ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Volume 63

1988

N° 1

© Masson, Paris, 1988.

Ann. Parasitol. Hum. Comp.,
1988, 63, n° 1, pp. 5-15.

MÉMOIRES ORIGINAUX

LE LAPIN, HÔTE EXPÉRIMENTAL DE *PNEUMOCYSTIS CARINII*

B. SOULEZ, E. DEI-CAS, D. CAMUS

Collaboration technique : A. WATTEZ

RÉSUMÉ. La plupart des auteurs utilisent le rat immunodéprimé comme hôte expérimental de *Pneumocystis carinii*. Cependant, le développement de la pneumocystose expérimentale chez cet hôte nécessite l'administration de corticoïdes durant 8 à 12 semaines.

Chez des lapins blancs (poids : 400 à 650 g), alimentés normalement, nous avons testé deux protocoles d'immunodépression : (a) injections quotidiennes d'acétate d'hydrocortisone (10 mg/kg), de pénicilline-G (25 000 UI) et de streptomycine (3 mg) ; (b) administration orale continue de prednisolone (20 mg/l/jour) et d'amoxicilline (25 mg/l/jour), dans l'eau de boisson.

Cinquante-cinq à soixante-dix-huit pour cent des animaux soumis à l'un ou l'autre protocole meurent après 5 à 20 jours. Leur mort est précédée d'une diarrhée importante.

Soixante-dix et soixante-dix-sept pour cent des lapins jeunes soumis respectivement aux protocoles (a) ou (b) montrent des *Pneumocystis* à l'examen microscopique direct des frottis. Cependant des *Pneumocystis* ont pu être mis en évidence chez tous les lapins après application d'une méthode de concentration. La proportion d'animaux positifs par frottis est de 55 % chez les lapins plus âgés (950-1 450 g) soumis au protocole (a). Dans tous les cas, les *Pneumocystis* obtenus s'avèrent de bons antigènes figurés pour l'immunofluorescence indirecte et des bons antigènes solubles pour la technique d'immunotransfert, vis-à-vis de sérums humains et de lapin.

Mots-clés : Corticoïdes. Diarrhée. Immunodépression. Lapin. *Pneumocystis carinii*. Pneumocystose. Sérologie.

The rabbit as experimental host of *Pneumocystis carinii*.

SUMMARY. *Pneumocystis carinii* can be collected from experimentally immunodepressed rats. However, development of experimental pneumocystosis in this host requires corticoid-treatment during 8 to 12 weeks while *P. carinii* can be obtained from immunodepressed rabbits after 2 to 4 weeks.

INSERM (U. 42), 369, rue J.-Guesde, F 59650 Villeneuve-d'Ascq et Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, 1, place Verdun, F 59045 Lille Cedex.

Accepté le 21 septembre 1987.

In 400 to 650 g body weight-white rabbits normally fed, two immunodepression protocols were used: (a) daily subcutaneous injections of hydrocortisone acetate (10 mg/kg body weight) and G penicillin (25,000 IU)-streptomycine (3 mg); (b) continuous oral administration of prednisolone (20 mg/l/day) and amoxicilline (25 mg/l/day) both diluted in drinking water.

Between 55 and 78 % of rabbits treated by any immunodepression protocol died within 5-20 days after a terminal important diarrhoea.

Seventy and seventy-seven per cent of the young rabbits respectively treated by protocols (a) or (b), showed the presence of *Pneumocystis* by the direct microscopic examination, but all of them were found positive after lung concentration. Fifty-five per cent of the older rabbits (950-1,400 g) were positive by pulmonar smear examination when treated with protocol (a). *Pneumocystis* obtained were good antigens for indirect immunofluorescence and immunoblot assays using human and rabbit sera.

Key-words: Corticosteroids. Diarrhoea. Immunodepression. Rabbit. *Pneumocystis carinii*. Pneumocystosis. Serology.

