

Sensibilité in vitro d'isolats gabonais de *Plasmodium falciparum* vis-à-vis de la chloroquine et du cycloguanil.

B. Pradines (1), M. Mabika Mamfoumbi (2), A. Keundjian (1), C. Lebeau (3), T. Fusai (1), M. Owono Medang (2), C. Rogier (1), D. Parzy (1) & M. Kombila (2)

(1) Unité de parasitologie, Institut de médecine tropicale du Service de santé des armées, Le Pharo, 13007 Marseille, France.

Tel :33 (0)4 91 15 01 50 ; Fax :33 (0)4 91 59 44 77 ;E-mail :imtssa@gulliver.fr

(2) Département de parasitologie-mycologie-médecine tropicale, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Libreville, Gabon.

(3) Service médical, 6ème Bataillon d'infanterie de marine, Libreville, Gabon.

Manuscrit n°1943. "Parasitologie". Reçu le 18 mars 1998. Accepté le 17 février 1999.

Summary: In Vitro Susceptibility of *Plasmodium falciparum* Isolates from Gabon to Chloroquine and Cycloguanil.

The in vitro susceptibility of 91 *Plasmodium falciparum* isolates obtained from malaria-infected children living near Libreville (Gabon) was evaluated against chloroquine and cycloguanil (biologically active metabolite of proguanil), using an isotopic micro-drug susceptibility test. In vitro resistance to chloroquine and cycloguanil was observed in 83% (35/42) and in 38% (30/78) of the patients, respectively. Our data showed that 41% (16/39) of Gabonese field isolates were resistant both to chloroquine and cycloguanil. These findings are of great importance because they might indicate imminent chloroquine-proguanil failure, and there are not many affordable antimalarial drugs to replace chloroquine-proguanil combination.

Résumé :

La sensibilité in vitro de 91 isolats de *Plasmodium falciparum* prélevés chez des enfants dans la banlieue de Libreville (Gabon) a été étudiée vis à vis de la chloroquine et du cycloguanil (métabolite actif du proguanil) en utilisant le microtest isotopique. La résistance in vitro à la chloroquine est observée pour 83 % des isolats (35/42) dont le taux plasmatique détecté par CHLP est inférieur au taux considéré comme protecteur (30 ng/ml) et celle au cycloguanil pour 38 % (30/78). Quarante et un pour cent (16/39) des souches présentent à la fois une résistance à la chloroquine et au cycloguanil.

Key-words: Malaria - *Plasmodium falciparum* - Chemosusceptibility - Chloroquine-proguanil association - Resistance - Libreville - Gabon - Central Africa

Mots-clés : Paludisme - *Plasmodium falciparum* - Chimio prophylaxie - Association chloroquine-proguanil - Résistance - Libreville - Gabon - Afrique centrale

Introduction

L'émergence de la chloroquinorésistance de *Plasmodium falciparum* et son extension ont remis en question à partir de 1986 la chimioprophylaxie usuelle par la chloroquine. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) et le Centre américain de contrôle des maladies (CDC) recommandent aux voyageurs non immuns l'utilisation de la méfloquine dans les pays africains sub-sahariens (29). Classiquement, les recommandations sanitaires européennes suggèrent l'utilisation de la méfloquine ou de l'association chloroquine (100 mg/24 heures) - proguanil (200 mg/24 heures) pour l'Afrique centrale et l'Afrique de l'Ouest (16,17). Dès 1990, la Direction centrale du Service de santé des armées recommandait cette association. En 1990, le remplacement de la prophylaxie réglementaire par chloroquine (100 mg/24 heures) par l'association chloroquine (100 mg/24 heures) - proguanil (200 mg/24 heures), en association avec une lutte antivectorielle renforcée, a permis en zone III de chloroquinorésistance (Gabon) de diminuer de 85 % l'incidence du paludisme chez les militaires français (36). Son utilisation au Cameroun, chez des résidents non immuns, a permis de prévenir efficacement le risque d'accès de paludisme (19). Le choix de la

posologie de cette association est encore discuté : chloroquine (300 mg/semaine) et proguanil (100 mg/jour); chloroquine (300 mg/semaine) et proguanil (200 mg/jour) (41, 42). Cette dernière posologie est préconisée par les autorités sanitaires du Royaume Uni (16).

Une approche indirecte pour évaluer l'efficacité d'une molécule antimalarique est la détermination de son activité schizonticide érythrocytaire *in vitro* vis-à-vis d'isolats sauvages de *P. falciparum*. En 1997, nous avons étudié la sensibilité *in vitro* de 91 isolats provenant de la même région (Libreville, Gabon) afin d'évaluer la sensibilité de ces souches à la chloroquine et au proguanil et de juger de l'efficacité de cette prophylaxie.

