique à transmission) pendant au moins 21 jours (Dei-Cas et coll., 1989).

La pneumocystose spontanée.

En 1989 enfin, Soulez et coll. décrivent pour la première fois la pneumocystose spontanée du lapereau au sevrage (28 jours dans le système d'élevage considéré)(Soulez et coll., 1989). Le parasite se développe dans le poumon des jeunes lapins sans inoculation ni immunodépression induite, et ce de façon quasi-systématique et asymptomatique. On obtient ainsi dans les poumons de 80 à 100 % des lapins des niveaux de parasite de 68 ± 50 millions de formes kystiques (sporocystes) quatre jours après le sevrage. Les anticorps sériques anti-*Pneumocystis* apparaissent lors de la résolution (rapide : 23 ± 9 millions de formes kystiques huit jours après le sevrage) de l'infection. L'administration de corticoïdes permet de prolonger l'infection (55 ± 50 millions de formes kystiques après deux à trois semaines). Cette infection naturelle reste aujourd'hui le seul modèle de primo-infection. En effet, si des infections naturelles à *P. carinii* ont été observées chez des porcs non immunodéprimés au Danemark (Bille-Hansen et coll., 1990), ces infections ne sont ni systématiques, ni asymptomatiques, ce qui les différencie nettement de la primo-infection humaine. Les seules données disponibles chez la souris (Garvy et Harmsen, 1996) montrent une infection très limitée, tant en nombre de parasites qu'en durée, qui n'a jamais été utilisée jusqu'ici.

Sous-chapitre 2.2 : Cinétique de l'infection



courbe n°1 : évolution du nombre de sporocyste de *P. carinii* dans le poumon en fonction de l'âge du lapin (Dridba, 1995).

La courbe n°1 montre l'évolution du nombre de parasites en fonction de l'âge des lapereaux, en nombre de sporocystes colorables au BTO (*cf. supra* : morphologie). La proportion de sporocystes est de 6 à 7 % en moyenne chez le lapin. On peut remarquer la grande variabilité du nombre de parasites, ce qui n'est guère surprenant, s'agissant d'une infection naturelle.

Sous-chapitre 2.3 : Aspects épidémiologiques

Universalité de l'infection.

Cette affection a été retrouvée chez des lapins (sauvages et d'élevage) de multiples races et de régions et pays différents. Parmi les animaux étudiés, on trouve des hybrides Californiens/Néo-zélandais provenant de chez Vasseur (Prouzel, France) et Charles River (Rouen, France), hollandais de chez Harlan (Oxon, Royaume-Uni), chinchillas de chez Harlan (Zeist, Pays-bas), hollandais, Rex, Feu-noir, Lorraine (est), Blanc de Bouscat (Verdun), nain de couleur, Polonais (Var), Argenté de Champagne (Saône et Loire), Californien (Dordogne), Sablé des Vosges (Bas-Rhin), Néo-zélandais (Barrois, Nord) (Mazars et coll., 1997a). Nous n'avons pour le moment jamais observé de colonie d'animaux indemnes, à l'exception de la colonie de l'I.N.R.A. de Tours spécialement développée à cette intention (Céré et coll., 1997b). Cette colonie a été obtenue par le traitement au cotri-

moxazole des femelles gestantes et de leurs produits sur trois générations, associé à des mesures d'isolement strict. Cette colonie a été recontaminée, demandant de nombreux mois pour obtenir à nouveau des animaux indemnes, ce qui montre l'importante circulation de l'organisme dans l'environnement et la facilité avec laquelle les animaux peuvent s'infecter (expérimentalement chez le rat sous corticoïdes la dose infectante est d'un seul organisme viable (Cushion et coll., 1999)).

Transmission.

C'est aussi à l'I.N.R.A. de Tours qu'a été mise en évidence une modalité particulière de transmission de l'infection. En effet, dans cette espèce, *P. carinii* passe de la mère au fœtus par voie transplacentaire (Céré et coll., 1997a). Ainsi, la PCR a révélé la présence d'ADN parasite dans le sang de la mère, le liquide amniotique et l'embryon dès le dixième jour de gestation. De plus, *P. carinii* a été observé en immunofluorescence dans le placenta ainsi que dans le poumon maternel (où l'on ne le retrouve que rarement chez l'adulte en-dehors de la gestation). Ces données, associées à la cinétique de l'infection et aux résultats de l'infection expérimentale (cf. *infra*), suggèrent que chez le lapin, la transmission transplacentaire est la principale voie de contamination par *P. carinii*. Cette voie de transmission rend d'autant plus difficile l'éradication de *P. carinii* dans une colonie et explique la nécessité de traitement des mères (l'association césarienne aseptique – isolement utilisée classiquement pour l'établissement de colonies d'animaux de laboratoire ne suffit pas). Le lapin est la seule espèce chez laquelle cette transmission materno-fœtale du parasite a été décrite comme mode habituel. Une note fait état de la présence du parasite chez un enfant mort-né d'une femme atteinte du SIDA et faisant une pneumocystose évolutive, ce qui est fort différent de l'infection subclinique du lapin (Mortier et coll., 1995). Cette transmission materno-fœtale pose également le problème de la source des organismes : ré-infection de la mère à partir de son environnement dans une période où elle redevient sensible, ré-activation d'une infection restée latente dans le poumon ou dans un autre organe encore non identifié (système lymphatique par exemple) ? Il est pour le moment trop tôt pour répondre à cette question. Il est cependant possible de faire deux remarques :

- D'une part, la facilité d'infection des animaux en cas de rupture ou de faille de l'isolement indique la circulation de *P. carinii* f. sp. *oryctolagi* dans l'air environnant.
- D'autre part, la PCR, voire la microscopie, permettent souvent de détecter du *P. carinii* dans les poumons de lapins en dehors de la phase active de la primo-infection. Ces résultats signent une permissivité particulière de cette espèce vis-à-vis de son *Pneumocystis*, apparemment supérieure à celle observée chez l'homme.

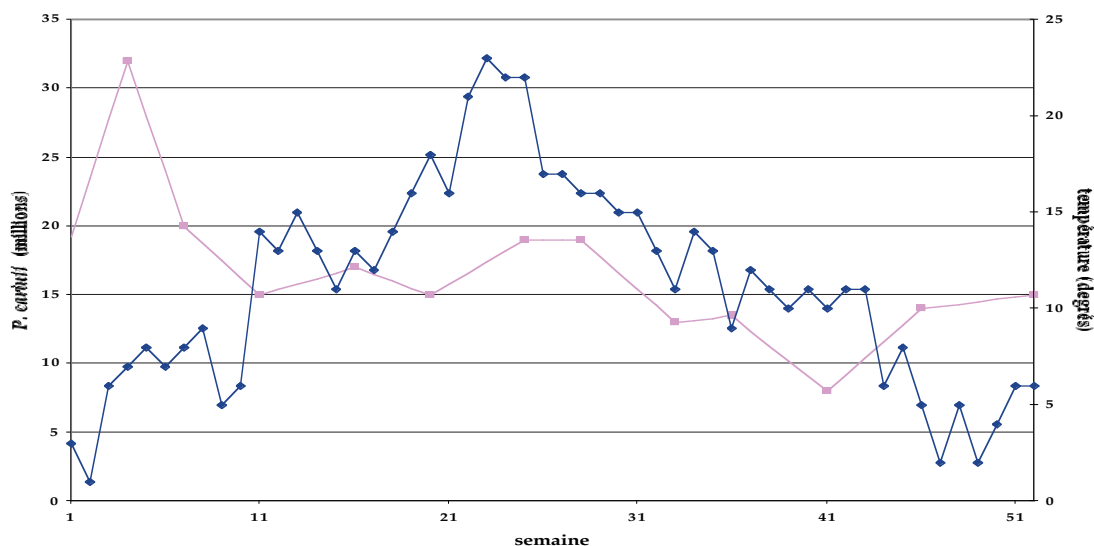
Conditions de développement.

À Tours toujours, l'obtention d'animaux indemnes a permis l'infection expérimentale par voie nasale, réalisée sur des lapins juste sevrés. Au cours de ces expériences, une cinétique similaire à celle observée lors de la primo-infection naturelle a pu être obtenue (si l'on considère la naissance comme moment de l'infection pulmonaire) : développement rapide du champignon avec un pic d'infection une trentaine de jours après l'infection et une résolution spontanée après deux à trois semaines. Cette expérience a donc montré que si la multiplication de *P. carinii* chez le lapin correspond à une « fenêtre » de réceptivité au cours du développement de l'animal, cette fenêtre s'étend au moins jusqu'à l'âge de trente-cinq jours. Ce modèle d'infection constitue un progrès important. En effet, il permet d'obtenir une infection maîtrisée (nombre de parasites inoculés, forme infectante, moment de l'infection), mais toujours sans avoir recours à une forme quelconque

d'immunosuppression iatrogène, et avec une évolution comparable à l'infection naturelle.

Saisonnalité.

Le dernier élément épidémiologique que l'on ait observé est une variation saisonnière de l'infection naturelle, plus intense durant la saison froide que durant l'été (Dridba, 1995) (cf. courbe 2). Ainsi le parasitisme moyen passe de 181,5 millions de parasites totaux jusqu'en février à 62,9 millions à partir de mars (Allaert, 1996).



courbe n°2 : évolution du nombre maximal de sporocystes de *P. carinii* par lapin (en rose) en fonction de la période de l'année et corrélation avec la température (en bleu)(Dridba, 1995).

Sous-chapitre 2.4 : Modifications biochimiques

Paramètres hématologiques.

Le suivi de la numération-formule sanguine au cours de la pneumocystose ne permet pas de mettre en évidence d'évolution significative (Dei-Cas, communication personnelle).

Paramètres enzymatiques.

Chez le lapin comme chez l'homme (Silverman et Rubinstein, 1985), l'activité lactate déshydrogénase sérique est augmentée au cours de la pneumocystose, bien que de façon modérée (cf. tableau 1).

Lipides.

Des modifications sont observées, tant en ce qui concerne les triglycérides (concentration sérique doublée durant la pneumocystose) que le cholestérol (concentration doublée, mais sans modification du cholestérol-HDL) (cf. tableau 1).

| <i>P. carinii</i> (10 ⁶) | Âge (jours) | TAG (g.l ⁻¹) | CHOL (g.l ⁻¹) | CHOL- HDL (g.l ⁻¹) | HDL/CHOL | LDH (U.l ⁻¹) |
|---|----------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| 0,51±0,2 n=16 | 52, 0±2,0 | 0,97±0,1 | 0,66±0,10 | 0,2±0,0 | 0,6±0,1 | 226±37 |
| 22,70±0,2 n=23 | 35,7±1,0 | 1,89±0,3 p<0,01 | 1,10±0,20 | 0,2±0,0 | 0,3±0,0 p<0,001 | 313±74 |

tableau I : évolution des paramètres biochimiques sériques au cours de la pneumocystose spontanée (*P. carinii* : en millions de formes kystiques, TAG : tri-acyl glycérol, CHOL : cholestérol total, CHOL-HDL : cholestérol-HDL, HDL/CHOL : rapport cholestérol-HDL /cholestérol total, LDH : lactate déshydrogénase)(Dei-Cas, communication personnelle).

Surfactant.

