

ACADÉMIE ROYALE DES SCIENCES D'OUTRE-MER

Classe des Sciences naturelles et médicales

Mémoires in-8°, Nouvelle Série, Tome 23, fasc. 1, Bruxelles, 1990

Etude sur l'histoire naturelle de
Cryptococcus neoformans (Sanfelice)
Vuillemin 1894 en régions tropicales
et sur son identification

PAR

Danielle SWINNE

Docteur en Sciences

Laboratoire de Mycologie

Institut de Médecine tropicale « Prince Léopold » (Anvers)

KONINKLIJKE ACADEMIE VOOR OVERZEESE WETENSCHAPPEN

Klasse voor Natuur- en Geneeskundige Wetenschappen

Verhandelingen in-8°, Nieuwe Reeks, Boek 23, afl. 1, Brussel, 1990

ACADÉMIE ROYALE DES SCIENCES D'OUTRE-MER

Classe des Sciences naturelles et médicales

Mémoires in-8°, Nouvelle Série, Tome 23, fasc. 1, Bruxelles, 1990

Etude sur l'histoire naturelle de
Cryptococcus neoformans (Sanfelice)
Vuillemin 1894 en régions tropicales
et sur son identification

PAR

Danielle SWINNE

Docteur en Sciences

Laboratoire de Mycologie

Institut de Médecine tropicale « Prince Léopold » (Anvers)

KONINKLIJKE ACADEMIE VOOR OVERZEESE WETENSCHAPPEN

Klasse voor Natuur- en Geneeskundige Wetenschappen

Verhandelingen in-8°, Nieuwe Reeks, Boek 23, afl. 1, Brussel, 1990

Mémoire présenté au concours annuel 1981
et couronné par la Classe des Sciences naturelles et médicales
en sa séance du 23 juin 1981

Rapporteurs : MM. G. BONÉ, J. JADIN et R. VANBREUSEGHEM

Texte définitif déposé le 20 mai 1988

ACADÉMIE ROYALE
DES
SCIENCES D'OUTRE-MER

Rue Defacqz 1 boîte 3
B-1050 Bruxelles (Belgique)
Tél. (02) 538 02 11

KONINKLIJKE ACADEMIE
VOOR
OVERZEESE WETENSCHAPPEN

Defacqzstraat 1 bus 3
B-1050 Brussel (België)
Tel. (02) 538 02 11

D/1990/0149/1

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos	5
Partie I : <u>Cryptococcus neoformans</u> (Sanfelice) Vuillemin 1894 et l'épidémiologie de la cryptococcose	9
A. <u>Cryptococcus neoformans</u>	10
B. La cryptococcose	10
C. Epidémiologie de la cryptococcose	10
Partie II : Etude sur l'histoire naturelle de <u>Cryptococcus neoformans</u> (Sanfelice) Vuillemin 1894 en régions tropicales et sur son identification	13
A. <u>Cryptococcus neoformans</u> dans les pays tropicaux - revue bibliographique	13
1. Les régions tropicales	13
2. La cryptococcose humaine	13
3. La cryptococcose animale	26
4. Vie saprophytique de <u>C. neoformans</u>	27
B. Essais d'isollements de <u>Cryptococcus neoformans</u> à partir de fientes d'oiseaux récoltées en pays tropicaux	30
1. Introduction	30
2. Techniques	30
3. Résultats	31
4. Discussion et conclusions	33
C. Etude comparative de souches de <u>Cryptococcus neoformans</u> .	33
1. Matériel	33
2. Etude biochimique comparée de 90 souches de <u>C. neoformans</u> d'origines diverses	37
3. Sensibilité à la 5-fluorocytosine	38
4. Essais d'obtention des formes sexuées de <u>Cryptococcus</u> <u>neoformans</u>	43
5. Pathogénicité comparée vis-à-vis de la souris blanche ...	51
Bibliographie	61

AVANT-PROPOS

Le présent travail a pour but de déterminer s'il existe ou non des différences tant du point de vue biochimique, pathogénicité qu'au point de vue formes sexuées entre les souches de C. neoformans isolées en Europe et celles isolées dans les pays tropicaux.

Une première partie consiste en une mise au point des données connues, actuellement acceptées, en ce qui concerne C. neoformans, sa vie parasitaire, sa vie saprophytique.

Une seconde partie constituant l'essentiel du présent travail est consacrée à l'étude du C. neoformans dans les pays tropicaux.

Un premier volet comprend une revue de la littérature. Vient ensuite un volet expérimental. Nous y mentionnons tout d'abord l'isolement de souches de C. neoformans à partir de matériel récolté en pays tropical.

Nous y comparons ensuite 90 souches de C. neoformans d'origines parasitaire et saprophytique en provenance d'Europe et des régions tropicales.

Un travail publié antérieurement (Swinne 1979) servira de support pour l'étude réalisée ici-même.

Précisons que le présent travail a été réalisé avant 1980, c'est-à-dire avant l'apparition des premiers cas de cryptococcoses associés au syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA. Cette mycose a, ces dernières années, indéniablement bénéficié d'un regain d'intérêt et est, de ce fait, mieux connue. Certaines données mentionnées ici n'ont donc plus cours aujourd'hui.

*
* *

Toute notre reconnaissance va aux nombreux amis qui ont accepté de nous aider en nous envoyant du matériel : le Dr A. Boumaza (Alger, Algérie), le Dr J. Dunand (Anyame, Côte d'Ivoire), le Dr D. Haddane (Rabat, Maroc), le Dr M.CL. Henry (Kinshasa, Zaïre), le Dr A. Khatir (Alger, Algérie), le Dr Makumyaviri Mipondi (Lubumbashi, Zaïre), le Prof. V. Pandey (Rabat, Maroc), le Dr M. Ranjandiche (Teheran, Iran), le Prof. L. Taverne (Bujumbura, Burundi), le Dr T.R. Tchalim (Lomé, Togo), le Dr J. Vargas (Santa Cruz, Bolivie), le Dr P.P. Vincke (Dakar, Sénégal).

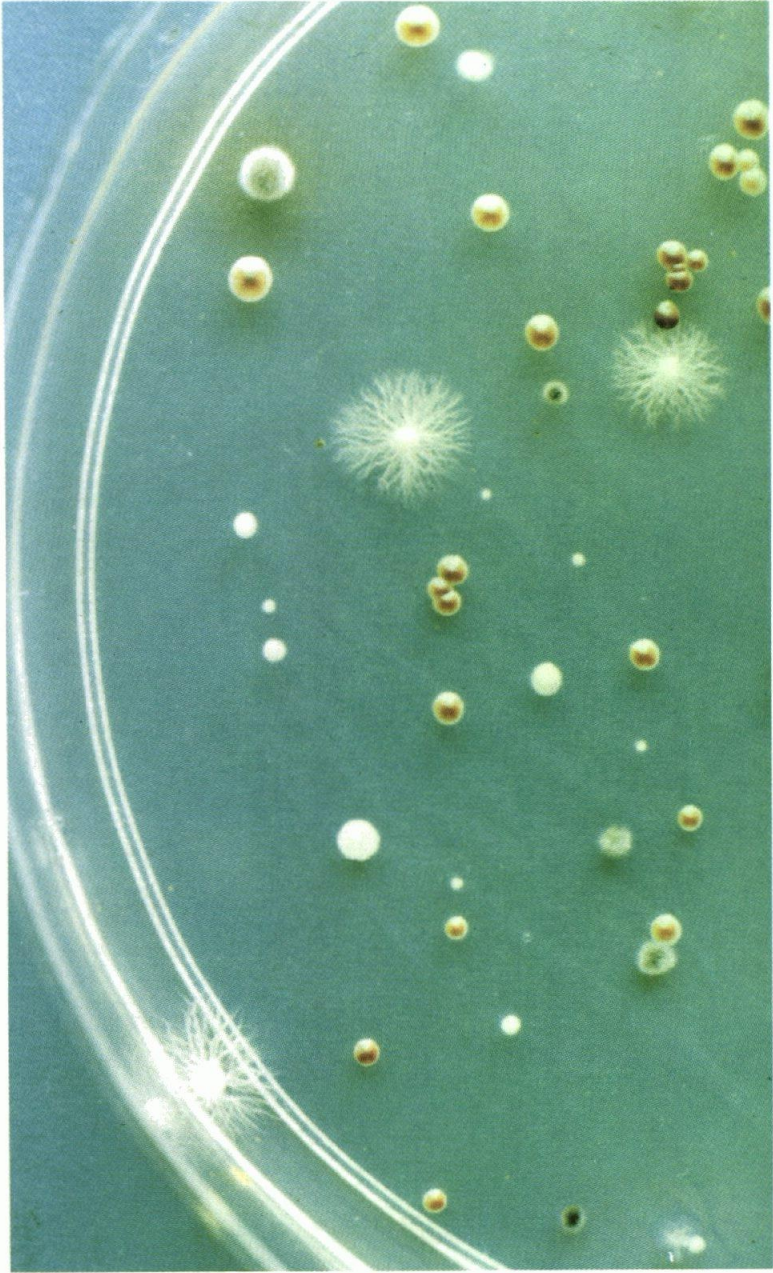


Fig. 1

Cryptococcus neoformans : brunissement spécifique sur milieu au *Guizotia abyssinica*.

PARTIE I

Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin 1894
et l'épidémiologie de la cryptococcose.

A. Cryptococcus neoformans

C. neoformans est une levure, c'est-à-dire un champignon unicellulaire qui se reproduit asexuellement par bourgeonnement. Les levures appartenant au genre Cryptococcus ne fermentent pas les sucres, hydrolysent l'urée, se reproduisent par bourgeonnement multipolaire, ne produisent pas de pseudomycélium et la plupart d'entre elles produisent des substances apparentées à l'amidon. Certaines souches donnent des cultures de consistance muqueuse et les cellules sont alors capsulées.

Toutes les espèces assimilent l'inositol comme source de carbone. A la forme asexuée connue sous le nom de C. neoformans correspondent deux formes sexuées morphologiquement différentes dénommées Filobasidiella neoformans et Filobasidiella bacillispora. Il s'agit d'espèces heterothalles.

Le genre Filobasidiella rentre dans la famille des Filobasidiaceae, ordre des Ustilaginales, classe des Basidiomycètes. F. neoformans dont les basidiospores sont rondes correspond aux formes asexuées dont les sérotypes se rangent dans deux des quatre sérotypes décrits au sein de l'espèce C. neoformans à savoir les sérotypes A et D. F. bacillispora dont les basidiospores sont bacilliformes correspond aux deux autres sérotypes décrits, les sérotypes B et C.

Les problèmes épidémiologiques liés à la répartition géographique de ces deux formes sexuées seront détaillés ultérieurement.

C. neoformans essentiellement connue sous sa forme asexuée, puisque l'obtention des formes sexuées demeure encore à ce jour une curiosité de laboratoire, se caractérise par certaines particularités liées à son métabolisme.

Ensemencée sur un milieu contenant un extrait aqueux de graines broyées de Guizotia abyssinica, elle donne, et il s'agit là d'un caractère spécifique, des colonies brunes dans un laps de temps pouvant s'étendre à 4 jours.

Du point de vue de l'assimilation des sucres, C. neoformans utilise entre autres le galactose, le maltose, le sucrose.

C. neoformans est une des deux espèces de *Cryptococcus* qui pousse à 37°C et demeure en fait la seule espèce reconnue comme pathogène vis-à-vis de certains mammifères dont l'homme. La détermination spécifique de C. neoformans implique donc nécessairement l'inoculation intracérébrale à la souris blanche. La pathogénicité de la souche vis-à-vis de la souris, la multiplication des levures capsulées dans la matière cérébrale sont des preuves nécessaires et suffisantes pour déterminer l'espèce C. neoformans.

Ce problème sera néanmoins rediscuté ultérieurement à la lumière de résultats expérimentaux que nous avons obtenus.

B. La cryptococcose

Cryptococcus neoformans est l'agent de la cryptococcose humaine et animale. C'est une maladie propre aux mammifères. Elle est cosmopolite. Bien connue chez l'homme sous sa forme méningo-encéphalitique, elle débute la plupart du temps par une forme pulmonaire souvent asymptomatique.

Des formes osseuses s'observent dans 5 à 10% des cas, des atteintes cutanées dans 10% des cas et des lésions muqueuses dans 3% des cas.

30% des cas de cryptococcose surviennent chez des gens atteints de maladies du système réticulo-endothélial principalement chez des personnes présentant une maladie de Hodgkin.

Les auteurs s'accordent à considérer que C. neoformans, qui est une levure qui vit dans le milieu extérieur, pénètre habituellement dans l'organisme par la voie respiratoire, et ce aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Chez ces derniers, ce sont à nouveau les poumons et le cerveau qui sont le plus souvent atteints et la multiplicité des lésions aux niveaux nasal et buccal, la fréquence des atteintes pulmonaires constituent des éléments en faveur de l'hypothèse selon laquelle les voies respiratoires servent de porte d'entrée au C. neoformans.

Chez les Bovidae et les Ovidae, C. neoformans peut cependant être agent de maminites.

Certains mammifères, par exemple le lapin, semblent résistants vis-à-vis de C. neoformans. Cette résistance serait, au moins partiellement, due à la température corporelle de l'animal pour autant que celle-ci excède 39°C.

C. Epidémiologie de la cryptococcose

C. neoformans est une levure exsaprophyte qui se retrouve principalement dans les fientes de pigeons dans lesquelles elle se multiplie.

Les pourcentages de positivité des fientes que nous avons obtenus sont cependant très différents suivant le mode de vie mené par les pigeons.

Alors que nous n'obtenons que 11,6% de positivité pour des fientes de pigeons récoltées en Belgique dans des pigeonniers privés, nous obtenons 76% de positivité pour des fientes de pigeons en provenance de pigeonniers-refuges où l'on recueille les pigeons égarés lors des concours colombophiles.

Nous pensons pouvoir attribuer cette différence de positivité, statistiquement significative, aux modes de vie différents menés par les pigeons. Alors que dans les pigeonniers privés, les pigeons sont libres de sortir, ceux des pigeonniers-refuges restent enfermés dans une petite cage durant deux semaines.

L'entassement des fientes constitue certainement un des facteurs responsables du maintien de C. neoformans dans ces pigeonniers-refuges.

Les fientes de canaris sont aussi très fréquemment positives pour C. neoformans.

Nous avons eu l'occasion d'effectuer des prélèvements de fientes lors de concours de chant de canaris. Ces concours rassemblent des centaines d'oiseaux qui, durant une semaine, restent enfermés dans des cages non entretenues et dans des conditions analogues à celles observées dans les pigeonniers-refuges. Nous y avons également isolé C. neoformans.

Ces derniers résultats viennent à l'appui de nos suppositions concernant l'influence du mode de vie mené par l'oiseau sur la positivité des fientes.

La littérature mentionne encore la positivité des fientes d'oiseaux d'espèces différentes et notamment d'autres Colombidae mais cette positivité semble moins fréquente que celle du pigeon. L'isolement de C. neoformans à partir des fientes pose de nombreux problèmes.

Lorsque l'on considère l'ensemble des résultats publiés dans la littérature, on est surpris par le manque d'homogénéité des pourcentages de positivité obtenus.

Ce phénomène est partiellement dû aux différentes techniques utilisées pour isoler C. neoformans à partir de fientes. Il résulte cependant essentiellement de l'état initial des fientes récoltées ainsi qu'à la manière dont on a conservé les fientes avant de les ensemençer.

Ayant, au cours de ce travail, essayé d'isoler C. neoformans à partir de fientes récoltées dans des pays tropicaux, nous précisons dans un chapitre ultérieur les conditions requises à l'isolement de C. neoformans à partir de fientes.

L'ensemble des travaux réalisés jusqu'à ce jour montre que le sort de C. neoformans semble bien lié à celui du pigeon. Dans les quelques cas où l'on isole C. neoformans à partir du "milieu extérieur", on ne peut pratiquement pas exclure une contamination par des déjections de pigeons.

De très nombreux travaux montrent que C. neoformans ne peut pas vivre dans le tube digestif du pigeon, sauf au niveau du jabot.

Nous avons en effet réussi à montrer en effectuant des écouvillonnages de jabots que, dans certains cas, 50% des pigeons appartenant à un pigeonnier où les fientes contiennent C. neoformans, sont porteurs de C. neoformans au niveau du jabot.

Le pigeon peut donc véhiculer C. neoformans dans son jabot et est potentiellement capable, si on l'introduit dans un pigeonnier où les fientes sont négatives, de contaminer les fientes qui, à leur tour, peuvent devenir réservoir.

Le maintien de C. neoformans au niveau du jabot est justifiable parce que le pH y est proche de 6,3 et donc compatible avec la survie de C. neoformans, parce que la température y est inférieure à celles observées en d'autres points du corps du pigeon.

Y a-t-il réel endosaprophytisme au niveau du jabot du pigeon ? Nous n'en avons aucune preuve mais cette éventualité est à envisager. On sait en effet que le jabot de pigeon constitue une des niches écologiques de levures exclusivement endosaprophytiques telles Candida albicans et Saccharomyces telluris. Il pourrait donc en être de même pour C. neoformans.

PARTIE II

Etude sur l'histoire naturelle
de Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin 1894
en régions tropicales et sur son identification.

Cette levure basidiomycète diffère-t-elle en tout ou en partie
de celle isolée dans les régions tempérées?

A. Cryptococcus neoformans dans les pays tropicaux - revue bibliographique.

1. Les régions tropicales

Lorsqu'on parle des maladies rencontrées dans les pays tropicaux, il s'agit bien souvent de maladies que l'on ne rencontre pas seulement entre les deux tropiques mais aussi dans les régions voisines à climat chaud.

Bien que nous ayons centré nos recherches bibliographiques sur les régions comprises entre les deux tropiques, il a été nécessaire dans certains cas d'élargir notre champ d'investigations. En parcourant la littérature, nous avons d'ailleurs constaté que d'autres auteurs avaient aussi éprouvé quelques difficultés à délimiter leur champ d'action en ce qui concerne les mycoses dites tropicales.

R. Vanbreuseghem (1971) écrit :

I am well aware that I have to rely on your indulgence not to insist too much on the definition of the limits of the prevalence and the exact extent of the tropical areas. Indeed our choice has not been very much influenced by the two circles running at 23°27' North and South of the Equator but more so, maybe, by a warm and humid physical climate and a social climate characterized by under-development, food shortage and many other deficiencies barring the way to an harmonious, well equilibrated and enjoyable life.

2. La cryptococcose humaine

Nous avons effectué une revue de la littérature consacrée à la cryptococcose humaine en régions tropicales. Les cas ont été groupés par continent et numérotés de 1 à 583.

a. L'Afrique

Nous avons estimé intéressant de mentionner tous les cas de cryptococcoses humaines recensés en Afrique bien que les pays du Maghreb ainsi que la province du Cap jouissent d'un climat méditerranéen.

Les pays africains ont été regroupés en 5 catégories :

- L'Afrique du Nord;
- L'Afrique du Nord-Est;
- L'Afrique Centrale (côté ouest);
- L'Afrique Centrale (côté est);
- L'Afrique du Sud.

1) Afrique du Nord

Le seul cas recensé est un cas de cryptococcose signalé à Alger (Thomas et al. 1977).

2) Afrique du Nord-Est

La littérature ne mentionne également qu'un seul cas en Egypte (Cossery 1930). Il s'agit cependant du premier cas de cryptococcose diagnostiqué en Afrique.

