

Comparaison des tests de résistance *in vivo* et *in vitro* chez des malades traités à la chloroquine à Yaoundé (Cameroun)

P. Ringwald¹ et L. K. Basco²

On a évalué l'utilité sur le terrain d'une épreuve isotopique *in vitro* en comparant ses résultats à la réponse thérapeutique déterminée par le test OMS *in vivo* simplifié chez des malades camerounais symptomatiques traités par la chloroquine. Sur les 117 malades recrutés pour cet essai, 102 (87%) sont allés jusqu'au bout du suivi de 14 jours et 95 isolats provenant de ces malades (46 enfants et 49 adultes) ont fourni des résultats interprétables avec le test *in vitro*. Sur ces 95 malades, 57 au total (60%; 28 enfants et 29 adultes) présentaient une réaction clinique adéquate avec des frottis négatifs ($n = 46$) ou une parasitémie asymptomatique ($n = 11$) le 7^e ou le 14^e jour. La moyenne géométrique des CI_{50} des isolats correspondants était de 63,3 nmol/l. On a observé des échecs thérapeutiques tardifs et précoces chez 29 (30,5%) et 9 (9,5%) des malades, respectivement. La moyenne géométrique des CI_{50} des isolats thérapeutiques tardifs et de 302 nmol/l pour les échecs thérapeutiques précoces. Parmi les malades pour lesquels il y avait eu échec thérapeutique tardif ou précoce, on a observé respectivement 5 isolats et 1 isolat donnant un résultat discordant (résistance *in vivo* et sensibilité *in vitro*). En considérant le test *in vivo* comme test de référence, la sensibilité, la spécificité et la valeur prédictive positive du test *in vitro* en ce qui concerne la mise en évidence des cas sensibles à la chloroquine étaient respectivement de 67, 84 et 86%. Il y avait concordance modérée entre le test *in vitro* et le test *in vivo* (valeur du coefficient kappa = 0,48). Le test *in vitro* est en assez bon accord avec la réponse thérapeutique et permet de s'affranchir de plusieurs facteurs liés à l'hôte et susceptibles d'influer sur les résultats du test *in vivo*. Cependant, en raison de l'existence de quelques résultats discordants, le test *in vitro* ne peut pas se substituer au test *in vivo* pour évaluer l'efficacité thérapeutique. La seule définition fiable de la « résistance » des plasmodies repose sur la réponse clinique et parasitologique des patients symptomatiques, et c'est donc le test *in vivo* qui constitue la méthode normale permettant de juger s'il y a sensibilité ou résistance et d'orienter ainsi la politique nationale en matière de traitement antipaludique.

Article publié en anglais dans *Bulletin of the World Health Organization*, 1999, **77** (1) : 34-43.

Introduction

La résistance à la chloroquine de *Plasmodium falciparum* est décrite dans tous les pays de l'Afrique subsaharienne (1). Pour l'instant, elle reste d'une ampleur limitée dans de nombreuses régions, et la plupart des cas de résistance dont il est fait état sont du niveau RI (2-4). Ces observations, jointes à des considérations d'ordre économique et à un niveau d'immunité acquise généralement élevé, justifient la recommandation d'utiliser la chloroquine en première intention dans le traitement des infections aiguës à falciparum

sans complications chez les patients autochtones de la majeure partie de l'Afrique subsaharienne où l'on peut obtenir des taux de guérison acceptables (5). Toutefois, le risque de voir la chloroquine devenir de plus en plus inefficace, comme cela se confirme dans d'autres zones d'endémie palustre, contraint à réévaluer régulièrement l'efficacité thérapeutique de ce produit pour savoir quelle politique suivre en Afrique en matière d'antipaludéens.

Il existe deux méthodes générales pour évaluer l'efficacité d'un médicament sur le terrain : les tests *in vivo* et les tests *in vitro* (6). Par le passé, on a eu largement recours, sur le terrain, aux épreuves normalisées de l'OMS, mais l'expérience a montré que ni les unes ni les autres n'avaient fait l'unanimité comme aide à la décision en matière de politique pharmaceutique (7). L'évaluation clinique de l'efficacité thérapeutique repose sur la détermination de la proportion d'échecs thérapeutiques au sein d'une population de malades sur un site expérimental donné. Le but des tests *in vivo* est de mettre en évidence une pharmacorésistance définie comme

¹ Chercheur, Institut français de Recherche scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) et Laboratoire de Recherches sur le Paludisme, Laboratoire associé francophone 302, Organisation de Coordination pour la Lutte contre les Endémies en Afrique centrale (OCEAC), Yaoundé (Cameroun). Adresse : OCEAC/ORSTOM, B. P. 288, Yaoundé (Cameroun) (mél. : oceac@camnet.cm).

² Chercheur, ORSTOM/OCEAC, Yaoundé (Cameroun).

«l'aptitude d'une souche de parasites du paludisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du sujet» (8). Les tests *in vivo* normalisés qui ont été décrits en 1973 supposent le recrutement de malades symptomatiques ou de porteurs asymptomatiques de plasmodies et nécessitent un suivi journalier sur 7 jours («test de 7 jours») ou de 28 jours (journalier les 7 premiers jours et hebdomadaire ensuite; «test prolongé») dans une zone exempte de paludisme (8). Ce genre de test n'est guère praticable en Afrique, en particulier d'un point de vue socio-économique, s'il faut une durée d'hospitalisation d'un mois. En outre, les résultats obtenus sur des porteurs asymptomatiques ne peuvent pas être extrapolés à des malades symptomatiques pour en tirer des conclusions quant à l'efficacité du traitement médicamenteux. Dernièrement, une amélioration très importante a été apportée grâce à la mise au point d'un test *in vivo* de 14 jours, plus commode et plus simple, qui se pratique sur des malades symptomatiques souffrant d'un accès simple de paludisme à falciparum (7). Ce test simplifié consiste à mesurer régulièrement la température du sujet et à examiner des étalements de sang au microscope. Ce test *in vivo* standard ou simplifié constitue la méthode de référence pour rechercher une pharmacorésistance.

Les épreuves *in vitro* reposent sur la culture d'isolats de *P. falciparum* en présence d'une série de concentrations de l'antipaludéen étudié pendant la durée d'un cycle évolutif ou une partie de ce cycle. Pour évaluer l'efficacité de l'antipaludéen, on peut soit compter le nombre de parasites qui atteignent le stade de schizonte (test *in vitro* de l'OMS), soit mesurer la quantité d'hypoxanthine radiomarquée, un précurseur de l'ADN, fixée par les parasites (microméthodes isotopiques) (6, 9-13). On conclut qu'il y a résistance lorsqu'il n'y a plus inhibition de la croissance au-dessous d'un certain seuil de concentration.

On a avancé que les résultats des tests de résistance *in vitro* ne coïncident pas toujours avec ceux des tests *in vivo* et seraient donc sans valeur pour les études cliniques (7). Ce problème est dû pour une part à la nature du test *in vitro* ainsi qu'à l'insuffisance des données relatives aux tests *in vitro* pratiqués sur les malades parallèlement aux tests *in vivo*. On n'a pas procédé à une comparaison poussée entre les tests *in vitro* et les tests *in vivo* dans le cas de la résistance à la chloroquine, car ce produit avait déjà cessé d'être efficace dans nombre de régions d'endémie avant même que les techniques de culture *in vitro* aient été mises au point et l'on n'en recommande d'ailleurs plus l'usage dans ces régions pour le traitement du paludisme à falciparum.