L'avantage de ce modèle pour l'étude des interactions entre pneumocystose et surfactant pulmonaire est l'absence d'utilisation de corticoïdes, qui ont par eux-mêmes une influence sur la production et la composition du surfactant. On observe au cours de la pneumocystose une chute du rapport phospholipides/protéines (Aliouat et coll., 1998). Cette chute résulte essentiellement d'une augmentation de la quantité de protéines totales. Une telle augmentation peut s'expliquer en partie par une transsudation de protéines sériques liée à l'inflammation et à l'altération de la membrane alvéolocapillaire du fait de l'action directe du parasite sur les pneumocytes de type I. Cependant on observe également une augmentation de la quantité de protéines spécifiques du surfactant (Prévost, communication personnelle). Une diminution de la quantité de phospholipides intervient également au début de l'infection, participant ainsi à l'évolution du rapport phospholipides/protéines. Cet effet est particulièrement précoce puisque l'on peut observer une inflexion de la courbe dès avant l'âge de 20 jours, alors que *Pneumocystis* est encore indétectable par les techniques usuelles de microscopie. L'adjonction de surfactant fonctionnel inhibe la croissance du champignon en culture, ce qui laisse supposer que les perturbations précoces observées *in vivo* sont induites par le parasites et sont indispensables à son développement (Aliouat, 1995).

Sous-chapitre 2.5 : Étude histologique

Aspects caractéristiques.

Comme il a été précisé précédemment, les principales particularités histologiques de la pneumocystose spontanée du lapereau (Rajagopalan-Levasseur et coll., 1998) sont :

- Le caractère nodulaire de l'infiltrat cellulaire (cf. photo 5B) ;
- La présence, en petit nombre mais de façon constante, de granulocytes éosinophiles dans l'infiltrat cellulaire (cf. photo 6B) ;
- L'absence, dans la grande majorité des cas, de l'exsudat éosinophile alvéolaire observé chez la plupart des espèces ;
- L'absence de fibrose, expliquant l'absence de lésions cicatricielles persistant après la résolution de l'infection.

Aspects cinétiques.

Le tableau 2 présente l'évolution des lésions histologiques au cours du temps. On peut distinguer deux phases dans cette évolution :

- Une phase initiale dominée par la congestion vasculaire et l'infiltration par des granulocytes neutrophiles. Cette phase correspond à la phase de multiplication des parasites dans le poumon ;
- Une phase tardive, caractérisée par une congestion de moins en moins marquée, avec prédominance des lymphocytes et des macrophages dans les infiltrats et hyperplasie des pneumocytes de type II. Durant cette phase, le nombre d'organismes présents dans les poumons diminue régulièrement.

| Âge (jours) | Congestion vasculaire | Épaisseur des septums (μm) | Densité en MA | Taille des PII (μm) | Nombre de PII | GN / champs | Foyers de lympho. (Nb/cm ²) |
|-------------|-----------------------|---|---------------|----------------------------------|---------------|-------------|---|
| 1 | - | 7±2 | ± | 5±2 | 2±1 | 2±1 | 0 |
| 10 | +++ | 7±2 | ± | 5±2 | 3±1 | 2±1 | 0 |
| 20 | ++ | 15±5 | ± | 5±2 | 3±1 | 6±2 | 0 |
| 25 | ++ | 15±4 | ± | 5±2 | 3±1 | 18±5 | 2±1 |
| 30 | ++ | 20±5 | ± | 10±3 | 5±2 | 8±3 | 12±4 |
| 35 | + | 35±5 | ++ | 12±3 | 5±2 | 12±4 | 15±5 |
| 40 | ± | 92±20 | +++ | 10±3 | 10±2 | 7±2 | 80±30 |
| 50 | ± | 55±25 | +++ | 10±3 | 9±3 | 9±3 | 125±40 |
| 60 | - | 20±10 | ± | 12±3 | 3±1 | 4±2 | 7±4 |
| 10 | 0 | 7±2 | ± | 5±2 | 2±1 | 2±1 | 0 |
| 30 | 0 | 7±2 | ± | 5±2 | 4±1 | 4±1 | 0 |
| 60 | 0 | 15±2 | ± | 5±2 | 4±1 | 4±1 | 0 |

tableau II : évolution des paramètres histologiques au cours de la pneumocystose spontanée (1 à 60 jours : lapins infectés ; 10, 30 et 60 jours : lapins indemnes ; MA : macrophages alvéolaires ; PII : pneumocytes de type II ; GN : granulocytes neutrophiles ; lympho : lymphocytes)(Dridba, 1995).

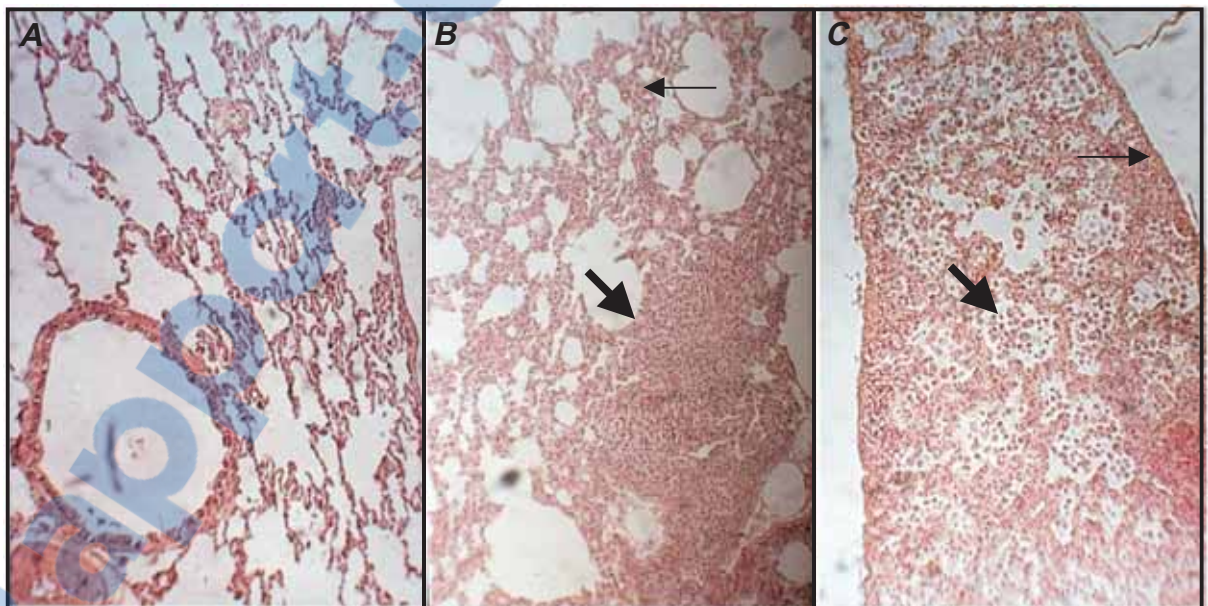


photo n°5 : aspects histologiques de la PPC du lapin en coloration à l'hémalun-éosine-safran (Dei-Cas, communication personnelle).

A : coupe histologique de poumon après résolution de la PPC, présentant un aspect sain.

B : coupe histologique de poumon au cours de la PPC. On remarque les cloisons interalvéolaires épaissies (flèche fine) et l'aspect nodulaire de l'infiltrat (flèche épaisse).

C : coupe histologique de poumon au cours d'une PPC particulièrement sévère. On remarque la réaction pleurale (flèche fine) et l'alvéolite macrophagique (flèche épaisse).

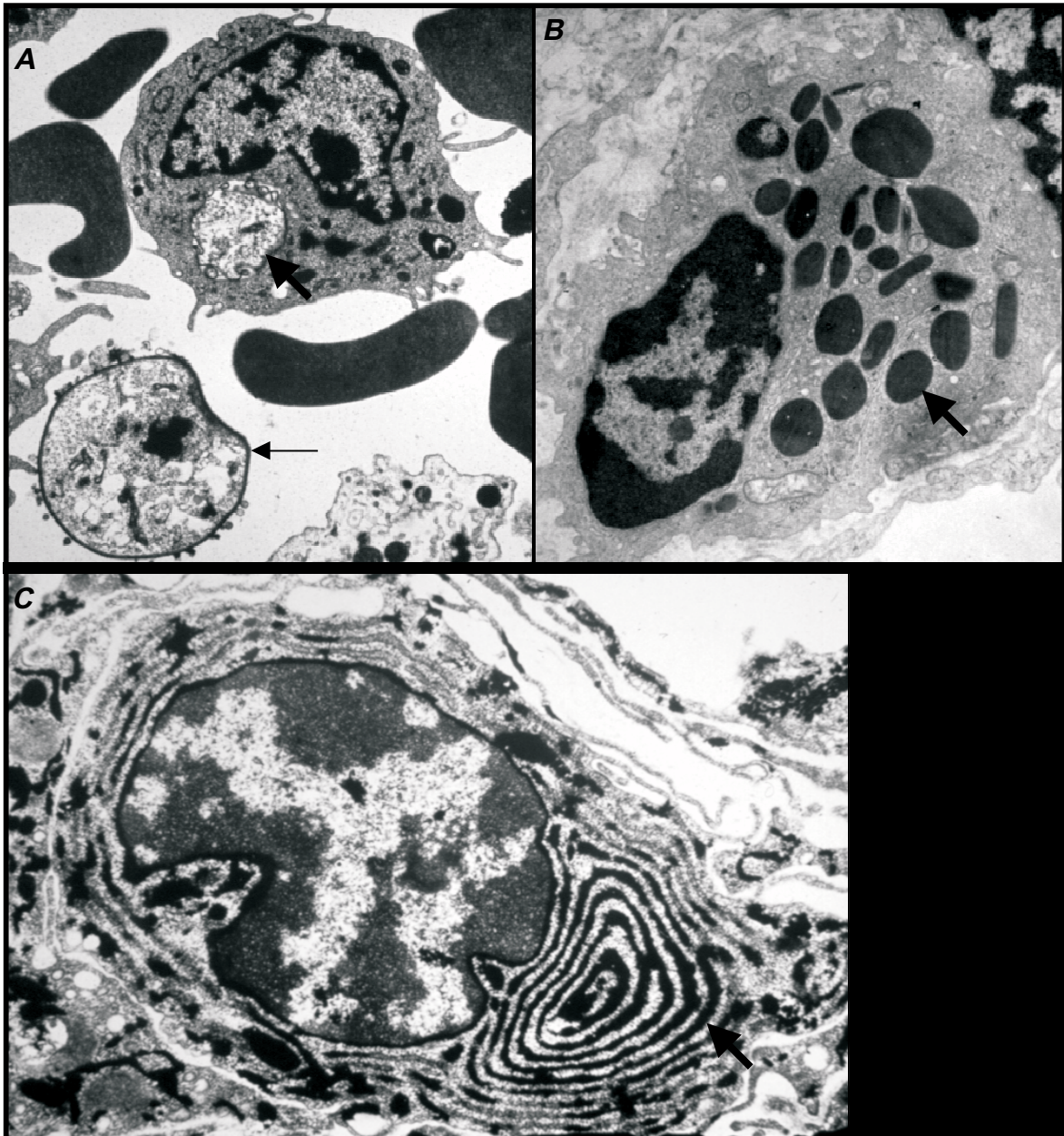


photo n°6 : principales cellules observées lors de la PPC du lapereau, en MET (Dei-Cas, communication personnelle).

A : macrophage ayant phagocyté une forme végétative de *P. carinii* (flèche épaisse) à côté d'un sporocyste immature (flèche fine).

B : granulocyte éosinophile. On remarque les granulations caractéristiques (flèche).

