

Réseau d'Etude de la Résistance (RER) pour pérenniser la surveillance de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques à Madagascar

Randrianarivelosia M¹, Rakotonjanabelo LA², Mauclère P¹, Ratsimbao A¹, Raharimalala LA¹, Arieu F¹

RESUME : La redéfinition de la politique nationale de lutte contre le paludisme en matière de chimiothérapie et de chimioprévention nécessite des données fiables et mises à jour sur le niveau de la sensibilité de *Plasmodium sp* aux antipaludiques. Ainsi, le Ministère de la Santé et l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) ont créé le réseau d'étude de la résistance - paludisme (RER) en septembre 1999. Pour pallier le manque de personnel disponible dans les structures de santé, les activités du RER privilégient les études *in vitro* qui sont réalisées à l'IPM. L'antipaludogramme est fait selon la technique isotopique utilisant de l'hypoxanthine radioactive. Les résultats de l'étude réalisée en 2001 montrent que les isolats de *P. falciparum* sont sensibles à l'amodiaquine ($n = 215$), au cycloguanil ($n = 56$), à la pyriméthamine ($n = 98$), et à la quinine ($n = 214$) à Madagascar. Un isolat de phénotype méfloquine-résistant (1 /110 soit 0,9%) est détecté dans la région Est. Une bonne sensibilité des isolats à la chloroquine est notée, avec 95,4% (206/216) des isolats de phénotype chloroquinosensible. La détection des mutations des gènes associées à la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine (gène *pfcr*) ou à la pyriméthamine (gène *pfdhfr*) est faite selon la technique de PCR/séquençage ou PCR/RFLP. Aucun isolat mutant *pfcr* T76 (0/104) potentiellement chloroquinorésistant, ni mutant *pfdhfr* N108 (0/43) potentiellement pyriméthamine-résistant n'est détecté. Ces données permettent de conseiller l'utilisation de la chloroquine ou de l'association sulfadoxine-pyriméthamine pour le traitement des accès palustres à Madagascar. Le RER résulte de la collaboration et du partenariat entre le Ministère de la Santé et l'IPM. Notre article a pour but de décrire le fonctionnement du réseau RER et de discuter la place de l'étude *in vivo*, de l'antipaludogramme et du génotypage des marqueurs de résistance dans la stratégie de surveillance de l'émergence et la dissémination des isolats résistants de *P. falciparum* à Madagascar ainsi que dans la sous-région de l'Océan Indien.

Mots-clés : Paludisme - *Plasmodium falciparum* - Résistance - Surveillance - Madagascar.

ABSTRACT : "RER, the national network for malaria resistance survey, for the sustainability of the surveillance of *Plasmodium falciparum* susceptibility to antimalarial drugs in Madagascar" : To re-define strategy and policy to cure or to prevent malaria, there is a need to get relevant and updated data on *Plasmodium sp* sensitivity level to antimalarial drugs. Thus, in September 1999, the Madagascan Ministry of Health and the Institut Pasteur de Madagascar (IPM) formed a network named RER for malaria resistance surveillance. To alleviate the lack of experienced medical teams within the health centres, and due to technical and logistic matters, as part of the network activities, it was decided to give a start with the *in vitro* studies which are carried out at IPM. *In vitro* sensitivity testing is done by use of the isotopic method. Results from the study done in 2001 demonstrate that the Madagascan *P. falciparum* isolates are susceptible to amodiaquine ($n = 215$), to cycloguanil ($n = 56$), to pyrimethamine ($n = 98$) and to quinine ($n = 214$). One isolate (1/110 i.e. 0.9%) of mefloquine-resistant phenotype is detected from the Eastern region. *P. falciparum* susceptibility to chloroquine is satisfactory with 95.4% (206/216) of *in vitro* sensitive isolates. RER arises from the partnership and collaboration between the Madagascan Ministry of Health and the IPM. The network set-up is presented. The usefulness of the *in vivo* approach, and the *in vitro* investigations (chemosusceptibility test and screening of mutations accounting for resistance to chloroquine) to monitor the emergence and the dissemination of drug-resistant parasites in Madagascar as well as in the subregion of the Indian Ocean is discussed.