Dans la présente analyse rétrospective, nous nous proposons de comparer les résultats des tests isotopiques *in vitro* à la réponse clinique (mesurée au moyen du test *in vivo* simplifié de l'OMS) obtenue chez des malades camerounais soumis à un traitement classique par la chloroquine. Nous avons

cherché à déterminer si les tests *in vitro* pratiqués sur un malade donné mesurent effectivement la sensibilité ou la résistance que la plasmodie manifeste *in vivo* vis-à-vis de la chloroquine et à établir dans quelle mesure les tests *in vitro* peuvent être considérés comme complémentaires du test *in vivo*.

Malades et méthodes

Malades

Notre échantillon se composait de 117 adultes et enfants camerounais âgés de plus de 5 ans (limites d'âge: 5-50 ans) habitant Yaoundé et recrutés au dispensaire de la Mission catholique Nlongkak de Yaoundé (Cameroun), entre 1994 et 1996, avec leur consentement libre et éclairé. Les critères de participation à l'essai étaient les suivants: symptômes de paludisme à falciparum en phase aiguë sans complications (température supérieure à 37,5°C au moment du recrutement ou antécédents de fièvre au cours des 24 heures précédentes), mono-infection par *P. falciparum*, parasitémie initiale >5000 hématozoaires asexués par l de sang et résultat négatif au test urinaire de Saker-Solomons pour la recherche d'antipaludéens (14). Les femmes enceintes, les malades présentant les symptômes d'un paludisme grave ou compliqué, selon la définition de l'OMS (15), ainsi que les malades souffrant d'une anémie sévère (taux d'hémoglobine <6 g/dl) ont été exclus de l'essai. L'étude a reçu l'approbation du Comité national d'Éthique du Cameroun.

Test *in vivo*

La chloroquine (dose totale 25 mg/kg de poids corporel fractionnée en trois prises: 10 mg/kg le jour 0 et le jour 1; 5 mg/kg le jour 2) a été administrée sous surveillance. Les malades ont été suivis en ambulatoire les jours 1, 2, 3, 4, 7 et 14. Lors de chaque visite, on a noté l'état clinique, la température et la densité parasitaire. Cette dernière a été mesurée soit par comptage du nombre d'hématies parasitées pour 20 000 hématies sur des frottis minces de sang colorés au Giemsa (le jour 0), soit par comptage du nombre de parasites asexués pour 1000 leucocytes en goutte épaisse, également colorée au Giemsa (à partir du jour 1) et exprimée en nombre de plasmodies par μ l de sang.

Dans la classification (révisée en 1996) que l'OMS donne de la réponse *in vivo* à un traitement par des antipaludéens, les malades sont mis en observation les jours 3, 7 et 14 et on contrôle la réponse clinique et la réponse parasitologique (7). En fonction des résultats obtenus pour ces deux réponses, on distingue les cas suivants: échec thérapeutique précoce (ETP), échec thérapeutique tardif (ETT), réponse clinique adéquate (RCA). On considère qu'il y a échec thérapeutique précoce si l'on constate la présence d'un des quatre critères suivants: frottis positif et symptômes de paludisme grave les jours 1, 2 ou 3; frottis positif (densité parasitaire > densité au jour 0) et fièvre le jour 2; frottis positif et fièvre le jour 3; frottis positif le jour 3 (densité parasitaire \geq 25%

de la densité avant traitement). L'échec thérapeutique tardif se définit par un frottis positif et des symptômes de paludisme grave entre le jour 4 et le jour 14. On parle enfin de réponse clinique adéquate (RCA) soit lorsque le malade présente un frottis négatif le dernier jour de la période de suivi de 14 jours, avec ou sans fièvre, soit lorsque le malade présente un frottis positif ou négatif et qu'il reste apyrétique pendant le suivi, sans avoir auparavant satisfait aux critères d'échec thérapeutique précoce ou tardif. Les malades qui entraient dans les catégories ETP ou ETT ont reçu un traitement *per os* par l'halofantrine (dose totale = 1500 mg pour les adultes ou 24 mg d'halofantrine-base par kg de poids corporel pour les enfants, fractionnée en trois prises à 6 heures d'intervalle) ou par la quinine (25 mg de quinine-base par kg de poids corporel, tous les jours pendant 5 jours).

Pour interpréter la réponse parasitologique, on a également utilisé le système classique de classification S-RI-RII-RIII (8). L'interprétation de la réponse parasitologique en utilisant les tests classiques de l'OMS nécessite un contrôle quotidien de la densité parasitaire entre les jours 0 et 7 dans le cas du « test de 7 jours », suivi d'un frottis sanguin hebdomadaire jusqu'au jour 28 dans le cas du « test prolongé ». Comme le test *in vivo* simplifié version 1996 ne nécessite plus l'examen quotidien d'un frottis sanguin et s'achève le jour 14, la réponse parasitologique peut quelquefois être difficile à distinguer clairement. C'est pourquoi la définition de cette réponse a été modifiée comme indiqué ci-dessous.

- Sensibilité (S)/résistance tardive stade I (RI). Disparition des formes asexuées le jour 6 ou antérieurement et frottis négatif le jour 7 et le jour 14. Comme dans le cas du « test de 7 jours », on ne peut pas distinguer une réponse de type S d'une réponse de type RI étant donné que la différence entre ces deux réponses dépend de la présence (RI tardive) ou de l'absence (S) d'une recrudescence entre les jours 15 et 28.
- Résistance précoce stade I (RI). Disparition des formes asexuées le jour 6 ou antérieurement, suivie d'une recrudescence entre les jours 7 et 14, inclusivement.
- Stade RI précoce/résistance stade II (RII). Réduction marquée de la parasitémie asexuée (<25% de la densité parasitaire avant traitement) dans les 48 heures suivant le début du traitement, et parasitémie asexuée persistante jusqu'au jour 7 (et jusqu'au jour 14 si le malade n'a pas été traité entre le jour 7 et le jour 13). Certains cas qui ne répondent pas aux critères de « réponse de type RI précoce » ou « RII » sont classés comme « réponse de type RI précoce/RII » car on n'a pas observé de disparition de la parasitémie asexuée entre les jours 4 et 6 faute d'avoir examiné des frottis au cours du suivi des malades. En outre, 7 cas d'« échec thérapeutique précoce » jugés inclassables faute d'avoir examiné leurs frottis sanguins au-delà du jour 3 (et qui avaient <25% de la parasitémie avant

traitement le jour 2) après une autre thérapeutique ont été ajoutés au groupe RI précoce/RII.