Introduction

Pneumocystis carinii, micro-organisme encore mal connu sur les plans biologique et taxonomique (Matsumoto et Yoshida, 1986), existe à l'état saprophyte dans le poumon de nombreux mammifères dont l'homme (Walzer, 1984) et des oiseaux (Matsumoto et Yoshida, 1986). Il représente actuellement l'agent opportuniste le plus fréquemment observé chez les patients atteints de SIDA (Selwyn, 1986). Le diagnostic parasitologique est fait en général après bronchoscopie en examinant le liquide bronchoalvéolaire. Cependant, le développement de tests sérologiques pour le diagnostic précoce apparaît très souhaitable. La pratique de tels tests nécessite la production en masse d'antigène et donc la mise au point de modèles animaux.

Des nombreux efforts ont été faits en vue du développement de modèles de pneumocystose expérimentale. L'animal le plus utilisé est le rat immunodéprimé. Le développement d'une pneumocystose chez cet hôte nécessite l'administration de corticoïdes durant 8 à 12 semaines en général associée à une carence protéique (Walzer, 1984).

Deux faits nous ont incité à nous intéresser au lapin comme hôte expérimental de *P. carinii*. D'une part, la durée de l'administration de corticoïdes (non associée à une carence protéique), permettant d'obtenir une pneumocystose, est plus courte : 2 à 4 semaines (Sheldon, 1959 ; Goyot et coll., 1984). D'autre part, il a été suggéré que les souches humaines de *Pneumocystis* seraient antigéniquement plus proches des souches de lapin que de celles du rat (Goyot et coll., 1984).

Dans le présent travail, nous rapportons nos observations concernant le développement d'une pneumocystose chez 100 lapins soumis à deux protocoles différents d'immunodépression, ainsi que quelques données sur l'utilisation du *Pneumocystis* de lapin pour des études immunologiques et physiopathologiques.

Matériel et méthodes

1 — LAPINS ET PROTOCOLES D'IMMUNODÉPRESSION

Cent lapins des deux sexes, bâtards néozélandais/californiens provenant d'un élevage artisanal et dont le poids est compris entre 450 et 1 400 g, sont placés à raison de deux à trois par cage et nourris à volonté avec un régime non carencé. Ils sont répartis en trois groupes sans tenir compte du sexe : groupe I, 20 lapins de 950 à 1 400 g ; groupe II et groupe III, comportant chacun 40 lapins juste sevrés, de 450 à 600 g.

Les lapins des groupes I et II sont soumis au protocole (a) : injections sous-cutanées quotidiennes d'acétate d'hydrocortisone (10 mg/kg) (Roussel, Paris), de pénicilline G (25 000 UI) (Specia, Paris) et de streptomycine (3 mg) (Diamant, Puteaux). Le groupe III est soumis au protocole (b) : prednisolone (20 mg/l/jour) (Houdé, Paris) et amoxicilline (25 mg/l/jour) (Beecham Seigné, Paris) par voie orale, les deux produits étant ajoutés dans l'eau de boisson.

2 — MISE EN ÉVIDENCE DE *Pneumocystis*

Les poumons sont obtenus par dissection des lapins morts spontanément ou après anesthésie au pentobarbital des animaux mourants. Dans ce dernier cas, les lapins sont saignés à blanc par ponction intracardiaque. Des frottis par apposition sont réalisés sur un minimum de trois lames à partir de six fragments de tissu pulmonaire de chaque lapin. Les poumons sont conservés à -80°C .

Les frottis par apposition et les préparations faites à partir des suspensions de *Pneumocystis* obtenus après concentration (voir ci-dessous) sont réalisés en double : une lame est colorée au bleu de toluidine O (Chalvardjian et Grawe, 1963 ; Marty et coll., 1981) et l'autre au colorant RAL 555 (Rhône Poulenc Santé — réactifs RAL — Villeneuve-la-Garenne). Nous avons utilisé ce dernier kit de coloration, normalement destiné aux frottis sanguins, de la façon suivante : fixation au méthanol (30 s), puis trempage des lames 40 secondes dans chacun des deux colorants.