3) Afrique Centrale - côté ouest

Pays	Auteurs	Nombre de cas
Congo	Ravisse <u>et al.</u> 1959	1
Côte d'Ivoire	Pene <u>et al.</u> 1969	1
Nigeria	Adeloye <u>et al.</u> 1976	1
Sénégal	Carnain <u>et al.</u> 1951	1
	Collomb <u>et al.</u> 1964	1
	Castets <u>et al.</u> 1967	1
	Sarrat 1973	1
Zaïre	Stijns & Royer 1953	1
	Vandepitte <u>et al.</u> 1953	1
	Royer <u>et al.</u> 1954	1
	Vassiliadis & de Antas Videira 1959	1
	5 ^e cas mentionné par Vassiliadis & de Antas Videira 1959	1
	Michaux <u>et al.</u> 1963	3
	Renoirte <u>et al.</u> 1967	6
	Gatti & Eeckels 1970	1
Total		22

4) Afrique Centrale - côté est

Pays	Auteurs	Nombre de cas
Kenya	Turner 1959	1
	Neville & Cooke 1959	11
	MacGill <u>et al.</u> 1969	3
	Stewart 1977	2
Ouganda	Mpairwe & Patel 1970	3
Rhodésie	Davey & Ross 1969	1
	Cattle & Gelfand 1972	1
	Gelfand 1972	2
	Friedlander & Gelfand 1977	7
	Jaravaza <u>et al.</u> 1977	2
Tanzanie	Cliff 1976	1
Zambie	Bhagwandeem 1969	1
	Patel <u>et al.</u> 1977	1
	Sinha <u>et al.</u> 1978	1
Total		37

5) Afrique du Sud

Pays	Auteurs	Nombre de cas
Rép. Afrique du Sud	Aneck-Hahn 1933	1
	Gray 1940	2
	Sampson & Farren 1942	1
	Barnard 1945	1
	Lewin & Roux 1946	4
	Bubb 1955	1
	Lurie 1955	18
	Pimstone & Saunders 1959	14
	Dorner & Findley 1960	1
	Vanden Ende <u>et al.</u> 1974	1
	Pillay & Simjee 1976	24
van Dellen & Buchanan 1980	1	
Botswana	Yalaburgi & Mohapatra 1980	1
Total		70

Commentaire

Sur un ensemble de 131 cas africains de cryptococcose humaine, on en relève 59 survenus dans des pays à climat typiquement tropical, c'est-à-dire en Afrique Centrale.

C'est cependant en Afrique du Sud que l'on a diagnostiqué le plus grand nombre de cas de cryptococcoses mais il serait, en tous cas actuellement, prématuré d'en conclure à l'existence en Afrique du Sud d'une plus grande fréquence de la maladie.

Nous attribuons plutôt ce phénomène à l'existence de centres médicaux peut-être mieux équipés et mieux informés qu'en d'autres pays d'Afrique.

Michaux et al. (1963) travaillant au Congo-Kinshasa signalent l'existence de 8 cas de cryptococcoses apparemment primaires. Ceci serait, d'après les auteurs, un phénomène assez fréquent en Afrique et contrasterait avec les observations d'auteurs américains tels Zimmerman & Rappaport (1954) qui estiment qu'aux Etats-Unis, 30% des cas de cryptococcoses coexistent avec une néoplasie du système réticulo-endothélial.

Signalons enfin l'existence au Zaïre d'une variété de C. neoformans, produisant des formes rondes, ovales et cigariformes à l'état parasitaire alors qu'en culture, on n'observe que la présence de formes rondes. Cette variété, décrite et dénommée C. neoformans var. gattii par Vanbreuseghem & Takashio (1970), a été isolée par Gatti & Eeckels (1970) à partir du liquide céphalorachidien d'un jeune bantou de 7 ans.

b. L'Amérique

L'Amérique du Nord est située tout entière dans l'hémisphère boréal.

Seul le sud au-dessous de $\pm 30^\circ$ de latitude nord connaît un climat qui s'apparente au climat tropical. Nous recenserons donc successivement les cas de cryptococcose publiés au Mexique et en Amérique Centrale.

En ce qui concerne l'Amérique du Sud, nous avons relevé tous les cas survenus dans la moitié située au nord du tropique du Capricorne.

Nous n'avons pas tenu compte des cas publiés au Chili et en Argentine. Ces 2 pays ont un climat très varié en raison de leur grande étendue en latitude et seul l'extrême-nord est compris dans la zone tropicale.

1) Cas de cryptococcoses humaines recensés au Mexique et en Amérique Centrale

Pays	Auteurs	Nombre de cas
Mexique	Gonzalez Ochoa 1951	1
	Gonzalez <u>et al.</u> 1959	1
	Verut <u>et al.</u> 1963	1
	Calderon <u>et al.</u> 1977	3
Cuba	Curbelo <u>et al.</u> 1957	1
	Tiant & Fuentes 1958	1
	Hernandez -Cossio <u>et al.</u> 1972	5
Porto-Rico	Ramos-Morales <u>et al.</u> 1960	1
	Reyes & Bermudes 1968	1
Jamaïque	Gordon & Grant 1954	1
	Condon <u>et al.</u> 1977	1
	Falconer <u>et al.</u> 1980	7
Panama	Herrera <u>et al.</u> 1956	1
Total		25

2) Cas de cryptococcoses humaines recensés en Amérique du Sud, au nord du tropique du Capricorne

Pays	Auteurs	Nombre de cas
Venezuela	Potenza & Benaïm-Pinto 1949	2
	Potenza <u>et al.</u> 1951	1
	Barnola & Martinez 1955	1
	Wenger 1955	1
	Barnola & Barrera 1956	1
	Perez Guevara 1956	1
	Perez Guevara <u>et al.</u> 1957	1
	Angulo-Ortega <u>et al.</u> 1961	24
	Campins <u>et al.</u> 1975	1
Colombie	Buitrago & Gomez 1960	1
	Pena 1967	5
Paraguay	Riveras <u>et al.</u> 1946	1
Brésil	de Almeida & da Silva Lacaz 1941	1
	de Almeida & da Silva Lacaz 1944	1
	Claussel 1949	1
	Cortez 1949	1
	Fialho 1952	1
	da Silva 1953	1
	Duarte 1953	1
	Tolosa <u>et al.</u> 1956	1
	Pereira <u>et al.</u> 1957	1
	Queiroz 1957	1
	Amorim & Pasqualucci 1958	1
	Giorgi <u>et al.</u> 1959	1
	Pasqualucci 1960	2
	de Carvalho <u>et al.</u> 1961	3
	Furtado 1962	2
	Magaldi <u>et al.</u> 1964	2
	Cardoso 1965	2
	Rubiao <u>et al.</u> 1966	1
	Michalany <u>et al.</u> 1967	1
Chaves <u>et al.</u> 1972	1	
Total		66

Commentaire

Le total des cas de cryptococcoses humaines recensé au Mexique, en Amérique Centrale et dans les régions d'Amérique du Sud soumises à un climat tropical s'élève à 91. Tout comme pour l'Afrique, il nous est difficile de tirer des conclusions quant à la fréquence de la cryptococcose dans les régions tropicales d'Amérique. Signalons cependant que le nombre réel de cas de cryptococcose est très certainement plus élevé que celui mentionné ci-dessus.

Pollak & Angulo-Ortega (1967) travaillant au Venezuela signalent avoir eu connaissance d'une cinquantaine de cas entre 1938 et 1967. Nous n'avons, nous-même, pour la même période, trouvé trace que de 32 cas dans la littérature. De l'avis d'auteurs brésiliens (de Almeida 1961) la cryptococcose serait plus fréquente en Amérique du Sud qu'aux Etats-Unis où elle atteindrait 1 personne sur 200 000. Cet auteur affirme avoir eu connaissance de 44 cas brésiliens, alors que nous n'en avons recensé que 17 dans la littérature publiée avant 1961.

En ce qui concerne la coexistence de la cryptococcose avec les maladies du système réticulo-endothélial, elle semble beaucoup plus rare que dans les régions tempérées (Pollak & Angulo-Ortega 1967).

c. L'Asie

C'est en Inde que la littérature consacrée à C. neoformans est la plus abondante.

On mentionne également de très nombreux cas de cryptococcose dans la péninsule Indochinoise située entre le 1^{er} et le 23^e degré de latitude nord. Nous avons trouvé quelques références signalant l'existence de cas de cryptococcose humaine aux Philippines, à Formose, à Hong Kong, mais aucune publication par contre pour l'Indonésie.

La littérature est détaillée dans les tableaux suivants :

1) Cas de cryptococcoses humaines recensés en Inde

Auteurs	Nombre de cas
Krainer <u>et al.</u> 1946	1
Balakrishna Rao & Lilauwala 1952	1
Ranamurthi & Anguli 1954	1
M.J. Khan <u>et al.</u> 1959	1
Sinha & Barua 1960	1
R.M. Verma <u>et al.</u> 1960	1
Anguli & Natarajan 1961	1
Basu Mallik & Nundy 1961	1
Mukherjea <u>et al.</u> 1961	1
Padhye & Thirumalachar 1961	2
Siriamachari <u>et al.</u> 1961	1
Koshi <u>et al.</u> 1964	1
Shah & Sharma 1964	1
Aikat <u>et al.</u> 1967	11
Basu Mallik <u>et al.</u> 1967	20
Chhetri & de Rahman 1967	4
Devadiga <u>et al.</u> 1968	1
Ramana Rao <u>et al.</u> 1968	1
Klokke 1969	1
Mittal <u>et al.</u> 1969	1
Ichaporla <u>et al.</u> 1970	5
Mukthabai <u>et al.</u> 1970	4
Reddy <u>et al.</u> 1971	1
Grover <u>et al.</u> 1975	70
A.K. Pal & Chopra 1975	1
Singh <u>et al.</u> 1979	1
Total	135

2) Cas de cryptococcoses humaines recensés aux Philippines, à Formose et à Hong-Kong, en Indochine et en Malaisie

Pays	Auteurs	Nombre de cas
Philippines	Aragon & Reyes 1959	1
	Danao <u>et al.</u> 1968	1
	Villacorta & Resch 1954	1
Formose	Wen Yang Lu Lu 1961	15
	Fan <u>et al.</u> 1974	51
	Hsi <u>et al.</u> 1975	2
	Lai <u>et al.</u> 1977	1
Hong Kong	Huang <u>et al.</u> 1963	3
Indochine et Malaisie	Genevray & Bablet 1928	1
	Pallis 1949	1
	Low 1951, cité par Muir & Ransome 1959	1
	Marsden 1953, cité par Muir & Ransome 1959	1
	Ross-Russell & Dean 1959	1
	Muir & Ransome 1959	1
	Bhamapravati & Surondhapant 1960	1
	Stitnimankarn <u>et al.</u> 1960	1
	Goh 1961	1
	Lim Teong Wah & Chan Kok Ewe 1962	5
	Areechon & Prapaiwongs 1963	1
	Brumpt & Moisant 1964	1
	Tia-Kim-Hy 1964	4
	Brumpt <u>et al.</u> 1965	3
	Bovornkitti <u>et al.</u> 1966	2
	Poopalasingam 1967	1
	Bascands <u>et al.</u> 1968	1
	Ho-Tan-Phuoc 1968	2
	Menakavit & Sajavanich 1968	2
	Nissaisorakan 1968	2
	Dutt <u>et al.</u> 1969	1
	Nguyen-Trong-Dat 1969	2
	Supramanian <u>et al.</u> 1969	3
	Ong & Prathap 1970	1
	Kutty 1971	1
	Truong-Cong-Tam 1972	1
	Phan Trinh <u>et al.</u> 1975	1
Capdevielle <u>et al.</u> 1977	5	
Poo & Paul 1977	1	
Laohapand & Dharamadhach 1978	1	
Total		125

Commentaire

Pour l'Asie "tropicale", nous recensons donc un total de 260 cas. La cryptococcose semble être une maladie assez fréquente non seulement en Inde mais aussi dans toute la péninsule Indochinoise et dans les îles. Il semble bien d'après les auteurs que le nombre de malades augmente de manière considérable chaque année.

Aikat et al. (1967) qui travaillent dans un hôpital à Calcutta, signalent avoir eu connaissance de 11 cas entre 1960 et 1962 inclus, alors qu'en 1963 on a diagnostiqué 8 cas. Ils attribuent cette augmentation à l'utilisation abusive d'antibiotiques antibactériens. De même à Singapour, Nadarajah (1976) mentionne l'observation de 30 cas en 11 ans, entre 1959 et 1970, de 21 cas en 2 ans, 12 pour 1974 et 9 en 1975.

A Kuala Lumpur, en Malaisie, Richardson et al. (1976) signalent également l'incidence croissante de la cryptococcose et affirment l'admission de 30 cas de méningites à Cryptococcus neoformans entre 1964 et 1975 au Service de Neurologie de l'Hôpital général de Kuala Lumpur.

d. L'Océanie

L'Océanie inclut toute la zone comprise entre les îles Hawaï, les îles Mariannes, la Nouvelle Guinée, l'Australie et la Nouvelle Zélande.

Les îles Hawaï sont coupées par le tropique du Cancer et l'Australie par le tropique du Capricorne.

La Nouvelle Zélande ainsi que le sud de l'Australie sont situés en zone tempérée alors que le restant de l'Océanie, y compris la moitié nord de l'Australie, sont situés en région tropicale.

Nous n'avons donc pas tenu compte des cas de cryptococcose de Nouvelle Zélande, ni de ceux recensés dans le sud de l'Australie.

Nous avons aussi éliminé, pour ne pas fausser les résultats, une série de cas que nous n'avons pas pu situer géographiquement; il y en a 40 exactement et l'on y retrouve notamment le cas de Sawers & Thomson (1935, in Hickie & Walker 1964) qui est le premier cas de cryptococcose recensé en Australie.

Au total, il nous reste très peu de cas que l'on puisse considérer comme des cas authentiquement "tropicaux".

Cas de cryptococcoses humaines recensés en Océanie

Pays	Auteurs	Nombre de cas	
Hawaii	Cloward 1948	1	
Nouvelle-Guinée	Champness & Clezy 1962	3	
	Kariks 1967	1	
Australie	Northern Territory	Crotty 1965	10
		Lo 1976	26
		d'A. Webling 1978	1
		Bateson 1979	9
Queensland	Geaney <u>et al.</u> 1956	14	
		Kuo 1962	1
		Sutherland 1969	27
Western Australia	Elphinstone 1969	8	
Total		101	

Commentaire

Nous recensons donc 101 cas pour les régions tropicales d'Océanie.

D'après Geaney et al. (1956) et Sutherland (1969), la maladie serait beaucoup plus fréquente en Australie qu'ailleurs dans le monde.

Bien que le plus grand nombre de cryptococcoses ait été publié dans le sud de l'Australie, économiquement plus développé, où le pourcentage de populations d'origine européenne est plus élevé, les auteurs s'accordent à dire que la cryptococcose se rencontre surtout en région tropicale dans les provinces du Northern Territory et du Queensland. (Champness & Clezy 1962, Sutherland 1969, Lo 1976, Bateson 1979).

Littman & Zimmerman (1956) travaillant aux Etats-Unis, signalent n'avoir constaté aucune prédisposition des individus à peau noire alors qu'en ce qui concerne l'Australie, les auteurs (Geaney et al. 1956, Crotty 1965, Lo 1976, Sutherland 1969, Bateson 1979) envisagent de commun accord l'existence d'une susceptibilité raciale des aborigènes.

En ce qui concerne le Queensland, Sutherland (1969) signale avoir recensé l'existence de 29 cas de cryptococcose pour 100 000 aborigènes alors que lorsqu'il s'agit d'Européens, la proportion n'est que de 1,6 cas par 100 000 personnes.

Sutherland ajoute que les hommes sont plus fréquemment atteints que les femmes, ce qui est d'ailleurs observé partout dans le monde.

Dans la province du Northern Territory où la population aborigène constitue 25% de la population totale alors qu'au Queensland elle ne constitue que 2,5% de la population totale, Lo (1976) et Bateson (1979) concluent également à la plus grande susceptibilité des aborigènes australiens : les 26 cas de Lo et 8 des 9 cas de Bateson s'observent chez d'authentiques aborigènes.

e. Répartition des cas en fonction du sexe, de l'âge et de la race

1) Sexe

Nous connaissons le sexe des individus atteints de cryptococcose dans 415 cas sur 583 recensés. La répartition se fait de la manière suivante :

	Nombre de cas
Hommes	260 (62,5%)
Femmes	155 (37,5%)
Total	415

Nous constatons que 62,5% des individus atteints de cryptococcose en pays tropical sont des hommes. Ceci ne fait que confirmer un fait universellement observé : la cryptococcose se rencontre plus fréquemment chez l'homme que chez la femme.

2) Age

Nous connaissons l'âge de 193 patients sur 583 recensés. Dans 191 sur 193 cas, nous avons aussi le sexe de l'individu.

Nous avons pu établir un tableau donnant la répartition des cas de cryptococcoses en fonction de l'âge et du sexe des patients.

Groupe n°	Age	Hommes		Femmes		Total	
		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
1	0-10 ans	12	6,2	10	5,2	22	11,5
2	11-20 ans	15	7,8	26	13,6	41	21,4
3	21-30 ans	30	15,7	19	9,9	49	25,6
4	31-40 ans	24	12,5	15	7,8	39	20,4
5	41-50 ans	16	8,3	4	2,0	20	10,4
6	51-60 ans	11	5,7	3	1,5	14	7,3
7	61-70 ans	4	2,0	1	0,5	5	2,6
8	71-80 ans	0	0,0	1	0,5	1	0,5
		112		79		191	

Ce tableau nous montre tout d'abord que les enfants de moins de 10 ans de l'un et l'autre sexes sont atteints de cryptococcose dans des proportions semblables.

Les jeunes femmes entre 11 et 20 ans sont plus fréquemment atteintes que les garçons du même âge et ce n'est qu'à partir de 20 ans que le phénomène s'inverse et que petit à petit l'homme devient plus fréquemment atteint que la femme du même âge.

Littman & Zimmerman (1956) affirment que 2/3 des cas de cryptococcoses se rencontrent chez des individus âgés de 30 à 60.

Groupons nos résultats en 3 catégories d'âges : moins de 30 ans, 30 à 60 ans, plus de 60 ans.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau suivant :

Groupes	Age	Hommes		Femmes		Total	
		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
1-2-3	≤ 30 ans	57	50,8	55	69,6	112	58,6
4-5-6	> 30 ans et ≤ 60 ans	51	45,5	22	27,8	73	38,2
7-8	> 60 ans	4	3,5	2	2,5	6	3,1
		112		79		191	

Ce tableau nous montre qu'en pays tropical, la cryptococcose atteint surtout les jeunes de moins de 30 ans : 58,6% des cas de cryptococcose humaine sont observés dans les 3 premiers groupes d'âges, alors que seulement 38,2% des cas s'observent pour des individus dont l'âge est compris entre 30 et 60 ans.

Mais il faut remarquer que cette différence de pourcentage résulte surtout de la différence de pourcentage observée entre les cas de cryptococcoses observés chez les filles de moins de 30 ans et celles de 30 à 60 ans : 69,6% des cas de cryptococcoses observés chez les femmes le sont chez des patientes de moins de 30 ans.

3) Race

Nos propres résultats ne nous ont pas permis de conclure à l'existence ou à la non-existence de prédispositions raciales.

f. Conclusions

Si les auteurs sud-américains insistent sur le fait qu'il y a plus de cryptococcose humaine en Amérique du Sud qu'aux Etats-Unis, les auteurs australiens affirment qu'il y en a davantage en Australie que partout ail-

leurs dans le monde, que ceci se vérifie surtout dans la moitié nord de l'Australie, soumise à un climat à caractère tropical.