- Résistance stade III (RIII). Légère réduction (>25% de la densité parasitaire avant le traitement), pas de changement, ou augmentation de la parasitémie asexuée au cours des premières 48 heures de traitement, et pas de disparition ultérieure de la parasitémie (jusqu'au jour 7). Les malades dont la densité parasitaire était >25% de la densité avant le traitement le jour 2 et qui nécessitaient une autre thérapie en raison de la détérioration de leur état clinique avant le jour 7 ont également été classés dans le groupe RIII (16).

Test *in vitro*

Avant le traitement, on a prélevé des échantillons de sang veineux (5-10 ml) pour le test *in vitro*. Le jour 0, on a déterminé la sensibilité *in vitro* des isolats cliniques sans leur faire subir une adaptation culturale préalable. La technique du test isotopique *in vitro* a été décrite dans une publication antérieure (17). En gros, la technique a consisté à laver trois fois les échantillons de sang dans le milieu de culture RPMI 1640. Les hématies parasitées (hématocrite 1,5%, parasitémie 0,1-1,0%) ont ensuite été mises en suspension dans le RPMI 1640 additionné de 10% de sérum humain et tamponné avec une solution de bicarbonate de sodium à 25 mmol/l et du HEPES à 25 mmol/l. On a ensuite réparti le mélange dans les godets de plaques de microtitrage à 24 godets (700 µl par godet) préalablement recouverts de chloroquine (limites finales de concentration : 12,5-1600 nmol/l, en triple exemplaire), sauf trois d'entre eux destinés à tenir lieu de témoins. Les plaques ont été incubées pendant 42 heures au total à la température de 37°C sous atmosphère à 5% de CO₂. Dix-huit heures après la période d'incubation initiale, on a ajouté de l'hypoxanthine tritiée (40 µCi/ml). A la fin de l'incubation, les plaques ont été congelées à -20°C puis décongelées pour provoquer la lyse des hématies. Après les avoir recueillies sur filtre en fibre de verre au moyen d'un récolteur, on a mesuré la fixation de la ³H-hypoxanthine au moyen d'un compteur à scintillations. Les résultats du test *in vitro* ont été exprimés par la concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀), c'est-à-dire la concentration à laquelle la fixation de la ³H-hypoxanthine était inhibée à 50%, comparativement aux résultats obtenus pour les godets sans chloroquine. En nous appuyant sur nos résultats antérieurs, nous avons considéré qu'il y avait résistance à la chloroquine *in vitro* lorsqu'on avait CI₅₀ >100 nmol/l (17). Un certain nombre de résultats de tests *in vitro* et *in vivo* ont été publiés antérieurement (17-19).

Analyse statistique

Nous avons comparé les paramètres cliniques, hématologiques et biochimiques des malades qui présentaient une réponse clinique adéquate (RCA) à ceux des malades pour lesquels nous avons un échec thérapeutique précoce ou tardif, en utilisant pour cela

Tableau 1. Résultats cliniques et parasitologiques du test *in vivo* simplifié pratiqué sur des malades camerounais traités par la chloroquine à raison de 25 mg/kg de poids corporel

Réponse ^a	Nombre de malades	
	Enfants (n = 46)	Adultes (n = 49)
Réponse clinique adéquate		
S/RI tardive	23	23
RI précoce	5	6
RI précoce/RII	0	0
RIII	0	0
Echec thérapeutique tardif		
S/RI tardive	0	0
RI précoce	4	5
RI précoce/RII	8	10
RIII	1	1
Echec thérapeutique précoce		
S/RI tardive	0	0
RI précoce	0	0
RI précoce/RII	3	4
RIII	2	0

^a La définition de la réponse thérapeutique (réponse clinique adéquate, échec thérapeutique tardif ou précoce) est celle qui est donnée dans la classification de l'OMS révisée en 1996 (7). Le système de stadification de la réponse parasitologique (S/RI tardive, RI précoce, RI précoce/RII et RIII) est une adaptation et une variante du système proposé dans la classification 1973 de l'OMS (8). Se reporter au texte pour les définitions.

Tableau 2. Paramètres cliniques et biologiques avant traitement des malades débarrassés ou non de leur infection palustre par un traitement à la chloroquine

Paramètre ^a	Réponse thérapeutique ^b	
	RCA	Echec thérapeutique
Nombre de malades	57	38
Nombre d'enfants (âgés de 5-15 ans)	28	18
Age moyen (en années)	17,7 ± 9,8 (5-47) ^c	19,1 ± 12,0 (5-50)
Poids moyen (en kg)	50,7 ± 21,8 (20-99)	48,2 ± 18,2 (20-88)
Sex ratio (masculin:féminin)	28:29	17:21
Symptômes avant traitement (jours moyens)	5,7 ± 6,2 (1-30)	4,6 ± 4,9 (1-30)
Parasitémie moyenne géométrique (formes asexuées par µl)	76 400 (9 420-508 700)	90 800 (19 920-579 400)
Température moyenne (°C)	37,9 ± 1,3	38,2 ± 1,3
Taux moyen d'hémoglobine (g/dl)	11,4 ± 2,6 (6,9-17)	11,3 ± 2,2 (6,3-14,7)
Nombre moyen de leucocytes (x 10 ⁶ /l)	5 640 ± 1 820 (2 900-11 000)	5 800 ± 1 890 (3 300-11 700)
Nombre moyen de plaquettes (x 10 ⁹ /l)	145 ± 68 (22-295)	152 ± 83 (34-362)
Taux moyen d'ASAT sérique (UI/l)	31,0 ± 27,3 (10-180)	35,3 ± 33,6 (8-150)
Taux moyen d'ALAT sérique (UI/l)	19,7 ± 20,1 (2-84)	19,9 ± 22,4 (4-84)
Taux moyen de créatinine (µmol/l)	68,2 ± 25,0 (30-138)	69,0 ± 29,0 (20-143)

^a Les valeurs moyennes pour les groupes RCA et échec thérapeutique ne diffèrent pas de façon significative (p > 0,05; test U de Mann-Whitney). ASAT = aspartate-aminotransférase; ALAT = alanine-aminotransférase.

^b Réponses thérapeutiques selon la définition qui figure dans la classification de l'OMS, révision 1996 (7). RCA = réponse clinique adéquate; le groupe «échec thérapeutique» inclut à la fois l'échec thérapeutique tardif (ETT) et l'échec thérapeutique précoce (ETP).

^c Les chiffres entre parenthèses indiquent l'intervalle de variation.

le test U de Mann-Whitney. Le niveau de signification (p) a été fixé à 0,05. Comme le test *in vivo* constitue la méthode de référence pour déterminer la résistance à la chloroquine, nous avons estimé la validité du test *in vitro* par rapport à la réponse thérapeutique en calculant sa sensibilité, sa spécificité et sa valeur prédictive. La réponse thérapeutique de chaque patient a été comparée séparément à la valeur de la CI₅₀ de chloroquine obtenue pour l'isolat de *P. falciparum* correspondant. Nous avons également comparé les résultats des tests de résistance *in vivo* et *in vitro* en faisant appel à un traitement statistique de type kappa et calculé un indice d'accord (20, 21). Le coefficient kappa représente le degré d'accord entre deux méthodes (ou deux observateurs) qui n'est pas imputable au seul hasard, un coefficient de 1 dénotant un accord parfait. Les valeurs intermédiaires de ce coefficient (entre 0 et 1) s'interprètent arbitrairement de la façon suivante: 0-0,20, faible accord; 0,21-0,40, accord convenable; 0,41-0,60, accord modéré; 0,61-0,80, bon accord; >0,81, très bon accord.