Key-words : Malaria - *Plasmodium falciparum* - Drug resistance - Surveillance - Madagascar.

INTRODUCTION

A la différence de certaines maladies transmissibles comme le sida que l'on peut éviter en respectant certaines règles d'hygiène de vie, le risque de contracter le paludisme n'est jamais nul

pour un résident aussi bien que pour un visiteur dans une zone impaludée. L'utilisation des antipaludiques, à des fins thérapeutiques et/ou préventives joue ainsi un rôle important dans le contrôle de cette maladie. Cependant, la situation mondiale du paludisme est marquée par la résistance des parasites aux antipaludiques communément utilisés, dont la chloroquine et l'association sulfadoxine-pyriméthamine [1].

¹ Institut Pasteur de Madagascar, Groupe de Recherche sur le Paludisme, BP 1274 - 101 Antananarivo - Madagascar.

² Direction de la Lutte contre les Maladies Transmissibles, Institut d'Hygiène Social, Ministère de la Santé, BP 460 - 101 Antananarivo - Madagascar.

ETUDE DE LA CHIMIOSENSIBILITE IN VITRO DE *Plasmodium falciparum* DANS LE CONTEXTE DU RER

La chimiorésistance des parasites constitue par conséquent un des obstacles qui entravent les programmes nationaux de lutte contre le paludisme. Cette résistance est évoquée dans les régions où *Plasmodium falciparum* circule. La définition par l'OMS de la chimiorésistance comme "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" remonte en 1973 [2], à l'époque où ni la technique de mise en culture *in vitro* de *P. falciparum* ni la chromatographie liquide de haute performance pour le dosage des médicaments n'étaient au point; et que le génotypage permettant entre autres la détection des mutations était encore un domaine naissant. Il n'est pas étonnant que la définition de la chimiorésistance citée ci-dessus soit fondée sur une observation clinique.

Afin de mieux comprendre la chimiorésistance et d'adapter la stratégie de riposte pour retarder et/ou limiter la dissémination des parasites résistants au sein d'un pays ou d'une région, l'ensemble des tests *in vitro*, tests *in vivo*, tests moléculaires et le dosage de médicaments apporte des informations complémentaires, sachant que chacune de ces méthodes aborde le phénomène de la chimiorésistance sous un angle différent.

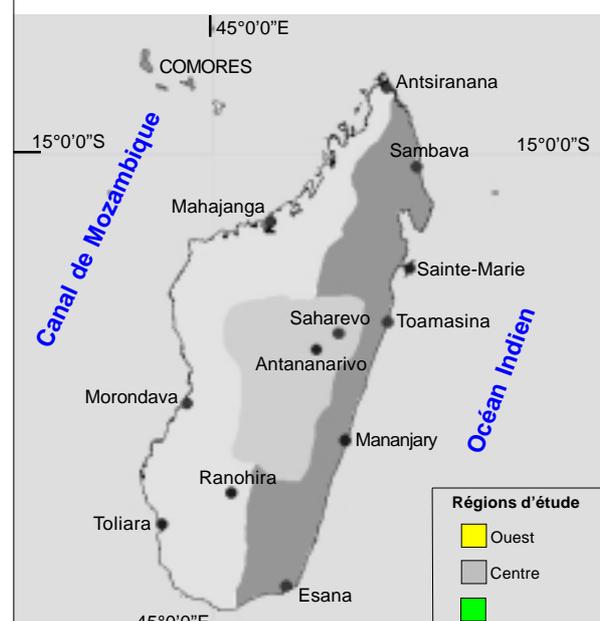
Madagascar et son Institut Pasteur continuent de lutter contre le paludisme. L'activité du Groupe de Recherche sur le Paludisme de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) est axée sur des thèmes de recherche opérationnelle, ayant pour but une meilleure adaptation des moyens et des stratégies de lutte contre le paludisme. Depuis 1986, l'IPM œuvre pour la surveillance de la sensibilité des parasites, *Plasmodium sp*, aux antipaludiques et celle des vecteurs, *Anopheles sp*, aux insecticides. Ces activités sont menées en collaboration avec la Direction de Lutte contre les Maladies Transmissibles (DLMT) du Ministère de la Santé. Dans cet ensemble, l'étude de la sensibilité de *Plasmodium sp* aux antipaludiques autorisés sur le marché malgache est une des priorités. Pour ce faire, l'IPM et le Ministère de la Santé créent le Réseau d'Etude de la Résistance (RER) d'envergure nationale. Pour mieux décrire la place du RER pour les années à venir dans la surveillance de la chimiosensibilité des parasites du paludisme aux médicaments, nous illustrons avec les résultats obtenus au cours de l'année 2001.