C : plasmocyte. Le contraste des membranes a été renforcé à l'iodure de zinc, rendant plus évident l'abondant réticulum endoplasmique de ces cellules (flèche).

Sous-chapitre 2.6 : Aspects immunitaires

Anticorps.

Akono et Palluault ont décrit l'apparition d'anticorps sériques anti-*P. carinii* entre quatre et cinq semaines, ce qui correspond à l'acmé de l'infection. Le titre augmente ensuite jusqu'à l'âge de neuf semaines puis se stabilise pour persister au moins plusieurs mois (Akono et Palluault, 1994). La réponse immune humorale sérique coïncide donc avec l'arrêt de la progression de l'infection et sa résolution. L'administration d'azathioprine inhibe fortement la réponse anticorps et empêche la résolution de la pneumocystose, qui devient létale. Par contre, le titre anticorps reste nul entre deux et quatre semaines. Au contraire, Tamburrini et coll. ont rap-

porté la présence d'IgG anti-*Pneumocystis* dès l'âge de cinq jours. Le taux d'IgG chute jusqu'à l'âge de vingt et un jours pour remonter ensuite, ce qui correspond aux observations d'Akono (Tamburrini et coll., 1999). Les IgM, absents à cinq jours, apparaissent dès quatorze jours pour voir leur taux se stabiliser à partir de vingt et un jours. On aurait donc ici un développement du parasite concomitant de la disparition de l'immunité passive d'origine maternelle et une résolution coïncidant ici aussi avec l'apparition de l'immunité active post-infectieuse. La raison pour laquelle Akono n'a pas mis en évidence d'immunité d'origine maternelle n'est pas connue. Le fournisseur des lapins n'était pas le même, mais l'infection à *P. carinii* était présente dans les deux cas. De même, la technique différait (immunofluorescence contre ELISA) mais les taux observés à quatorze jours par Tamburrini et coll., supérieurs à ceux mesurés à quarante-cinq jours, étaient suffisants pour être détectés par immunofluorescence.

Akono a également étudié par immunoblotting les principaux antigènes de *P. carinii* reconnus par les sérums des lapins (Akono et Palluault, 1994). Les antigènes immunodominants sont des constituants de 36 à 39 kDa et de 50 à 55 kDa. La réponse vis-à-vis de la MSG (116 kDa) est plus inconstante mais est constamment observée lors de la clairance du parasite. Ces résultats sont en accord avec d'autres obtenus chez le rat. Les antigènes de *Pneumocystis* isolés d'hôtes différents montrent un certain degré de réactivité croisée mais avec des affinités variables (Goyot et coll., 1984).

Lymphocytes T.

L'utilisation d'anticorps anti-CD4 en immunohistochimie a révélé que 60 % des lymphocytes infiltrant le poumon au cours de la pneumocystose sont porteurs de ce marqueur (Dridba, 1995). Ces résultats confirment l'importance de ces cellules dans la résolution de l'infection, importance mise en évidence à la fois épidémiologiquement chez l'homme et expérimentalement chez la souris. Cependant l'évolution du rapport CD4/CD8 n'a pu être déterminée car l'anticorps anti-CD8 de lapin n'était pas disponible à l'époque.

Espèces activées de l'oxygène.

La production d'espèces activées de l'oxygène par les macrophages alvéolaires de lapin a pu être observée *in vitro* par chimioluminescence (Rajagopalan-Levasseur et coll., 1998). Cette production est obtenue après stimulation par *P. carinii* et amplifiée par opsonisation avec un antisérum spécifique, décomplémenté ou non. L'existence de cette production *in vivo* a été confirmée par immunofluorescence, en utilisant des anticorps dirigés contre les ponts amino-imino-propène. Ces ponts résultent de la peroxydation des lipides membranaires sous l'effet des espèces activées de l'oxygène. Un marquage intense est observé chez des lapins infectés de trente jours, à la surface des différentes formes du parasite ainsi qu'occasionnellement au niveau du pôle apical de quelques cellules épithéliales ciliées bronchiques.

Par contre, il n'a pas été possible de mettre en évidence de production de monoxyde d'azote par les macrophages alvéolaires de lapin *in vitro*, que ce soit après stimulation par *P. carinii* ou par du lipopolysaccharide bactérien (LPS).

Macrophages alvéolaires.

Histologiquement, la résolution de la pneumocystose s'accompagne d'un infiltrat macrophagique important (Dridba, 1995), les macrophages comblant la lumière alvéolaire. Cet aspect histologique d'alvéolite macrophagique s'accompagne de nombreuses images de phagocytose, concernant à la fois les formes végétatives et les sporocystes (cf. photo 7). Les organismes phagocytés apparaissent plus ou

moins dégradés en MET. Aucune image (ni aucune autre donnée expérimentale, et ce quelle que soit l'espèce concernée) ne laisse supposer que *Pneumocystis* puisse survivre à l'intérieur des cellules phagocytaires.

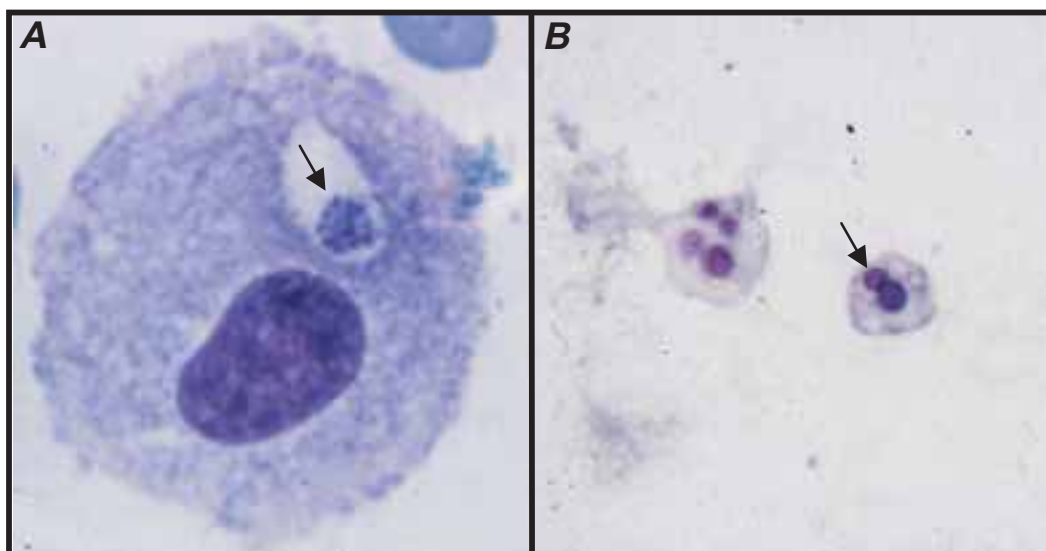


photo n°7 : phagocytose de *Pneumocystis carinii* par les macrophages alvéolaires (Dei-Cas, communication personnelle).

A : macrophage alvéolaire ayant phagocyté un sporocyste mature de *P. carinii* (flèche), coloré au MGG.

B : empreinte colorée au BTO montrant différents sporocystes de *P. carinii* (flèche) se superposant avec les fantômes de macrophages alvéolaires.

Nous avons alors étudié l'aptitude phagocytaire des macrophages alvéolaires *ex vivo* (Allaert et coll., 1996). Nous avons pour cela prélevé des macrophages par LBA sur des lapins de dix, trente et soixante jours et nous les avons mis en culture. Après deux heures de culture, nous les avons mis en contact avec *P. carinii* ou *Candida albicans* pendant trente minutes avant fixation et détermination du pourcentage de cellules ayant phagocyté. *C. albicans* a été utilisé comme témoin positif, étant donné qu'il exprime dans sa paroi le même type de molécules que *P. carinii* : β -glucanes et α -mannanes. Au cours de ces expériences, nous avons testé l'effet de la laminarine, inhibiteur de l'interaction β -glucanes-récepteur au complément de type 3 (CR-3) et du mannane de *Saccharomyces cerevisiae*, inhibiteur de l'interaction α -mannanes-récepteur au mannose du macrophage (MMR). En effet, on a décrit chez le rat une phagocytose de *P. carinii* dépendant du MMR (Ezekowitz et coll., 1991) et une production de facteur nécrosant les tumeurs (TNF)- α dépendant du CR-3, mais sans phagocytose (Hoffman et coll., 1993). Concernant la phagocytose de *C. albicans*, le comptage a été réalisé au microscope à fond clair après coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG). Par contre, *P. carinii* a été marqué à la fluoresceine et le comptage réalisé en associant épifluorescence et contraste interférentiel (Ezekowitz et coll., 1991). Les résultats obtenus sont les suivants :

- Concernant *C. albicans*, l'aptitude phagocytaire des macrophages alvéolaires de lapin apparaît conforme à ce que l'on observe dans d'autres modèles – plus de cent levures phagocytées pour cent macrophages, avec inhibition partielle à la fois par la laminarine et le mannane et inhibition pratiquement totale avec l'association laminarine-mannane. Cependant cette aptitude phagocytaire apparaît environ 50 % inférieure lorsque les macrophages sont prélevés durant la pneumocystose (sur des lapins de trente jours) par rapport à ce qui est obtenu avec des cellules prélevées sur des lapins de dix ou soixante jours (Allaert et coll., 1996).
- Concernant *P. carinii*, le niveau de phagocytose apparaît dans tous les cas extrêmement faible, de l'ordre de 10 % de celui obtenu avec *C. albicans*. Si l'on

peut observer la même différence entre les lapins de trente jours et les autres, le niveau de phagocytose est insuffisant pour que cette différence soit statistiquement significative.

Étant donné l'importance du TNF- α dans la résolution de la pneumocystose (Chen et coll., 1992), nous avons également testé la production de cette cytokine pro-inflammatoire par les macrophages alvéolaires de lapin. Ici aussi, des macrophages ont été prélevés par LBA sur des lapins de dix, trente et soixante jours et mis en culture. Après deux heures de culture, les macrophages ont été stimulés par *P. carinii* ou du LPS bactérien – comme témoin positif. Après 24 heures, les surnageants de culture ont été récupérés et l'activité TNF mesurée sur lignée fibroblastique murine L929 (lignée sensible à l'effet léthal du TNF). Les résultats obtenus (Allaert et coll., 1996) vont dans le même sens que précédemment :

- Le LPS induit une forte production de TNF par les macrophages alvéolaires de lapin (de l'ordre de 10^3 U.ml⁻¹), mais cette production est nettement diminuée lorsque les macrophages sont prélevés au cours de l'infection (-80 %).
- *P. carinii* n'induit aucune production significative de TNF par les macrophages alvéolaires en culture.

En résumé, il apparaît qu'*in vitro*, la fonction des macrophages alvéolaires est altérée durant la pneumocystose, sans qu'il soit possible pour le moment d'attribuer cette altération à l'action de *Pneumocystis* ou à un phénomène primitif chez le lapin dont le champignon profiterait. Il apparaît de plus qu'en l'absence d'opsonisation, ces macrophages n'interagissent que très faiblement avec *P. carinii*. Au contraire, les données histologiques semblent indiquer un rôle important du macrophage *in vivo* : lorsque l'alvéolite macrophagique est faible l'infection progresse alors que lorsqu'elle devient intense l'infection régresse ; *Pneumocystis* subit l'action des espèces activées de l'oxygène ; enfin de nombreuses images de phagocytose sont visibles. La discordance apparente entre ces résultats pourrait s'expliquer par l'apparition d'anticorps anti-*P. carinii* opsonisant les parasites et permettant leur reconnaissance par les macrophages alvéolaires ainsi que par l'activation tardive de ces derniers par des cytokines produites au cours du pic d'infection, notamment l'interféron- γ (*cf. infra*).