Résultats

Nous avons recruté 117 malades au total (65 adultes et 52 enfants) pour notre étude. Sur ce total, 102 malades (87%; 55 adultes et 47 enfants) sont allés jusqu'au bout de la période de suivi de 14 jours. Sur les 15 malades non suivis, trois ne sont pas allés jusqu'au terme de leur traitement de 3 jours (perdus de vue avant le jour 2) et deux, cinq et trois autres ont été perdus de vue respectivement le jour 3, le jour 7 et le jour 14. Deux malades ont été exclus de l'essai pour cause d'automédication concomitante avec de la quinine *per os*. Les isolats parasitaires provenant de 107 des 117 malades (91%) ont pu être cultivés avec succès pour déterminer la CI₅₀ de chloroquine. Sur les 15 isolats provenant des malades n'ayant pu être suivis, quatre se sont révélés sensibles à la chloroquine *in vitro*, huit étaient chloroquino-résistants *in vitro*, et dans trois cas les résultats n'ont pu être interprétés. Sept isolats provenant de malades suivis jusqu'au terme de la période d'observation de 14 jours (5 RCA et 2 ETP) n'ont pas fourni de résultats interprétables avec le test *in vitro*. Dans le cas des malades qui ne sont pas allés jusqu'au bout des 14 jours (n = 15), ou encore dont les isolats n'ont pas eu une croissance satisfaisante ou ont été perdus par suite de contamination

bactérienne ($n = 10$), l'analyse n'a pas été poussée plus loin.

Sur les 95 malades qui sont allés jusqu'au terme du suivi et dont les isolats ont pu être cultivés avec succès en vue du test *in vitro*, 46 étaient des enfants de moins de 15 ans et 49 des adultes (Tableau 1). Parmi ces malades, 57 (60%; 28 enfants, 29 adultes) ont présenté une réponse clinique adéquate (Tableau 1); 46 d'entre eux étaient apyrétiques le jour 3 ou les jours précédents et le sont restés jusqu'au jour 14; ils ont eu une goutte épaisse négative ou un frottis positif (densité <25% de la densité au jour 0) le jour 3 et des frottis négatifs les jours 7 et 14 (S/RI tardive); 8 avaient un frottis négatif le jour 3 et un frottis positif les jours 7 ($n = 2$) ou 14 ou les deux, mais sont restés afebriles entre les jours 3 et 14 (RI précoce); enfin, 3 avaient un frottis positif le jour 3 (densité <25% de la densité au jour 0), un frottis négatif le jour 7 et un frottis positif le jour 14 mais étaient restés afebriles entre les jours 3 et 14 (RI précoce). Il y avait par conséquent 11 malades dans le groupe RCA avec une recrudescence asymptomatique de leur parasitémie le jour 7 et/ou le jour 14 (RI précoce).

On a observé un échec thérapeutique avec la chloroquine sur 38 malades au total (40%). Cet échec a été tardif chez 29 (30,5%) et on peut distinguer plusieurs sous-groupes. Chez 20 malades, la parasitémie n'a pas disparu au cours de la période de suivi de 14 jours et ces malades ont été fébriles entre le jour 7 et le jour 14 (RI précoce/RII ou RIII); chez 6 malades, la parasitémie a disparu le jour 2 et/ou le jour 3, mais pour réapparaître entre les jours 7 et 14 avec de la fièvre et un frottis positif (RI précoce); enfin, 3 malades ont eu des frottis positifs jusqu'au jour 3, un frottis négatif le jour 7 et de nouveau un frottis positif avec de la fièvre le jour 14 (RI précoce). On a observé un échec thérapeutique précoce chez 9 malades (9,5%); 6 d'entre eux avaient de la fièvre et un frottis positif le jour 3; on a constaté une détérioration de l'état clinique en présence d'une parasitémie chez 3 d'entre eux le jour 2 ou le jour 3. Les paramètres cliniques et biologiques des malades sont récapitulés au Tableau 2. Bien que la parasitémie initiale ait eu tendance à être un peu plus forte chez les malades qui n'avaient pas réagi à la chloroquine (76 400 formes asexuées par μ l de sang au lieu de 90 800; $p > 0,05$), les deux groupes de malades présentaient des paramètres cliniques et des constantes hématologiques ou biochimiques similaires ($p > 0,05$) avant l'administration de chloroquine.

La moyenne géométrique des valeurs de la CI_{50} de chloroquine obtenues *in vitro* avec les isolats provenant des 57 malades du groupe RCA était égale à 63,3 nmol/l (intervalle de variation: 8,9-486 nmol/l) (voir Figure 1). Au total, 38 de ces isolats (35 provenant des malades classés S/RI tardive et 3 des malades classés RI précoce) se sont révélés sensibles à la chloroquine *in vitro*, alors que 19 (11 provenant de malades classés S/RI tardive et 8 des malades classés RI précoce) s'y sont montrés résistants. Pour les isolats provenant des malades classés ETT, la moyenne géométrique des valeurs de la CI_{50} était

Fig. 1. Distribution des valeurs de la CI_{50} de chloroquine, déterminées par le test isotopique *in vitro*, comparée à la réponse thérapeutique à la chloroquine des malades étudiés

(La réponse clinique est graduée en réponse clinique adéquate (RCA), échec thérapeutique tardif (ETT) ou échec thérapeutique précoce (ETP), selon le système de classification 1996 de l'OMS (7))

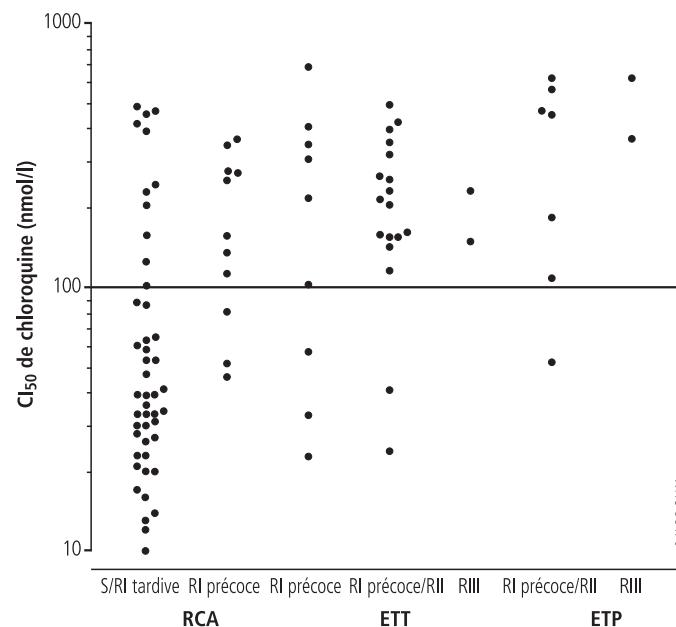


Tableau 3. Validité du test isotopique *in vitro* de résistance à la chloroquine appliqué à la mesure de l'efficacité médicamenteuse *in vivo* basée sur la réponse thérapeutique

Résultat du test <i>in vitro</i> ^a	Réponse thérapeutique ^b		Total
	RCA	Echec thérapeutique ETT/ETP	
$IC_{50} < 100$ nmol/l	38	6 (5/1) ^c	44
$IC_{50} \geq 100$ nmol/l	19	32 (24/8)	51
Total	57	38 (29/9)	95

^a La sensibilité *in vitro* à la chloroquine a été définie par $IC_{50} < 100$ nmol/l et la résistance *in vitro* à la chloroquine par $IC_{50} \geq 100$ nmol/l. D'après la réponse thérapeutique, la sensibilité du test *in vitro* = 67%, sa spécificité = 84% et sa valeur prédictive = 86%.