De plus, la cryptococcose serait plus fréquemment observée chez l'aborigène australien qu'au sein d'autres groupes raciaux.

En ce qui concerne l'Asie, l'essentiel de l'information nous vient d'Inde: le nombre de cas de cryptococcose humaine y serait en accroissement ces dernières années; ce phénomène serait essentiellement iatrogène.

En Afrique, tout comme en Amérique du Sud, il semble qu'il y ait prédominance de cryptococcoses primaires.

La littérature nous apprend enfin l'existence de Cryptococcus neoformans var. gattii en Afrique.

Le recensement de 583 cas de cryptococcose humaine observés en Afrique, en Amérique Centrale, en Amérique du Sud, en Asie et en Océanie nous montre qu'en pays tropical, à l'inverse de ce que l'on observe si l'on prend l'ensemble des cas humains survenus en pays tropicaux et non tropicaux, la cryptococcose est plus fréquente chez l'individu de moins de 30 ans, chez qui l'on observe 58,6% des cas de cryptococcoses.

La répartition des cas se fait de manière égale entre les 2 sexes avant 30 et après 60 ans, mais l'homme, ayant de 30 à 60 ans, est beaucoup plus souvent atteint que la femme.

3. La cryptococcose animale

Chez les animaux, tout comme chez l'homme, ce sont les poumons et le cerveau qui sont le plus souvent atteints et ce sont également les voies respiratoires qui serviraient de porte d'entrée au C. neoformans.

Nous avons recensé les cas suivants :

a. L'Afrique

La littérature mentionne un cas de cryptococcose pulmonaire chez un Cercopithecidae (Papio papio) au Sénégal (Baylet & Camain 1961), un cas de cryptococcose méningée équine au Zaïre (Herin & Dormal 1962) et un cas de cryptococcose méningée canine en Afrique du Sud (Coetzer, Imes & Irvine-Smith 1976).

Des cas de mammites atteignent le mouton en Egypte (Abdallah 1959).

b. L'Amérique

1) L'Amérique Centrale

A Panama, Takos & Elton (1953) observent deux cas de cryptococcose spontanée chez le singe (Leontocebus geoffroyi).

Les cas de mammites observés dans les Antilles par Suttmöller & Poelma (1957) le sont chez des chèvres récemment importées d'Amérique du Sud, notamment en provenance de Colombie et du Venezuela.

2) L'Amérique du Sud

La cryptococcose se rencontre chez le chien (de la Vega & Rakover 1963-1966, Peluffo & Conti Diaz 1976), chez le chat (Celso Hygino da Cruz et al. 1971), chez le cheval (Sotobrachio 1969).

Daconso & Chagas (1957) isolent C. neoformans de lésions pulmonaires chez la chèvre.

En 1968, en Colombie, Grose et al. l'isolent de foies, de rates et d'intestins de chauve-souris (Carollia perspicillata et Pteronotus psilotis).

c. L'Asie

Cryptococcus neoformans y est mentionné comme agent de mammites chez des vaches par Monga et al. (1970), chez des buffles, des vaches et des chèvres par M. Pal & Randhawa (1976).

d. L'Océanie

Toute la littérature provient d'Australie et de Nouvelle Guinée.

C. neoformans s'y rencontre chez le chat (Johnston & Lavers 1963, Clark & Roubin 1970, Humphrey et al. 1977), chez le cheval (Watt 1970), chez le mouton (Laws & Simmons 1966), chez la vache, non comme agent de mammite mais comme agent de cryptococcose pulmonaire (Connole & Johnston 1967).

e. Conclusions

En région tropicale, la cryptococcose cérébrale et pulmonaire se rencontre chez les animaux domestiques : le chien, le chat, le cheval. On la signale chez le singe et C. neoformans a pu être isolé d'organes de chauves-souris sans qu'il y ait cependant apparemment de manifestations cliniques.

On peut aussi observer des cas de cryptococcose pulmonaire chez les ovins et les bovins, mais chez ces derniers, l'on observe surtout la mammite à C. neoformans.

Ainsi que le constatent Ainsworth & Austwick (1973), rien ne nous permet de dire que la cryptococcose animale en région tropicale diffère en quoi que ce soit de la cryptococcose animale en pays tempéré.

4. Vie saprophytique de C. neoformans

La source essentielle de C. neoformans en région tropicale semble bien être les fientes de pigeons, ce que l'on observe aussi en région tempérée (Swinne 1979).

Les tableaux suivants regroupent la littérature se rapportant à l'isolement de C. neoformans à partir de fientes de pigeons ou de sol contaminé par des fientes de pigeons.

Auteurs	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs
I. <u>Afrique</u>		
Tunisie		
Kchouk <u>et al.</u> 1972	18	1
II. <u>Amérique Centrale</u>		
El Salvador		
Godoy <u>et al.</u> 1966	115	14
III. <u>Amérique du Sud</u>		
Brésil		
Silva & Paula 1963	10	2
Colombie		
Mira <u>et al.</u> 1968	80	8
IV. <u>Asie</u>		
Inde		
Sethi <u>et al.</u> 1966	36	2
Gugnani <u>et al.</u> 1967	141	13
Padhye & Thirumalachar 1967	10	6
Gugnani <u>et al.</u> 1972	141	18
Verma, P.C. & Kalra 1976	6	2
Corée		
Lee & Suh 1975	248	67
Thaïlande		
Taylor & Duanginani 1968	34	7
Thasnakorn <u>et al.</u> 1970	12	8
Nissaisorakan 1972	848	31

Certains auteurs, tels Brumpt & Moisant (1964), Brumpt et al. (1965) au Cambodge, Basu Mallik et al. (1967) en Inde constatent que certains de leurs patients atteints de cryptococcose ont de fréquents contacts avec des pigeons.

Randhawa & Paliwal (1979) prélèvent 835 échantillons de types divers chez 760 patients présentant des problèmes pulmonaires. Trois d'entre eux, dont deux ont de fréquents contacts avec des pigeons, ont des expectorations positives.

La littérature indienne témoigne aussi d'autre part de l'isolement de C. neoformans à partir d'expectorations de gens apparemment sains, la levure étant considérée dans ce cas comme saprophyte.

Sandhu et al. (1964) isolent C. neoformans à partir d'expectorations chez un individu sain.

Gugnani et al. (1972) démontrent la positivité des expectorations d'un préposé à l'entretien des volières du parc zoologique de Delhi.

Les expectorations de 35 de ses collègues dont 11 sont affectés à l'entretien de volières, sont négatives.

En 1977, Randhawa & Paliwal effectuent, toujours chez des individus apparemment en bonne santé, 820 lavages oropharyngés dont 1 est positif et 723 écouvillonnages dans les espaces interdigitaux dont 6 sont positifs pour C. neoformans.

Tout comme dans les régions tempérées, les déjections de pigeons constituent apparemment en région tropicale un excellent milieu de culture pour C. neoformans.

Alors que l'on isole assez fréquemment C. neoformans à partir de fientes de pigeons ou de sol contaminé par des déjections de pigeons, la positivité de sols non mélangés à des fientes de pigeons est faible ou nulle.

C'est ce qu'observent au Brésil, Rogers & Beneke (1964) qui n'isolent que 4 souches de C. neoformans à partir de 202 échantillons de sol pur. De même, au Venezuela, Salfelder et al. (1968) isolent 1 souche pour 336 échantillons de sol. Aucune souche n'est isolée par Gugnani et al. (1972) qui examinent 30 échantillons de sol prélevé en Inde.

Le pigeon joue donc aussi en région tropicale un rôle essentiel dans l'épidémiologie de la cryptococcose.

Des travaux indiens, dus à Z.U. Khan et al. (1978) démontrent la positivité de jabots de pigeons, de l'air de pigeonniers. Des observations semblables ont été faites en Belgique (Swinne 1979).

Quelques travaux témoignent de la positivité de fientes d'oiseaux autres que celles des pigeons.

La positivité de fientes de poules est signalée au Brésil (Silva 1960), la positivité de fientes de coucou en Thaïlande (Taylor & Duangmani 1968).

Enfin, en Corée, Lee & Suh (1975) signalent la positivité de fientes de poules, de faisans, de moineaux, de pinsons, de colombes, de cacatoes.

B. Essais d'isollements de Cryptococcus neoformans à partir de fientes d'oiseaux récoltées en pays tropicaux

1. Introduction

Comme nous l'avons déjà précédemment souligné, l'isolement de C. neoformans à partir de fientes pose de nombreux problèmes. Le manque d'homogénéité des pourcentages de positivité observé dans la littérature ne tient pas exclusivement à la technique utilisée pour isoler C. neoformans à partir des fientes, mais aussi à l'état initial du matériel récolté.

Staib (1963) démontre le maintien de C. neoformans dans des fientes de canaris conservées durant 420 jours à température ambiante et complètement desséchées.

Nous avons (Swinne 1979) mélangé C. neoformans à des fientes de pigeons et nous avons exposé les mélanges aux intempéries durant 2 ans.

C. neoformans a résisté pendant toute la durée de l'expérience mais nous avons néanmoins constaté qu'il résiste bien mieux lorsque les fientes sont à l'abri des intempéries. Les fientes se dessèchent alors progressivement et forment une espèce de galette au sein de laquelle C. neoformans reste vivant.

Lorsque les fientes sont fraîches, on assiste tout d'abord à une multiplication très rapide du C. neoformans.

Cette multiplication se poursuit tant que le pH reste favorable à la survie de C. neoformans, c'est-à-dire inférieur à des valeurs voisines de 8,0.

Au bout de 24 à 28 h, le pH se rapproche ou atteint 8,0 et devient dans ce cas défavorable, ce qui entraîne la chute du nombre des levures.

Pour remédier à cet inconvénient, il faut conserver les fientes fraîches positives à une température voisine de -10°C, qui empêche la multiplication du C. neoformans mais permet le maintien du pH dans une zone favorable à sa survie. On pourra donc ainsi avoir une estimation exacte du nombre de C. neoformans initialement présent dans l'échantillon de fientes. Si l'on est dans l'impossibilité de stocker les fientes au frigo, ce qui se produit quand il faut expédier les échantillons par voie postale, il importe de dessécher l'échantillon avant de l'expédier. Nous avons donc toujours suggéré aux gens qui nous expédient des fientes de pigeons de les faire sécher avant de les expédier, et ce à l'air libre mais à l'ombre, Ishag *et al.* (1968) ayant constaté l'effet nocif de la lumière sur le maintien de C. neoformans dans les fientes de pigeons.

2. Techniques

Nous avons utilisé une technique d'ensemencement direct de fientes émulsionnées sur milieu sélectif. Lorsque nous disposions de suffisamment de matériel, 1 ml environ de fientes était émulsionné dans 9 ml d'eau physiologique stérile.

Un écouvillon stérile y était trempé et appliqué à la surface du milieu de culture gélosé coulé en boîtes de Petri.

Quand nous ne disposions que de peu de matériel, celui-ci était émulsionné dans une quantité proportionnellement plus réduite d'eau physiologique stérile.

Le milieu sélectif utilisé est le milieu de Hopfer & Blank (1975) à l'acide caféique.

On sait depuis fort longtemps (Staib 1962) que l'incorporation d'extraits aqueux de Guizotia abyssinica broyés à un milieu de culture provoque le brunissement spécifique du C. neoformans sur ce milieu.

C. neoformans synthétise en effet un enzyme - la phénoloxydase - dont l'action a comme conséquence d'aboutir à la formation d'un pigment proche de la mélanine.

Un effet similaire s'observe si l'on utilise de l'acide caféique comme substrat.

Hopfer & Blank signalent le brunissement de C. neoformans sur le milieu proposé en un maximum de 4 jours, un début de pigmentation étant déjà décelable après 24 h.

Ce milieu (voir index, n°1, p. 60) contient en outre du citrate ferrique dont l'incorporation accélère le brunissement, 1 g/l de chloramphénicol et 1 g/l de diphényle, ce dernier ayant pour fonction d'inhiber la croissance des moisissures.

Le milieu est coulé à raison de 20 ml par boîte de Petri. Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 25°C pendant 1 semaine.

3. Résultats

Nous avons reçu 207 échantillons mais 5 d'entre eux contenaient essentiellement des graines et non des fientes de Colombidae. Nous ne les avons donc pas comptés.

48 d'entre eux avaient un pH ne permettant pas la survie de C. neoformans. Le total réel des échantillons examinés est donc de 154.

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau suivant :

Nombre de souches de C. neoformans isolées à partir de fientes de Colombidae récoltées dans les pays tropicaux.

	Nbre échant. fientes	Nbre échant. positifs
Pigeons	143	26
Tourterelles	11	2
	154	28

Ce qui correspond à 18,1% de positivité.

Si nous éliminons les 9 échantillons reçus de Bolivie et d'Iran pour ne garder que les 145 échantillons reçus d'Afrique, nous constatons que nous avons isolé 28 souches de C. neoformans à partir de 145 échantillons de fientes de Colombidae, ce qui nous donne 19,3% de positivité.

Les résultats se répartissent comme suit

I - Fientes de pigeons

Pays	Nbre échant. fientes	Nbre échant. positifs
Algérie (1)	32	1
Maroc (2)	21	1
Côte d'Ivoire (3)	3	2
Togo (4)	24	16
Zaïre (5)	54	6
	134	26

II - Fientes de tourterelles

Pays	Nbre échant. fientes	Nbre échant. positifs
Maroc (6)	8	1
Burundi (7)	3	1
	11	2

Références des souches :

(1) : RV 45846; (2) : RV 46472; (3) : RV 46288; (4) : RV 45874 - RV 45875
RV 45876 - RV 45877 - RV 45878 - RV 45879 - RV 45880 - RV 45881 -
RV 45882 - RV 45883 - RV 45884 - RV 45885 - RV 45886 - RV 45887 -
RV 45888 - RV 45889;

(5) : RV 42544 - RV 45719 - RV 45720 - RV 46289 - RV 46290;

(6) : RV 45718; (7) : RV 43172.

Les souches RV 45846, RV 46472 et RV 45718 proviennent de régions à climat méditerranéen.

Rassemblons donc en un tableau les résultats obtenus pour l'Afrique :

Isolement de souches de C. neoformans à partir de fientes de Colombidae récoltées en Afrique

	Nbre échant. fientes	Nbre échant. positifs	% +
Pigeons	134	26	19,4
Tourterelles	11	2	18,1
	145	28	19,3

Comparons les résultats obtenus pour les fientes de pigeons à ceux obtenus en Belgique pour des récoltes d'échantillons effectuées dans des pigeonniers privés (Swinne 1979).

Isolement de souches de C. neoformans à partir de fientes de pigeons récoltées en Belgique et en Afrique

	Nbre échant. fientes	Nbre échant. positifs	% +
Belgique	232	27	11,2
Afrique	134	26	19,4

La différence est statistiquement significative ($\chi^2_1 = 4,096$).

4. Discussion et conclusions

Nos résultats montrent la plus grande positivité des fientes de Colombidae en Afrique.

Ces résultats expérimentaux sont vraisemblablement très proches de la réalité. Il faut néanmoins se garder de toute conclusion hâtive en raison de l'hétérogénéité du matériel reçu.

Nous pouvons justifier notre attitude par deux exemples.

- Sur les 32 échantillons reçus d'Algérie et prélevés à Alger, 3, dont l'un d'entre eux est positif, proviennent d'un pigeonnier privé. Ces 3 échantillons proviennent d'endroits abrités ce qui constitue un facteur favorable au maintien de C. neoformans dans les fientes.

Les 29 autres échantillons ont, par contre, été récoltés sur des monuments et au hasard des rues d'Alger, ont donc été vraisemblablement soumis à l'action du soleil, des intempéries, facteurs défavorables au maintien de C. neoformans dans les fientes de pigeons.

- Pour les fientes récoltées au Togo, nous n'avons aucun renseignement quant à l'origine des 24 échantillons reçus si ce n'est qu'ils ont été prélevés par la même personne. La positivité de 16 d'entre eux n'est peut-être due qu'au seul fait qu'ils ont été prélevés dans le même pigeonnier.

C. Etude comparative de souches de Cryptococcus neoformans

1. Matériel

Nous avons comparé des souches d'origines parasitaire et saprophytique, en provenance d'Europe et de régions tropicales. Nous avons étudié un total

de 90 souches de C. neoformans provenant de la collection du laboratoire de Mycologie de l'Institut de Médecine tropicale (Antwerpen). *

Ce sont :

- 18 souches isolées en cas de cryptococcoses humaines européens (a);
- 12 souches isolées de cas de cryptococcoses humaines africains (b);
- 30 souches de sources saprophytiques européennes (c);
- 30 souches de sources saprophytiques tropicales (d).

a. Liste des souches isolées de cas de cryptococcoses en Europe

N°	Référence	Origine géographique
1	RV 11824	Belgique
2	RV 15412	Allemagne
3	RV 15413	Allemagne
4	RV 15414	Allemagne
5	RV 15415	Allemagne
6	RV 18037	Belgique
7	RV 25794	Belgique
8	RV 26508	Belgique
9	RV 27720	Belgique
10	RV 27777	Belgique
11	RV 33370	Belgique
12	RV 33938	Belgique
13	RV 34018	Belgique
14	RV 34802	Italie
15	RV 36214	Italie
16	RV 37169	Belgique
17	RV 40391	Belgique
18	RV 45385	Belgique

* Certaines de ces souches ont été isolées par le Pr F. Gatti, le Dr A. Lassagni, le Dr H.S. Randhawa, le Pr F. Staib, le Dr J. Stijns et le Pr J. Vandepitte.

b. Liste des souches isolées de cas de cryptococcose en Afrique

N°	Référence	Origine géographique
19	RV 3463	Zaïre
20	RV 5265	Zaïre
21	RV 8001	Zaïre
22	RV 13645	Zaïre
23	RV 20185	Zaïre
24	RV 20186*	Zaïre
25	RV 25803	Zaïre
26	RV 25804	Zaïre
27	RV 26951	Zaïre
28	RV 26952	zaïre
29	RV 41011	Zaïre
30	RV 41257	Zaïre

c. Liste de souches isolées de sources saprophytiques en Europe

N°	Référence	Origine	Origine géographique
31	RV 15411	fientes canaris	Allemagne
32	RV 26211	fientes pigeons	Belgique
33	RV 29038	fientes canaris	Belgique
34	RV 29063	fientes canaris	Belgique
35	RV 29192	air d'un pigeonnier	Belgique
36	RV 29291	fientes pigeons	Belgique
37	RV 29445	fientes canaris	Belgique
38	RV 29482	jabot de pigeons	Belgique
39	RV 29483	air d'un pigeonnier	Belgique
40	RV 29485	jabot de pigeons	Belgique
41	RV 29491	fientes de pigeons	Belgique
42	RV 29654	fientes de pigeons	Belgique
43	RV 30060	fientes de pigeons	Belgique
44	RV 30654	fientes de pigeons	Belgique
45	RV 30655	fientes de pigeons	Belgique
46	RV 30710	fientes de pigeons	Belgique
47	RV 30711	fientes de pigeons	Belgique
48	RV 30952	eau de boisson de pigeons	Belgique
49	RV 30957	eau de boisson de pigeons	Belgique
50	RV 31002	air d'un pigeonnier	Belgique
51	RV 31372	fientes pigeons	Belgique
52	RV 31563	fientes pigeons	Belgique
53	RV 31590	fientes pigeons	Belgique
54	RV 31591	fientes pigeons	Belgique
55	RV 32955	jabot de pigeons	Belgique
56	RV 32958	jabot de pigeons	Belgique
57	RV 33161	jabot de pigeons	Belgique
58	RV 34343	fientes de pigeons	Belgique
59	RV 34345	jabot de pigeons	Belgique
60	RV 34393	fientes de pigeons	Belgique

* C. neoformans var. gattii

d) Liste des souches isolées de sources saprophytiques dans des pays tropicaux
(exc. les souches RV 45718 et 45846)

N°	Référence	Origine	Origine géographique
61	RV 28082	fientes pigeons	Zaïre
62	RV 42544	fientes pigeons	Zaïre
63	RV 43172	fientes de tourterelles	Burundi
64	RV 45718	fientes de tourterelles	Maroc
65	RV 45719	fientes de pigeons	Zaïre
66	RV 45720	fientes de pigeons	Zaïre
67	RV 45846	fientes de pigeons	Algérie
68	RV 45874	fientes de pigeons	Togo
69	RV 45875	fientes de pigeons	Togo
70	RV 45876	fientes de pigeons	Togo
71	RV 45878	fientes de pigeons	Togo
72	RV 46115	végétaux	Inde
73	RV 46116	végétaux	Inde
74	RV 46118	expectorations	Inde
75	RV 46119	fientes de pigeons	Inde
76	RV 46122	fientes de pigeons	Inde
77	RV 46123	expectorations*	Inde
78	RV 46124	expectorations	Inde
79	RV 46125	expectorations	Inde
80	RV 46126	expectorations	Inde
81	RV 46127	expectorations	Inde
82	RV 46128	expectorations	Inde
83	RV 46129	fientes de pigeons	Inde
84	RV 46130	fientes de pigeons	Inde
85	RV 46131	fientes d'oiseaux	Inde
86	RV 46132	fientes d'oiseaux	Inde
87	RV 46288	fientes de pigeons	Côte d'Ivoire
88	RV 46289	fientes de pigeons	Zaïre
89	RV 45880	fientes de pigeons	Togo
90	RV 45888	fientes de pigeons	Togo

* Les souches de C. neoformans isolées d'expectorations humaines et considérées comme étant d'origine saprophytique nous ont été envoyées par le Dr H.S. Randhawa.