Cytokines.

Les cytokines sont des facteurs extrêmement importants de régulation de la réponse immune. Aussi avons-nous recherché dans le tissu pulmonaire l'expression des ARN messagers codant quatre d'entre elles (Allaert et coll., 1997). Nous avons suivi le niveau d'expression de ces molécules au cours de l'évolution de la pneumocystose spontanée. Les quatre molécules choisies sont :

- l'interleukine 8, chimiokine chimiotactique essentiellement pour les granulocytes neutrophiles ;
- la monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), chimiokine chimiotactique essentiellement pour les monocytes/macrophages ;
- l'interféron- γ , lymphokine de type 1 ;
- l'interleukine 10, lymphokine de type 2.

Sur trois lapins de chaque âge, un morceau de 1 g du lobe pulmonaire inférieur gauche a été prélevé après euthanasie et immédiatement congelé à -70°C . L'ARN a ensuite été extrait et transcrit en ADNc. L'amplification par PCR permettait d'obtenir des fragments visualisables par coloration au bromure d'éthidium après électrophorèse en gel d'agarose. Les résultats (tableau 3) ont montré que les deux chimiokines sont exprimées précocement durant l'infection (dès l'âge de vingt-cinq jours), l'expression de l'IL-8 durant jusqu'à l'âge de 45 jours. Ces résultats sont cohérents avec les observations histologiques : hypercellularité précoce mais disparaissant entre 50 et 60 jours. L'expression d'IFN- γ plutôt que d'IL-10 semble indiquer que la réponse lymphocytaire T est majoritairement de type 1, du moins

localement. Cependant ces résultats restent à confirmer sur un plus grand panel de cytokines.

| Âge (jours) | IL-8 | MCP-1 | IL-10 | IFN- γ |
|-------------|------|-------|-------|---------------|
| 10 | - | - | - | - |
| 20 | - | - | - | - |
| 25 | + | ± | - | - |
| 30 | + | ++ | ± | + |
| 35 | + | ++ | - | + |
| 40 | ± | - | - | - |
| 45 | + | - | - | ± |
| 50 | - | - | - | - |
| 60 | - | - | - | - |

tableau III : Expression des ARN_m de cytokines dans le poumon de lapin (- : pas de bande visible sur gel d'agarose ; ± : bande faible ou inconstante ; + : bande nette pour tous les lapins ; ++ : bande forte pour tous les lapins)(Allaert et coll., 1997).

Surfactant.

Le surfactant pulmonaire joue également un rôle dans la réponse immunitaire pulmonaire. Les protéines hydrophiles (SP-A et SP-D) en particulier ont des propriétés opsonisantes vis-à-vis de nombreux pathogènes. Concernant *Pneumocystis*, on a décrit la fixation de ces deux protéines à la surface du champignon, par interaction avec la MSG, mais aussi la diminution de la phagocytose de *P. carinii* par les macrophages en présence de SP-A (Koziel et coll., 1998 ; O'Riordan et coll., 1995 ; Zimmerman et coll., 1992). Il serait donc intéressant de préciser les modifications du contenu protéique du surfactant au cours de la pneumocystose (*cf. supra*). C'est pourquoi nous sommes actuellement en train d'étudier l'évolution de la distribution des quatre protéines spécifiques du surfactant au cours de l'infection par immunohistochimie.

Chapitre 3 : Hypothèses sur l'histoire naturelle de la PPC du lapin

Dans cette partie, nous allons proposer un modèle épidémiologique de la pneumocystose naturelle du lapin, basé sur les connaissances actuelles, et qui permettra d'envisager des pistes d'exploration de la pneumocystose humaine.

Sous-chapitre 3.1 : Acquisition de l'infection

Comme nous venons de le voir, la contamination du lapereau se fait essentiellement par voie transplacentaire. Étant donnée la fréquence apparente de cette forme de transmission, la voie aérienne ne semble pas jouer un rôle majeur dans cette première contamination, malgré son efficacité (démonstrée par la rapide recontamination de la colonie de Tours).

Sous-chapitre 3.2 : Primo-infection

Pendant les premières semaines de la vie, le parasite se multiplie lentement. Si *P. carinii* se localise dans le poumon dès la vie fœtale du lapin, l'importance des conditions locales sur le développement du parasite suggère que sa multiplication ne débute qu'après la naissance, une fois les poumons remplis d'air et fonction-

nels. Cette multiplication aboutit à l'affection décrite dans ce travail. L'infection massive par *P. carinii* induit alors une réponse immunitaire spécifique (objectivée par l'apparition d'anticorps sériques) qui permet au lapereau de contrôler la parasitose. En effet, les animaux incapables de monter une réponse immune spécifique (souris SCID, animaux *Nude*, animaux déplétés en lymphocytes T CD4⁺) sont sensibles à la pneumocystose. De plus la cinétique obtenue lors de l'infection expérimentale des lapins indemnes de *P. carinii* est identique à celle observée lors de l'infection naturelle (en prenant la naissance comme point de départ). Il semble donc bien que c'est l'acquisition d'une réponse immune spécifique qui soit responsable de la guérison et non des facteurs liés à des particularités de développement du lapin survenant autour de l'âge d'un mois. De plus, le développement de l'infection naturelle semble coïncider avec la disparition de l'immunité passive d'origine maternelle et la résolution de celle-ci avec l'apparition d'une immunité active. Cependant, le fait que l'infection ne se développe pas plus rapidement lors d'infection expérimentale, donc chez des animaux ne disposant pas d'immunité passive, laisse supposer que le temps de développement de l'infection est plus simplement lié au rythme de multiplication naturel de *P. carinii* f. sp. *oryctolagi*. Le temps de doublement de *Pneumocystis* chez le lapin a récemment été évalué à un jour et demi (Aliouat *et al.*, 1999). Cela correspond à une croissance assez lente mais plus rapide que celle calculée chez le rat (quatre jours et demi) ou chez la souris (plus de dix jours). Plutôt que de mettre en cause l'efficacité des anticorps maternels (le transfert de l'immunité humorale s'est révélé efficace chez la souris), on peut envisager un certain synchronisme de *P. carinii* avec son hôte, qui a conduit à l'adaptation de la vitesse de croissance du champignon à la vitesse de disparition des anticorps d'origine maternelle, au cours de la longue co-évolution des deux espèces.

Sous-chapitre 3.3 : Persistance de l'infection et recontaminations

Chez le lapin, *Pneumocystis carinii* peut facilement être retrouvé par PCR, voire en microscopie optique (mais en très faible nombre et non associé à des lésions histologiques) dans les poumons de lapins de tous âges. Cet animal semble donc particulièrement permissif vis-à-vis de l'infection à *P. carinii*.

Chapitre 4 : Transposition à l'homme : dans quelle direction chercher ?

Sous-chapitre 4.1 : Recherche de la primo-infection humaine

Les plus anciennes données concernant la primo-infection humaine sont des données sérologiques. Les prélèvements nécessaires à ces études étaient en effet relativement peu invasifs et pratiqués sur un relativement grand nombre de patients pour des raisons diverses. Une fraction pouvaient alors être utilisée pour la recherche d'anticorps anti-*Pneumocystis*.

Nous avons également plusieurs rapports, dont certains assez anciens, impliquant *Pneumocystis* dans des cas de pneumonie du jeune enfant (Brasfield et coll., 1987 ; Garcia et coll., 2000 ; Stagno et coll., 1981 ; Stagno et coll., 1980). *P. carinii* apparaît comme l'agent de 17 à 18 % des cas étudiés (Brasfield et coll., 1987 ; Stagno et coll., 1981), et l'apnée comme le symptôme le plus caractéristique de ce pathogène. *Pneumocystis carinii* a également été récemment associé à la mort subite du nourrisson au Chili (où la loi impose l'autopsie systématique des enfants morts de ce syndrome) et à Oxford (Royaume-Uni). *P. carinii* a été retrouvé dans les

poumons de 35 % des enfants décédés de mort subite contre 3 % des enfants morts de causes diverses (Vargas et coll., 1999).

Cependant, la difficulté qu'il y a à mettre en évidence *P. carinii* est le principal obstacle à la recherche parasitologique de la primo-infection chez l'enfant. Les techniques traditionnelles de coloration nécessitent du temps et un personnel qualifié. Et y compris dans ces conditions leur manque de sensibilité est tel que le résultat est parfois négatif même en cas d'infection clinique. Elles ne sont donc envisageables que sur des prélèvements suffisamment représentatifs, donc profonds : LBA, biopsie pulmonaire. Ces prélèvements invasifs sont absolument inenvisageables à titre expérimental chez l'homme, en l'absence d'impératifs cliniques. Les techniques moléculaires (PCR) ont permis des progrès énormes en sensibilité. Il devient possible de proposer des protocoles d'expérimentation utilisant des prélèvements peu invasifs (lavage oropharyngé, aspiration nasopharyngée, écouvillonnage nasal profond) donc réalisables sur de plus larges échantillons de patients. Si la sensibilité de tels prélèvements, qui n'atteignent pas le site de développement du champignon (l'alvéole), reste limitée et moins documentée, elle atteint quand même 80 % chez les patients atteints de PPC et 5 % du personnel hospitalier en contact avec des individus à risque montre un lavage oropharyngé positif (Durand-Joly, communication personnelle).

Les études actuellement en cours pour rechercher la primo-infection à *P. carinii* associent recherche sérologique et recherche du champignon par PCR dans des prélèvements effectués sur un maximum de jeunes enfants se présentant dans les services de pédiatrie pour différentes affections respiratoires. Les premiers résultats semblent confirmer l'implication de *Pneumocystis* dans un nombre important (32 %) d'infections respiratoires du jeune enfant (Vargas et coll., 2001).

Sous-chapitre 4.2 : Recherche des sources d'infection

Comme nous l'avons déjà précisé, *Pneumocystis* est à la fois un organisme rare et fréquent. Rare parce qu'on ne le retrouve qu'exceptionnellement dans les poumons de personnes non immunodéprimées, et fréquent parce que la primo-infection semble quasi-systématique et que la maladie est répandue parmi les populations à risque. Ce qui pose la question suivante : les seuls enfants faisant une primo-infection et immunodéprimés présentant une infection clinique suffisent-ils à entretenir une population de champignons assez nombreuse pour expliquer la fréquence avec laquelle ces populations se contaminent ?

Cette question a conduit à proposer l'existence d'une forme de *P. carinii* se développant en dehors de son hôte mammalien. Cependant, si des séquences d'ADN de *Pneumocystis* ont été identifiées dans l'air, y compris dans des zones qui ne sont pas directement en contact avec des personnes que l'on sait infectées (air de Paris, campagne anglaise (Philippe et coll., 1999 ; Wakefield, 1994)), aucun organisme en développement n'a jamais été retrouvé en dehors de son hôte. Si les outils moléculaires permettent aujourd'hui d'identifier *P. carinii* de façon à la fois spécifique et sensible, le champs de recherche est immense : en effet, la seule hypothèse que l'on puisse poser avec quasi-certitude *a priori* est que le champignon doit se développer dans l'environnement de son hôte, afin de pouvoir le recontaminer par voie aérienne. Aller « à la pêche » à l'aveugle semble donc présenter fort peu de chances de succès. Ici, l'utilisation du lapin comme modèle peut être s'avérer utile, l'environnement d'une animalerie étant plus facile à maîtriser que l'environnement ouvert dans lequel nous évoluons. Et si l'on sait que l'on peut entretenir *P. carinii* dans des colonies de souris SCID, la situation est fort différente, car s'agissant d'animaux sensibles à l'infection clinique, les quantités de parasites hébergés sont beaucoup plus importantes, rendant un hypothétique réservoir environnemental beaucoup moins nécessaire.