^b La définition de la réponse thérapeutique est celle qui est donnée dans la classification OMS, révision 1996 (7). RCA = réponse clinique adéquate; ETT = échec thérapeutique tardif; ETP = échec thérapeutique précoce. Les patients dont la réponse thérapeutique correspondait à un échec thérapeutique tardif ou précoce ont été regroupés pour l'analyse statistique.

^c Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de sujets avec un ETT ou un ETP.

égale à 173 nmol/l (intervalle de variation: 23-690 nmol/l; $n = 29$). Cinq de ces 29 isolats (3 provenant du groupe RI précoce et 2 du groupe RI précoce/RII) se sont révélés sensibles à la chloroquine *in vitro*, alors que les 24 autres (6 du groupe RI précoce, 16 du groupe RI précoce/RII et 2 du groupe RIII) lui étaient résistants. Pour les 9 isolats provenant des malades classés ETP, la moyenne géométrique des valeurs de la CI_{50} était égale à 302 nmol/l (intervalle de variation: 53-641

nmol/l). Un seul isolat de ce groupe (RI précoce/RII) s'est révélé sensible à la chloroquine *in vitro*.

La validité des résultats obtenus *in vitro*, déterminée en comparant la réponse thérapeutique à la valeur seuil de 100 nmol/l de la CI₅₀ de chloroquine, est donnée au Tableau 3. La sensibilité, la spécificité et la valeur prédictive ou diagnostique du test *in vitro* pour ce qui est de distinguer entre cas sensibles et cas résistants à la chloroquine ont été trouvées respectivement égales à 67, 84 et 86%. On a ensuite comparé les résultats des tests *in vivo* et *in vitro* en calculant la valeur du coefficient kappa qui mesure l'accord entre les deux techniques; la valeur trouvée, 0,48, correspond à un accord modéré.

Discussion

Un certain nombre de travaux ont déjà été consacrés à l'évaluation de la correspondance entre les réponses *in vivo* et *in vitro* aux antifoliques (22-24). Les résultats obtenus ne sont pas comparables en raison de différences entre les techniques *in vitro* utilisées et de divergences dans leur interprétation. En outre, ils ne sont pas significatifs du fait de la trop petite taille de l'échantillon d'isolats obtenu sur le terrain. Comme, de plus, les antifoliques sont administrés *in vivo* sous la forme d'une association, il n'est pas certain que l'activité manifestée *in vitro* par les deux médicaments à une concentration déterminée reflète exactement les conditions qui règnent *in vivo*. Dans la plupart des autres études, on a procédé séparément à l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'efficacité des antipaludiques (25-27). Les implications réelles de ces travaux, notamment ceux qui reposent exclusivement sur des tests *in vitro* ou *in vivo* chez des malades asymptomatiques, ne sont claires ni du point de vue clinique, ni du point de vue épidémiologique.

La présente étude est la première à comparer simultanément la réponse *in vitro* et la réponse *in vivo* à la chloroquine d'un grand nombre d'isolats de *P. falciparum* obtenus sur le terrain chez des malades symptomatiques. La comparaison des paramètres cliniques et biologiques avant traitement entre les malades classés comme RCA et ceux chez qui la réponse s'est traduite par un échec thérapeutique montre qu'il n'y avait pas de facteurs importants de risque d'échec thérapeutique. Comparativement au test *in vivo* simplifié pour la détermination de la résistance à la chloroquine, la valeur prédictive de l'épreuve isotopique *in vitro* indique que 86% des malades chez lesquels le test *in vitro* a révélé la présence d'isolats sensibles à la chloroquine ont effectivement réagi de façon satisfaisante à ce médicament. Il semble donc que l'épreuve *in vitro* reflète relativement bien la réponse *in vivo* des malades traités à la chloroquine dont on a évalué l'état par un examen clinique et parasitologique.

Chez tous les malades du groupe RCA, la fièvre est tombée le jour 3 ou antérieurement, sans réapparaître le jour 14, et leurs frottis étaient soit négatifs, soit positifs avec une densité parasitaire

<25% de la densité initiale le jour 3. Parmi ces malades, on peut distinguer trois sous-groupes en fonction de leur réponse parasitologique le jour 7 et/ou le jour 14: le type 1 ou S/RI tardive ($n = 46$) correspond à des malades à frottis négatif les jours 7 et/ou 14; le type 2 ou RI précoce ($n = 8$) correspond à des malades à frottis négatif le jour 3 mais présentant une parasitémie asymptomatique les jours 7 et/ou 14; le type 3 ou RI précoce ($n = 3$) est celui des malades avec un frottis positif le jour 3, un frottis négatif le jour 7 et une parasitémie asymptomatique le jour 14. L'importance de cette classification en sous-groupes à l'intérieur du groupe RCA réside dans le fait que le test *in vitro*, de par sa meilleure sensibilité, permet de repérer la présence d'isolats chloroquino-sensibles chez des malades RCA aparasitémiques. Par conséquent, si l'on considère qu'une parasitémie asymptomatique, persistante ou récurrente les jours 7 et/ou 14 est un critère d'échec thérapeutique (au lieu d'une RCA, selon la classification OMS de 1996), le test *in vitro* serait meilleur en sensibilité (67% contre 76%), et légèrement moins bon en spécificité (84% contre 82%) et en valeur prédictive (86% contre 80%) que le test *in vivo*. Le coefficient kappa entre les deux tests passerait également de 0,48 à 0,58. Les malades RCA du type 3 (RI précoce) étaient tous les trois porteurs d'isolats chloroquino-résistants d'après le résultat du test *in vitro* (CI₅₀ de chloroquine >100 nmol/l, à savoir, respectivement 137, 272 et 348 nmol/l). Cinq malades RCA du type 2 (RI précoce) étaient porteurs d'isolats chloroquino-résistants (CI₅₀ respectivement égale à 114, 158, 258, 278 et 368 nmol/l), alors que chez trois malades du même type on constatait la présence d'isolats chloroquino-sensibles (CI₅₀ respectivement égale à 46, 51 et 81 nmol/l). Sur les 46 malades RCA du type 1 (S/RI tardive), on a obtenu 35 isolats chloroquino-sensibles et 11 isolats chloroquino-résistants.