A Madagascar, un vaste pays de 587 000 km² abritant 16 000 000 d'habitants, force est de constater un nombre insuffisant d'équipes médicales nécessaires pour la surveillance méthodique de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques. Pour pallier ce manque, le Réseau d'Etude de la Résistance (RER) a été créé en septembre 1999 et est fonctionnel depuis janvier 2000 [3]. Le mécanisme de fonctionnement de ce réseau RER permet la formation ou le recyclage des personnels de santé sur le diagnostic du paludisme (examen microscopique actuellement et utilisation de bandelette dans un avenir proche), sur le prélèvement et l'acheminement des isolats de *Plasmodium sp*, sur la prise en charge des accès palustres; et surtout d'informer les autorités de santé et les médecins praticiens sur la chimiosensibilité/chimiorésistance des plasmodies à Madagascar. La stratégie de surveillance repose dans un premier temps sur le test de chimiosensibilité *in vitro* (antipaludogramme) et sur le test moléculaire (détection des mutations des gènes de résistance chez le parasite). Ces tests sont effectués à l'IPM.

Collecte d'isolats de *Plasmodium sp*

Les isolats de *Plasmodium sp* sont collectés dans différentes régions de Madagascar afin d'être représentatifs pour la région Est, la région des Hautes Terres Centrales et la région Ouest (figure).

Figure : Sites du réseau d'étude de la résistance-paludisme (RER) à Madagascar en 2001



En 2001, 579 prélèvements sanguins sont parvenus à l'unité de recherche sur le paludisme de l'IPM à Antananarivo. Après contrôle des frottis sanguins correspondants, 7 prélèvements (1,1%) n'ont pas contenu d'hématozoaires (tableau I). Sur les 572 isolats de plasmodies collectés, *P. falciparum* était le plus fréquent (551/572 soit 96,3%).

Tableau I : Répartition des isolats de *Plasmodium sp* collectés à Madagascar en 2001 (après examen microscopique de contrôle à l'IPM)

Espèce plasmodiale	Origines des isolats			Total
	Région Est	Région Ouest	Région Centrale	
<i>Plasmodium falciparum</i>	255	87	209	551
<i>Plasmodium vivax</i>	4	2	5	11
<i>Plasmodium ovale</i>	1	0	2	3
<i>Plasmodium malariae</i>	2	3	0	5
<i>Plasmodium falciparum</i> + <i>Plasmodium vivax</i>	0	0	1	1
<i>Plasmodium falciparum</i> + <i>Plasmodium malariae</i>	0	0	1	1
Lame négative	4	1	2	7
Total	266	93	220	579

Sensibilité *in vitro* des isolats de *P. falciparum* aux antipaludiques majeurs

Le test de chimiosensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques est effectué selon la méthode isotopique, basée sur l'inhibition de l'incorporation de l'hypoxanthine radioactive, marquée au tritium [3-5]. Les molécules testées sont des antipaludiques quinoléiques et antifoliniques. Les seuils de résistance à la chloroquine, à l'amodiaquine, à la méfloquine, à la quinine, au cycloguanil, et à la pyriméthamine, sont respectivement fixés à 110 nM, 70 nM, 50 nM, 800 nM, 500 nM et à 2000 nM [3,6].