Une autre hypothèse qui avait été formulée – et acceptée – depuis fort longtemps mais largement remise en cause depuis, est l'existence de porteurs sains de *P. carinii* (Dei-Cas et coll., 1992). On a en effet longtemps cru que nous portions tous un petit nombre d'organismes dans nos poumons, et que ces organismes se multipliaient lorsque les conditions immunologiques le leur permettaient. Cependant, des outils extrêmement sensibles comme l'immunofluorescence et surtout la PCR n'ont pas permis de retrouver *P. carinii* dans les poumons de cadavres de personnes mortes d'autres causes (Millard et Heryet, 1988 ; Peters et coll., 1992). Des expériences de tentatives de réactivation chez la souris de pneumocystose après résolution ont confirmé chez cet animal l'élimination totale du parasite. Il semble donc que dans la majorité des cas, *P. carinii* soit totalement absent du poumon des personnes immunocompétentes. Mais des études récentes ont permis d'une part de mettre en évidence un portage de *P. carinii* par des personnes immunodéprimées mais n'ayant pas développé de pneumocystose clinique au cours du suivi, et d'autre part, un portage transitoire du champignon par du personnel médical sain soignant des personnes atteintes de pneumocystose (Nevez et coll., 1999b ; Vargas et coll., 2000). Ce dernier élément, associé au fait que l'on connaît des cas de transmission directe de malade à individu sensible, pose des questions concernant les mesures à prendre pour éviter la transmission de la pneumocystose au sein de l'hôpital, sachant que pour le moment les patients atteints de cette infection ne sont généralement pas isolés. L'utilisation d'un modèle animal pour l'étude du portage sain pose la question de la plus ou moins grande permissivité des différentes espèces vis-à-vis de leur *Pneumocystis*. Il apparaît en effet que le lapin semble très permissif (il est fréquent d'obtenir des PCR positives sur les poumons d'animaux adultes et en bonne santé). La souris, au contraire, l'est très peu (le parasite est rapidement éliminé après résolution de l'infection). Le rat est dans une situation intermédiaire (on a décrit une persistance du parasite dans le poumon de plus d'un an après résolution de l'infection). Quant à l'homme, il semble plutôt peu permissif au vu des études nécropsiques.

Si aucun réservoir environnemental n'est découvert et que le portage sain du champignon reste limité à un petit nombre d'individus pendant de courtes durées, il faudra considérer les enfants effectuant leur primo-infection comme le principal réservoir du parasite. Il sera alors intéressant de suivre l'évolution des populations de *Pneumocystis* au sein de la population humaine (enfants susceptibles à la primo-infection et personnes sensibles entrant en contact avec elles).

Sous-chapitre 4.3 : Recherche des facteurs immunitaires impliqués dans la protection

Afin de mieux cerner les populations à risque et de développer des mesures de prophylaxie et de thérapeutique immunologiques, il est nécessaire de mieux comprendre les facteurs immunitaires impliqués dans la protection vis-à-vis de l'infection à *P. carinii*, ces facteurs apparaissant déterminants pour le développement de la maladie.

Les anticorps semblant jouer un rôle important, plusieurs équipes ont cherché, chez la souris, à déterminer les antigènes induisant une immunité protectrice, et à développer des techniques d'immunisation permettant de maintenir des taux d'anticorps efficaces au cours d'immunodépresseions sévères. Certains résultats chez cet animal sont encourageants (Garvy et coll., 1997).

Le macrophage ayant lui aussi une part non négligeable dans la lutte contre *P. carinii*, et voyant ses populations moins diminuées lors de l'infection par le VIH que le lymphocyte T CD4⁺, il peut être intéressant de déterminer plus avant les conditions de son efficacité, afin d'espérer les restaurer, au moins en partie, au cours de la maladie. Dans cette perspective, les résultats déjà obtenus chez le lapin,

en-dehors de toute immunodépression induite, offrent quelques bases qu'il serait utile de développer.

Enfin, une inflammation inefficace dans la maîtrise de l'infection mais particulièrement délétère pour l'environnement pulmonaire joue un rôle important dans la physiopathologie de la pneumocystose. L'étude des conditions et des mécanismes d'installation de cette réponse inflammatoire permettrait d'améliorer la prise en charge de cette maladie. Malheureusement, aucun modèle animal n'offre à l'heure actuelle un tel tableau inflammatoire associé à un développement continu de l'infection.

Sous-chapitre 4.4 : Outils nécessaires

Pour l'étude de la physiologie du parasite, de son mode de reproduction, de ses conditions de développement et pour la mise au point de modèle d'infection, la culture de *P. carinii* f. sp. *hominis* est pratiquement un pré-requis. Cependant pour l'heure, malgré de nombreux efforts, et en dehors des rapports non confirmés de Merali et coll. (Merali et coll., 1999), les progrès réalisés dans ce domaine restent limités. De plus, les conditions de travail sont beaucoup plus drastiques qu'avec les organismes d'origine animale car les prélèvements sont souvent contaminés par le VIH. Les données connues à l'heure actuelle laissent pourtant espérer à relativement court terme des résultats analogues à ce que l'on obtient chez le rat, c'est-à-dire une culture à court terme, qui constituera un progrès appréciable mais n'éliminera pas la dépendance vis-à-vis des prélèvements chez l'homme, prélèvements sporadiques et pauvres en parasites.

Les études épidémiologiques bénéficieront également du développement des outils de typage moléculaire. Le principal outil de typage actuellement utilisé pour *P. carinii* f. sp. *hominis* est la séquence des deux espaceurs internes transcrits (ITS 1 et 2) du gène de l'ARN ribosomal (Wakefield, 1998a). Or ces séquences présentent une telle variabilité, un tel pouvoir discriminant, qu'elles se révèlent peu adaptées au suivi épidémiologique de grandes populations. Il faudrait donc définir des marqueurs mieux adaptés. Le projet actuel de séquençage du génome de *P. carinii* (f. sp. *carinii*) pourra peut-être apporter une contribution utile dans ce domaine (Cushion et Arnold, 1997). La définition de tels outils de typage pour *P. carinii* f. sp. *oryctolagi* sera également très utile au développement de l'épidémiologie dans le modèle lapin.

Enfin, la recherche et la standardisation de méthodes de prélèvement à la fois peu invasives et les plus riches possibles en *Pneumocystis* pourrait améliorer la faisabilité d'études épidémiologiques de grande envergure chez l'homme. Les deux méthodes actuellement employées, et qui ont permis les avancées que l'on sait, sont le lavage oropharyngé et l'écouvillonnage nasal profond, qui semble intéressant bien que plus invasif (Vargas et coll., 2000).

Chapitre 5 : Conclusion

La pneumonie à *Pneumocystis carinii* a acquis une place importante en pathologie humaine au cours des vingt dernières années, avec le développement des cas d'immunodépression pathologique ou iatrogène. Elle reste aujourd'hui une des premières infections opportunistes survenant chez les patients sidéens, et la première infection inaugurant le stade SIDA. Des progrès ont été réalisés, notamment avec la mise en place d'une prophylaxie systématique chez certaines populations à risque et l'amélioration de la prise en charge de l'infection par le VIH. Cependant, il semble difficile de progresser beaucoup plus sans une meilleure connaissance du champignon. Si l'étude de la physiologie du parasite peut ouvrir la voie à de

nouvelles thérapeutiques, la compréhension de son épidémiologie, et notamment de ses modes de transmission est nécessaire à l'évaluation du danger et à sa prévention pour les personnes sensibles. Le développement d'outils moléculaires a pu apporter des éléments nouveaux dans ce domaine. Mais l'existence d'un modèle d'infection naturelle permettra d'aller encore plus loin dans cette compréhension. Si l'infection du lapin présente quelques différences par rapport à l'infection humaine, elle reste à ce jour le seul modèle utilisable dans cette optique, et nous sommes loin d'avoir épuisé toutes ses possibilités. Il nous semble donc intéressant de poursuivre son développement, en s'attachant particulièrement à mieux appréhender l'histoire naturelle de l'infection.

Bibliographie

- AKONO, Z. et PALLUAULT, F.
Pneumocystis carinii Delanoë et Delanoë, 1912 agent d'une maladie en extension : la pneumocystose ; II. Aspects immunologiques.
L'année biologique, juin 1994, **33**, 2, 81-111.
- ALIOUAT, E.-M.
Étude de l'expression phénotypique de la diversité génétique de *Pneumocystis carinii* : infectivité et spécificité parasitaire.
Th. Nv. Rég. : Sciences de la Vie et de la Santé : Lille, USTL : 1995. 103 p.
- ALIOUAT, E.-M., DEI-CAS, E., OUAISSI, A., PALLUAULT, F., SOULEZ, B. et CAMUS, D.
In vitro attachment of *Pneumocystis carinii* from mouse and rat origin.
Biol Cell, 1993, **77**, 2, 209-17.
- ALIOUAT, E.-M., DUJARDIN, L., MARTINEZ, A., DURIEZ, T., RICARD, I. et DEI-CAS, E.
Pneumocystis carinii growth kinetics in culture systems and in hosts: involvement of each life cycle parasite stage.
J Eukaryot Microbiol, 1999, **46**, 5, 116S-117S.
- ALIOUAT, E.-M., ESCAMILLA, R., CARIVEN, C., VIEU, C., MULLET, C., DEI-CAS, E. et PRÉVOST, M.-C.
Surfactant changes during experimental pneumocystosis are related to *Pneumocystis* development.
Eur Respir J, 1998, **11**, 3, 542-7.
- ALIOUAT, E.-M., MAZARS, E., DEI-CAS, E., DELCOURT, P., BILLAUT, P. et CAMUS, D.
Pneumocystis cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity.
J Eukaryot Microbiol, 1994, **41**, 5, 71S.
- ALLAERT, A.
Le macrophage alvéolaire dans la pneumocystose spontanée du lapin au sevrage.
DEA : Parasitologie : Lille, Université du Droit et de la Santé – Lille II : 1996. 31 p.
- ALLAERT, A., JOUAULT, T., RAJAGOPALAN-LEVASSEUR, P., ÖDBERG-FERRAGUT, C., DEI-CAS, E. et CAMUS, D.
Detection of cytokine mRNA in the lung during the spontaneous *Pneumocystis carinii* pneumonia of the young rabbit.
J Eukaryot Microbiol, 1997, **44**, 6, 45S.
- ALLAERT, A., RAJAGOPALAN-LEVASSEUR, P., JOUAULT, T., CAMUS, D. et DEI-CAS, E.
Role of alveolar macrophages during the spontaneous *Pneumocystis carinii* pneumonia of rabbit at weaning.
J Eukaryot Microbiol, 1996, **43**, 5, 23S.
- ATZORI, C., ALIOUAT, E.-M., BARTLETT, M. S., DUJARDIN, L., CARGNEL, A. et DEI-CAS, E.