Si nous supposons que les réponses RCA de types 2 et 3 (RI précoce) devraient correspondre à une chloroquino-résistance, il apparaît qu'il y a discordance entre la réponse thérapeutique et la réponse *in vitro* chez trois malades RCA du type 2 et chez 11 du type 1. Sur les trois malades du type 2, il y avait deux enfants et un adulte. L'un des enfants était porteur d'un isolat chloroquino-sensible avec une sensibilité moindre *in vitro* (81 nmol/l). Chez les autres malades, il ne semble pas qu'il y ait de raison évidente à la non-disparition de leur parasitémie, sinon la possibilité de variations individuelles dans la pharmacocinétique de la chloroquine, des vomissements non signalés ou, ce qui est capital, la réapparition de parasites asexués par suite d'une réinfection. Chez les malades du type 1, on a constaté une guérison clinique et parasitologique le jour 14. Au total, 35 malades porteurs d'isolats chloroquino-sensibles ont été guéris, comme prévu, alors que 11 malades ont été guéris malgré la présence de plasmodies chloroquino-résistantes. La discordance observée chez les malades RCA du type 1 pourrait également être due à l'âge. Sur les 11 malades présentant des résultats discordants (intervalle de

variation : 125-486 nmol/l), l'un était âgé de 6 ans, 4 de 11 à 14 ans et 6 étaient des adultes. Nous n'en avons pas la preuve biologique, mais nous supposons que cette discordance pourrait être liée à une forte immunité acquise qui favorise l'élimination du parasite, indépendamment de sa chimio-sensibilité.

Contrairement à ce qui s'est passé dans le groupe RCA, avec ses différents sous-groupes, on a observé moins de discordances entre la réponse thérapeutique et la réponse *in vitro* dans les groupes où il y avait échec thérapeutique. Il y avait au total 24 malades appartenant au groupe ETT dont les isolats étaient chloroquino-résistants, cinq malades de ce groupe avec des réponses discordantes (3 enfants et 2 adultes; 3 RI précoce et 2 RI précoce/RII) étant porteurs d'isolats chloroquino-sensibles. Il est possible que la situation de trois de ces cinq malades ETT soit analogue à celle des trois malades RCA du type 2 (RI précoce), malades qui présentaient une parasitémie asymptomatique les jours 7 et/ou 14, malgré la présence d'isolats chloroquino-sensibles. Deux des cinq malades ETT à réponse discordante (un enfant de 5 ans et un autre de 7 ans) ont présenté une parasitémie persistante pendant les 14 jours du suivi, malgré la présence d'isolats chloroquino-sensibles.

Dans le cas des malades pour lesquels il y a eu échec thérapeutique précoce (ETP), la classification en RI, RII ou RIII selon le « test de 7 jours » ou le « test prolongé de 28 jours » n'a pas été chose facile. On a observé deux types de réponse parasitologique chez les malades ETP. Le premier sous-groupe de malades (2 enfants) présentait une modeste réduction de leur parasitémie le jour 2 (>25% de la parasitémie avant traitement) qui les a fait classer comme RIII selon les critères établis par Rieckmann (16), en dépit de l'impossibilité de les suivre jusqu'au jour 7 par suite de la nécessité de leur administrer un autre traitement les jours 3 ou 4. Rétrospectivement, cette classification paraît justifiée du fait de la valeur élevée de la CI_{50} de chloroquine obtenue pour les isolats provenant de ces malades (respectivement 373 et 641 nmol/l). Le deuxième sous-groupe de malades ETP (3 enfants et 4 adultes) n'a pu être classé selon le système S-RI-RII-RIII du fait qu'il a fallu aussi leur administrer un autre traitement les jours 2 ou 3 et que leur réponse parasitologique ne satisfaisait pas aux critères de classification en RIII. En se fondant sur deux observations, on a considéré que la réponse de ces 7 malades correspondait à une RI tardive/RII. Primo, par rapport à la valeur observée avant le traitement, la parasitémie moyenne au jour 2 se situait respectivement à 1,6%, 2,4% (à l'exclusion d'un malade pour lequel elle était de 180%), 3,7%, 7,3% et 56% dans les groupes suivants: S/RI tardive, RI précoce, RI précoce/RII, les 7 malades non classables, et RIII. Secundo, l'analyse de la distribution de la parasitémie au jour 2 comparée à celle de la parasitémie initiale a montré que les 50^e percentiles étaient dans le même ordre, soit 0,4%, 1,3%, 1,7%, 3,4% et 51%. Par conséquent, la réponse parasitologique au jour 2 des sept malades non classables était très proche de celle

des malades classés en RI précoce/RII d'après leur réponse.

Pour six des sept isolats provenant des malades ETP, la CI_{50} de chloroquine avait une valeur élevée (110, 187, 461, 477, 575 et 635 nmol/l). Dans le groupe ETP, on n'a observé qu'un seul malade pour lequel il y avait une discordance *in vivo/in vitro*. Il s'agissait d'un enfant de 5 ans qui le jour 3 présentait une légère fièvre (37,8°C) et un frottis positif (131 760 parasites asexués par μ l le jour 0 et 9 parasites asexués par μ l le jour 3). Il est possible que dans ce cas particulier on soit passé trop hâtivement à un autre antipaludéen le jour 3 et il aurait probablement fallu le réexaminer le jour 4 sans avoir changé de traitement la veille. Ces cas d'échec thérapeutique précoce montrent combien il est important que le médecin administre un autre antipaludéen dès qu'il constate un début de détérioration de l'état clinique ou de la fièvre avec un frottis positif avant le jour 3. Bien que, dans notre étude, nous n'ayons observé qu'un petit nombre d'échecs thérapeutiques précoces, le critère subjectif d'un tel échec, à savoir l'aggravation de l'état clinique, nous semble bien corroboré dans la majorité des cas par les critères parasitologiques et peut correspondre à des cas fort graves d'échec thérapeutique.

Le test *in vivo* constitue une mesure précise et valable de l'efficacité thérapeutique et c'est le moyen le plus fiable de mettre en évidence une chimio-résistance. Contrairement aux tests *in vitro*, il peut être pratiqué dans des zones reculées par un personnel qualifié ayant un minimum de formation. Il permet également de travailler directement sur les malades, d'obtenir des données cliniques, de suivre la réponse clinique sur une brève période et de modifier le traitement en cas d'échec thérapeutique. Toutefois, il n'est pas tout à fait exclu que se posent des problèmes de biais et de précision. Lorsqu'on observe un échec thérapeutique au moyen d'un test *in vivo*, l'établissement d'une relation de cause à effet entre cet échec et l'existence d'une chimiorésistance *in vivo* nécessite d'autres investigations, car de nombreux facteurs liés au parasite et à l'hôte peuvent entrer en ligne de compte. Par exemple, au nombre des facteurs liés aux caractéristiques et à la dynamique de la transmission, il faut mettre la présence, le jour 0, de formes intra-érythrocytaires à phénotype chimiorésistant, l'apparition tardive de « couvées » secondaires ou tertiaires de parasites issues du foie lorsque la concentration de l'antipaludéen a atteint une valeur subthérapeutique dans l'organisme de l'hôte, ou encore la réinfection de l'hôte par de nouvelles populations de plasmodies une fois le traitement terminé. Parmi les facteurs liés à l'hôte qui peuvent avoir une responsabilité importante dans les échecs thérapeutiques figurent notamment le caractère variable des paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques ainsi que le niveau d'immunité acquise. Il peut encore y avoir d'autres facteurs qui facilitent ou au contraire retardent la disparition de la parasitémie ou la défervescence, par exemple la virulence intrinsèque de la souche parasitaire, certains facteurs génétiques