Matériels et méthodes

Prélèvements

L'étude a été menée d'avril à juillet 1997 dans la banlieue de Libreville chez 91 enfants hospitalisés pour accès paludéens et âgés de 6 mois à 15 ans. L'activité de la chloroquine et du cycloguanil (le métabolite actif du proguanil) a été évaluée en utilisant une variante du microtest isotopique de chimiosensibilité. Le dosage d'éventuels traitements (chloroquine,

quinine, amodiaquine, proguanil et pyriméthamine) a été réalisé afin de minimiser une éventuelle surestimation de la résistance (la consultation hospitalière suit généralement un échec du traitement domiciliaire).

Un échantillon de 5 à 10 ml de sang, en fonction de l'âge du malade, a été prélevé sur tube Vacutainer® ACD. Les prélèvements ont été conservés à +4 °C, puis expédiés par avion à Marseille. Entre le prélèvement et l'arrivée à Marseille, il s'est écoulé de 24 à 84 heures.

A leur arrivée au laboratoire, les échantillons sanguins ont été examinés sur frottis mince pour déterminer la parasitémie et l'aspect des parasites. Seuls les prélèvements ayant plus de 0,01 % de parasites viables ont été testés.

Test in vitro

Les dilutions des différents antimalariques ont été distribuées en triplets dans des plaques de 96 puits, puis séchées à température ambiante.

Chaque nouveau lot de plaques a été testé sur deux clones de référence: le clone chloroquinosensible D6 (Sierra Leone) et le clone chloroquinorésistant W2 (Indochine).

Les hématies ont été mises en suspension dans du milieu RPMI 1640 pour les tests de chimiosensibilité à la chloroquine. Pour les tests au cycloguanil, nous avons utilisé le milieu RPMI spécial appauvri en folates (10 µg/ml) et en acide p-aminobenzoïque (0,5 µg/ml) (SP 823 Gibco, BRL), confectionné selon les recommandations de l'OMS et additionné de L-glutamine. Ces deux milieux ont été supplémentés à 10 % de sérum compatible, NaHCO₃ 25 mM et HEPES 25 mM.

Les échantillons ayant des parasitémies supérieures à 0,8 % ont été dilués avec des hématies saines du groupe A+ afin d'ajuster leur parasitémie entre 0,5 et 0,8 %.

Les résultats de croissance plasmodiale en fonction de la concentration d'antimalarique déterminent une fonction sigmoïdale et sont interprétés par analyse en régression non linéaire. La concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) est définie comme la concentration d'antimalarique permettant 50 % de l'incorporation d'hypoxanthine tritiée des puits témoins sans antimalarique.

Résultats et discussion

Les résultats sont interprétables pour 63/91 des tests à la chloroquine et 78/91 des tests au cycloguanil. Il s'est avéré, après dosage plasmatique par CLHP, que 48 patients sur les 63 tests à la chloroquine interprétables présentaient un taux plasmatique de chloroquine > 0 ng/ml et que 21 de ces 43 patients présentaient un taux de chloroquine considéré comme protecteur (> 30 ng/ml). Aucun antifolate n'a été détecté.

La fréquence d'isolats résistants à la chloroquine a alors été évaluée dans les trois groupes : groupe incluant tous les patients (n = 63), groupe n'incluant que les patients n'ayant rien pris (n = 15) et groupe excluant les patients dont le taux de chloroquine est considéré comme protecteur (n = 42).

Etablis par des études précédentes de corrélation *in vitro/in vivo*, les seuils de résistance à la chloroquine et au cycloguanil sont respectivement estimés à 100 nM et 500 nM. Le niveau de sensibilité au cycloguanil est considéré comme intermédiaire quand la CI₅₀ est comprise entre 50 et 500 nM.

La résistance *in vitro* à la chloroquine est observée pour 90 % des isolats dans le groupe incluant tous les patients (57/63), pour 83 % des isolats dans le groupe excluant les patients dont le taux de chloroquine est considéré comme protecteur (35/42) et pour 73 % des isolats dans le groupe n'incluant

que les patients n'ayant rien pris (11/15). Un certain nombre de ces patients sont hospitalisés après un échec du traitement par la chloroquine : c'est le cas des 21 patients dont le taux de chloroquine est considéré comme protecteur.

Dès 1993, à Lambaréné (Gabon), une étude *in vivo* avait montré que 65 % des patients présentaient une parasitémie persistante après traitement par la chloroquine (22) et, en 1994, que 100 % des isolats étaient résistants *in vitro* (43). Des résultats analogues ont été observés dans les pays limitrophes du Gabon ou dans certains pays de l'Afrique Centrale : 60 % d'isolats chloroquinorésistants *in vitro* au Congo (9,13) et 50 % au Cameroun (2,10), 79,5 % d'isolats chloroquinorésistants *in vivo* au Zaïre (44) et 70 % au Kenya (4). Les isolats chloroquinorésistants de *P. falciparum* sont moins fréquents en Afrique de l'Ouest : 29 % *in vitro* (32) et 30 % *in vivo* (37) au Sénégal.