2. Etude biochimique comparée de 90 souches de *C. neoformans* d'origines diverses

a. Introduction

La détermination spécifique de *C. neoformans* implique nécessairement l'inoculation intracrânienne à la souris blanche (Vanbreuseghem 1966). La pathogénicité vis-à-vis de la souris blanche constitue un élément indispensable à la détermination de cette levure, mais pour pouvoir être considérée comme une souche appartenant à l'espèce *C. neoformans*, toute levure doit néanmoins aussi répondre à certains critères mentionnés par Lodder (1970).

b. Etude comparée

Les 90 souches ne fermentent pas les sucres, hydrolysent l'urée, se reproduisent par bourgeonnement multipolaire, ne produisent pas de pseudo-mycélium et synthétisent sur certains milieux de culture des substances apparentées à l'amidon.

Elles assimilent l'inositol comme source de carbone. A cet ensemble de particularités, nous ajouterons que les 90 souches poussent à 37°C, ne poussent pas sur un milieu auquel on a ajouté 0,5 mg/ml d'actidione, n'assimilent pas le nitrate de potassium comme source d'azote, assimilent le maltose, le sucrose mais non le mélibiose et le lactose comme source de carbone.

Néanmoins, en ce qui concerne l'utilisation d'erythritol comme source de carbone, Lodder signale qu'elle peut être positive ou négative suivant les souches. Aucune des 90 souches testées n'assimile en fait totalement l'erythritol, seules 5 d'entre elles donnent un résultat plus ou moins positif. Ce sont 3 souches d'origine européenne, RV 26211, RV 30710 isolées de fientes de pigeons, RV 29483 isolée de l'air d'un pigeonnier et deux souches d'origine indienne, RV 46115 isolée de végétaux et RV 46122 isolée de fientes de pigeons.

En ce qui concerne l'assimilation de rhamnose considérée comme toujours positive pour *C. neoformans*, nous avons constaté qu'une souche, RV 18037, isolée d'un cas de cryptococcose humaine en Belgique, faisait exception et ne l'assimilait pas.

Nous avons aussi voulu vérifier le brunissement des 90 souches sur milieu à l'acide caféique. Nous avons utilisé le milieu de Hopfer & Blank (1975) déjà utilisé précédemment pour l'isolement de *C. neoformans* à partir de fientes de pigeons.

Nous n'y avons pas incorporé de chloramphénicol, ni de diphényle puisqu'il s'agissait, cette fois, d'y ensemercer des souches pures.

Nous avons constaté le brunissement de 100% des souches d'origine saprophytique en 24 h, qu'elles aient été isolées en Europe ou dans des régions tropicales.

Pour les souches d'origine parasitaire, par contre, le brunissement est plus tardif.

Seules 22 souches sur 30 étaient brunes au bout de 24 h (12/18 d'origine européenne et 10/12 d'origine africaine).

100% des souches étaient néanmoins brunes au bout de 4 jours, laps de temps recommandé par Hopfer & Blank pour la lecture des résultats.

c. Conclusions

L'examen des résultats obtenus ne nous permet pas de conclure à l'existence d'un critère biochimique de différenciation entre les souches d'origines européenne et tropicale. Par contre, nous observons une différence entre les souches d'origines saprophytique et parasitaire en ce qui concerne le brunissement sur milieu de Hopfer & Blank.

Alors que 100% des souches d'origine saprophytique sont brunes après 24 h d'incubation, ce brunissement ne s'observe que dans 22 cas sur 30 au bout de 24 h s'il s'agit de souches d'origine parasitaire.

3. Sensibilité à la 5-fluorocytosine

a. Introduction

La 5-fluorocytosine* (5-FC) est un antifongique de synthèse fabriqué par les Laboratoires Roche. C'est un dérivé fluoré de la cytosine, base pyrimidique intervenant dans la composition des acides nucléiques. 5-FC agit en interférant avec le métabolisme de l'uracile au niveau des acides ribonucléiques et non avec la cytosine comme telle, l'uracile provenant de la désamination de la cytosine.

La 5-FC est utilisée pour le traitement de la cryptococcose humaine, en association avec l'amphotéricine B (Jimbow et al. 1978, Bennett et al. 1979).

Ceci constitue actuellement la thérapeutique de choix pour la cryptococcose, les auteurs ayant noté que l'administration combinée d'amphotéricine B et de 5-FC produisait un effet synergétique. La durée du traitement en est aussi réduite. On peut utiliser des doses moins élevées d'amphotéricine B que lorsque cette dernière est administrée seule, ce qui est avantageux puisque cet antifongique est fort toxique. On supprime enfin, par l'administration combinée des 2 antifongiques, le risque lié à l'apparition et au maintien de souches de C. neoformans résistants à la 5-FC.

* N° expérimentation : RO-2-9915.

Dès 1969, Shadomy signale en effet que si la concentration minimale inhibitrice de souches sensibles de C. neoformans est comprise entre 0,46 et 3,9 μ g/ml, on constate très fréquemment l'apparition de souches résistantes à plus de 1000 μ g/ml chez des patients ayant été traités à la 5-FC, alors que presque 100% des souches de C. neoformans isolées avant le début du traitement sont sensibles à un maximum de 10 μ g/ml de 5-FC (Block et al., 1973)

Ces auteurs déterminent aussi que cette résistance n'est pas induite par la 5-FC.

La drogue agit comme agent sélecteur, en supprimant les cellules sensibles tout en permettant la multiplication des cellules résistantes.

Dans une population résistante, 100% des cellules montrent une résistance à la 5-FC.

Le but poursuivi a été de déterminer quelle était la répartition géographique des souches résistantes à la 5-FC.

b. Matériel et méthode

Nous avons déterminé la sensibilité à la 5-FC de 90 souches européennes ou tropicales, d'origines parasitaire ou saprophytique.

Les concentrations minimales inhibitrices variant en fonction de la taille de l'inoculum, de la température et de la durée de l'incubation (Block et al., 1973), nous avons très rigoureusement maintenu les mêmes conditions expérimentales pour les 90 souches testées.

La sensibilité vis-à-vis de la 5-FC a tout d'abord été testée sur le milieu de Shadomy* comme le recommande la firme Rosco** qui vend des pastilles de 5-FC. Le milieu est coulé en boîte de Petri. Onensemence une suspension contenant 10^4 à 10^5 cellules par ml à la surface du milieu de culture avant de déposer les pastilles d'antifongiques. La suspension est étalée avec un écouvillon. Les levures proviennent de cultures âgées de 48 h. Les pastilles contiennent 10 μ g de 5-FC.

Les boîtes de Petri sont ensuite incubées à 25°C pendant 48 h et non à 37°C pendant 24 à 28 heures comme la firme le recommande.

La croissance de C. neoformans est favorisée par une incubation à 25°C et les résultats bien plus aisés à lire (Swinne 1977).

Au bout de 48 heures, on constate, s'il y a inhibition de la croissance de C. neoformans, la présence d'une zone circulaire d'inhibition centrée sur la pastille chargée de 5-FC. La longueur du diamètre de la zone d'inhibition est inversement proportionnelle à la concentration minimale inhibitrice.

* Voir index des milieux : n°2.

** A/S Rosco-Denmark : Antimicrobial sensitivity testing using "neo-sensitabs"
- J.B. Casals, O.G. Pedersen, 1980, 5th ed.

La firme Rosco interprète les résultats de la manière suivante :

Types de souches	Longueur du diamètre en mm
sensibles	≥ 30
intermédiaires	23 - 29
résistantes	≤ 22

Ces estimations sont bien sûr valables pour une incubation de 24 h à 28 h à 37°C et ne sont donc pas rigoureusement valables pour nos conditions expérimentales (48 h à 25°C) puisque Block et al. (1973) affirment que la concentration minimale inhibitrice est fonction de la température et de la durée de l'incubation.

Comme nos conditions expérimentales sont plus favorables à la croissance de la levure et de ce fait défavorables à l'action de la 5-FC, nous pouvons considérer que, testées dans nos conditions expérimentales, les 90 souches auront une concentration minimale inhibitrice supérieure à celles observées dans les conditions expérimentales recommandées par la firme Rosco : une souche répertoriée comme sensible pour nous, l'est très certainement pour la firme Rosco !

Dans un premier temps, la sensibilité ou la résistance des 90 souches à la 5-FC a été testée à deux reprises sur boîte de Petri, et estimée en fonction du diamètre d'inhibition.

Nous avons ensuite pour 7 souches déterminé avec précision la concentration minimale inhibitrice.

Les tests ont été réalisés en milieu "Yeast morphological agar" (YMA), les dilutions de 5-FC ont été réalisées en eau distillée à partir d'une solution-mère filtrée sur Seitz.

L'expérience est réalisée en éprouvettes. L'inoculum est de $2 \cdot 10^4$ C. neoformans par tube. Chaque tube contient 4 ml de milieu de base (YMA). Le milieu de base est fondu, maintenu liquide à 45°C au bain-marie. On y ajoute alors 0,5 ml de suspension de levures en eau distillée et 0,5 ml de la solution de 5-FC concentrée 10 x par rapport à la concentration désirée. On laisse solidifier en inclinant les tubes.

Les concentrations finales testées sont : 0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 15 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml.

Le seuil de "sensibilité" à la 5-FC se situe à 10 µg/ml. Au-delà on parle de souche "résistante" (Block et al. 1973). Chaque souche a été testée à deux reprises pour chaque concentration. Deux tubes témoins ne contenaient pas de 5-FC. L'incubation permettant une lecture aisée des résultats est de 72 h à 25°C.

c. Résultats

1) Sensibilité ou résistance à la 5-FC estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition.

a) 83 souches sur 90 sont très nettement sensibles à la 5-FC, le diamètre du disque d'inhibition centré sur la pastille varie de 40 mm à 60 mm. Le centre du disque est occupé par une zone d'inhibition totale dont le diamètre excède les 30 mm. Une zone d'inhibition partielle, annulaire, l'entoure.

La firme Rosco estime qu'une souche est sensible à la 5-FC si le diamètre de la zone d'inhibition est au moins égal à 30 mm. Les 83 souches sont dans ce cas-là. Pour 2 d'entre elles (RV 33161 : souche européenne d'origine saprophytique isolée du jabot de pigeons et RV 46116 : souche indienne d'origine saprophytique isolée de végétaux), nous notons l'apparition dans la zone d'inhibition totale, de résistants secondaires. Ce phénomène est bien connu pour la 5-FC et mentionné notamment par Drouhet et al. (1976).

b) 6 autres souches semblent légèrement moins sensibles. L'inhibition n'est en effet jamais complète après 48 h d'incubation à 25°C. Le diamètre du disque d'inhibition partielle excède cependant toujours les 30 mm. Ce sont 6 souches d'origine saprophytique :

- 4 d'entre elles sont des souches européennes isolées à partir de fientes de pigeons : RV 29291; RV 29491; RV 30655; RV 30711.
- 2 d'entre elles sont des souches indiennes : RV 46115 isolée à partir de végétaux et RV 46122 isolée à partir de fientes de pigeons.

c) 1 souche est totalement résistante à la 5-FC. Il s'agit de la souche RV 32955, d'origine saprophytique européenne, isolée de jabot de pigeon. La pastille chargée de 10 µg/ml n'est entourée d'aucune zone d'inhibition, même partielle.

2) Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la croissance de Cryptococcus neoformans

Les tests ont été réalisés avec 7 souches de C. neoformans :

- 4 souches très sensibles à la 5-FC (S) choisies parmi les 83 souches dont le disque d'inhibition à la 5-FC comprend une zone centrale d'inhibition totale. Ce sont les souches RV 29063, RV 29192, RV 29482, RV 29485;
- 2 autres souches moins sensibles à la 5-FC (I) choisies parmi les 6 souches dont le disque d'inhibition ne comporte pas de zone d'inhibition totale. Ce sont les souches RV 46115 - RV 46122;
- 1 souche totalement résistante à la 5-FC (R). C'est la souche RV 32955.

L'origine des souches est mentionnée dans le tableau suivant :

N° souches	Type	Orig. géo.	Sources
RV 29063	S	Europe	fientes de canaris
RV 29192	S	Europe	air d'un pigeonier
RV 29482	S	Europe	jabot de pigeons
RV 29485	S	Europe	jabot de pigeons
RV 32955	R	Europe	jabot de pigeons
RV 46115	I	Inde	végétaux
RV 46122	I	Inde	fientes de pigeons

Les résultats sont mentionnés dans le tableau ci-dessous de la manière suivante :

++++ = 100% de croissance; +++ = 75% de croissance; ++ = 50% de croissance; + = 25% de croissance; /- / = pas de croissance ou inhibition complète.

Souches	Concentrations en 5-FC - μ g/ml*			
	0	0,1	1	5
RV 29063	++++ / +++++	++ / ++	/- / - /	/- / - /
RV 29192	++++ / +++++	+ / +	/- / - /	/- / - /
RV 29482	++++ / +++++	+ / - /	/- / - /	/- / - /
RV 29485	++++ / +++++	++ / ++	/- / - /	/- / - /
RV 32955	++++ / +++++	++++ / +++++	++++ / +++++	++++ / +++++
RV 46115	++++ / +++++	+++ / +++	/- / - /	/- / - /
RV 46122	++++ / +++++	+++ / +++	+ / +	/- / - /

Il y a inhibition totale dans tous les tubes contenant 10, 15, 50 et 100 μ g/ml pour toutes les souches sauf pour RV 32955 dont la croissance n'est absolument pas inhibée même dans les tubes contenant 100 μ g/ml : cette souche est donc bien résistante à la 5-FC.

Les concentrations minimales inhibitrices (C.M.I.) des autres souches sont :

N° souche

RV 29063 : 0,1 < CMI \leq 1 μ g/ml

RV 29192 : 0,1 < CMI \leq 1 μ g/ml

RV 29482 : 0,1 < CMI \leq 1 μ g/ml

RV 29485 : 0,1 < CMI \leq 1 μ g/ml

RV 46115 : 0,1 < CMI \leq 1 μ g/ml

RV 46122 : 1 < CMI < 5 μ g/ml

* 2 tubes par C°.

Si l'on examine avec plus d'attention les croissances observées dans les tubes contenant $0,1 \mu\text{g/ml}$, nous pouvons constater que 4 de ces 6 souches semblent plus sensibles : ce sont les souches n^{os} RV 29063, RV 29192, RV 29482, RV 29485. Ces 4 souches correspondent aux 4 souches choisies parmi les 83 souches donnant une zone d'inhibition totale au centre du disque d'inhibition observé avec la technique des pastilles de 5-FC. (p. 41). Les 2 autres souches (RV 46115 et RV 46122) correspondent aux 2 souches choisies parmi les 6 souches ne donnant pas de zone d'inhibition totale au centre du disque d'inhibition observé avec la technique des pastilles de 5-FC (p. 41).

d) Conclusions

Les résultats obtenus par la technique d'ensemencement sur boîte de Petri, suivie du dépôt de pastilles chargées de $10 \mu\text{g}$ de 5-FC sont confirmés par la technique des dilutions successives en tubes. Cette dernière technique plus précise permet la détermination des concentrations minimales inhibitrices.

On peut estimer que 83 sur 90 souches auront une concentration minimale inhibitrice supérieure à $0,1 \mu\text{g/ml}$, mais inférieure ou égale à $1 \mu\text{g/ml}$.

6 autres souches, dont la sensibilité est moins accusée, ont une concentration minimale inhibitrice qui doit varier entre $0,1 \mu\text{g/ml}$ et $5 \mu\text{g/ml}$.

Nous avons enfin isolé 1 souche résistante à la 5-FC : il s'agit d'une souche européenne saprophytique isolée de jabot de pigeons. Cette souche semble devenue naturellement résistante; elle n'a en effet apparemment jamais été en contact avec la 5-FC.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre la sensibilité vis-à-vis de la 5-fluorocytosine et l'origine géographique des souches de C. neoformans, alors que ce fait se vérifie pour C. albicans.

Pour cette espèce de levure, la résistance à la 5-fluorocytosine est liée au sérotype B, prédominant en milieu africain (Drouhet et al. 1975).

4. Essais d'obtention des formes sexuées de Cryptococcus neoformans

a. Introduction

Kwon Chung (1975, 1976) décrit les deux formes sexuées de C. neoformans : Filobasidiella neoformans et Filobasidiella bacillispora.

En effet, à une seule forme asexuée correspondent 2 formes sexuées. L'obtention de ces dernières permet de ranger C. neoformans au sein de la Classe des Basidiomycètes.

La distinction entre les deux espèces se fait sur base de la morphologie des basidiospores qui sont rondes chez F. neoformans et bacilliformes chez F. bacillispora. On peut aussi distinguer les 2 espèces sexuées sur base de

caractères sérotypiques. On observe 4 sérotypes différents chez C. neoformans, dénommés A, B, C, D : F. neoformans correspond aux sérotypes A et D de C. neoformans et F. bacillispora aux sérotypes B et C.

Il s'agit de deux espèces hétérothalles et l'obtention de ces formes sexuées implique le mélange de souches des 2 types (=mating types) opposés α et a appartenant à une même espèce. La forme sexuée s'obtient sur "malt extract agar", "hay infusion agar", ou sur Vg dilué après une incubation de 2 à 3 semaines à 25°C (Kwon Chung 1977).