liés à l'hôte mais sans rapport avec l'immunité, la présence de maladies qui sont passées inaperçues lors de la visite de recrutement et, enfin, le comportement social de l'hôte (par exemple une automédication simultanée avec d'autres antipaludéens classiques ou la prise de remèdes traditionnels à base de plantes). Toutes ces considérations montrent que, à moins de pouvoir exclure ces facteurs, on ne peut attribuer avec certitude un échec thérapeutique donné à la présence d'une chimiorésistance *in vivo*. Ces contraintes sont de nature à limiter la précision du test *in vivo* et il nous faut les prendre en considération lors de l'évaluation de nos résultats, car elles affectent nos mesures de la validité du test *in vitro*. En outre, à moins que certains de ces facteurs puissent expliquer les cas de discordance *in vitro/in vivo*, il ne nous est pas possible de redéfinir le seuil de résistance à la chloroquine *in vitro* sur la base des données obtenues *in vivo*.

En plus des difficultés que comporte l'établissement d'une relation de cause à effet entre échec thérapeutique et chimiorésistance *in vivo*, les critères révisés de l'OMS peuvent ne pas être adaptés à tous les cas. L'un des critères d'échec thérapeutique (aggravation de l'état clinique nécessitant un changement de traitement) repose sur un bilan clinique subjectif qui risque de biaiser les résultats dans le sens d'une augmentation du nombre de cas « résistants ». D'après notre propre expérience, le critère de fièvre récurrente le jour 3 conduit parfois à un classement erroné des malades. Quelques malades, qui avaient de la fièvre avec une goutte épaisse positive le jour 3 (des cas d'« échec thérapeutique » selon la classification de l'OMS) et que l'on n'avait pas traités, ont vu leur parasitémie disparaître et leur fièvre tomber le jour 4 et ils sont restés afebriles et aparasitémiques jusqu'au jour 14 (RCA). Ces cas illustrent bien les limites du test de résistance *in vivo*. Cependant, malgré ses inconvénients potentiels, le test *in vivo* (« test de 7 jours », « test prolongé de 28 jours » ou test simplifié) doit être considéré comme la seule mesure valable de la chimiorésistance disponible actuellement qui puisse être utilisée pour orienter les traitements antipaludiques dans le cadre d'une politique nationale de lutte.

Il est possible que les épreuves *in vitro* constituent un moyen plus objectif de mettre en évidence une chimiorésistance, puisque la nature même de ces tests permet de s'affranchir de plusieurs facteurs liés à l'hôte qui seraient susceptibles de gêner l'interprétation des résultats, comme les réinfections, l'immunité et les caractéristiques pharmacodynamiques ou pharmacocinétiques. Les épreuves *in vitro* sont complémentaires des tests *in vivo* et leurs résultats donnent théoriquement une évaluation plus directe de la chimiorésistance (28). Cependant, la plupart des laboratoires spécialisés qui effectuent des tests *in vitro* en routine sont situés loin des sites où sont menées les études cliniques; de plus, la pratique des tests isotopiques exige un haut niveau de formation et de compétence technique, des moyens de transport pour acheminer les échantillons et un

équipement complexe. C'est ce qui explique que les épreuves *in vitro* soient utilisées pour la description épidémiologique de la résistance aux antipaludiques indépendamment des études cliniques et pour le criblage des nouvelles molécules (10, 25-29). Ces deux applications des épreuves *in vitro* ont certainement permis d'obtenir des données importantes, mais les résultats de la présente étude, s'ils mettent en lumière l'utilité de ces tests en tant qu'outils diagnostiques complémentaires, n'indiquent nullement qu'ils peuvent se substituer aux tests *in vivo* sur le terrain.

Un autre problème majeur que pose le test *in vitro* tient au choix des valeurs seuils qui serviront à classer les résultats en termes de sensibilité ou de résistance. Théoriquement, on peut utiliser comme valeur seuil la concentration plasmatique thérapeutique, mais on néglige alors les contraintes de la méthode de culture *in vitro* (30). En effet, les conditions optimales de culture *in vitro* sont sensiblement différentes des conditions *in vivo* et font intervenir la composition du milieu, l'hématocrite (1-2,5% pour les tests *in vitro*, 35-45% pour les tests *in vivo*) et la proportion de sérum (10% pour la culture *in vitro*, 55-65% dans le cas des tests *in vivo*). Il est donc possible que la concentration plasmatique thérapeutique ne convienne pas à la culture des plasmodies *in vitro*. La comparaison de différents clones ou souches de plasmodies adaptées au laboratoire et la détermination de la concentration limitante d'antipaludéen qui suscite une réponse chez ces souches de référence ont également été utilisées pour obtenir une estimation de la valeur seuil. Toutefois, même si l'on connaît la réponse au médicament de l'isolat initial dont dérive tel ou tel clone ou souche, l'adaptation des parasites aux conditions *in vitro* a modifié le phénotype original de telle sorte que celui-ci peut ne plus posséder les caractéristiques de l'isolat initial (31). En outre, les valeurs seuils déterminées par cette méthode risquent de ne pas être bien précises dans le cas de certains isolats obtenus sur le terrain, du fait de la présence de populations mixtes contenant des plasmodies de divers phénotypes. Par conséquent, même si un clone ou une souche de *P. falciparum* de phénotype et de génotype bien déterminés peuvent être utiles pour le travail de laboratoire, la présence de divers facteurs *in vivo* empêche toute comparaison directe entre les conditions *in vitro* et les conditions *in vivo*; de ce fait, la valeur seuil utilisée pour différencier les isolats sensibles des isolats résistants risque de comporter une forte dose d'arbitraire, à moins que l'on effectue des essais à grande échelle dans différentes conditions épidémiologiques pour définir simultanément le profil de chimiosensibilité *in vitro*, le génotype, les paramètres pharmacocinétiques et la réponse immunitaire.