3 — TECHNIQUES DE CONCENTRATION ET DE QUANTIFICATION DE *Pneumocystis*

Les poumons congelés sont découpés en petits fragments et mis en agitation pendant 4 heures à 4°C dans du Hanks citraté sans calcium ni magnésium (Maddison et coll., 1982). Après filtration sur gaze, le filtrat est centrifugé à 2 900 g, 10 minutes. Le sédiment, resuspendu dans du Hanks avec du calcium et du magnésium, est soumis ou non à l'action d'enzymes diverses (collagénase 0,2 % et hyaluronidase 0,2 %, ou pronase 0,1 %) pendant 1 heure à 37°C sous agitation. La suspension obtenue est centrifugée à 2 900 g pendant 10 minutes, puis le culot

resuspendu dans du Hanks sans calcium ni magnésium et mélangé avec du Percoll (densité : 1,130) et du NaCl 0,2 M dans les proportions respectives 15 : 30 : 5. Ce mélange est centrifugé à 1 000 g pendant 15 minutes à 4° C. On obtient un surnageant contenant des *Pneumocystis* et des débris tissulaires, un culot constitué par des éléments non parasitaires, des fractions intermédiaires contenant essentiellement les différents stades parasitaires (kystes, formes prékystiques, trophozoïtes). Chaque fraction est lavée trois fois dans du Hanks sans calcium ni magnésium à 2 900 g, 10 minutes à 4° C. Pour éliminer les débris tissulaires encore présents, le surnageant est filtré sur millipore (10 µm). Le nombre de kystes de *Pneumocystis* a été déterminé en utilisant la technique d'Ikai et coll. (1977).

4 — TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE

Les appositions de tissu pulmonaire riche en *Pneumocystis* et les suspensions de kystes et des trophozoïtes sont employées comme antigène. Dans le dernier cas, la suspension est ajustée à 1×10^6 kystes/ml. Dix microlitres de cette suspension sont déposés par godet sur des lames utilisées en immunofluorescence. Celles-ci sont conservées à -20° C et fixées 10 minutes à l'acétone avant l'utilisation.

Les sérums humains sont dilués dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,2, 0,2 M), déposés sur les lames et incubés à 37° C pendant 30 minutes. Des globulines anti-immunoglobulines humaines conjuguées avec l'isothiocyanate de fluorescéine (IPP, Paris) diluées au 1 : 50 dans une solution de bleu d'Evans au 1 : 10 000 final dans du PBS, sont utilisées pour la réaction (30 mn à 37° C).

5 — ÉLECTROPHORÈSE ET IMMUNOTRANSFERT

La préparation parasitaire (3×10^5 à 1×10^6 kystes par centimètre de gel) est resuspendue dans le tampon de dépôt, ultrasonée 15 minutes à une amplitude de 7 µm (OSI-MSE, France) et chauffée 5 minutes à 100° C en conditions réductrices (dithiothreitol 0,1 M, 5 minutes, 100° C) ou non. L'analyse est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (12 %) au dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE), suivant la technique de Laemmli (1970). Le matériel ainsi séparé est électrotransféré sur une feuille de nitrocellulose (Towbin et coll., 1976). La feuille de nitrocellulose est incubée avec des sérums humains ou de lapin dilués au 1 : 600 dans du tampon TNT (trométhamine 15 mM — NaCl 14 mM — Tween 20 0,05 %) pendant 1 heure à 37° C sous agitation. Les bandes de nitrocellulose sont lavées 3 fois 20 minutes dans du TNT, puis incubées 1 heure à 37° C avec les anti-globulines correspondantes conjuguées avec de la peroxydase (Tago, France) et diluées au 1 : 600 dans du TNT. Elles sont ensuite lavées 10 minutes dans du PBS. La révélation est réalisée avec une solution de diaminobenzidine (1 mg/ml) et de H₂O₂ (1 µl/ml) dans du PBS, préparée extemporanément, pendant 5 minutes environ. Enfin, les bandes sont lavées dans l'eau.