Kwon Chung (1977) confirme l'existence de souches auto-fertiles de type αa .

Sur un ensemble de 328 souches de C. neoformans dont 94 ont une origine saprophytique et 234 une origine parasitaire, elle en isole 2 qui sont auto-fertiles, c'est-à-dire de type αa . Ce sont deux souches en provenance de cas cliniques. Il est également possible de fabriquer artificiellement des souches de type αa en laboratoire par croisement de souches α et a sur milieu de culture. La fertilité d'une souche de type αa s'accroît cependant si on la croise avec une souche de type a .

Les deux espèces de Filobasidiella se rencontrent comme agents de la cryptococcose humaine et animale.

Bennett et al. (1977) étudient 277 souches isolées de cas de cryptococcoses humaines ou animales dont 272 proviennent des Etats-Unis, et 117 souches d'origine saprophytique dont 89 proviennent des Etats-Unis. Ils en déterminent le sérotype et les résultats sont mentionnés dans le tableau suivant :

Détermination du sérotype de souches de C. neoformans d'origine saprophytique et parasitaire

Origines	Nbre souches	Sérotypes					
		A	B	C	D	AD	indét.
para.	277	203 (74,6%)	28 (10,3%)	11 (4,0%)	13 (4,8%)	11 (4,0%)	6 (2,2%)
sapro.	117	99 (84,6%)	0 (0%)	0 (0%)	17 (14,5%)	0 (0%)	1 (0,8%)

Commentaire

Qu'il s'agisse de souches d'origine parasitaire ou saprophytique le sérotype A est le plus fréquemment isolé. L'espèce F. neoformans qui correspond aux sérotypes A et D est donc bien plus fréquente que l'espèce F. bacillispora qui correspond aux sérotypes B et C. Il faut remarquer qu'aucune souche appartenant aux sérotypes B et C n'a été isolée de source saprophytique, on ne connaît donc pas la source saprophytique de l'espèce F. bacillispora.

Les auteurs signalent cependant l'hétérogénéité de la répartition géographique des souches d'origine parasitaire. Alors que pour l'ensemble des Etats-Unis, l'espèce F. neoformans est plus fréquemment responsable de cryptococcose, il n'en est pas de même si l'on prend uniquement les souches isolées en Californie du Sud. Dans cette région, F. neoformans et F. bacillispora sont tous deux, dans des proportions équivalentes, responsables de cryptococcoses humaines et animales.

Les types α et a se rencontrent tous deux au sein de chacun des 4 sérotypes. Kwon Chung & Bennet (1978) étudient leur répartition au sein de souches d'origines parasitaire et saprophytique. Les résultats sont mentionnés dans les deux tableaux suivants :

- 1) Détermination de la répartition des types α et a, parmi 105 isoléments de C. neoformans d'origine saprophytique

Mating types	Sérotypes						
	A	B	C	D	AD	indét.	Tot.
α	73	0	0	13	0	1	87
a	0	0	0	2	0	0	2
α a	0	0	0	0	0	0	0
indét.	16	0	0	0	0	0	16
Tot.	89	0	0	15	0	1	105

- 2) Détermination de la répartition des types α et a, parmi 208 isoléments de C. neoformans d'origine parasitaire

Mating types	Sérotypes						
	A	B	C	D	AD	indét.	Tot.
α	138	14	7	11	4	0	174
a	2	3	1	1	0	0	7
α a	0	0	0	2	0	0	2
indét.	17	6	0	2	0	0	25
Tot.	157	23	8	16	4	0	208

Commentaire

Qu'il s'agisse de souches d'origine parasitaire ou saprophytique, le type α est bien plus fréquent que le type a. On rencontre α et a dans les proportions de ± 40 pour 1 quand il s'agit de souches d'origine saprophytique et dans les proportions de 25 pour 1 quand il s'agit de souches d'origine parasitaire.

Le but de notre travail a été d'essayer d'obtenir la forme sexuée des 90 souches de C. neoformans étudiées afin de déterminer l'éventuelle existence d'un lien entre la répartition géographique, l'origine des souches et l'appartenance à l'une ou l'autre des formes sexuées.

b. Matériel et méthode

Le milieu utilisé est le Vg dilué au $1/10^e$ *, coulé en boîtes de Petri. Il s'agit d'un milieu recommandé par Kwon Chung (1977). Chacune des 90 souches a été croisée avec 4 souches-tests : Filobasidiella neoformans (RV 45980), F. neoformans α (RV 45981), Filobasidiella bacillispora α (RV 45979) et F. bacillispora α (RV 45977).**

Les croisements sont répétés 2 fois.

Si les résultats ne sont pas les mêmes, on répète une 3^e et si nécessaire, une 4^e fois, l'expérience pour obtenir confirmation des résultats observés.

Les croisements s'effectuent de la manière suivante : des quantités équivalentes (\pm 0,2 ml) de chacune des 90 cultures de C. neoformans et de chacune des 4 souches-tests (cultures âgées de 48 h) sont mélangées et étalées à la surface du milieu de culture coulé en boîte de Petri. L'incubation est de 3 semaines à température ambiante. S'il y a réaction sexuée, apparaissent en bordure des colonies, essentiellement dans la gélose, des filaments terminés en massues (basides), surmontés de 4 basidiospores théoriquement rondes chez F. neoformans et bacilliformes chez F. bacillispora.

L'apparition de la forme sexuée se voit à l'œil nu dans la plupart des cas. L'examen détaillé des filaments, basides et basidiospores ne peut se faire qu'au microscope (x 250, x 400).

Chacune des 90 souches de C. neoformans et chacune des 4 souches-tests a été ensemencée seule sur milieu Vg dilué au $1/10^e$. Les 4 souches-tests ont été croisées deux à deux sur ce même milieu.

c. Résultats

1) Il n'y a apparemment parmi les 90 souches testées ou parmi les 4 souches-tests aucune souche auto-fertile de type $\alpha\alpha$. Aucune de ces souches ne produit de formes sexuées sur Vg dilué au $1/10^e$ lorsqu'elle est ensemencée seule.

* Voir index des milieux : n°3.

** Tous nos remerciements vont au Dr K.J. Kwon Chung qui nous a très aimablement fourni les souches-tests suivantes : 3501- α -D/R V 45980; 3502-a-/RV 45981; 444- α -B/RV 45979; 191-a-C/RV 45977.

2) Croisements des 4 souches-tests entre elles.

Le tableau suivant nous donne les résultats obtenus pour les croisements des souches-tests deux à deux sur Vg dilué au 1/10^e.

F. bacillispora → F.b.

F. neoformans → F.n.

X : croisement non réalisé

/+/: apparition de la forme sexuée

/-/: absence de forme sexuée

	Fba	Fb	Fna	Fn
Fba	X	/+/	/-/	/+/
Fb		X	/-/	/-/
Fna			X	/+/
Fn				X

Commentaire

Nous constatons la présence de formes sexuées si l'on croise Fba avec Fb α et Fna avec Fn α, ce qui est bien conforme aux observations de Kwon Chung. Néanmoins, nous constatons la présence de réactions "croisées" entre les 2 espèces F. bacillispora et F. neoformans puisque nous avons production de filaments, de basides et de basidiospores si l'on croise la souche Fba (RV 45977) avec Fn α (RV 45980).

3) Essais d'obtention de la forme sexuée de 90 souches de C. neoformans d'origines saprophytique ou parasitaire, européenne ou tropicale.Avertissement

- signifie que la souche n'a réagi avec aucune des 4 souches-tests.
- +/Fba signifie que la souche réagit avec Fba. Si cela ne s'est produit qu'une seule fois, on note : (1x).
- +/Fba et +/Fna signifie que la souche réagit avec Fba et Fna. Si la réaction ne s'est produite qu'une seule fois, on note : (1x).

Les 4 premiers tableaux nous donnent les résultats obtenus pour les 90 souches.

Tableau 1

Réactions sexuées des souches européennes d'origine parasitaire (18 souches)

Types	Nombre de souches
/-/	4 (1)
+/Fba	4 (2)
+/Fba (1x)	1 (3)
+/Fba et +/Fna	5 (4)
+/Fba et (1x) +/Fna	4 (5)

(1) RV 26508 - RV 33370 - RV 33938 - RV 34802.

(2) RV 34018 - RV 36214 - RV 37169 - RV 45385.

(3) RV 11824.

(4) RV 15413 - RV 18037 - RV 25794 - RV 27720 - RV 27777.

(5) RV 15412 - RV 15414 - RV 15415 - RV 40391.

Tableau 2

Réactions sexuées des souches africaines d'origine parasitaire (12 souches)

Types	Nombre de souches
/-/	6 (1)
+/Fba	3 (2)
+/Fba (1x)	1 (3)
+/Fba et +/Fna	0
+/Fba et (1x) +/Fna	2 (4)

(1) RV 5265 - RV 8001 - RV 13645 - RV 20185 - RV 25803.

(2) RV 20186 (*C. neoformans* var. *gattii*) - RV 26952 - RV 41011.

(3) RV 25804.

(4) RV 3463 - RV 26951.

Tableau 3

Réaction sexuées des souches européennes d'origine saprophytique (30 souches)

Types	Nombre de souches
/-/	12 (1)
+/Fba	8 (2)
+/Fba (1x)	2 (3)
+/Fba et +/Fna	8 (4)
+/Fba et (1x) +/Fna	0

(1) RV 15411 - RV 29038 - RV 29063 - RV 29291 - RV 29491 - RV 29654 - RV 30957 - RV 31372 - RV 32955 - RV 32958 - RV 33161 - RV 34345.

(2) RV 29482 - RV 29483 - RV 29485 - RV 30060 - RV 30655 - RV 30711 - RV 31002 - RV 31591.

(3) RV 29445 - RV 30654.

(4) RV 26211 - RV 29192 - RV 30710 - RV 30952 - RV 31563 - RV 31590 - RV 34343 - RV 34393.

Tableau 4

Réactions sexuées des souches tropicales d'origine saprophytique (30 souches)

Types	Nombre de souches
/-/	9 (1)
+/Fba	10 (2)
+/Fba (1x)	3 (3)
+/Fba et +/Fna	3 (4)
+/Fba et (1x) +/Fna	5 (5)

- (1) RV 28082 - RV 45719 - RV 45846 - RV 45874 - RV 46116 - RV 46119 - RV 46122 - RV 46123 - RV 46125.
 (2) RV 42544 - RV 43172 - RV 45875 - RV 45876 - RV 45880 - RV 46115 - RV 46128 - RV 46130 - RV 46132 - RV 46289.
 (3) RV 45718 - RV 45720 - RV 45878.
 (4) RV 46118 - RV 46124 - RV 46126.
 (5) RV 45888 - RV 46127 - RV 46129 - RV 46131 - RV 46288.

Rassemblons les résultats obtenus pour les 90 souches de manière à n'avoir plus que 3 catégories : /-; +/Fba; +/Fba et +/Fna.

Dans la catégorie +/Fba* rentrent les souches qui ont, au moins une fois, réagi avec Fba et dans la catégorie +/Fba et +/Fna** rentrent les souches qui ont, au moins une fois, réagi avec Fba et Fna.

Réactions sexuées observées pour l'ensemble des souches de C. neoformans.

Origine des souches	Types de réactions			Total des souches
	/-/	+/Fba	+/Fba et +/Fna	
Europ. parasit.	4	5	9	18
Afric. parasit.	6	4	2	12
Europ. saproph.	12	10	8	30
Trop. saproph.	9	13	8	30
	31	32	27	90

N.B. Des effectifs théoriques trop réduits (< 5) ne permettent pas d'application des tests statistiques d'indépendance à ces résultats.

* Rappel : +/Fba signifie "qui donne une réaction sexuée avec F. bacillispora a".

** Rappel : +/Fba et +/Fna signifie "qui donne une réaction sexuée avec F. bacillispora a et avec F. neoformans a.

Si toutes les souches d'origine parasitaire, qu'elles soient européennes ou tropicales, proviennent de cas humains de cryptococcose, les souches d'origine saprophytique ont des sources plus variées. Le tableau suivant donne la répartition des souches d'origine saprophytique, européennes et tropicales (2 x 30 souches), en fonction du type de réaction sexuée observé et de leurs sources respectives.

Souches d'origines saprophytique	Types de réaction		
	/-/	+/Fba	+/Fba et +/Fna
fientes de canaris	3	1	0
fientes de pigeons	10	13	9
fientes d'oiseaux	0	3	1
jabots de pigeons	4	2	0
air	0	2	1
eau	1	0	1
expectorations	2	1	4
végétaux	1	1	0
	21	23	16

Sur les 30 souches tropicales d'origine saprophytique, 15 proviennent d'Afrique, 15 d'Inde.

Sur ces 30 souches, 9 ne donnent aucune réaction sexuée (4 africaines et 5 indiennes); 13 réagissent avec Fba (9 africaines et 4 indiennes); 8 réagissent avec Fba et Fna (2 africaines et 6 indiennes).

d. Discussion et conclusions

Sur les 90 souches étudiées, $\pm 1/3$ des souches ne donne aucune réaction sexuée. $\pm 1/3$ des souches réagit avec F. bacillispora a et $\pm 1/3$ des souches réagit doublement avec F. bacillispora a et F. neoformans a.

Le type de réaction sexuée observé semble indépendant de l'origine géographique de la souche, ainsi que de son origine parasitaire ou saprophytique. De même, aucune source saprophytique ne semble liée à un type réactionnel bien particulier. Toutefois, aucune de ces constatations n'a pu être confirmée statistiquement, les effectifs étant trop réduits.

En ce qui concerne l'absence de réaction observée dans 31 cas, elle peut être attribuée soit à l'état physiologique des souches croisées, soit à l'utilisation du milieu Vg dilué au 1/10. Certaines souches sont en effet conservées depuis plusieurs années sous forme lyophilisée d'une part, ce qui peut avoir des répercussions sur leur état physiologique et l'on peut d'autre part imaginer que le milieu Vg dilué au 1/10 ne convient peut-être pas pour l'obtention des formes sexuées de toutes les souches de C. neoformans.

Parmi les 90 souches étudiées, 59 souches (32 + 27) ont réagi avec des souches de type a, elles sont donc de type α . La prédominance des types α a été démontrée par Kwon Chung & Bennett (1978) et nos résultats ne font que confirmer leurs observations mais nous devons néanmoins attirer l'attention sur le fait que nous n'avons isolé aucune souche de type a.

Il est également surprenant d'avoir 32 souches, dont 23 d'origine saprophytique, qui réagissent avec F. bacillispora si l'on se souvient que cette forme sexuée ne renferme que des souches appartenant aux sérotypes B et C mais que d'autre part aucune souche de C. neoformans appartenant à l'un ou l'autre de ces sérotypes n'a jamais été isolé de l'environnement. Signalons néanmoins que parmi les souches d'origine parasitaire réagissant avec F. bacillispora a, nous avons la souche RV 20186 qui est la souche de C. neoformans var. gattii isolée par Gatti et décrite par Vanbreuseghem et Takashio.

Nous avons enfin 27 souches qui réagissent avec les souches-test α de chacune des deux espèces. Il s'agit d'une réaction analogue à celle observée en croisant les souches-tests Fba (RV 45977) et Fna (RV 45980).

Deux explications sont possibles :

a) Des souches appartenant à l'espèce F. bacillispora peuvent donner une reproduction sexuée avec des souches appartenant à l'espèce F. neoformans : il ne s'agit donc pas de 2 espèces mais seulement de deux variétés différentes.

b) Il ne s'agit pas d'une vraie reproduction sexuée avec obtention de spores sexuées viables mais d'une simple stimulation. Ce serait le même type de stimulation que nous aurions observé en croisant 23 de nos souches saprophytiques avec F. bacillispora a.

Les conditions expérimentales ne nous permettent malheureusement pas de nous prononcer en faveur de l'une ou de l'autre hypothèse.

5. Pathogénicité comparée vis-à-vis de la souris blanche

a. Introduction

La condition nécessaire et suffisante pour déterminer C. neoformans est la production chez la souris blanche d'une méningite cryptococcique. La voie d'inoculation la plus favorable à l'obtention de cette méningite est la voie intracérébrale (Vanbreuseghem 1966).

Nous avons choisi cette voie d'inoculation pour comparer d'une part la pathogénicité des 90 souches envers la souris blanche et pour déterminer aussi si ce critère d'identification spécifique vaut pour toutes les souches de C. neoformans quelle que soit leur origine.

b. Matériel et méthode

360 souris blanches* femelles, âgées de 3 semaines, pesant de 20 à 22 g ont été inoculées par voie intracérébrale.

Chaque souche a été injectée à 4 souris.

Chaque animal a reçu 5.10^5 cellules de C. neoformans dans un volume de 1/20^e ml d'eau physiologique. Nous avons laissé mourir les souris de cryptococcose et avons enregistré les dates de mort. Les souris survivantes ont été supprimées 150 jours après l'inoculation. Le cerveau a été prélevé dans tous les cas.

Un examen direct d'un fragment de cerveau nous a permis de constater ou non la présence de cellules de C. neoformans. Lorsque l'examen direct du cerveau était négatif, ce dernier était prélevé dans sa totalité et broyé dans 2 ml d'eau physiologique stérile. 0,5 ml du broyat était ensuite ensemencé sur Sabouraud gélosé porté à 37°C pendant 8 jours.

L'analyse statistique** des résultats a impliqué l'utilisation de 3 types de tests.

1) Le test F de signification (F de Snedecor) appliqué à l'analyse de variances dans une classification hiérarchisée a été utilisé pour évaluer la pathogénicité des diverses souches les unes par rapport aux autres, pour évaluer les différences de pathogénicité observées entre les 4 groupes de souches de C. neoformans, à savoir le groupe de souches européennes d'origine parasitaire, le groupe de souches africaines d'origine parasitaire, le groupe de souches européennes d'origine saprophytique et le groupe de souches tropicales d'origine saprophytique.

Ce type d'analyse convient pour comparer les moyennes de plusieurs groupes qui sont eux-mêmes composés de sous-groupes qui eux, sont tirés au hasard.

Nous avons ici 4 grands groupes principaux :

- Groupe 1 = souches européennes d'origine parasitaire;
- Groupe 2 = souches africaines d'origine parasitaire;
- Groupe 3 = souches européennes d'origine saprophytique;
- Groupe 4 = souches tropicales d'origine saprophytique.

Au sein de chacun des groupes principaux, nous avons des groupes secondaires s'identifiant au nombre de souches différentes testées.

Le groupe 1 comprend 18 sous-groupes (= 18 souches);

Le groupe 2 comprend 12 sous-groupes (= 12 souches);

Le groupe 3 comprend 30 sous-groupes (= 30 souches);

Le groupe 4 comprend 30 sous-groupes (= 30 souches).

* Souche NMRI (Naval Medical Research Institute).

** Toute notre reconnaissance va au Pr Dr M. Mulumba qui nous a guidée dans le choix des tests à effectuer, nous aidant ensuite à les appliquer.

Il faut pour avoir un test statistiquement significatif que la pathogénicité des souches au sein de chacun des 4 groupes principaux soit suffisamment différente d'un groupe à l'autre pour surpasser la variabilité observée entre individus inoculés avec une même souche et la variabilité observée entre souches différentes.

Ce test a encore été utilisé afin de déterminer une éventuelle différence de pathogénicité entre les souches africaines* et les souches indiennes** au sein du groupe 4, c'est-à-dire le groupe de souches tropicales d'origine saprophytique.