Au total, 301 (54,6%) des isolats de *P. falciparum* collectés sur anticoagulant, ont été testés au moins contre une des molécules antipaludiques sus mentionnées (tableaux II et III). Ces isolats remplissaient les critères d'inclusion : charge parasitaire >2500 trophozoïtes par µl de sang; durée d'acheminement moins de 72 heures; pas de prise d'antipaludiques avant la consultation; quantité de culot de globules rouges suffisante.

Les isolats testés sont sensibles à l'amodiaquine (n=215), au cycloguanil (n=56), à la pyriméthamine (n=98) et à la quinine (n=214). Un isolat (1/110 soit 0,9%) de phénotype méfloquine-résistant est détecté dans la région Est. Au total, 10 isolats de *P. falciparum* de phénotype chloroquinorésistant sont détectés (5,2% dans la région Est; 3,2% dans la région Ouest et 4,5% dans la région Centrale). La différence n'est pas significative entre les

fréquences des isolats au phénotype chloroquinorésistant dans les différents sites d'étude aussi bien qu'entre les trois régions.

Tableau II : Sensibilité *in vitro* des isolats de *P. falciparum* aux antipaludiques quinoléiques à Madagascar

Molécules antipaludiques	Origines des isolats			Total
	Région Est	Région Ouest	Région Centrale	
Chloroquine				
Tests faits	130	52	108	290
Tests interprétables	96	31	89	216
Moyenne des CI50 (extrême des CI50)	39,7 (4,1-206,6)	31,6 (0,2-152,1)	33,3 (0,2-292,8)	
CI50 > 110 nM	5	1	4	10
Amodiaquine				
Tests faits	129	52	107	288
Tests interprétables	96	31	88	215
Moyenne des CI50 (extrême des CI50)	12,7 (0,4-57,9)	9,3 (0,01-27,5)	9,9 (1,4-64,2)	
CI50 > 70 nM	0	0	0	0
Mefloquine				
Tests faits	50	24	59	133
Tests interprétables	46	18	46	110
Moyenne des CI50 (extrême des CI50)	12,1 (1,7-53,2)	10,2 (3,4-20,4)	8,8 (1,3-24,1)	
CI50 > 50 nM	1	0	0	1
Quinine				
Tests faits	128	51	107	286
Tests interprétables	96	31	87	214
Moyenne des CI50 (extrême des CI50)	108,1 (4,2-584,2)	109,9 (32,5-214,7)	85,1 (8,5-280,4)	
CI50 > 800 nM	0	0	0	0

Tableau III : Sensibilité *in vitro* des isolats de *P. falciparum* aux antifoliniques à Madagascar (CI50 exprimée en nM)

Molécules antipaludiques	Origines des isolats			Total
	Région Est	Région Ouest	Région Centrale	
Pyriméthamine				
Tests faits	117	51	95	263
Tests interprétables	54	10	34	98
Moyenne des CI50 (extrême des CI50)	22,1 (0,01 - 251,3)	7,86 (0,2 - 51,1)	5,5 (0,01 - 42,9)	
CI50 > 2000 nM	0	0	0	0
Cycloguanil				
Tests faits	44	23	49	126
Tests interprétables	32	8	16	56
Moyenne des CI50 (extrême des CI50)	6,8 (0,01 - 48,2)	3,8 (0,01 - 16,4)	2,9 (0,01 - 13,4)	
CI50 > 500 nM	0	0	0	0

Dans le contexte RER, la faisabilité de la réalisation d'antipaludogramme à grande échelle à Madagascar est confirmée. Cet antipaludogramme est le seul phénotypage que l'on puisse effectuer pour quantifier la sensibilité des parasites du paludisme aux antipaludiques. Les résultats obtenus montrent que la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine reste stable dans les différentes régions de Madagascar. Les taux de parasites de phénotype chloroquinorésistant sont <10% durant les deux dernières décennies. Par contre, une étude récente effectuée par l'IPM démontre que le taux de *P. falciparum* chloroquinorésistant est élevé aux Comores [7]. Cette situation aux Comores reflète la réalité quasi-généralisée dans la région de l'Afrique de l'Est sur la résistance à la chloroquine.