Résultats

1 — ÉVOLUTION CLINIQUE ET DÉVELOPPEMENT DE LA PARASITOSE

Dans un délai compris entre 15 et 20 jours sous immunodépression (protocoles (a) ou (b)), l'état de la plupart des lapins s'aggrave soudainement et une diarrhée importante précède constamment le décès. Nous n'avons pas relevé des signes cliniques permettant de prévoir ce dénouement 6 heures environ, avant qu'il ait lieu : seule la palpation thoracique permet souvent de déceler un encombrement respiratoire.

Le champignon *Saccharomycopsis gutulatus* et des coccidies du genre *Eimeria* sont presque constamment présents dans le tube digestif des lapins intacts et immunodéprimés.

Chez les animaux diarrhéiques morts spontanément, les frottis pulmonaires par apposition sont constamment positifs et le nombre de kystes par animal est en général très important. Ceux-ci sont aisément observables sur les préparations colorées au bleu de toluidine O et au RAL-555, cette coloration permettant aussi d'identifier les trophozoïtes et les formes prékystiques (fig. 1).

L'âge (ou le poids) des animaux immunodéprimés est un facteur de première importance (tableau I) : le nombre de kystes par animal est beaucoup plus faible chez les lapins du groupe I (950-1 400 g) que chez les animaux des deux autres groupes (450-600 g). Souvent, chez les lapins que nous venons de recevoir et qui n'ont donc pas été soumis à un traitement immunodépresseur, l'application de la technique de concentration permet de déceler une infection pneumocystosique très légère. Parfois, chez ces animaux non immunodéprimés, les frottis sont positifs : ceci signifie qu'ils ont au moins $1 \text{ à } 2 \times 10^6$ kystes dans leurs poumons, d'après la corrélation que nous avons pu établir entre les techniques microscopiques directes et après concentration (résultats non publiés). Très occasionnellement, nous avons observé des levures ou des bactéries sur les frottis pulmonaires.

2 — COMPARAISON DES DEUX PROTOCOLES D'IMMUNODÉPRESSION

Les résultats apparaissent sur le tableau I. Les lapins recevant de la prednisolone *per os* sont plus fréquemment parasités (77 %) et plus riches en *Pneumocystis* que les lapins ayant reçu de l'hydrocortisone sous-cutanée (70 %). De plus, la forte mortalité enregistrée les 5 premiers jours chez les lapins des groupes I et II (traités par l'hydrocortisone sous-cutanée) n'existe pas chez ceux du groupe III (traités par la prednisolone *per os*). On peut aussi remarquer que les lapins des groupes I et II morts pendant les 5 premiers jours sont relativement pauvres en *Pneumocystis*.

3 — UTILISATION DE *Pneumocystis* DE LAPIN COMME ANTIGÈNE

Les frottis par apposition et les suspensions de kystes se sont avérés des bons antigènes figurés pour les réactions d'immunofluorescence indirecte (fig. 1).

TABLEAU I. — Développement de *Pneumocystis carinii* chez le lapin immunodéprimé. Comparaison de deux protocoles d'immunodépression : (a) injection sous-cutanée quotidienne d'acétate d'hydrocortisone (10 mg/kg), pénicilline G (25 000 UI)-streptomycine (3 mg); (b) administration orale continue, dans l'eau de boisson, de prednisolone (20 mg/l/jour) et d'amoxicilline (25 mg/l/jour).

A : Groupe I (poids : 950-1 450 g ; protocole a)		
Jours ¹	(+)/T (%) ²	K (× 10 ⁶) ³
5	0/ 3 (0)	0-1
10	2/ 4 (50)	3-6
15	2/ 2 (100)	3-6
20	3/ 5 (60)	3-8
> 24	4/ 6 (66)	3-8
Total :	11/20 (55)	
B : Groupe II (poids : 400-650 g; protocole a)		
Jours ¹	(+)/T (%) ²	K (× 10 ⁶) ³
1- 5	4/ 9 (44)	2- 6
5-10	10/13 (77)	3- 6
10-15	8/11 (73)	4-10
15-23	6/ 7 (86)	6-14
Total :	28/40 (70)	
C : Groupe III (poids : 400-650 g; protocole b)		
Jours ¹	(+)/T (%) ²	K (× 10 ⁶) ³
8-15	13/14 (93)	6-12
16-25	14/16 (88)	8-20
25-40	3/ 4 (75)	9-80
41-61	1/ 6 (17)	70
Total :	31/40 (77)	

1. Nombre de jours sous immunodépression.

2. Nombre de lapins dont les frottis par apposition étaient positifs/nombre de lapins examinés. Pourcentages entre parenthèses.