2) Le test t de Student a été utilisé pour comparer la moyenne de survie des souris des 4 groupes principaux pris deux à deux.

3) Le test du χ^2 a été utilisé afin de déterminer si l'absence de C. neoformans dans le cerveau d'une souris inoculée par voie intracérébrale est en relation directe avec l'origine européenne ou tropicale de la souche inoculée.

c) Résultats

1) Les tableaux suivants nous donnent, exprimé en jours, le temps de survie de chacune des 4 souris inoculées avec chacune des 90 souches.

L'absence de chiffre indique que la souris était toujours vivante au 150^e jour après l'inoculation.

Le signe +/- signifie que l'examen direct ou au moins le broyat a permis de constater la positivité du cerveau. Le signe -/- indique qu'aucun C. neoformans n'a pu être ni mis en évidence par l'examen direct, ni isolé par broyat du cerveau.

Toutes les souris mortes dans l'intervalle de 150 jours sont mortes de cryptococcose cérébrale et leur cerveau était positif.

* RV 28082; RV 42544; RV 43172; RV 45718; RV 45719; RV 45720; RV 45846;
RV 45874; RV 45875; RV 45876; RV 45878; RV 45880; RV 45888; RV 46288;
RV 46289.

** RV 46115; RV 46116; RV 46118; RV 46119; RV 46122; RV 46123; RV 46124;
RV 46125; RV 46126; RV 46127; RV 46128; RV 46129; RV 46130; RV 46131;
RV 46132.

Survie exprimée en jours de souris inoculées par voie intracérébrale avec 5.10^5 cellules de C. neoformans d'origines diverses

a) Souches européennes d'origine parasitaire : 18 souches

N° des souches	Souris			
	n° 1	2	3	4
RV 11824	6	6	7	8
RV 15412	43	50	116	123
RV 15413	7	7	8	11
RV 15414	34	53	+	+
RV 15415	8	9	10	13
RV 18037	12	24	-	/
RV 25794	7	7	7	9
RV 26508	7	13	39	+
RV 27720	23	23	61	62
RV 27777	16	20	27	113
RV 33370	11	11	14	56
RV 33938	16	17	18	20
RV 34018	22	39	-	-
RV 34802	24	36	41	+
RV 36214	36	45	+	-
RV 37169	29	+	-	-
RV 40391	9	11	24	+
RV 45385	10	11	11	13

b) Souches africaines d'origine parasitaire : 12 souches

N° des souches	Souris			
	n° 1	2	3	4
RV 3463	-	-	-	-
RV 5265	36	68	70	143
RV 8001	149	+	+	+
RV 13645	9	9	10	10
RV 20185	+	-	-	-
RV 20186	86	-	-	-
RV 25803	68	68	78	-
RV 25804	3	9	11	17
RV 26951	18	28	29	91
RV 26952	11	12	12	17
RV 41011	8	8	9	11
RV 41257	8	9	11	11

c) Souches européennes d'origine saprophytique : 30 souches

N° des souches	Souris			
	n° 1	2	3	4
RV 15400	7	8	11	18
RV 26211	10	10	10	21
RV 29038	7	8	12	27
RV 29063	8	10	12	12
RV 29192	11	12	12	14
RV 29445	9	10	16	17
RV 29482	9	12	13	16
RV 29483	11	12	15	34
RV 29485	20	22	24	39
RV 29491	67	70	118	+
RV 29654	/	71	81	100
RV 30060	8	10	14	27
RV 30654	50	94	124	+
RV 30655	61	65	77	94
RV 30710	5	8	12	12
RV 30711	24	34	50	+
RV 30952	18	19	32	34
RV 30957	32	78	89	+
RV 31002	12	13	15	20
RV 31372	14	26	26	41
RV 31563	12	12	18	19
RV 31590	11	11	13	15
RV 31591	9	12	13	15
RV 32955	10	12	12	41
RV 32958	10	11	15	25
RV 33161	11	12	14	29
RV 34343	8	9	10	29
RV 34345	10	13	19	+
RV 34393		8	11	17

d) Souches tropicales d'origine saprophytique : 30 souches

N° des souches	Souris			
	n° 1	2	3	4
RV 28082	11	21	38	65
RV 42544	24	42	48	49
RV 43172	21	32	32	39
RV 45718	32	39	45	100
RV 45719	43	80	+	-
RV 45720	7	8	9	10
RV 45846	35	42	72	-
RV 45874	11	28	37	39
RV 45875	22	22	28	30
RV 45876	7	15	22	38
RV 45878	16	18	44	89
RV 45880	+	+	-	-
RV 45888	28	48	104	-
RV 46115	+	+	+	+
RV 46116	100	109	+	+
RV 46118	10	12	14	41
RV 46119	7	16	16	17
RV 46122	+	+	+	-
RV 46123	16	20	69	+
RV 46124	21	28	29	34
RV 46125	+	-	-	-
RV 46126	8	8	11	13
RV 46127	8	8	9	11
RV 46128	+	+	-	-
RV 46129	15	16	18	19
RV 46130	22	29	40	44
RV 46131	33	40	41	+
RV 46132	22	44	59	+
RV 46288	22	33	59	+
RV 46289	35	44	56	97

2) Analyse statistique des résultats

a) L'application du test F de signification à l'analyse de variances dans une classification hiérarchisée nous permet de conclure à l'existence de différences de pathogénicité envers la souris blanche d'une part, statistiquement hautement significatives entre les différentes souches ($p < 0,01$) et statistiquement significatives d'autre part entre les 4 groupes principaux ($p < 0,05$).

Ce test ne nous a d'autre part pas permis de déceler une quelconque différence de pathogénicité entre les souches africaines et les souches indiennes au sein de groupe de souches saprophytiques d'origine tropicale ($p > 0,05$).

S'il existe une différence de pathogénicité entre ces 2 groupes, elle demeure masquée par les différences observées au sein même de chacun des 2 groupes.

b) L'application du test t de Student nous permet de comparer les moyennes des temps de survie des souris au sein des 4 groupes principaux pris deux à deux. On sait que la durée moyenne de survie des souris, exprimées en jours est de :

- 17,05 jours pour le groupe "européen d'origine parasitaire" (groupe 1);
- 19,47 jours pour le groupe "africain d'origine parasitaire" (groupe 2);
- 15,55 jours pour le groupe "européen d'origine saprophytique" (groupe 3);
- 27,31 jours pour le groupe "tropical d'origine saprophytique" (groupe 4).

Seule la différence observée entre les moyennes des groupes 3 et 4 est hautement significative ($0,01 > p > 0,001$; $t = 2,76$).

c) Certaines des souris demeurées vivantes 150 jours après l'inoculation avaient le cerveau négatif lors de l'autopsie.

Nous avons voulu déterminer si l'élimination de C. neoformans au niveau du cerveau de la souris survient plus ou moins fréquemment en fonction de l'origine européenne ou tropicale des souches.

Maintien ou élimination de C. neoformans dans le cerveau de souris inoculées par voie intracrânienne ($5 \cdot 10^5$ cellules) avec des souches d'origine européenne ou tropicale

Origine géographique des souches	Nbre de souris + maintien de <u>C. neoformans</u>	Nbre de souris + élimination de <u>C. neoformans</u>	Total
souches européennes	182	7	189
souches tropicales	146	22	168
	328	29	

$$(\chi^2 = 10,51; p < 0,001)$$

Le test du χ^2 est hautement significatif et nous permet de dire que les souris inoculées avec des souches d'origine tropicale éliminent plus facilement C. neoformans.

d) Discussion et conclusions

Nous constatons donc que la pathogénicité des souches de C. neoformans envers la souris blanche varie très fortement d'une souche à l'autre.

Pour certaines souches (RV 11824), toutes les souris meurent en l'espace d'une semaine après avoir reçu 5.10^5 cellules de C. neoformans par voie intracérébrale. Pour d'autres (RV 3463), les souris survivent non seulement 150 jours après l'inoculation, mais éliminent complètement le C. neoformans qui ne peut être retrouvé ni à l'examen direct, ni par rétroculture. Si aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre la pathogénicité des souches africaines et des souches indiennes d'origine saprophytique, il n'en est pas de même en ce qui concerne les 4 grands groupes.

En effet, si nous n'avons pu conclure en ce qui concerne les souches d'origine parasitaire, la différence de pathogénicité observée entre les souches saprophytiques, européennes et tropicales, est statistiquement significative : les souches tropicales d'origine saprophytique sont moins pathogènes que les souches européennes d'origine saprophytique.

Nous constatons de plus que les souris inoculées par voie intracérébrale avec les souches tropicales, qu'elles soient d'origine parasitaire ou saprophytique, les éliminent bien plus facilement que lorsqu'il s'agit de souches européennes parasitaires ou saprophytiques. La différence est également statistiquement significative.

Il serait cependant intéressant de répéter ces expériences en choisissant une autre voie d'inoculation que la voie intracérébrale. Inoculées par voie intrapéritonéale, toutes ces souches, qu'elles soient d'origine européenne ou tropicale, ont peut-être la même virulence, les différences de pathogénicité ne s'exprimant que lorsque les souches sont inoculées par voie intracérébrale.

En d'autres termes, le neurotropisme des souches saprophytiques d'origine tropicale pourrait différer de celui des souches saprophytiques d'origine européenne et être moins marqué ou nul pour certaines souches tropicales.

D. Discussion et conclusions générales

1) L'analyse détaillée de la littérature consacrée à la cryptococcose humaine (583 cas) en régions tropicales nous permet de conclure à la prédominance de la cryptococcose chez les jeunes de moins de 30 ans, fait qui ne se vérifie pas pour les régions tempérées où la cryptococcose atteint surtout les individus entre 30 et 60 ans.

Il y aurait, d'après divers auteurs, prédominance de cas de cryptococcose primaire en Afrique et en Amérique du Sud. Il y aurait aussi plus de cas de cryptococcose humaine en régions tropicales qu'en régions tempérées. Ceci se vérifie notamment pour l'Australie où il y aurait en plus une plus grande susceptibilité raciale des aborigènes.

2) Nos essais d'isollements de C. neoformans à partir de fientes d'oiseaux récoltées en pays tropicaux nous ont permis de constater que les fientes de pigeons en Afrique étaient plus fréquemment positives qu'en Europe.

3) L'étude biochimique comparée de 90 souches de C. neoformans nous a permis de constater qu'il n'existe aucun critère biochimique de différenciation entre les souches d'origine européenne et d'origine tropicale.

4) Drouhet et al. (1975) établissent l'existence chez Candida albicans d'un lien entre la résistance à la 5-fluorocytosine et l'origine géographique des souches. Aucune constatation analogue n'a pu être établie pour C. neoformans.

5) Des essais d'obtention de la forme sexuée de C. neoformans ne nous ont pas permis d'établir l'existence d'un lien unissant l'une ou l'autre des formes sexuées de C. neoformans à l'origine géographique des souches. Les 59 souches de C. neoformans ayant produit une réaction sexuée appartiennent au type "a", ce qui est conforme aux résultats obtenus antérieurement par d'autres auteurs.

Les réactions sexuées inexplicables avec la souche-test F. bacillispora "a" (RV 45977) d'une part, avec simultanément les souches-tests F. bacillispora "a" (RV 45977) et F. neoformans "a" (RV 45981) d'autre part nous incitent à croire à l'existence de phénomènes de stimulation sexuelle entre souches appartenant à deux espèces différentes, à moins qu'il ne s'agisse de vraies reproductions sexuées. Dans ce cas, il faudrait envisager l'existence de 2 variétés de C. neoformans et non pas de 2 espèces différentes.

6) Notre travail expérimental nous permet enfin de conclure à l'existence d'une différence de pathogénicité vis-à-vis de la souris blanche inoculée par voie intracérébrale entre les souches saprophytiques d'origine tropicale et celles d'origine européenne.

INDEX DES MILIEUX

1. Milieu à l'acide caféique (Hopfer & Blank 1975)

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$:	5,000 g
$\text{K}_2\text{H PO}_4$:	0,800 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$:	0,700 g
Glucose :	5,000 g
Extrait de levure :	2,000 g
Acide caféique :	0,180 g
Citrate ferrique :	0,002 g

(Ajouter par 1000 ml de milieu, 4 ml d'une solution stock obtenue par dissolution au bain-marie brûlant de 10 mg de citrate ferrique dans 20 ml d'eau distillée)

Agar :	20,000 g
Aq. dist. q.s. :	1000 ml
PH final non ajusté :	6,5

Autoclaver le milieu pendant 12 min.

Le milieu ne peut être exposé à la lumière et est stocké à 4°C.

Incubation de 4 jours maximum à 25°C.

2. Milieu de Shadorny

- Yeast nitrogen base agar dilué en tampon phosphate à pH = 7,0.

Tampon phosphate : 0,33 g NaH_2PO_4
+ 0,92 g K_2HPO_4 par l

- 1% de glucose

- 0,15% de l- asparagine.

3. Milieu Vg dilué au 1/10e (Pitt & Miller 1968)

Vg : 50 ml

(Vegetable juice du "Standard Brands", Terre Haute, Indiana, U.S.A.)

Eau distillée : 50 ml

Ajuster le pH avec Na OH à 5,5

Filtrer sur papier Watman n°1

Diluer le filtrat 10 x en eau distillée (plus ou moins 900 ml)

Ajouter 20 g d'agar

Faire fondre l'agar, répartir en tubes à raison de 20 ml par tube

Autoclaver 20 min à 120°C

Couler en boîte de Petri.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdallah, I.S. 1969. Study of sheep mastitis as caused by Cryptococcus neoformans in Egypt. - Vet. Med. J. Giza, **16** : 203-216.
- Adeloye, A., Aghadiuno, P. & Osuntokun, B.O. 1976. Cryptococcal granuloma (toruloma) of the central nervous system in a patient with schistosomiasis. - Am. J. trop. Med. Hygiene, **25** : 129-131.
- Aikat, B.K., Chatterjee, B.D. & Banerjee, P.L. 1967. The rising incidence of cryptococcosis. - Ind. J. med. Res., **55** : 43-46.
- Ainsworth, G.C. & Austwick, P.K.C. 1973. Fungal diseases of animals, 2nd edit. - Com. Agr. Bur. Farnham, Slough, England.
- Amorim, M.F. & Pasqualucci, M.E.A. 1958. Natureza das lesões do sistema nervoso central na torulose. - Rev. Lat. Am. Anat. patol., **2** : 41.
- Aneck-Hahn, H.G.L. 1933. Blastomycosis of the central nervous system. - S. Afr. med. J., **7** : 369-370.
- Anguli, V.C. & Natarajan, P. 1961. Systemic cryptococcosis with a toruloma of the left ventricle - case report. - Ind. J. Path. Bact., **4** : 179-182.
- Angulo-Ortega, A., Rodriguez, C. & Garcia Galindo, G. 1961. Criptococcosis en Venezuela. - Mycopath. Mycol. appl., **15** : 367-388.
- Aragon, P.R. & Reyes, A.C. 1959. Cryptococcus neoformans infection of the brain : laboratory studies. - Acta med. Philipp., **16** : 23-30.
- Areechon, W. & Prapaiwongs, T. 1963. Pulmonary cryptococcosis - a case report with lung resection. - J. med. Assoc. Thailand, **46** : 18-23.
- Balakrishna Rao, D.N. & Lilauwala, N.F. 1952. Cryptococcosis of central nervous system. - Ind. J. Surg., **14** : 10-19.
- Barnard, P.J.J. 1945. Meningitis due to Torula histolytica. - Proc. Transvaal Mine med. Off. Ass., **25** : 92-94.
- Barnola, J. & Martinez, A. 1955. Torulopsis cerebral. - III Jorn. venezol. Anat. Patol. Maracaibo y Publicaciones del Centro Medico Caracas, 1-36.
- Barnola, J. & Barrera, G. 1956. Criptococcosis infantil. - III Jorn. venezol. Pueric. y Pediat. Maracaibo, 8.12.1956.
- Bascands, J., Caron, J.J. & Gueziec, J. 1968. A propos d'une observation de cryptococcose pulmonaire. - Med. trop., **28** : 409-415.
- Basu Mallik, K.C. & Nundy, A.K. 1961. Torula meningitis. - Bull. Calc. School trop. Med., **9** : 93-94.
- Basu Mallik, K.C., Chatterjee, B.D., Banerjee, P.L. & Dutta, M. 1967. An epidemiological study of systemic cryptococcosis in Calcutta areas. - Ind. J. med. Res., **55** : 529-534.
- Bateson, E.M. 1979. Pulmonary torulosis in the Northern territory, Radiological appearances. - Austr. Radiol., **23** : 233-238.
- Baylet, R. & Camain, R. 1961. Torulose spontanée chez un cynocéphale. - Bull. Soc. Path. exot., **54** : 11-12.
- Bennett, J.E., Kwon Chung, K.J. & Howard, D.H. 1977. Epidemiologic differences among serotypes of Cryptococcus neoformans. - Am. J. Epidemiology, **105** : 582-586.

- Bennett, J.E., Kwon-Chung, K.J. & Theodore, T.S. 1978. Biochemical differences between serotypes of Cryptococcus neoformans. - Sabouraudia, **16** : 167-174.
- Bennett, J.E., Dismukes, W.E., Duna, R.J., Medoff, G., Sande, M.A., Gallis, H., Leonard, J., Fields, B.T., Bradshaw, M., Haywood, H., Mac Gee, A.Z., Gate, T.R., Cobbs, C.G., Warner, J.F. & Alling, D.W. 1979. - A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. - New Engl. J. Medicine, **301** : 126-131.
- Bhagwandeem, S.B. 1969. Disseminated cryptococcosis. - Med. J. Zambia, **2** : 203-204.
- Bhamapravati, N. & Surondhapant, S. 1960. Cryptococcosis of the central nervous system. - J. med. Ass. Thailand, **43** : 101-110.
- Block, E.R., Jennings, A.E. & Bennett, J.E. 1973. 5-fluorocytosine resistance in Cryptococcus neoformans. - Antimic. Agents Chemoth., **3** : 649-656.
- Block, E.R., Jennings, A.E. & Bennett, J.E. 1973. Variables influencing sensitivity testing of Cryptococcus neoformans to 5-fluorocytosine. - Antimic. Agents Chemoth., **4** : 392-395.
- Bovornkitti, S., Prijyanonda, B., Viseskul, C., Chatikavanij, K., Prachaubmoh, K. & Keranpongs, C. 1966. Pulmonary cryptococcosis - report of 2 cases. - J. med. Ass. Thailand, **49** : 768-775.
- Brumpt, V. & Moisan, P. 1964. Première observation de cryptococcose neuro-méningée au Cambodge. - Bull. Soc. Path. exot., **57** : 12-16.
- Brumpt, V., Fontan, R., Tia-Kim-Hy & Saphon Ridel. 1965. La cryptococcose neuro-méningée au Cambodge. Nouvelles observations - Enquête sur la source d'infection dans la nature. - Bull. Soc. Path. exot., **58** : 59-67.
- Bubb, H. 1955. Cryptococcus neoformans infection in bone. - S. Afr. med. J., **29** : 1259-1261.
- Buitrago, E. & Gomez, S. 1960. Comprobacion de un caso de criptococosis. - Caldas Med., **1** : 516.
- Calderon, E., Coh, C., Gonzales, N., Hernandez, M. & Martinez, E. 1977. Criptococosis del sistema nervioso central. - Bol. med. Hosp. Infant., **34** : 83-92.
- Camain, R., Charmot, G. & Campana Rouget, J. 1951. Torulose cerebro-méningée observée à Dakar. - Revue Coll. Méd. Chir., **23** : 230-232.
- Campins, H., Galavis, D. & Vegas, H. 1975. Cryptococcosis in Venezuela. - Mycopathologia, **55** : 153-157.
- Capdevielle, P., Doury, J.C., Forçain, M., Teyssier, J., Pelloux, H., Queinnec, J. & Pirame, Y. 1977. De la cryptococcose neuro-méningée au Sud-Vietnam. A propos de 5 cas. - Méd. trop., **37** : 73-76.
- Cardoso, J.P. 1965. Identificação de Cryptococcus neoformans de casos humanos em Minas Gerais. - Hospital - Rio, **68** : 209-215.
- Castets, M., Rey, M., Boiron, H., Nouhouayi, A. & Dumas, M. 1967. Cryptococcose cerebro-méningée - à propos d'un cas traité avec succès par l'amphotéricine B. - Bull. Soc. Méd. Afr. noire Langue française, **12** : 21-26.
- Cattle, D. & Gelfand, M. 1972. A case of pleural cryptococcosis with meningeal spread. - Centr. Afr. J. Med., **18** : 250-253.