Ce qui justifie le maintien et l'élargissement du réseau de surveillance de la résistance dans la sous région de l'Océan Indien, sachant que le contrôle du paludisme ne se limite pas à l'échelle d'un (seul) pays.

Le test de chimiosensibilité *in vitro* a sa place dans la surveillance de la résistance de *P. falciparum*. Ce qui explique l'évolution et le développement de différentes techniques allant du test microscopique, passant par le test isotopique au test colorimétrique naissant. Sachant que les parasites sont cultivés *in vitro* en dehors des contextes pathologique et immunologique, le phénotype déterminé par le test *in vitro* est quantitatif et reproductible. Une surveillance temporelle et spatiale de la sensibilité des parasites du paludisme peut ainsi se faire.

In vitro, il est possible de tester sur un même prélèvement d'un patient, différents antipaludiques. Les résultats obtenus permettent d'étudier les corrélations entre les activités des différentes molécules et d'identifier des alternatives potentielles aux médicaments de première ou de deuxième ligne préconisés par la politique nationale de lutte.

Actuellement, l'efficacité thérapeutique de la chloroquine demeure satisfaisante à Madagascar [8]. Mais les combinaisons de traitement, communément appelées bi- ou multithérapie sont vraisemblablement les schémas thérapeutiques d'avenir pour la prochaine décennie. Notre étude démontre la bonne sensibilité *in vitro* des isolats de *P. falciparum* à l'amodiaquine et à la pyriméthamine. Pour préserver l'efficacité de ces molécules, il est temps d'envisager de tester l'efficacité thérapeutique de l'amodiaquine ou de l'association pyriméthamine-sulfadoxine combinée à un dérivé d'artémisinine (dont l'artésunate).

DETECTION DES MUTATIONS ASSOCIEES A LA RESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES

Il s'agit de surveiller l'émergence et/ou la dissémination des souches plasmodiales mutantes et potentiellement résistantes aux antifolates et à la chloroquine. Pour les régions d'accès difficile, sans lignes routières ni aériennes régulières, la durée d'acheminement des prélèvements depuis les sites jusqu'au laboratoire est un des facteurs limitant pour la réalisation du test de chimiosensibilité *in vitro*. Il est pratique de mettre en œuvre la technique de génotypage qui ne nécessite pas la mise en culture des parasites pour pouvoir prédire leurs sensibilités aux antipaludiques de mécanisme d'action connu.

Mutation K76T du gène *Pfcr* et prédiction de la sensibilité à la chloroquine

L'identification du rôle de la protéine transmembranaire de la vacuole digestive *pfcr* dans la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine offre une nouvelle approche dans la surveillance de la prévalence des isolats résistants. La signification de la mutation lysine-76-thréonine (K76T) dans la résistance à la chloroquine a été renforcée par des essais cliniques à la chloroquine en Afrique subsaharienne et en Amérique latine [9]. L'étude de la mutation du codon 76 de *pfcr* a été étudiée chez 104 isolats malgaches, par la technique de PCR suivie de digestion ou de séquençage [7,10]. Ces isolats sont tous de phénotype sauvage (K76) i.e. potentiellement sensible à la chloroquine. La mutation T76 n'est pas détectée même chez des isolats pour lesquels la CI50 de la chloroquine est >100 nM.

Mutation du codon 108 du gène *pf*dhfr et la sensibilité à la pyriméthamine

La mutation serine-108-asparagine (S108N) est le principal support moléculaire de la résistance à la pyriméthamine. Les tests portent sur des isolats collectés dans les deux villes portuaires de Madagascar : Toamasina dans la région Est, et Mahajanga dans la région Ouest. Sur 43 isolats testés (au phénotype sensible selon les résultats de l'antipaludogramme), aucun mutant *pf*dhfr N108 n'est enregistré. Ce qui complète à 142 le nombre total de test de génotypage de *pf*dhfr fait sur des isolats de *P. falciparum* de Madagascar ces derniers temps. Un seul cas (1%) de mutation N108 a été mis en évidence depuis [6,10].