3. Nombre de kystes (après concentration) par lapin (voir texte).

FIG. 1. — *Pneumocystis carinii* chez le lapin. Forme prékystique (a), kyste immature (b) et kyste mature (c), sur des frottis par apposition de poumon de lapin colorés au méthanol-Giemsa ; kystes, immature (d) et mature (e), sur frottis par apposition coloré au RAL 555 ; étalement d'une suspension de kystes obtenue à partir de poumon de lapin en appliquant la technique de concentration décrite dans le texte et coloré au bleu de toluidine O (f) ; réaction d'immunofluorescence indirecte (g) : sérum humain réagissant vis-à-vis de kystes de *Pneumocystis* (frottis par apposition de poumon de lapin infecté). Le trait sur les photos correspond à 10 µm.

Dans les réactions positives, la fluorescence des kystes apparaît accentuée en périphérie. Sur frottis, nous avons pu constater la réponse occasionnellement positive des trophozoïtes de *Pneumocystis*.

La réaction d'immunofluorescence, réalisée avec l'antigène extrait à la pronase, vis-à-vis de sérums provenant de patients atteints de pneumocytose et d'autres maladies infectieuses s'est avérée utilisable en pratique courante. Une étude est actuellement en cours pour évaluer sur un grand nombre de patients sa sensibilité et sa spécificité.

Les résultats concernant la détection d'anticorps sur les antigènes obtenus après transfert sur feuille de nitrocellulose sont montrés sur la *figure 2*. Les frac-

FIG. 2. — Analyse par immunotransfert de la réponse humorale chez l'homme et chez le lapin vis-à-vis de *Pneumocystis carinii*. Électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-Page) de l'antigène *Pneumocystis* de lapin après traitement réducteur, suivie d'électrotransfert sur feuille de nitrocellulose. Le sérum d'un lapin du groupe III, porteur de 8×10^7 kystes de *Pneumocystis* (B) ne réagit que vis-à-vis de 2 fractions antigéniques : 56 et 42 kd. Le sérum d'un lapin non immunodéprimé et légèrement infecté (quantification impossible) (A) reconnaît plusieurs bandes sur l'électrotransfert. Des anticorps présents dans le sérum d'un patient développant une pneumocystose évolutive (C), se fixent aux fractions de 60, 77 et 115 kd. (Les chiffres à côté des bandes expriment les poids moléculaires des fractions en kilodaltons).

tions antigéniques (antigène *Pneumocystis* obtenu après action de la collagénase-hyaluronidase) de 77 et 115 kd réagissent avec des anticorps présents aussi bien dans les sérums des lapins non immunodéprimés et légèrement infectés par *Pneumocystis*, que dans ceux de sujets sains ou atteints de pneumocystose (fig. 2, A et C). Des anticorps dirigés contre les mêmes bandes disparaissent du sérum des lapins immunodéprimés et massivement infectés, tandis que les anticorps réagissant contre les fractions de 42 et 56 kd demeurent (fig. 2, B).

Discussion

Les lapins et les rats sont souvent porteurs de *Pneumocystis* (Yoshida et coll., 1981 ; Radulescu et coll., 1986). L'avantage essentiel de l'utilisation du rat, comme hôte expérimental de *Pneumocystis*, réside dans le grand nombre de parasites par poumon qu'il est possible d'obtenir dans ce modèle. L'utilisation du lapin comme hôte expérimental se justifie cependant pour les raisons suivantes : premièrement, il est possible d'obtenir des parasites en quantité suffisante pour des investigations biologiques dans un délai de 2 à 3 semaines alors que chez le rat il faut prolonger l'immunodépression durant 8 à 12 semaines en associant souvent un régime carencé (Walzer, 1984). Deuxièmement, les lapins sont moins chers à l'achat que les rats Sprague-Dawley, souvent utilisés comme hôte expérimental de *Pneumocystis*. Troisièmement, les souches de *Pneumocystis* de lapin seraient antigéniquement plus proches des souches humaines que celles de rat (Goyot et coll., 1984). Par ailleurs dans notre laboratoire, les rats (Wistar) et les souris (Balb/c, Swiss et C₃H/HeN) que nous avons examinés avant ou après immunodépression se sont avérés négatifs (résultats non publiés).