- Celso Hygino da Cruz, L., Chagas Walker, A. & Borges de Figueiredo, J. 1971. Cryptococcosis in a cat: first case in Brazil. - Rev. Bras. Med. vet., **1**: 25-28.
- Champness, L.T. & Clezy, J.K.A. 1962. Torulosis in Papua and New Guinea. - Med. J. Australia, **49**: 560.
- Chaves, E., Lopes, A.Q., da Silva, M.P. & da Silva Gonçalves, J.A. 1972. Pulmonary and meningeal cryptococcosis complicated with lung schistosomiasis. - Rev. Inst. Med. trop., **14**: 222-229.
- Chhetri, M.K. & de Rahman, B. 1967. Cryptococcosis in a Calcutta hospital. - J. Ass. Phys. India, **15**: 363-368.
- Clark, L. & Roubin, G.S. 1970. Cryptococcosis in a cat. - Austr. vet. J., **46**: 544-548.
- Claussel, D.T. 1949. Infecção primitiva do sistema nervoso central por Torulosis neoformans (Torula histolytica). Relato de um caso. - An. Fac. Med. Porto Alegre, **9**: 71-77.
- Cliff, J. 1976. Cryptococcal meningitis: a case report. - Dar es Salaam med. J., **7**: 35-36.
- Cloward, R.B. 1948. Torula meningitis, first case to be reported in Hawaii. - Hawai med. J., **7**: 377-381.
- Coetzer, J.A.W., Imes, G.D. & Irvine-Smith, C. 1976. Cryptococcosis in a dog. - J. S. Afr. vet. Assoc., **47**: 49-52.
- Collomb, H., Philippe, Y. & Cadillon, J. 1964. Cryptococcose meningo-cérébrale (à propos d'un cas observé au Sénégal). - Bull. Soc. Path. exot., **57**: 105-110.
- Condon, P.J., Terry S.I. & Falconer, H. 1977. Cryptococcal eye disease. - Doc. Ophthalmologica, **44**: 49-56.
- Connole, M.D. & Johnston, L.A.Y. 1967. A review of animal mycoses in Australia. - Vet. Bull. Wybridge, **37**: 145-153.
- Cortez, J.M. 1949. Criptococose pulmonar (Blastomicose europeia). - An. Paul. Med. Cir., **58**: 315-329.
- Cossery, G.N. 1930. Blastomycotic meningitis. - J. Egypt. med. Assoc., **13**: 198-206.
- Crotty, J.M. 1965. Systemic mycotic infection in Northern territory aborigenes. - Med. J. Australia, **1**: 184-186.
- Curbelo, A., Marquez, V. Palacin, A., de Velasco, R. & Amado Ledo, E. 1957. Septicemia y meningitis a Cryptococcus neoformans.- Arch. Hosp. univ. Habana, **9**: 324-327.
- Dacorso, P. & Chagas, W.A. 1957. Cryptococose pulmonar em caprino. - An. Col. Anat. Bras., **3**: 55-70.
- Danao, S.C., Gonzaga, A.J., Reyes, A.C. & Zainuco, J.T. 1968. Cryptococcal meningitis. - Acta med. Philipp., **5**: 77-83.
- da Silva, N.N. 1953. Criptococcose cutanea. - Hospital - Rio, **44**: 375-381.
- Davey, J.K.A. & Ross, M.D. 1969. Cryptococcosis of bone. - Centr. Afr. J. Med., **15**: 78-79.
- de Almeida, F. & da Silva Lacaz, C. 1941. Micose pelo Cryptococcus neoformans (Primeiro caso observado em São Paulo).- An. Paulist. de Med. e Circ., **42**: 385-399.

- de Almeida, F., da Silva Lacaz, C. & Salles, M. 1944. Blastomicose de tipo Busse-Buschke (ganulomatose criptococica, torula infection, torulosis). - An. Fac. Med. Univ. Sao Paulo, **20** : 115-131.
- de Almeida, F. 1961. Algunos datos sobre la criptococcosis en America del Sud. - Mycopath. Mycol. appl., **15** : 389-393.
- de Carvalho, A., Romeiro Neto, M., Barbas Filho, J.V. & Behmer, O.A. 1961. Pulmonary torulosis : clinical considerations on 3 cases. - Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo, **16** : 263-273.
- de la Vega, E. & Rakower, M. 1963-1966. Un caso de criptococcosis en el perro. - Rev. Fac. Med. vet. Univ. nac. Lima, **18-20** : 259-262.
- Devadiga, K.V., Mathai, K.V., Job, C.K. & Chandy, J. 1968. Cryptococcal infection of the central nervous system. - Neurology, India, **16** : 117-121.
- Dini, S. & Gargani, G. 1976. La criptococcosi sperimentale del topo da stipiti umani e tellurici. Aspetti micologici ed istopatologici. - Arch. "De Vecchi" Anat. pat. Med. clin., **61** : 303-329.
- Dorner, B.A. & Findlay, M. 1960. Generalized cryptococcosis with osseous involvement. - S. Afr. med. J., **34** : 611-613.
- Drouhet, E., Mercier-Soucy, L. & Montplaisir, S. 1975. Sensibilité et résistance des levures pathogènes aux 5-fluoropyrimidines. I. Relation entre les phénotypes de résistance à la 5-fluorocytosine, le sérotype de Candida albicans et l'écologie de différentes espèces de Candida d'origine humaine. - Ann. Microbiol., **126b** : 25-29.
- Drouhet, E., Alayse, A.M. & Improvisi, L. 1976. Phenotypes de résistance à la 5-fluorocytosine chez Cryptococcus neoformans. - Bull. Soc. Mycol. méd., **5** : 17-20.
- Duarte, E. 1953. Criptococose generalizada : apresentação de um caso com autopsia completa. - Hospital - Rio, **43** : 345-361.
- Dutt, A.K., Krishnan, M. & Lim, E.J. 1969. Broncho-pulmonary cryptococcosis. - Med. J. Malaya, **24** : 74-78.
- Elphinstone, J.J. 1969. Cryptococcosis : a survey of cases diagnosed in Western Australia with a report of two cases. - Med. J. Australia, **56** : 81-82.
- Falconer, H., Terry, S.I., Spencer, H. Cross, J.N., King, S.D., Chen, W. & Sparke, B. 1980. Cryptococcosis in the West Indies. - West Indian med. J., **29** : 142-146.
- Fan, J.S., Yang, S.P., Hsieh, W.C., Hwang, Y.S. & Chen, C.Y. 1974. Cryptococcosis in Taiwan. - J. Formosan med. Assoc., **73** : 313-323.
- Fialho, A. 1952. Sobre um caso de micose pulmonar e meningea produzida pelo Cryptococcus neoformans (torulose). - Brazil Medico, **66** : 201-202.
- Frey, D. & Durie, B. 1964. The isolation of Cryptococcus neoformans (Torula histolytica) from soil in New Guinea and pigeon droppings in Sydney, New South Wales. - Med. J. Australia, **1** : 947.
- Friedlander, M. & Gelfand, M. 1977. Cryptococcosis. - Central Afr. J. Med., **23** : 73-77.
- Furtado, T.A. 1962. Criptococose - Tratamento de 2 casos pela anfotericina B. - Hospital - Rio, **63** : 151-154.
- Gargani, G. 1977. Osservazioni sulla virulenza per il topo di stipiti di Cryptococcus neoformans di origine animale e tellurica. - Boll. Ist. Sieroter. milanese, **56** : 365-382.

- Gatti, F. & Eeckels, R. 1970. An atypical strain of Cryptococcus neoformans (San Felice) Vuillemin 1894. Part 1 : description of the disease and of the strain. - Ann. Soc. belge Méd. trop., 50 : 689-694.
- Geaney, B., Horsfall, W.R. & Neilson, G. 1956. Torulosis in Queensland : report of fourteen cases. - Med. J. Austr., 2 : 378-382.
- Gelfand, M. 1972. Cryptococcal meningitis : report of two cases. - Central Afr. J. Med., 18 : 248-250.
- Genevray, J. & Bablet, J. 1928-1930. Sur un cas de blastomycose méningée à Saccharomyces tumefaciens observé au Tonkin. - Arch. Inst. Pasteur d'Indochine, 8/12 : 33-44.
- Giorgi, D., Puppo, P.P., Reis, J.B. & Lima, J.G.C. 1959. Tratamento da criptococose do sistema nervoso com a amphotericin B. - Arq. Neuro-psiquiatria Sao Paulo, 17 : 377-386.
- Godoy, G.A., Ganuza, G., Marinero, J.A. & Marin, C. 1966. Aislamiento de Cryptococcus neoformans de nuestras tierras colectados en El Salvador. - Arch. Col. Med. El Salvador, 19 : 164-169.
- Goh, K.T. 1961. Cryptococcus neoformans meningitis. - J. Singapore Paed. Soc., 3 : 72.
- Gonzales, A., Fuentes, E. & Perez Tamayo, R. 1959. Criptococosis generalizada. - Prensa Med. mex., 24 : 373-378.
- Gonzalez, A. 1951. Las micosis pulmonares en Mexico. - Mem. IV. Congr. nac. Tuberc. Silicosis : 247-345.
- Gordon, C.C. & Grant, L.S. 1954. A preliminary survey of fungus infections in Jamaica. - West Indian med. J., 3 : 95-97.
- Gray, F.C. 1940. Two cases of torula meningitis with special reference to the laboratory findings. - S. Afr. med. J., 14 : 66-70.
- Grose, E., Marinkelle, C.J. & Striegel, C. 1968. The use of tissue cultures in the identification of Cryptococcus neoformans isolated from bats. - Sabouraudia, 6 : 127-132.
- Grover, S., Sharma, K.D. & Jagtap, P. 1975. Cryptococcal meningitis. - J. postgraduate Medicine, 21 : 151-156.
- Gugnani, H.C., Shone, S.K., Shrivastav, J.B., Murty, D.K. & Gupta, N.P. 1967. Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin from natural habitats in India. - Ind. J. med. Res., 55 : 1290-1294.
- Gugnani, H.C., Gupta, N.P. & Shrivastav, J.B. 1972. Prevalence of Cryptococcus neoformans in Delhi Zoological Park and its recovery from the sputum of an employee. - Indian J. med. Res., 60 : 182-185.
- Herin, V. & Dormal, R. 1962. Relation d'un cas de cryptococose équine à Léopoldville. - Ann. Soc. belge Méd. trop., 6 : 865-870.
- Hernandez-Cossio, O., Simon y Canton, L., Estrada Gonzalez, R., Vidal Vidal, R., Galarraga Inza, J. & Castillo Cueto Téc, F. 1972. Micosis del sistema nervioso Central. Descripción de seis casos. - Rev. cub. Med. trop., 24 : 5-30.
- Herrera, J.M., Briceno, C.E. & Souza, O.E. 1956. Blastomicosis generalizada por Cryptococcus neoformans. Primer caso mortal estudiado en Panama. - Arch. med. Panamenos, 5 : 107-125.
- Hopfer, R.L. & Blank, F. 1975. Caffeic acid - containing medium for identification of Cryptococcus neoformans. - J. clin. Microbiol., 2 : 115-120.

- Ho-Tan-Phuoc. 1968. Contribution à l'étude de la cryptococcose au Vietnam. A propos de nos deux premiers cas de cryptococcose pulmonaire chirurgicale. - Thèse Médecine n°1034, Saïgon.
- Hsi, M.S., Chen, R.C. & Hung, T.P. 1975. Treatment of cryptococcal meningitis with 5-fluorocytosine : report of two cases. - J. Formosan med. Assoc., **74** : 129-136.
- Huang, C.T., Wong, P.C. & Chan-Teoh, C.H. 1963. Cryptococcal meningitis in Hong-Kong. - J. clin. Path., **26** : 464-469.
- Humphrey, J.D., Fordham, A. & Mac Kerrow, J. 1977. Cryptococcosis in a cat in Papua New Guinea. - Austr. vet. J., **53** : 197.
- Ichaporia, R.N., Grant, K.B. & Waria, R.S. 1970. Cryptococcal meningitis. - J. Indian med. Assoc., **54** : 425-427.
- Ishag, C.M., Bulmer, G.S. & Felton, F.G. 1968. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of Cryptococcus neoformans. - Mycopath. Mycol. appl., **35** : 81-90.
- Jaravaza, V.S., Marks, S. & Levy, L.F. 1977. Two cases of toruloma of the cerebrum. - Centr. Afr. J. Med., **23** : 77-80.
- Jimbow, T., Tejima, Y. & Ikemoto, H. 1978. Comparison between 5-fluorocytosine, amphotericin B and the combined administration of these agents in the therapeutic effectiveness of cryptococcal meningitis. - Chemotherapy, **24** : 374-389.
- Johnston, L.A.Y. & Lavers, D.W. 1963. Cryptococcal meningitis in a cat in North Queensland. - Austr. vet. J., **39** : 306-307.
- Kariks, J. 1967. Cryptococcosis : solitary pulmonary and multiple cerebral tumors. - Med. J. Australia, **54** : 651-652.
- Kaufman, L. & Blumer, S. 1977. Cryptococcosis : the awakening giant. - Proc. 4th int. Conf. Mycoses, Paho Sc., Publ. nr 356.
- Kchouk, M., Ben Rachid, M.S. & Chadli, A. 1972. Première souche tunisienne de Cryptococcus neoformans isolée de fientes de pigeons. - Arch. Inst. Pasteur de Tunis, **49** : 227-233.
- Khan, M.J., Myers, R. & Koshy, G. 1959. Pulmonary cryptococcosis : a case report and experimental study. - Dis. Chest., **36** : 656-660.
- Khan, Z.U., Pal, M., Randhawa, H.S. & Sandhu, R.S. 1978. Carriage of Cryptococcus neoformans in the crop of pigeons. - J. med. Microbiology, **11** : 215-218.
- Klokke, A.H. 1969. Generalized cryptococcosis with skin ulceration in an Indian woman. - Trop. geogr. Medicine, **21** : 19-26.
- Koshi, G., Sudersanam, D., Selvapandian, A.J. & Myers, R.M. 1964. Cryptococcosis "masquerading" as tuberculosis of the spine. - Ind. J. Path. Bact., **7** : 264-271.
- Krainer, L., Small, J.M., Hewlitt, A.B. & Deness, T. 1946. Case of systemic torula infection with tumour formation in meninges. - J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., **9** : 158.
- Kuo, D. 1962. A case of torulosis of the central nervous system during pregnancy. - Med. J. Australia, **49** : 558-560.
- Kutty, M.K. 1971. Solitary pulmonary cryptococcoma. - Southeast Asian J. trop. Med. public. Health, **2** : 87.

- Kwon Chung, K.J. 1975. Description of a new genus Filobasidiella, the perfect state of Cryptococcus neoformans. - Mycologia, **67** : 1197-1200.
- Kwon Chung, K.J. 1976. Morphogenesis of Filobasidiella neoformans, the sexual state of Cryptococcus neoformans. - Mycologia, **68** : 821-833.
- Kwon Chung, K.J. 1976a. A new species of Filobasidiella, the sexual state of Cryptococcus neoformans B and C serotypes. - Mycologia, **68** : 942-946.
- Kwon Chung, K.J. 1977. Heterothallism vs. self fertile isolates of Filobasidiella neoformans (Cryptococcus neoformans). - Proc. 4th int. Conf. Mycoses (June 1977).
- Kwon Chung, K.J. & Bennett, J.E. 1978. Distribution of α and a mating types of Cryptococcus neoformans among natural and clinical isolates. - Am. J. Epidemiology, **108** : 337-340.
- Lai, Y.H., Tsai, J.H. & Chen, C.Y. 1977. Amphotericin B and 5-fluorocytosine treatment in renal transplant recipient with cryptococcal meningitis. - J. Formosan med. Assoc., **76** : 639-647.
- Laohapand, T. & Dharamadhach, A. 1978. Systemic cryptococcosis and aspergillosis in the same patient : a case report. - J. med. Assoc. Thailand, **61** : 420.
- Laws, L. & Simmons, G.C. 1966. Cryptococcosis in a sheep. - Austr. vet. J., **42** : 321-323.
- Lec, S.I. & Suh, S.B. 1975. Studies on the distribution of Cryptococcus neoformans and its mycological characteristics isolated from avian excreta. - J. Korean med. Assoc., **18** : 883-892.
- Lewin, W. & Roux, P. 1946. Torula infection of the central nervous system : four recent cases. - S. Afr. med. J., **20** : 2-5.
- Lim Teong Wah & Chan Kok Ewe. 1962. Observations on the laboratory diagnosis of cerebral torulosis (cryptococcosis). - Med. J. Malaya, **16** : 193-205.
- Littman, M.L. & Zimmerman, L.E. 1956. Cryptococcosis-torulosis. - Ed. Grune & Stratton, 205 pp.
- Littman, M.L. & Jinks, E.W. 1968. Cryptococcosis : current status. - Am. J. Medecine, **45** : 922-932.
- Lo, D. 1976. Cryptococcosis in the Northern territory. - Med. J. Austr., **2** : 825-828.
- Lodder, J. 1970. The yeasts, a taxonomic study. - Ed. North Holland publishing Company, Amsterdam-London.
- Lurie, H.I. 1955. Fungal diseases in South Africa. - S. Afr. med. J., **29** : 186-188.
- MacGill, P.E., Sequeira, R., Jindani, A., Nguli, E.T., Forrester, A.T.T. & Fulton, W.F.M. 1969. 5-fluorocytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. - E. Afr. med. J., **46** : 663-668.
- Magaldi, C., Neto, V.A. & Monteiro, D.M. 1964. Criptococose : a proposito de un caso de forma pulmonar isolada e de outre em associacao com toxoplasmose adquirida. - Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. Sao Paulo, **19** : 19-32.
- Menakavit, W. & Sajavanich, Y. 1968. Cryptococcosis of the central nervous system. Report of two cases from Chiangmai. - J. med. Assoc. Thailand, **51** : 541-553.