Les résultats de génotypage montrent l'absence de mutant T76 *pfcr* et N108 *pf*dhfr chez les isolats étudiés. Sachant que mutant est synonyme de potentiellement résistant, la prévalence des formes résistantes de *P. falciparum* est actuellement très faible à Madagascar, aussi bien contre la chloroquine que contre la pyriméthamine (un des principes actifs de Fansidar®). Par contre, la même technique de typage a permis de mettre en évidence une forte prévalence des parasites mutants *pfcr* T76 (33/49, soit 67%) [7] et de mutants *pf*dhfr N108 (28/52, soit 53,8%) aux Comores [*Randrianarivelosia, communication personnelle*].

Madagascar figure parmi les pays où la chloroquine ou le Fansidar® est efficace en monothérapie pour la prise en charge des accès palustres simples. A terme, les conséquences

éventuelles de l'invasion de parasites mutants/résistants aux amino-4-quinoléines et aux antifolates sont la limitation de l'utilisation de ces antipaludiques à des fins préventives ou curatives, voire le retrait de ces antipaludiques de la liste des médicaments essentiels pour le programme de lutte contre le paludisme. Par conséquent, l'émergence et la dissémination des parasites résistants doivent être surveillées continuellement.

L'avantage pratique du génotypage pour la surveillance de la résistance est manifeste. Le taux des tests *in vitro* interprétables pour les antifoliniques est limité (98/236, soit 37,3% pour pyriméthamine; et 56/126, soit 44,4% pour cycloguanil). Pourtant, tous les tests en génotypage étaient interprétables. La forte corrélation entre la sensibilité *in vitro* à la pyriméthamine et la présence/absence de mutation N108 du gène *pfdhfr* supporte l'avantage de l'approche par génotypage pour la surveillance de la résistance de *P. falciparum* aux antifoliniques dont le mécanisme d'action est bien élucidé. La détection des mutations de *pfdhfr* et de *pfdhps* offre la possibilité de tester un grand nombre d'échantillon de sang contenant des isolats de *P. falciparum*, et qui peuvent être collectés sur papier buvard.

CONTROLE DE QUALITE

Des clones de références de *P. falciparum* sont maintenus en culture continue à l'Unité de Paludisme de l'IPM. Ces clones caractérisés servent de témoins positifs pour les génotypages et pour valider systématiquement la qualité des lots de plaques médicamenteuses pour l'antipaludogramme.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'antipaludogramme est un phénotypage, qui consiste à quantifier la sensibilité des parasites du paludisme aux antipaludiques. Il permet de tester à la fois plusieurs molécules contre un même isolat. Le niveau de sensibilité de plasmodies aux antipaludiques majeurs testés au cours de la saison 2001 est satisfaisant à Madagascar. L'absence des souches de *P. falciparum* mutantes *pfert* T76 et *pfdhfr* N108 permet d'utiliser le génotypage de ces marqueurs de résistance pour détecter l'émergence des parasites mutants/résistants à Madagascar. Les premières données sur le gène *pfdhfr* sont à compléter, en analysant les mutations additives (codons 51 et 59) qui peuvent intensifier la résistance à la pyriméthamine.

Les résultats des études *in vitro* doivent servir d'index (**alarme**) pour prédire l'apparition, l'émergence, et la dissémination des souches résistantes. Mais le standard de référence de la résistance est la classification des réponses thérapeutiques selon le protocole de l'OMS, qui permettra de lancer l'**alerte** en cas d'augmentation dramatique de la fréquence des échecs thérapeutiques.