A notre connaissance, aucun protocole d'immunodépression par voie orale n'avait été proposé chez le lapin pour l'obtention de *Pneumocystis*. L'administration *per os* de prednisolone allège considérablement les manipulations et s'est avérée beaucoup mieux tolérée par les lapins que les injections quotidiennes d'acétate d'hydrocortisone.

Les jeunes lapins des groupes II (hydrocortisone sous-cutanée) et III (prednisolone *per os*), mis sous corticoïdes peu de temps après le sevrage, ont développé une pneumocystose plus intense, et plus fréquente, que celle observée chez les lapins plus âgés du groupe I. Des études sur la susceptibilité du rat vis-à-vis de *Pneumocystis* en fonction de l'âge, ne semblent pas avoir été réalisées (Walzer et Young, 1984).

Dans tous les groupes, des lapins ont présenté une diarrhée *pre mortem* constamment associée à l'existence de pneumocystose. A notre connaissance, ce phénomène n'a pas été rapporté chez le rat ; cependant la survenue d'une diarrhée a été signalé au cours de la pneumocystose chez l'enfant (Hughes et coll., 1973, cité par Young et coll., 1984). En dehors de la maladie elle-même, il est possible que la diarrhée soit due à des infections microbiennes ou parasitaires intercurrentes ou au dysmicrobisme induit par les différentes associations médicamenteuses utilisées.

Chez le lapin, nous obtenons des quantités importantes de *Pneumocystis*. La technique au bleu de toluidine O (Chalvardjian et Grawe, 1963 ; Marty et coll., 1981) est de réalisation simple et permet un comptage rapide des kystes dans les préparations. La nécessité d'une coloration permettant de visualiser l'intérieur des kystes et les différents stades du parasite a conduit la plupart des auteurs à associer la coloration classique au méthanol-Giemsa (Bessis, 1976, p. 221). Le kit RAL 555 remplace efficacement cette dernière technique ; de plus, elle colore finement les structures cytologiques en 2 minutes. Ces méthodes panoptiques permettent, par ailleurs, de distinguer *Pneumocystis* des éléments fongiques, dont la paroi est colorée aussi par le bleu de toluidine O.

La technique d'immunofluorescence indirecte s'avère intéressante en pratique hospitalière et une évaluation est en cours. La technique d'immunotransfert détecte des anticorps sériques dirigés contre les fractions antigéniques de 77 et 115 kd (fig. 2) chez le sujet malade et chez le lapin peu infecté et non immunodéprimé. Nous ne savons pas si la « disparition » des anticorps dirigés contre ces deux fractions, chez les lapins hautement infectés, est la conséquence d'un excès d'antigène ou de l'intensité de l'immunodépression. Des fractions antigéniques d'un poids moléculaire compris entre 110 et 116 kd et entre 55 et 60 kd, mais du *Pneumocystis* de rat, fixent aussi des anticorps humains et de rat (Graves et coll., 1986).

En définitive, le lapin immunodéprimé nous a permis d'obtenir de façon aisée et reproductible une pneumocystose expérimentale. Nous avons ainsi pu mettre au point des techniques cytologiques de diagnostic, établir clairement les différences morphologiques entre *Pneumocystis* et d'autres pathogènes pulmonaires et effectuer des études ultrastructurales et immunologiques (manuscrits en préparation).