Current *in vitro* culture systems for *Pneumocystis*.
FEMS Immunol Med Microbiol, 1998, **22**, 1-2, 169-72.

BARTLETT, M. S., LEE, C. H., LU, J. J., BAUER, N. L., BETTZ, J. F.,
 McLAUGHLIN, G. L. et SMITH, J. W.
Pneumocystis carinii detected in air.
J Eukaryot Microbiol, 1994, **41**, 5, 75S.

BECK, J. M., NEWBURY, R. L. et PALMER, B. E.
Pneumocystis carinii pneumonia in SCID mice induced by viable organisms propa-
 gated *in vitro*.
Infect Immun, 1996, **64**, 11, 4643-7.

BILLE-HANSEN, V., JORSAL, S. E., HENRIKSEN, S. A. et SETTNES, O. P.
Pneumocystis carinii pneumonia in Danish piglets.
Vet Rec, 1990, **127**, 16, 407-8.

BRASFIELD, D. M., STAGNO, S., WHITLEY, R. J., CLOUD, G., CASSELL, G. et
 TILLER, R. E.
 Infant pneumonitis associated with cytomegalovirus, *Chlamydia*, *Pneumocystis*, and
Ureaplasma: follow-up.
Pediatrics, 1987, **79**, 1, 76-83.

BUCHANAN, G.
 Note on the developmental forms of *Trypanosoma brucei* (*pecaudi*) in the internal
 organs, auxillary glands and bone marrow of the gerbil.
Proceedings of the Royal Society of London, 1911, **B**, LXXXIV, 161.

CANO, S., CAPOTE, F., PEREIRA, A., CALDERON, E. et CASTILLO, J.
Pneumocystis carinii pneumonia in patients without predisposing illnesses. Acute
 episode and follow-up of five cases.
Chest, 1993, **104**, 2, 376-81.

CARINI, A.
 Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*.
Arch Soc Med Ci Sao Paulo, août 1910, **16**.

CARINI, A. et MACIEL, J.
 Ueber *Pneumocystis carinii*.
Centr f Bakt, 1916, **I**, LXXVII, 46.

CDC
 USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons
 infected with Human Immunodeficiency Virus.
MMWR, 1999a, **48**, RR-10, 4-7.

CDC
 Surveillance for AIDS-defining opportunistic illnesses, 1992-1997.
MMWR, 1999b, **48**, SS-2, 1-20.

CÉRÉ, N., DROUET-VIARD, F., DEI-CAS, E., CHANTELOUP, N. et COUDERT, P.
In utero transmission of *Pneumocystis carinii* sp. f. *oryctolagi*.
Parasite, 1997a, **4**, 4, 325-30.

CÉRÉ, N., POLACK, B. et COUDERT, P.
 Obtaining a *Pneumocystis*-free rabbit breeding stock (*Oryctolagus cuniculus*).
J Eukaryot Microbiol, 1997b, **44**, 6, 19S-20S.

CHAGAS, C.
 Nova trypanozomiaze humana.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 1909, **1**, 159-218 + Estampas 9-13.

CHAGAS, C.
 Le cycle de *Schizotrypanum cruzi* chez l'homme et les animaux de laboratoire.
Bull Soc Path Exot, 1911, **4**, 467-71.

CHEN, W., HAVELL, E. A. et HARMSSEN, A. G.
 Importance of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in
 host resistance against *Pneumocystis carinii* infection.
Infect Immun, 1992, **60**, 4, 1279-84.

CHO, S. R., PARK, Y. G., MOON, H. N., LEE, S. H. et HONG, S. T.

Karyotypes of *Pneumocystis carinii* derived from several mammals.
Korean J Parasitol, 1999, **37**, 4, 271-5.

CREUSY, C., BAHON-LE CAPON, J., FLEURISSE, L., MULLET, C., DRIDBA, M.,
 CAILLIEZ, J.-C., ANTOINE, M., CAMUS, D. et DEI-CAS, E.
Pneumocystis carinii pneumonia in four mammal species: histopathology and ultra-
 structure.
J Eukaryot Microbiol, 1996, **43**, 5, 47S-48S.

CUSHION, M. T. et ARNOLD, J.
 Proposal for a *Pneumocystis* genome project.
J Eukaryot Microbiol, 1997, **44**, 6, 7S.

CUSHION, M. T., LINKE, M. J., COLLINS, M., KEELY, S. P. et STRINGER, J. R.
 The minimum number of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* organisms required to
 establish infections is very low.
J Eukaryot Microbiol, 1999, **46**, 5, 111S.

DEI-CAS, E.
Pneumocystis infections: the iceberg?
Med Mycol, 2000, **38**, Suppl. 1, 23-32.

DEI-CAS, E. et ALIOUAT, E.-M.
Archiascomycetes, Pneumocystidales. Genus: *Pneumocystis* (Taxonomy and Iconogra-
 phy).
 In : DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J.
 Atlas of Clinical Fungi.
 Utrecht : Centralbureau voor Schimmelcultures, 2000, 176-177.

DEI-CAS, E., BRUN-PASCAUD, M., BILLE-HANSEN, V., ALLAERT, A. et
 ALIOUAT, E.-M.
 Animal models of pneumocystosis.
FEMS Immunol Med Microbiol, 1998, **22**, 1-2, 163-8.

DEI-CAS, E., CAILLIEZ, J.-C., PALLUAULT, F., ALIOUAT, E.-M., MAZARS, E.,
 SOULEZ, B., SUPPIN, J. et CAMUS, D.
 Is *Pneumocystis carinii* a deep mycosis-like agent?
Eur J Epidemiol, 1992, **8**, 3, 460-70.

DEI-CAS, E., JACKSON, H., PALLUAULT, F., ALIOUAT, E.-M., HANCOCK, V.,
 SOULEZ, B. et CAMUS, D.
 Ultrastructural observations on the attachment of *Pneumocystis carinii* *in vitro*.
J Protozool, 1991, **38**, 6, 205S-207S.

DEI-CAS, E., MAZARS, E., ÖDBERG-FERRAGUT, C., DURAND, I., ALIOUAT,
 E.-M., DRIDBA, M., PALLUAULT, F., CAILLIEZ, J.-C., SÉGUY, N., TIBAYRENC,
 M., MULLET C., CREUSY, C. et CAMUS, D.
 Ultrastructural, genomic, isoenzymatic and biological features make it possible to
 distinguish rabbit *Pneumocystis* from other mammal *Pneumocystis* strains.
J Eukaryot Microbiol, 1994, **41**, 5, 84S.

DEI-CAS, E., SOULEZ, B. et CAMUS, D.
 Ultrastructural study of *Pneumocystis carinii* in explant cultures of rabbit lung and
 in cultures with and without feeder cells.
J Protozool, 1989, **36**, 1, 55S-57S.

DELANOË, P. et DELANOË, M.
 Sur les rapports des kystes de Carini des poumons des rats avec le *Trypanosoma*
lewisi.
CR Acad Sci (Paris), 1912, **155**, 658-60.

DEMANCHE, C., BARTHÉLÉMY, M., PETIT, T., POLACK, B., WAKEFIELD, A.
 E., DEI-CAS, E. et GUILLOT, J.
 Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity
 and suggests coevolution.
J Clin Microbiol, 2001, **39**, 6, 2126-33.

DRIDBA, M.



Les réactions inflammatoires locales au cours de la pneumocystose spontanée chez le lapereau.

DEA : Parasitologie : Lille, Université du Droit et de la Santé – Lille II : 1995. 29 p.
DUMOULIN, A., MAZARS, E., SÉGUY, N., GARGALLO-VIOLA, D., VARGAS, S., CAILLIEZ, J. C., ALIOUAT, E.-M., WAKEFIELD, A. E. et DEI-CAS, E.

Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000, **19**, 9, 671-8.

DURAND-JOLY, I., WAKEFIELD, A. E., PALMER, R. J., DENIS, C.-M., CREUSY, C., FLEURISSE, L., RICARD, I., GUT, J.-P. et DEI-CAS, E.

Ultrastructural and molecular characterization of *Pneumocystis carinii* isolated from a rhesus monkey (*Macaca mulata*).

Med Mycol, 2000, **38**, 1, 61-72.

EDMAN, J. C., HATTON, T. W., NAM, M., TURNER, R., MEI, Q., ANGUS, C. W. et KOVACS, J. A.

A single expression site with a conserved leader sequence regulates variation of expression of the *Pneumocystis carinii* family of major surface glycoprotein genes.

DNA Cell Biol, 1996, **15**, 11, 989-99.

EIJKING, E. P., VAN DAAL, G. J., TENBRINCK, R., LUIJENDIJK, A., SLUITERS, J. F., HANNAPPEL, E. et LACHMANN, B.

Effect of surfactant replacement on *Pneumocystis carinii* pneumonia in rats.

Intensive Care Med, 1991, **17**, 8, 475-8.

ELVIN, K., BJORKMAN, A., HEURLIN, N., ERIKSSON, B. M., BARKHOLT, L. et LINDER, E.

Seroreactivity to *Pneumocystis carinii* in patients with AIDS versus other immunosuppressed patients.

Scand J Infect Dis, 1994, **26**, 1, 33-40.

ERIKSSON, O. E.

Pneumocystis carinii, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (*Pneumocystidaceae*, *Pneumocystidales*, *Ascomycota*).

Systema Ascomycetum, 1994, **13**, 2, 165-180.

ESCAMILLA, R., PRÉVOST, M.-C., CARIVEN, C., HERMANT, C., KREMPF, M. et CHAP, H.

Bronchoalveolar lavage phospholipid abnormalities in HIV-infected patients.

Eur Respir J, 1993, **6**, 9, 1301-7.

ESCAMILLA, R., PRÉVOST, M.-C., HERMANT, C., CARATERO, A., CARIVEN, C. et KREMPF, M.

Surfactant analysis during *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients.

Chest, 1992, **101**, 6, 1558-62.

EUZÉBY, J.

Protozoologie médicale comparée. Vol. II.

Lyon : Fondation Marcel Mérieux, 1987. 475 p.

EUZÉBY, J.

Mycologie médicale comparée. Tome I.

Lyon : Fondation Marcel Mérieux, 1992. 452 p.

EZEKOWITZ, R. A., WILLIAMS, D. J., KOZIEL, H., ARMSTRONG, M. Y., WARNER, A., RICHARDS, F. F. et ROSE, R. M.

Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor.

Nature, 1991, **351**, 6322, 155-8.

FOLLANSBEE, S. E., BUSCH, D. F., WOFSEY, C. B., COLEMAN, D. L., GULLET, J., AURIGEMMA, G. P., ROSS, T., HADLEY, W. K. et DREW, W. L.

An outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men.

Ann Intern Med, 1982, **96**, 6 Pt 1, 705-13.

FRENKEL, J. K.

Pneumocystis jiroveci n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology.
Natl Cancer Inst Monogr, 1976, **43**, 13-30.

GARCIA, C. A., DELPIANO, L., PRADO, F., PONCE, C. A., AMAYA, M. et VARGAS, S. L.
 Apnea severa: signo precoz de neumonia por *Pneumocystis carinii* en un lactante VIH negativo.
Rev Med Chil, 2000, **128**, 4, 425-9.

GARVY, B. A. et HARMSSEN, A. G.
 Susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection: host responses of neonatal mice from immune or naive mothers and of immune or naive adults.
Infect Immun, 1996, **64**, 10, 3987-92.