Dans le cadre des activités du RER, les enquêtes transversales seront multipliées pour élargir la surveillance de l'efficacité des antipaludiques. Des missions sont prévues dans la région de Sofia (nord ouest) et dans les villes portuaires pour une étude couplant les approches *in vivo* et *in vitro* à la chloroquine, et à d'autres antipaludiques susceptibles de relayer ce médicament de première ligne pour la politique nationale de lutte contre le paludisme à Madagascar. Des dosages d'antipaludiques sériques doivent être faits avant et après le traitement, pour apporter des éléments d'éclaircissement aux facteurs de confusion relatifs à la cause des échecs thérapeutiques.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement tous ceux qui ont participé aux activités du RER, notamment les médecins du SLP, les équipes médicales des différentes structures de santé publiques, de Salfa, des dispensaires catholiques et de l'IPM pour leur participation à la collecte d'isolats. Nous remercions les patients qui ont accepté de donner de leur sang. Les tests in vitro ont été effectués avec l'assistance technique de Dr Marie-Ange Rason, de MM Herilalaina Andrianantenaina, Rogelin Raheinjafy et de Mme Zara N Razafiarimanga. L'établissement de la carte donnant la répartition des sites a été confié au Dr Rindra Vatosoa Randremanana. Cette étude était financée par l'Institut Pasteur de Madagascar via le projet Fac IG "Maladies émergentes et ré-émergentes" et le projet régional Raf 6/025 de l'International Atomic Energy Agency (IAEA) de Vienne, et partiellement par le Ministère de la Santé malgache via le projet Cresan de la Banque Mondiale.

REFERENCES

- 1- **Wellems TE, Plowe CV.** Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* 2001, 184 : 770-776.
- 2- **Organisation Mondiale de la Santé.** Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. Genève : OMS, 1973; 128 p. (Série de Rapports techniques, n°529).
- 3- **Randrianarivojosia M, Sahondra Harisoa JL, Rabarijaona LP, Raharimalala LA, Ranaivo L, Pietra V, Duchemin JB, Rakotomanana F, Robert V, Mauclère P, Arieu F.** *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to amodiaquine compared with other major antimalarials in Madagascar. *Parassitologia*, 2003 (sous presse).

- 4- **Randrianariveლოსია M, Ratsimbasoa A, Randrianasolo L, Randrianarijaona A, Jambou R.** *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, halofantrine, mefloquine and quinine in Madagascar. *East Afr Med J* 2002; **79** : 237-241.
 - 5- **Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD.** Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; **16** : 710-718.
 - 6- **Randrianariveლოსია M, Arieყ F, Raharimalala AL, Parzy D, Rogier C, Jambou R.** Current absence of pyrimethamine-resistance of *Plasmodium falciparum* in Madagascar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; **96** (sous presse).
 - 7- **Arieყ F, Randrianariveლოსია M, Duchemin JB, Rakotondramarina D, Ouledi A, Robert V, Jambou R, Jahevitra M, Andrianantenaina H, Raharimalala L & Maucière P.** *Plasmodium falciparum* *pfert* K76T mutation mapping : a useful tool for malaria control strategy in Madagascar. *J Infect Dis* 2002; **185** : 710-712.
 - 8- **Raharimalala AL, Randrianariveლოსია M, Randriamanantena A, Ranarivelo LA, Jaureguiberry S, Rason MA, Rakotomalala E, Arieყ F.** Sensibilité de *Plasmodium falciparum* à Sainte Marie dans l'Est de Madagascar : études *in vivo* et *in vitro*. *Arch Inst Pasteur de Madagascar* 2000; **66** : 26-31.
 - 9- **Djimde A, Doumbo OK, Steketee RW, Plowe CV.** Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *Lancet* 2001; **358** : 890-891.
 - 10- **Rason MA, Arieყ F, Rafidimanantsoa L, Andrianantenaina BH, Sahondra Harisoa JL, Randrianariveლოსია M.** Monitoring the drug-sensitivity of *Plasmodium falciparum* in coastal towns in Madagascar by use of *in vitro* chemosensitivity and mutation detection tests. *Parasite* 2002; **9** : 247-253.
-