- Michalany, J., Guerreido, D.T. & Teixeira de Camargo, V.I. 1967. Criptococose renal isolada. Apresentação de um caso cirurgico. - Rev. Inst. Med. trop., **9** : 295-298.
- Michaux, J.L., Vandepitte, J., Hennebert, P.N. & Sonnet, J. 1963. Aspects cliniques et thérapeutiques de la cryptococose chez le Bantou. A propos de 3 cas traités par l'amphotéricine B. - Ann. Soc. belge Med. trop., **43** : 751-776.
- Mira, C.A., Anzola, R., Martinez, A., Llinas, R., Valencia, C. & Restrepo, A. 1968. Aislamiento de Cryptococcus neoformans a partir de materiales contaminados con excreta de palomas en Medellín, Colombia. - Antioquia Med., **18** : 33-40.
- Mittal, M.M., Chatterjee, P.K. & Sharma, M.L. 1969. Cryptococcosis : a case report. - J. Ass. Phys. India, **17** : 109-114.
- Monga, D.P., Mohapatra, L.N. & Kalra, D.S. 1970. Bovine mastitis caused by Cryptococcus neoformans. - India J. med. Res., **58** : 1203-1205.
- Mpairwe, Y. & Patel, K.M. 1970. Cryptococcal meningitis in Mulago Hospital, Kampala. - E. Afr. med. J., **47** : 445-447.
- Muir, C.S. & Ransome, G.A. 1959. Cryptococcus neoformans meningitis. - Med. J. Malaya, **14** : 125-134.
- Mukherjea, A.K., Sengupta, M. & Ray, H.N. 1961. Retinal cyst due to Cryptococcus neoformans. - Bull. Calcutta Sch. trop. Med., **9** : 106-107.
- Mukthabai, B., Sunanda Kini, U., Nagesha, C.N., Agrawal, K.L. & Chari, M.V. 1970. Cryptococcosis in Mangalore. - Ind. J. Path. Bact., **3** : 83-86.
- Nadarajah, M. 1976. Cryptococcal meningitis in Singapore. - Singapore med. J., **17** : 239-241.
- Neville, L.M.B. & Cook, E.R.N. 1959. Human cryptococcosis in Kenya. - E. Afr. med. J., **36** : 309.
- Nissaisorakan, M. 1968. Cryptococcus neoformans and Allescheria boydii in Thailand. - Royal Thai Army Med. J., **21** : 23-32.
- Nissaisorakan, M. 1972. Cryptococcus neoformans from excrement of birds in Thailand - part I. - Med. J. Assoc. military Surgeons, **14** : 30-47.
- Nguyen-Trong-Dat, 1969. Contribution à l'étude de la cryptococose neuro-méningée au Vietnam. A propos de 2 cas observés à l'hôpital Cing Hoà. - Thèse de médecine n°1294, Saïgon.
- Ong, T.H. & Prathap, K. 1970. Localized osseous involvement in cryptococcosis : case report and review of the literature. - Austr. N.Z.J. Surg., **40** : 186-190.
- Padhye, A.A. & Thirumalachar, M.J. 1961. Cryptococcus neoformans from patients in Poona. - Curr. Sci., **30** : 180.
- Padhye, A.A. & Thirumalachar, M.J. 1967. Isolation of Trichophyton simii and Cryptococcus neoformans from soil in India. - Hindustan Antibiot. Bull., **9** : 155-157.
- Pal, A.K. & Chopra, S.K. 1975. Intracranial space occupying lesions. An analysis of 142 cases. - Ind. J. Path. Bact., **18** : 8-15.
- Pal, M. & Randhawa, H.S. 1976. Caprine mastitis due to Cryptococcus neoformans. - Sabouraudia, **14** : 261-263.
- Pallis, C. 1949. Cryptococcal meningitis. - Proc. Alumni. Association (King Edward VII College of Medicine, Singapore), **2** : 452-457.

- Pasqualucci, M.E.A. 1960. Ocorrencia de lesoes tumoriformes na criptococose cerebral e de outros orgaos. - Hospital - Rio, 58 : 139-147.
- Patel, K.F., Sinha, P. & Carruthers, R.H. 1977. Case of cryptococcoma producing tracheal obstruction during anaesthesia. - Med. J. Zambia, 11 : 170.
- Peluffo, G. & Conti Diaz, I.A. 1976. Criptococosis canina - Primera observacion nacional. - Rev. Med. vet., 57 : 89-90.
- Pena, C.E. 1967. Deep mycotic infections in Colombia. A clinicopathologic study of 162 cases. - Amer. J. clin. Path., 47 : 505-520.
- Pene, P., Orio, J., Bourgeade, A. & Bouichou, Y. 1969. Premier cas de cryptococose méningée en Côte d'Ivoire. - Bull. Soc. Path. exot., 62 : 831-839.
- Pereira, V.G., Marineli, D. & Cintra, A.B.U. 1957. Criptococose disseminada (torulose). Considerações acerca de um case atipico. - Rev. Hosp. Clin. Sao Paulo, 12 : 455-458.
- Perez Guevara, J. 1956. Leptomeningitis difusa e hidrocefalia interna de predominio derecho debida a Torula histolytica (Cryptococcus neoformans) con comprobacion necropsica. - Rev. Col. Med. Estado Anzoategui, 11 : 381.
- Perez Guevara, J., Urbina, P. & Dominguez, R. 1957. Neuromeningitis moral debida a Torula hystolitica (Cryptococcus neoformans). - Gac. med. Caracas, 64 : 139.
- Phan Trinh, Tran Vinh Hien, Bui Dong, Lu Lan, Nguyen Danh Hong, Pham Song & Tran Huu Giac. 1975. Sur un cas de cryptococose mortelle, comme maladie primitive à point de départ broncho-pulmonaire et septicémique avec localisation multiviscérale, surtout intra-cardiaque et intra-aortique. - Bull. Soc. Path. exot., 68 : 283-294.
- Pillay, N. & Simjee, A.E. 1976. Cryptococcal meningitis. Our experience in 24 black patients. - S. Afr. med. J., 50 : 1604-1606.
- Pinstone, B.L. & Saunders, S.J. 1959. Aspects of cryptococcosis. - S. Afr. J. Lab. klin., 5 : 156-169.
- Pollak, L. & Angulo-Ortega, A. 1967. Las micosis broncopulmonares en Venezuela. - El Torax, 16 : 135-145.
- Poo, Q.M. & Paul, F.M. 1977. Cryptococcus neoformans meningitis in a school girl. - J. Singapore Paed. Soc., 19 : 17-23.
- Poopalasingam, T. 1967. Cryptococcal meningitis (torulosis). - Med. J. Malaya, 21 : 337-343.
- Potenza, L. & Benaïm-Pinto, E. 1949. Observaciones en Venezuela de dos casos de torulosis en el sistema nervioso central. - Arch. Venezol. Patol. trop. Parasitol. Med., 1 : 235.
- Potenza, L., Rodriguez, C. & Feo, M. 1951. Torulopsia neoformans pleural. Estudio clinico, patologico y micologico del primer caso observado en Venezuela. - Rev. Sanidad Asit. Soc. Caracas, 16 : 195.
- Queiroz, R. 1957. Torulose pulmonar (resumo). - Rev. Paul. Med. Circ., 50 : 67-73.
- Ramamurthi, B. & Anguli, V.C. 1954. Intramedullary cryptococcal granuloma of the spinal cord. - J. Neurosurgery, 2 : 622-624.
- Ramana Rao, P.V., Prabhakar, V. & Dayananda Rao, B. 1968. A case of cryptococcal abscess of the brain. - Neurology - India, 16 : 122-124.

- Ramos-Morales, F., De Jesus, M.A., De Torregrosa, M.V. & Diaz Rivera, R.S. 1960. Cryptococcal meningitis : case report. - Bol. Asoc. med. Puerto Rico, **52** : 121-130.
- Randhawa, H.S. & Paliwal, D.K. 1977. Occurrence and significance of Cryptococcus neoformans in the oropharynx and on the skin of a healthy human population. - J. clin. Microbiology, **6** : 325-327.
- Ravisse, P., Reynaud, R., Depoux, R. & Salles, P. 1959. Sur le premier cas de cryptococcose découvert en Afrique équatoriale française. - Presse med., **67** : 727.
- Reddy, D.R., Prabhakar, V., Rao, B.D. & Laxmi, C.R. 1971. A case of cryptococcal abscess of the brain. - Indian J. med. Sci., **25** : 546-549.
- Renoirte, R., Michaux, J.L., Gatti, F., Vanbreuseghem, R., Bastin, J.P., Drexler, L., Maertens, K. & Renoirte-Montjoie, A.M. 1967. Nouveaux cas d'histoplasmoses africaines et de cryptococcoses observés en République Démocratique du Congo. - Bull. Acad. roy. Méd. Belgique, **7** : 465-527.
- Reyes, F.M. & Bermudes, R.H. 1968. Cryptococcosis complicating multiple myeloma. - Bol. Asoc. med. Puerto Rico, **60** : 560-565.
- Richardson, P.M., Mohandas, A. & Arumugasamy, N. 1976. Cerebral cryptococcosis in Malaysia. - J. Neurology, Neurosurgery, Psychiatry, **39** : 330-337.
- Riveros, J., Boggino & Mayor, V. 1946. Sobre un caso blastomycosis a Torula histolytica. - Rev. med. Paraguay, **3** : 95-102.
- Rogers, A.L. & Beneke, E.S. 1964. Human pathogenic fungi recovered from Brazilian soil. - Mycopath. Mycol. appl., **22** : 15-20.
- Ross-Russell, R.W. & Dean, D. 1957. Torula meningitis in Malaya. - Brit. med. J., **2** : 627.
- Royer, R., Delville, J.P. & Mairlot, F. 1954. Observation d'un cas de torulose méningée et pulmonaire. - Ann. Soc. belge Méd. trop., **34** : 229-232.
- Rubiao, P.E., Gontijo, J. & Magalhaes, M.M. 1966. Prostatite micotica (criptococica) simulando cancer da prostata - Relato de um caso. - Hospital - Rio, **70** : 1327-1336.
- Salfelder, K., Schwarz, J., Romero, A., de Liscano, T.R., Zambrano, Z. & Diaz, I. 1968. Habitat of Nocardia asteroides, Phialophora pedrosoi and Cryptococcus neoformans in Venezuela. - Mycopath. Mycol. appl., **34** : 144-154.
- Sampson, B.F. & Farren, J.E. 1942. Another case of torula meningitis. - S. Afr. med. J., **16** : 245-247.
- Sandhu, R.S., Jaggi, O.P., Rwanthawa, H.S., Sandhu, D.K. & Gupta, I.M. 1964. Isolation of Cryptococcus neoformans from a patient without clinical signs of infection. - Ind. J. Chest Dis., **6** : 93-97.
- Sarrat, H. 1973. Filamentation in vivo observée au cours d'une cryptococcose humaine. - Bull. Soc. fr. Myc. med., **11** : 65-67.
- Sethi, K.K., Randhawa, H.S., Abraham, S., Mishra, S.K. & Damodaran, V.N. 1966. Occurrence of Cryptococcus neoformans in pigeon excreta in Delhi. - Ind. J. Chest Dis., **8** : 207-210.
- Shadomy, S. 1969. In vitro studies with 5-fluorocytosine. - Appl. Microbiology, **17** : 871-877.

- Shah, P.M. & Sharma, K.D. 1964. Cryptococcosis : report of a case with the review of literature. - Indian Pediat., **1** : 181-189.
- Silva, M.E. 1960. Ocorrência de Cryptococcus neoformans e Microsporium gypseum em solos da Bahia, Brasil. - Bol. Fund. G. Moniz, **17** : 14 pp.
- Silva, M.E. & Paula, L.A. 1963. Isolamento de Cryptococcus neoformans de excrementos e ninhos de pombas (Columba livia) em Salvador, Bahia (Brasil). - Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo, **5** : 9-11.
- Singh, M.M., Paliwal, D.K. & Randhawa, H.S. 1979. Benign pulmonary cryptococcosis. - Ind. J. Chest Dis., **21** : 97-101.
- Sinha, G.B. & Barua, D. 1960. Cerebral cryptococcosis. - Bull. Calc. School trop. Med., **8** : 140.
- Sinha, P., Naik, K.G. & Bhagwat, G.P. 1978. Mediastinal cryptococcoma. - Thorax, **33** : 657-659.
- Sotobrado, J.A. 1969. Un caso de infección pulmonar por Cryptococcus (torula) en equino. - Rev. vet. Venez., **27** : 379-384.
- Sriramachari, S., Varma, R.M., Pillai, K.M., Ramananda Rao, S. & Sirsi, M. 1961. Cryptococcosis, a case report. - Neurology, Bombay, **9** : 119-127.
- Staib, F. 1962. Cryptococcus neoformans und Guizotia abyssinica (Syn. G. oleifera). - Zschr. Hyg., **148** : 466-475.
- Staib, F. 1963. Zur Widerstandsfähigkeit von Cryptococcus neoformans gegen Austrocknung und hohe Temperaturen. - Arch. Mikrobiol., **44** : 323-333.
- Staib, F. & Mishra, S.K. 1975. Selective involvement of the brain in experimental murine cryptococcosis. I. Microbiological observations. - Zbl. Bakt. Hyg., 1^{ste} Abt. Orig., **232** : 355-364.
- Stewart, J.D. 1977. Cryptococcal meningitis treated with 5-fluorocytosine and amphotericin B. - E. Afr. med. J., **54** : 684-685.
- Stijns, J. & Royer, P. 1953. Un cas de méningite à torulopsis au Congo belge. - Ann. Soc. belge Méd. trop., **33** : 483-486.
- Stitnimankarn, T., Na Nakorn, S. & Rigunti, M. 1960. - Cryptococcosis : report of first case in Thailand. - J. med. Assoc. Thailand, **43** : 78-100.
- Supramanian, J.H.J., Ng, K.C., Tambyah, J. & Goh, C.W. 1969. Cryptococcosis : a report of 3 cases with special emphasis on management and a review of the local literature. - Singapore med. J., **10** : 155-163.
- Sutherland, J.M. 1969. Geography and diseases of the nervous system. - Med. J. Austr., **56** : 885-891.
- Sutmöller, P. & Poelma, F.G. 1957. Cryptococcus neoformans infection (torulosis) of goats in the leeward islands region. - West Indian med. J., **6** : 225-228.
- Swinne, D. 1979. Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin 1894 et l'épidémiologie de la cryptococcose. - Acta Zool. Path. Antverpiensia, **74** : 5-134.
- Takos, M.J. & Elton, N.W. 1953. Spontaneous cryptococcosis of marmoset monkeys in Panama. - Arch. Path., **55** : 403.
- Taylor, R.L. & Duangmani, C. 1968. Occurrence of Cryptococcus neoformans in Thailand. - Amer. J. Epidemiology, **87** : 318-332.
- Thasnakorn, P., Dhiraputra, C. & Bhadrakom, S. 1970. A search for pathogenic fungi from droppings in fancier's houses in Dhonburi. - J. med. Assoc. Thailand, **53** : 708-710.

- Thomas, J., Carsuzzaa, M., Lefèvre, M., Discamps, G., Desmerges, C., Jacobi, J.C. & Aubry, P. 1977. Cryptococcose avec localisation hépatique. - Bull. Soc. Méd. Afr. noire Langue française, **22** : 1-5.
- Tia-Kim-Hy. 1964. Etude des premiers cas de cryptococcose neuroméningée observés au Vietnam. - Thèse Médecine, Pnom Penh.
- Tiant, F.R. & Fuentes, C.A. 1958. Cryptococcosis de localizacion cutanea. - Bol. Soc. Cub. Dermat. Sifilographia, **15** : 65-72.
- Tolosa, A., Spina-França, A. & da Silva Lacaz, C. 1956. Criptococcose do sistema nervoso central - Registro de um caso. - Arq. Neuro-psiquiatria Sao Paulo, **14** : 171-178.
- Truong-Cong-Tam. 1972. Pulmonary cryptococcosis (report of one case). - Thèse de Médecine n°1918, Saïgon.
- Turner, P.P. 1959. A case of cryptococcosis with choroïdal torulomata. - E. Afr. med. J., **36** : 220-223.
- Vanbreuseghem, R. 1966. Guide pratique de Mycologie médicale et vétérinaire. - Ed. Masson et Cie, Paris.
- Vanbreuseghem, R. 1971. Introduction to the "2nd International Colloquium on Medical Mycology" (Antwerpen, 3-5 décembre 1971).
- Vanbreuseghem, R., De Vroey, Ch. & Takashio, M. 1978. Guide pratique de Mycologie médicale et vétérinaire. - Ed. Masson et Cie, Paris.
- Vanbreuseghem, R. & Takashio, M. 1970. An atypical strain of Cryptococcus neoformans (San Felice) Vuillemin 1894. Part II : Cryptococcus neoformans var. gattii, var. nov. - Ann. Soc. belge Méd. trop., **50** : 695-702.
- van Dellen, J.R. & Buchanan, N. 1980. Intrathecal cryptococcal lesion of the cauda equina successfully treated with intrathecal amphotericin B : a case report. - S. Afr. med. J., **58** : 137.
- Vanden Ende, E.W., Hammond, J.A. & Amoils, R.L. 1974. Cryptococcal meningitis : a case treated with 5-fluorocytosine. - S. Afr. med. J., **48** : 555-556.
- Vandepitte, J., Colaert, J. & Liégeois, A. 1953. Leptoméningite à Torulopsis neoformans. - Ann. Soc. belge Méd. trop., **33** : 503-509.
- Vassiliadis, P. & de Antas Videira. 1959. Nouveaux cas de cryptococcoses au Congo belge. - Ann. Soc. belge Méd. trop., **39** : 753-758.
- Verma, P.C. & Kalra, D.S. 1976. Isolation of Cryptococcus neoformans from pigeon excreta and its association with mastitis. - Haryana vet., **15** : 104-105.
- Verma, R.M., Sriramachari, S., Pillai, K.M., Sridhara Rama Rao, B.S., Ramananda Rao, R. & Sirsi, M. 1960. A case report of cryptococcal infection of the brain. - Trans. All. India Inst. ment. Hlth., **1** : 63-73.
- Verut, D., Novales, J. & Lavallo, P. 1963. Criptococcosis cutaneo - mucosa estudio del primer caso observado en Mexico. - Mem. I. Cong. Mex. Derm., Mexico, 297-301.
- Villacorta, M.G. & Resch, Ch. A. 1954. Torulosis aggravated by dental procedures. - J. Phil. med. Ass., **30** : 651-653.
- Watt, D.A. 1970. A case of cryptococcal granuloma in the nasal cavity of a horse. - Aust. vet. J., **46** : 493-495.

- d' A. Webling, D. 1978. Rapid resolution of cryptococcal meningitis during superimposed Pseudomonas cepacea infection. - Med. J. Australia, 2 : 336-337.
- Wenger, F. 1955. Las micosis profundas en el material de anatomia patologica de Maracaibo. - Memorias VI, Congreso venezol. Cienc. med., 5 : 2888.
- Wen Yang Lu Lu. 1961. Cryptococcosis : a report of 4 additional cases with review of 11 cases found in Taiwan. - J. Formosan med. Assoc., 60 : 867-881.
- Yalaburgi, S.B. & Mohapatra, K.C. 1980. Cryptococcus neoformans meningitis : a case report. - S. Afr. med. J., 57 : 1011-1012.
- Zimmerman, L.E. & Rappaport, H. 1954. Occurrence of cryptococcosis in patients with malignant disease of reticuloendothelial system. - Amer. J. clin. Path., 24 : 1050-1072.



Achevé d'imprimer le 15 mars 1990
par les imprimeries
Dewarichet s.p.r.l., 1060 Bruxelles

Gedrukt op 15 maart 1990
door drukkerijen
Dewarichet p.v.b.a., 1060 Brussel