GARVY, B. A., WILEY, J. A., GIGLIOTTI, F. et HARMSSEN, A. G.
 Protection against *Pneumocystis carinii* pneumonia by antibodies generated from either T helper 1 or T helper 2 responses.
Infect Immun, 1997, **65**, 12, 5052-6.

GIGLIOTTI, F. et HUGHES, W. T.
 Passive immunoprophylaxis with specific monoclonal antibody confers partial protection against *Pneumocystis carinii* pneumonitis in animal models.
J Clin Invest, 1988, **81**, 6, 1666-8.

GIGLIOTTI, F., WILEY, J. A. et HARMSSEN, A. G.
 Immunization with *Pneumocystis carinii* gpA is immunogenic but not protective in a mouse model of *P. carinii* pneumonia.
Infect Immun, 1998, **66**, 7, 3179-82.

GOTTLIEB, M. S., SCHROFF, R., SCHANKER, H. M., WEISMAN, J. D., FAN, P. T., WOLF, R. A. et SAXON, A.
Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.
N Engl J Med, 1981, **305**, 24, 1425-31.

GOYOT, P., BO NIELSEN, P. et MOJON, M.
 La technique d'immuno-fluorescence indirecte appliquée à la comparaison des antigènes *Pneumocystis carinii* d'origine humaine et animale (rat & lapin).
Bulletin de la Société Française de Parasitologie, 1984, **2**, 143-6.

HARMSSEN, A. G., CHEN, W. et GIGLIOTTI, F. (1995).
 Active immunity to *Pneumocystis carinii* reinfection in T-cell-depleted mice.
Infect Immun, 1995, **63**, 7, 2391-5.

HARMSSEN, A. G. et STANKIEWICZ, M.
 Requirement for CD4+ cells in resistance to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice.
J Exp Med, 1990, **172**, 3, 937-45.

HAUSER, P. M., BLANC, D. S., SUDRE, P., MANOLOFF, E. S., NAHIMANA, A., BILLE, J., WEBER, R. et FRANCIOLI, P.
 Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing.
Aids, 2001, **15**, 4, 461-6.

HOFFMAN, A. G., LAWRENCE, M. G., OGNIBENE, F. P., SUFFREDINI, A. F., LIPSCHIK, G. Y., KOVACS, J. A., MASUR, H. et SHELFHAMER, J. H.
 Reduction of pulmonary surfactant in patients with human immunodeficiency virus infection and *Pneumocystis carinii* pneumonia.
Chest, 1992, **102**, 6, 1730-6.

HOFFMAN, O. A., STANDING, J. E. et LIMPER, A. H.
Pneumocystis carinii stimulates tumor necrosis factor-alpha release from alveolar macrophages through a beta-glucan-mediated mechanism.
J Immunol, 1993, **150**, 9, 3932-40.

HUGHES, W. T.

Current issues in the epidemiology, transmission, and reactivation of *Pneumocystis carinii*.
Semin Respir Infect, 1998, **13**, 4, 283-8.

HUGHES, W. T., FELDMAN, S. et SANYAL, S. K.
 Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis with trimethoprim- sulfamethoxazole.
Can Med Assoc J, 1975, **112**, 13 n° spéc., 47-50.

HUGHES, W. T., McNABB, P. C., MAKRES, T. D. et FELDMAN, S.
 Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis.
Antimicrob Agents Chemother, 1974, **5**, 3, 289-93.

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

KOZIEL, H., PHELPS, D. S., FISHMAN, J. A., ARMSTRONG, M. Y., RICHARDS, F. F. et ROSE, R. M.
 Surfactant protein-A reduces binding and phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by human alveolar macrophages *in vitro*.
Am J Respir Cell Mol Biol, 1998, **18**, 6, 834-43.

LAING, R. B.
 Nosocomial infections in patients with HIV disease.
J Hosp Infect, 1999, **43**, 3, 179-85.

LATOUCHE, S., ORTONA, E., MAZARS, E., MARGUTTI, P., TAMBURRINI, E., SIRACUSANO, A., GUYOT, K., NIGOU, M. et ROUX, P.
 Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions.
J Clin Microbiol, 1997a, **35**, 2, 383-7.

LATOUCHE, S., POIROT, J. L., BERTRAND, V. et ROUX, P.
Pneumocystis carinii hominis sequencing for reactivation or *de novo* contamination and for hypothetical transmission from person to person.
APMIS, 1997b, **77**, Suppl., 11-3.

LEIGH, T. R., MILLETT, M. J., JAMESON, B. et COLLINS, J. V.
 Serum titres of *Pneumocystis carinii* antibody in health care workers caring for patients with AIDS.
Thorax, 1993, **48**, 6, 619-21.

LEOUNG, G. S. (page publiée en juin 1998 et consultée le 19 juin 2001). Pneumocystosis and HIV in PEIPERL, L. et VOLBERDING, P. (Eds), University of California San Francisco et San Francisco General Hospital, *HIV InSite Knowledge Base*, [en ligne]. Adresse URL : <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite.jsp?page=KB>.

LIDMAN, C., OLSSON, M., BJORKMAN, A. et ELVIN, K.
 No evidence of nosocomial *Pneumocystis carinii* infection via health care personnel.
Scand J Infect Dis, 1997, **29**, 1, 63-4.

LIMPER, A. H., CROUCH, E. C., O'RIORDAN, D. M., CHANG, D., VUK-PAVLOVIC, Z., STANDING, J. E., KWON, K. Y. et ADLAKHA, A.
 Surfactant protein-D modulates interaction of *Pneumocystis carinii* with alveolar macrophages.
J Lab Clin Med, 1995, **126**, 5, 416-22.

LIMPER, A. H., HOYTE, J. S. et STANDING, J. E.
 The role of alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* degradation and clearance from the lung.
J Clin Invest, 1997, **99**, 9, 2110-7.

LIMPER, A. H., STANDING, J. E., HOFFMAN, O. A., CASTRO, M. et NEESE, L. W.
 Vitronectin binds to *Pneumocystis carinii* and mediates organism attachment to cultured lung epithelial cells.
Infect Immun, 1993, **61**, 10, 4302-9.

LU, J. J., BARTLETT, M. S., SHAW, M. M., QUEENER, S. F., SMITH, J. W., ORTIZ-RIVERA, M., LEIBOWITZ, M. J. et LEE, C. H.
 Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes.
J Clin Microbiol, 1994, **32**, 12, 2904-12.

LUNDGREN, B., KOVACS, J. A., NELSON, N. N., STOCK, F., MARTINEZ, A. et GILL, V. J.
Pneumocystis carinii and specific fungi have a common epitope, identified by a monoclonal antibody.
J Clin Microbiol, 1992, **30**, 2, 391-5.

LUNDGREN, B. et WAKEFIELD, A. E.
 PCR for detecting *Pneumocystis carinii* in clinical or environmental samples.
FEMS Immunol Med Microbiol, 1998, **22**, 1-2, 97-101.

MASUR, H., MICHELIS, M. A., GREENE, J. B., ONORATO, I., STOUWE, R. A., HOLZMAN, R. S., WORMSER, G., BRETTMAN, L., LANGE, M., MURRAY, H. W. et CUNNINGHAM-RUNDLES, S.
 An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction.
N Engl J Med, 1981, **305**, 24, 1431-8.

MATSUMOTO, Y. et YOSHIDA, Y.
 Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts.
J Protozool, 1984, **31**, 3, 420-8.

MAZARS, E., GUYOT, K., DURAND, I., DEI-CAS, E., BOUCHER, S., ABDERRAZAK, S. B., BANULS, A. L., TibayrEnc, M. et CAMUS, D.
 Isoenzyme diversity in *Pneumocystis carinii* from rats, mice, and rabbits.
J Infect Dis, 1997a, **175**, 3, 655-60.

MAZARS, E., GUYOT, K., FOURMAINTRAUX, S., RENAUD, F., PÉTAVY, F., CAMUS, D. et DEI-CAS, E.
 Detection of *Pneumocystis* in European wild animals.
J Eukaryot Microbiol, 1997b, **44**, 6, 39S.

MERALI, S., FREVERT, U., WILLIAMS, J. H., CHIN, K., BRYAN, R. et CLARKSON, A. B., Jr.
 Continuous axenic cultivation of *Pneumocystis carinii*.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, **96**, 5, 2402-7.

MEUWISSEN, J. H., TAUBER, I., LEEUWENBERG, A. D., BECKERS, P. J. et SIEBEN, M.
 Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans.
J Infect Dis, 1977, **136**, 1, 43-9.

MILLARD, P. R. et HERYET, A. R.
 Observations favouring *Pneumocystis carinii* pneumonia as a primary infection: a monoclonal antibody study on paraffin sections.
J Pathol, 1988, **154**, 4, 365-70.

MONTGOMERY, A. B.
 Prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients infected with the human immunodeficiency virus type 1.
Semin Respir Infect, 1989, **4**, 4, 311-7.

MORTIER, E., POUCHOT, J., BOSSI, P. et MOLINIÉ, V.
 Maternal-fetal transmission of *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus infection.
N Engl J Med, 1995, **332**, 12, 825.

NEVEZ, G., RACCURT, C., JOUNIEAUX, V., DEI-CAS, E. et MAZARS, E.
 Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients.
AIDS, 1999a, **13**, 4, 535-6.

NEVEZ, G., RACCURT, C., VINCENT, P., JOUNIEAUX, V. et DEI-CAS, E.

Pulmonary colonization with *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus-negative patients: assessing risk with blood CD4+ T cell counts.
Clin Infect Dis, 1999b, **29**, 5, 1331-2.

NIELSEN, M. H. et SETTNES, O. P.
Morphology of *Pneumocystis carinii* and activation of the plasmalemmal vesicular system in alveolar epithelial cells of the host. An ultrastructural study.
APMIS, 1991, **99**, 3, 219-25.

O'RIORDAN, D. M., STANDING, J. E., KWON, K. Y., CHANG, D., CROUCH, E. C. et LIMPER, A. H.
Surfactant protein D interacts with *Pneumocystis carinii* and mediates organism adherence to alveolar macrophages.
J Clin Invest, 1995, **95**, 6, 2699-710.

PALLUAULT, F., SLOMIANNY, C., SOULEZ, B., DEI-CAS, E. et CAMUS, D.
High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I. Epon embedding.
Parasitol Res, 1992, **78**, 5, 437-44.

PEGLOW, S. L., SMULIAN, A. G., LINKE, M. J., POGUE, C. L., NURRE, S., CRISLER, J., PHAIR, J., GOLD, J. W., ARMSTRONG, D. et WALZER, P. D.
Serologic responses to *Pneumocystis carinii* antigens in health and disease.
J Infect Dis, 1990, **161**, 2, 296-306.

PETERS, S. E., WAKEFIELD, A. E., SINCLAIR, K., MILLARD, P. R. et HOPKIN, J. M.
A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification.
J Pathol, 1992, **166**, 2, 195-8.

PHELPS, D. S.
Pulmonary surfactant modulation of host-defense function.
Appl Cardiopulmon Pathophysiol, 1995, **5**, 221-229.

PHELPS, D. S. et ROSE, R. M.
Increased recovery of surfactant protein A in AIDS-related pneumonia.
Am Rev Respir Dis, 1991, **143**, 5 Pt 1, 1072-5.

PHELPS, D. S., UMSTEAD, T. M., ROSE, R. M. et FISHMAN, J. A.
Surfactant protein-A levels increase during *Pneumocystis carinii* pneumonia in the rat.
Eur Respir J, 1996, **9**, 3, 565-70.