A l'heure actuelle, la chloroquine constitue encore le bon choix comme antipaludéen de première intention pour le traitement de l'accès palustre simple chez les malades africains autochtones, car elle est bon marché, sans danger, bien tolérée, disponible un peu partout et très efficace contre *P. vivax*, *P. ovale*,

P. malariae ainsi que contre les souches sensibles de *P. falciparum*. Toutefois, dans certaines zones d'endémie, l'existence de cas de résistance à la chloroquine devient de plus en plus préoccupante. Il faut donc surveiller l'extension de cette résistance pour pouvoir définir une politique d'utilisation rationnelle des antipaludéens en Afrique. Les tests *in vitro* ou *in vivo* utilisés pour déterminer cette résistance ont, les uns comme les autres, leurs limites et, de toute manière, n'appréhendent pas les mêmes phénomènes biologiques. Notre étude montre que le test de résistance *in vitro* constitue un outil complémentaire dont les résultats concordent modérément avec ceux du test *in vivo* simplifié. L'usage du test *in vitro* devrait être limité à la recherche pour obtenir des données de référence sur la réponse aux antipaludéens et surveiller l'évolution de la résistance croisée. Le test *in vitro* ne peut se substituer au test *in vivo* pour déterminer l'efficacité thérapeutique et ne saurait jouer de rôle dans l'orientation des traitements antipaludiques dans le cadre d'une politique nationale

de lutte. Il peut être difficile de définir avec précision les critères de résistance à la chloroquine *in vivo*, critères probablement difficiles à satisfaire sur le terrain, mais un test *in vivo* normalisé, fondé sur la totalité des données cliniques et épidémiologiques disponibles reste le meilleur moyen dont on dispose pour définir la résistance aux antipaludéens dans un contexte épidémiologique donné. ■

Remerciements

Nous tenons à remercier Sœur Solange ainsi que les infirmières et le personnel de laboratoire du dispensaire de la Mission catholique Nlongkak pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée. Cette étude a été financée par l'AUPELF-UREF. Leonardo Basco a bénéficié d'une bourse du Programme spécial PNUD/Banque mondiale/OMS de Recherche et de Formation concernant les Maladies tropicales.

Bibliographie

1. *Voyages internationaux et santé : vaccinations exigées et conseils d'hygiène*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1999.
2. **Turaman C, Basco LK, Le Bras J.** Evaluating the efficacy of chloroquine in febrile Guinean children infected with *Plasmodium falciparum* by a simplified *in vivo* test [Test simplifié *in vivo* pour l'étude de l'efficacité de la chloroquine chez des enfants guinéens fébriles impaludés par *Plasmodium falciparum*]. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1992, **70**(4): 477-480 (résumé en français).
3. **Adagu IS et al.** Antimalarial drug response of *Plasmodium falciparum* from Zaria, Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995, **89** : 422-425.
4. **Chandenier J et al.** Chimiosensibilité *in vivo* et *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à Brazzaville (Congo). *Cahiers Santé*, 1995, **5** : 25-29.
5. *Prise en charge du paludisme non compliqué et utilisation des antipaludiques pour la protection des voyageurs. Rapport d'une consultation informelle*. Genève, 18-21 septembre 1995. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1995 (document non publié WHO/MAL/96.1075 disponible sur demande à la Division de la Lutte contre les Maladies tropicales, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse).
6. **Bruce-Chwatt LJ et al.** Chimiothérapie du paludisme. Deuxième édition. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1984.
7. *Evaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques pour le traitement du paludisme à P. falciparum non compliqué dans les régions à transmission élevée*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1996 (document non publié WHO/MAL/96.1077 disponible sur demande à la Division de la Lutte contre les Maladies tropicales, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse).
8. *Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1973 (OMS, Série de Rapports techniques, N° 529).
9. **Payne D, Wernsdorfer WH.** Development of a blood culture medium and a standard *in vitro* microtest for field-testing the response of *Plasmodium falciparum* to antifolate antimalarials [Mise au point d'un milieu de culture et d'un microtest *in vitro* standard pour la détermination sur le terrain de la réponse de *Plasmodium falciparum* aux antifoliques]. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1989, **67**(1) : 59-64 (résumé en français).
10. **Desjardins RE et al.** Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1979, **16** : 710-718.
11. **Chulay JD, Haynes JD, Diggs CL.** *Plasmodium falciparum*: assessment of *in vitro* growth by [³H]hypoxanthine incorporation. *Experimental parasitology*, 1983, **55** : 138-146.
12. **Webster HK et al.** Antimalarial drug susceptibility testing of *Plasmodium falciparum* in Thailand using a microdilution radioisotope method. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 1985, **34** : 228-235.
13. **Childs GE, Wimonwattawatee T, Pooyindee N.** Evaluation of an *in vitro* assay system for drug susceptibility of field isolates of *Plasmodium falciparum* from southern Thailand. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 1988, **38** : 19-23.
14. **Mount DL et al.** Adaptations of the Saker-Solomons test : simple, reliable colorimetric field assays for chloroquine and its metabolites in urine [Adaptations du test de Saker-Solomons : méthodes colorimétriques simples et fiables pour le dosage sur le terrain de la chloroquine et de ses métabolites dans les urines]. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1989, **67**(3) : 295-300 (résumé en français).
15. **Warrel DA, Molyneux ME, Beales PF.** Severe and complicated malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1990, **84** : 1-65.
16. **Rieckmann KH.** Monitoring the response of malaria infections to treatment [Surveillance de la réponse des parentes du paludisme au traitement]. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1990, **68**(6) : 759-760 (résumé en français).
17. **Ringwald P, Bickii J, Basco LK.** *In vitro* activity of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaoundé, Cameroon. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 1996, **55** : 254-258.
18. **Ringwald P, Bickii J, Basco LK.** Randomised trial of pyronaridine versus chloroquine for acute uncomplicated falciparum malaria in Africa. *Lancet*, 1996, **347** : 24-28.
19. **Bickii J, Basco LK, Ringwald P.** Assessment of three *in vitro* tests and an *in vivo* test for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*, 1998, **36** : 243-247.
20. **Cohen J.** A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and psychological measures*, 1960, **20** : 27-46.
21. **Fermanian J.** Mesure de l'accord entre deux juges. Cas qualitatif. *Revue épidémiologique et santé publique*, 1984, **32** : 140-147.

22. **Schapira A et al.** The susceptibility of *Plasmodium falciparum* to sulfadoxine and pyrimethamine : Correlation of *in vivo* and *in vitro* results. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 1986, **35** : 239-245.
23. **Björkman A, Willcox M.** *In vivo* and *in vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to sulphadoxine/pyrimethamine in Liberia, West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1986, **80** : 572-574.
24. **Petersen E et al.** *In vitro* and *in vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Liberia to pyrimethamine, cycloguanil and chlorcycloguanil. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 1990, **84**(6) : 563-571.
25. **Warsame M et al.** Positive relationship between the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and pyronaridine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1991, **85**(5) : 570-571.
26. **Brasseur P et al.** Multi-drug resistant falciparum malaria in Cameroon in 1987-1988. I. Stable figures of prevalence of chloroquine- and quinine-resistant isolates in the original foci. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 1992, **46** : 1-7.
27. **Basco LK, Le Bras J.** *In vitro* activity of artemisinin derivatives against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 1993, **49**(3) : 301-307.
28. **Wernsdorfer WH.** Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta tropica*, 1994, **56**(2-3) : 143-156.
29. **Geary TG, Divo AA, Jensen JB.** An *in vitro* assay system for the identification of potential antimalarial drugs. *Journal of parasitology*, 1983, **69**(3) : 577-583.
30. **Trager W, Jensen JB.** Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 1976, **193** : 673-675.
31. **Le Bras J et al.** *Plasmodium falciparum*: Drug sensitivity *in vitro* of isolates before and after adaptation to continuous culture. *Experimental parasitology*, 1983, **56** : 9-14.