REMERCIEMENTS. Nous voulons exprimer notre remerciement aux Docteurs P. Delplace et J. F. Dubremetz qui nous ont conseillé très efficacement dans le domaine de l'électrophorèse et de l'immunotransfert, au Docteur Ch. Slommiany qui a participé à la mise au point de notre technique de concentration et à M. Michel Croza, technicien animalier. Nous remercions également la Société RPS Réactifs RAL (Villeneuve-la-Garenne) pour sa participation dans ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- BESSIS M. : Réinterprétation des frottis sanguins. *Masson*, Paris, 1976, p. 221.
 CHALVARDJIAN A. M., GRAWE L. A. : A new procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cysts in tissue sections and smears. *J. Clin. Pathol.*, 1963, 16, 383-384.
 GOYOT P., NIELSEN P. B., MOJON M. : La technique d'immunofluorescence indirecte appliquée à la comparaison des antigènes *Pneumocystis carinii* d'origine humaine et animale (rat et lapin). *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1984, 2, 143-146.
 GRAVES D. C., McNABB S. J. N., WORLEY M. A., DOWNS T. D., IVEY M. H. : Analyses of Rat *Pneumocystis carinii* antigens recognized by human and rat antibodies by using western immunoblotting. *Infect. Immun.*, 1986, 54, 96-103.
 HUGHES W. T., PRICE R. A., KIM H. K., COBURN T. P., GUGSBY D., FELDMAN S. : *Pneumocystis carinii* pneumonitis in children with malignancies. *J. Pediatr.*, 1973, 82, 404 (cité par Young, 1984).

- IKAI T., YOSHIDA Y., OGINO K., TAKEUCHI S., YAMADA M. : Studies on *Pneumocystis carinii* and *P. carinii* pneumonia. II. Method for concentration and quantitation of *P. carinii* cysts. *Jpn. J. Parasitol.*, 1977, 66, 314-322.
- LAEMMLI U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685.
- MADDISON S. E., HAYES G. V., IVEY M. H., TSANG V. C. W., SLEMENDA S. B., NORMAN L. G. : Fractionation of *Pneumocystis carinii* antigens used in an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies and in the production of antiserum for detecting *Pneumocystis carinii* antigenemia. *J. Clin. Microbiol.*, 1982, 15, 1029-1035.
- MARTY P., DELLAMONICA P., LE FICHOUX Y., BERNARD E., PAGLIARDINI G., VILLEVIELLE J. : *Pneumocystis carinii*, Delanoe et Delanoe, 1912, en microscopie optique. Les différentes techniques d'identification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1981, 56, 363-374.
- MATSUMOTO Y., YOSHIDA Y. : Advances in *Pneumocystis* biology. *Parasitol. Today*, 1986, 2, 137-142.
- RADULESCU S., RAU C., BURGHELEA B., PETROVICI A. L. : Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in rats as parasite source for *in vitro* cultures. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 1986, 45, 47-56.
- SELWYN P. A. : AIDS: What is now known. III. Clinical aspects. *H. P. Publ. Comp.*, New York, 1986.
- SHELDON W. H. : Experimental pulmonary *Pneumocystis carinii* infection in rabbits. *J. Exp. Med.*, 1959, 110, 147-160.
- TOWBIN H., STAEGELIN T., GORDON J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and source applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 4350-4354.
- WALZER P. D. : Experimental models of *Pneumocystis carinii* infections. In: *Pneumocystis carinii*, pneumonia (Young L. S., ed.). *M. Dekker, Inc.*, New York, 1984, 7-76.
- WALZER P. D., YOUNG L. S. : Clinical relevance of animal models of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1984, 2, 1-6.
- YOSHIDA Y., YAMADA M., SHIOTA T., IKAI T., TAKEUCHI S., OGINO K. : Provocation experiment: *Pneumocystis carinii* in several kinds of animals. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A*, 1981, 250, 206-212.
- YOUNG L. S. : Clinical aspects of pneumocystosis in man: epidemiology, clinical manifestations, diagnostic approaches and sequelae. In: *Pneumocystis carinii*, pneumonia (Young L. S., ed.). *M. Dekker*, New York, 1984, 139-174.