PHILIPPE, L., RENÉ, C., GUILLOT, J., BERTHALÉMY, M., POLACK, B., LAINÉ, V., LACUBE, P., CHERMETTE, R. et ROUX, P.
Impaction versus filtration for the detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air.
J Eukaryot Microbiol, 1999, **46**, 5, 94S.

PIFER, L. L., HUGHES, W. T., STAGNO, S. et WOODS, D.
Pneumocystis carinii infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children.
Pediatrics, 1978, **61**, 1, 35-41.

POBLETE, R. B., RODRIGUEZ, K., FOUST, R. T., REDDY, K. R. et SALDANA, M. J.
Pneumocystis carinii hepatitis in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).
Ann Intern Med, 1989, **110**, 9, 737-8.

POTTRATZ, S. T. et MARTIN, W. J. D.
Role of fibronectin in *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung.
J Clin Invest, 1990, **85**, 2, 351-6.

POTTRATZ, S. T., PAULSRUD, J., SMITH, J. S. et MARTIN, W. J. D.
Pneumocystis carinii attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp 120, a fibronectin binding protein.
J Clin Invest, 1991, **88**, 2, 403-7.

POTTRATZ, S. T., WEIR, A. L. et WISNIOWSKY, P. E.
Pneumocystis carinii attachment increases expression of fibronectin binding integrins on cultured lung cells.

Infect Immun, 1994, **62**, 12, 5464-9.

RAJAGOPALAN-LEVASSEUR, P., ALLAERT, A., DRIDBA, M., ÖDBERG-FERRAGUT, C., JOUAULT, T., CREUSY, C., CAMUS, D. et DEI-CAS, E.
Response to *Pneumocystis* infection in an immunocompetent host.
FEMS Immunol Med Microbiol, 1998, **22**, 1-2, 107-21.

RAVIGLIONE, M. C.
Extrapulmonary pneumocystosis: the first 50 cases.
Rev Infect Dis, 1990, **12**, 6, 1127-38.

RUSSIAN, D. A. et KOVACS, J. A.
Pneumocystis carinii in Africa: an emerging pathogen?
Lancet, 1995, **346**, 8985, 1242-3.

SARKAR, S., DUBE, M. P., JONES, B. E. et SATTLER, F. R.
Pneumocystis carinii pneumonia masquerading as tuberculosis.
Arch Intern Med, 1997, **157**, 3, 351-5.

SHA, B. E., BENSON, C. A., DEUTSCH, T., NOSKIN, G. A., MURPHY, R. L., POTTAGE, J. C., Jr., FINN, W. G., ROTH, S. I. et KESSLER, H. A.
Pneumocystis carinii choroiditis in patients with AIDS: clinical features, response to therapy, and outcome.
J Acquir Immune Defic Syndr, 1992, **5**, 10, 1051-8.

SHEEHAN, P. M., STOKES, D. C., YEH, Y. Y. et HUGHES, W. T.
Surfactant phospholipids and lavage phospholipase A2 in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia.
Am Rev Respir Dis, 1986, **134**, 3, 526-31.

SHELDON, W. H.
Experimental pulmonary *Pneumocystis carinii* infection in rabbits.
J Exp Med, 1959, **110**, 147-60.

SILVERMAN, B. A. et RUBINSTEIN, A.
Serum lactate dehydrogenase levels in adults and children with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex: possible indicator of B cell lymphoproliferation and disease activity. Effect of intravenous gammaglobulin on enzyme levels.
Am J Med, 1985, **78**, 5, 728-36.

SMULIAN, A. G., SULLIVAN, D. W. et THEUS, S. A.
Immunization with recombinant *Pneumocystis carinii* p55 antigen provides partial protection against infection: characterization of epitope recognition associated with immunization.
Microbes Infect, 2000, **2**, 2, 127-36.

SOULEZ, B., DEI-CAS, E. et CAMUS, D.
Le lapin, hôte expérimental de *Pneumocystis carinii*.
Ann Parasitol Hum Comp, 1988, **63**, 1, 5-15.

SOULEZ, B., DEI-CAS, E., CHARET, P., MOUGEOT, G., CAILLAUX, M. et CAMUS, D.
The young rabbit: a nonimmunosuppressed model for *Pneumocystis carinii* pneumonia.
J Infect Dis, 1989, **160**, 2, 355-6.

SOULEZ, B., PALLUAULT, F., CESBRON, J. Y., DEI-CAS, E., CAPRON, A. et CAMUS, D.
Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice.
J Protozool, 1991, **38**, 6, 123S-125S.

STAGNO, S., BRASFIELD, D. M., BROWN, M. B., CASSELL, G. H., PIFER, L. L., WHITLEY, R. J. et TILLER, R. E.
Infant pneumonitis associated with cytomegalovirus, *Chlamydia*, *Pneumocystis*, and *Ureaplasma*: a prospective study.
Pediatrics, 1981, **68**, 3, 322-9.

STAGNO, S., PIFER, L. L., HUGHES, W. T., BRASFIELD, D. M. et TILLER, R. E.
Pneumocystis carinii pneumonitis in young immunocompetent infants.

Pediatrics, 1980, **66**, 1, 56-62.

TAMBURRINI, E., ORTONA, E., VISCONTI, E., MENCARINI, P., MARGUTTI, P., ZOLFO, M., BARCA, S., PETERS, S. E., WAKEFIELD, A. E. et SIRACUSANO, A. *Pneumocystis carinii* infection in young non-immunosuppressed rabbits. Kinetics of infection and of the primary specific immune response. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 1999, **188**, 1, 1-7.

THOMAS, C. F., Jr. et LIMPER, A. H. *Pneumocystis pneumonia*: clinical presentation and diagnosis in patients with and without acquired immune deficiency syndrome. *Semin Respir Infect*, 1998, **13**, 4, 289-95.

TOUZET, S., PARISET, C., RABODONIRINA, M. et POUTEIL-NOBLE, C. Nosocomial transmission of *Pneumocystis carinii* in renal transplantation. *Transplant Proc*, 2000, **32**, 2, 445.

VAN DER MEER, G. et BRUG, S. L. Infection à *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 1942, **22**, 301-9.

VANÉK, J. et JÍROVEC, O. Parasitäre Pneumonie. Interstitielle Plasmazellenpneumonie der Frühgeborenen, verursacht durch *Pneumocystis carinii*. *Zentralbl Bakteriol*, 1952, **120**, 158-60.

VARGAS, S. L., HUGHES, W. T., SANTOLAYA, M. E., ULLOA, A. V., PONCE, C. A., CABRERA, C. E., CUMSILLE, F. et GIGLIOTTI, F. Search for Primary Infection by *Pneumocystis carinii* in a Cohort of Normal, Healthy Infants. *Clin Infect Dis*, 2001, **32**, 6, 855-61.

VARGAS, S. L., PONCE, C. A., GIGLIOTTI, F., ULLOA, A. V., PRIETO, S., MUNOZ, M. P. et HUGHES, W. T. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**, 4, 1536-8.

VARGAS, S. L., PONCE, C. A., HUGHES, W. T., WAKEFIELD, A. E., WEITZ, J. C., DONOSO, S., ULLOA, A. V., MADRID, P., GOULD, S., LATORRE, J. J., AVILA, R., BENVENISTE, S., GALLO, M., BELLETTI, J. et LOPEZ, R. Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. *Clin Infect Dis*, 1999, **29**, 6, 1489-93.

VAVRA, J. et KUČERA, K. *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J Protozool*, 1970, **17**, 3, 463-83.

WAKEFIELD, A. E. Detection of DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* in samples of ambient air. *J Eukaryot Microbiol*, 1994, **41**, 5, 116S.

WAKEFIELD, A. E. Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1998a, **22**, 1-2, 59-65.

WAKEFIELD, A. E. Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1998b, **22**, 1-2, 5-13.

WAKEFIELD, A. E., PETERS, S. E., BANERJI, S., BRIDGE, P. D., HALL, G. S., HAWKSWORTH, D. L., GUIVER, L. A., ALLEN, A. G. et HOPKIN, J. M. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. *Mol Microbiol*, 1992, **6**, 14, 1903-11.

WALZER, P. D. Historical perspectives on *Pneumocystis carinii*. *J Protozool*, 1989, **36**, 1, 39-41.

WHITWELL, K.

Pneumocystis carinii infection in foals in the UK.

Vet Rec, 1992, **131**, 1, 19.

WRIGHT, T. W., GIGLIOTTI, F., FINKELSTEIN, J. N., McBRIDE, J. T., AN, C. L. et HARMSSEN, A. G.

Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia.

J Clin Invest, 1999, **104**, 9, 1307-17.

YONEDA, K. et WALZER, P. D.

Mechanism of pulmonary alveolar injury in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in the rat.

Br J Exp Pathol, 1981, **62**, 4, 339-46.

YOSHIDA, Y.

Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*.

J Protozool, 1989, **36**, 1, 53-60.

YOUSFI, M., BOIBIEUX, A., BOUHOUR, D., BIRON, F., CHIDIAC, C. et PEYRAMOND, D.

SIDA et pneumocystose inaugurale. Impact de la trithérapie antirétrovirale.

Pathol Biol (Paris), 1999, **47**, 5, 566-9.

ZIMMERMAN, P. E., VOELKER, D. R., McCORMACK, F. X., PAULSRUD, J. R. et MARTIN, W. J. D.

120-kD surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* is a ligand for surfactant protein A.

J Clin Invest, 1992, **89**, 1, 143-9.

Rapport-Gratuit.com

Résumé

La pneumocystose spontanée du lapereau : un modèle de la primo-infection humaine ?

Pneumocystis carinii est un micro-organisme fongique responsable de pneumonies graves chez les personnes immunodéprimées. Sa biologie reste fort mal connue, bien qu'on l'ait découvert il y a près d'un siècle. Contrairement aux autres espèces animales étudiées, le lapin présente, à la fin de son premier mois d'existence, une infection à *P. carinii* bénigne, spontanément résolutive, et aboutissant à sa séroconversion. Cette infection évoque la primo-infection humaine, objectivée par la séroconversion de la majorité des enfants avant l'âge de deux ans. Malgré certaines différences tenant à l'existence d'une transmission transplacentaire non observée chez l'homme et à une plus grande permissivité, le lapin apparaît donc comme un modèle intéressant pour l'étude de l'histoire naturelle et de l'épidémiologie de l'infection à *P. carinii*. L'obtention de lapins indemnes de *P. carinii* et d'outils de typage moléculaire du parasite favorisera le développement de ce modèle.

Summary

The spontaneous *Pneumocystis carinii* pneumonia of young rabbit: a model for human primary infection?

Pneumocystis carinii is a fungal microorganism capable of causing fatal pneumonia in immunocompromised persons. *P. carinii*'s biology is still largely unknown nearly a century after its discovery. Unlike the other animal species studied, rabbit develops at the end of its first month of life a benign, self-resolutive *P. carinii* infection leading to the apparition of serum antibodies against the fungus. This infection is similar to the human primary infection assessed by the seroconversion of most healthy children before the age of two. In spite of some differences in the way of transmission (the transplacental transmission observed in rabbit does not seem to exist in human) and in the level of permissivity, rabbit appears to be an interesting model for studying natural history and epidemiology of *P. carinii* infection. The obtaining of *P. carinii*-free rabbits and molecular typing tools will further the development of this model.