La résistance *in vitro* au cycloguanil est observée pour 38 % des isolats (30/78). Le niveau de sensibilité au cycloguanil est considéré comme intermédiaire pour 26 isolats (33 %). Les seules données récentes *in vitro* dans les populations autochtones en Afrique concernent le Sénégal avec 22 % d'isolats résistants au cycloguanil (32).

Les mécanismes d'action de la chloroquine et du proguanil ainsi que leurs mécanismes de résistance sont différents. La résistance *in vitro* à la fois à la chloroquine et au proguanil est évaluée dans le groupe excluant les patients dont le taux de chloroquine est considéré comme protecteur (n = 42) (3 isolats ne présentent pas de résultat interprétable pour le cycloguanil). Elle est observée pour 41 % des isolats (16/39) (tableau I). Quatre isolats sont sensibles aux deux antimalariques (10 %), mais trois d'entre eux ont un niveau de sensibilité intermédiaire au cycloguanil. Les premiers cas de résistance clinique à l'association chloroquine - proguanil ont été observés dès 1991 au Kenya (5) et 1992 au Bénin (26). L'association chloroquine-proguanil semble moins efficace, au Kenya, que la primaquine, la méfloquine ou la doxycycline (40), alors qu'en Ouganda, pays voisin, elle reste plus efficace que la prise hebdomadaire de méfloquine ou de chloroquine seule (1).

Tableau I.

Sensibilité *in vitro* vis-à-vis de la chloroquine et du cycloguanil de 39* isolats africains de *Plasmodium falciparum* provenant d'enfants de la banlieue de Libreville (Gabon) dont les taux plasmatiques de chloroquine et de proguanil sont considérés comme non protecteurs (< 30 ng/ml).

In vitro sensitivity to chloroquine and cycloguanil of 39 African isolates of Plasmodium falciparum from children of Libreville (Gabon) suburbs whose plasmatic rates of chloroquine and proguanil are considered not to be protective (< 30 ng/ml)

	isolats CQ-résistants CI ₅₀ > 100 nM nb (%)	isolats CQ-sensibles CI ₅₀ < 100 nM nb (%)
isolats CY-résistants CI ₅₀ > 500 nM	16 (41%)	1 (2,5%)
isolats CY-intermédiaires 50 nM < CI ₅₀ < 500 nM	12 (31%)	3 (8%)
isolats CY-sensibles CI ₅₀ < 50 nM	6 (15%)	1 (2,5%)

CQ : chloroquine

CY : cycloguanil

* 3 des 42 isolats avec un taux plasmatique de chloroquine considéré comme non protecteur ont un résultat ininterprétable vis-à-vis du cycloguanil

Certains auteurs (PARZY, manuscrit en préparation) considèrent les souches ayant des sensibilités intermédiaires au cycloguanil comme des souches potentiellement résistantes, soit au total 32/39 isolats résistants. En se basant sur ces travaux, 72 % des isolats (28/39) apparaissent alors comme birésistants et une seule souche serait à la fois sensible aux deux antimalariques (2,5 %).

L'extrapolation des données *in vitro* à l'efficacité *in vivo* doit être traitée avec précaution. Les tests *in vivo* sont plus simples à mettre en œuvre et à interpréter, mais les résultats sont difficilement comparables du fait de l'influence de l'immunité.

Plusieurs restrictions doivent être apportées aux études *in vitro* : exclusion des facteurs pharmacocinétiques (problèmes de métabolisation du proguanil en cycloguanil (38, 39)), observation de la résistance à la fois à la chloroquine et au cycloguanil et non de la résistance à l'association des deux antimalariques. Nous avons minimalisé l'éventuelle surestimation de la résistance à la chloroquine et au cycloguanil du fait que la consultation hospitalière suit souvent un échec du traitement domiciliaire, en excluant les patients présentant un taux plasmatique de chloroquine considéré comme protecteur. Enfin, *in vitro*, l'évaluation de l'activité du cycloguanil est limitée exclusivement à son activité schizonticide érythrocytaire. Or il a été démontré que le cycloguanil est plus actif vis-à-vis des stades hépatiques que vis-à-vis des formes intraérythrocytaires : un isolat résistant au cycloguanil pendant le cycle érythrocytaire peut en fait être sensible pendant la phase hépatique (21). Ces observations impliquent que nous sous-estimons, probablement, l'efficacité *in vivo* de l'association chloroquine-proguanil.

Conclusion

Depuis le développement de la résistance à la chloroquine, le proguanil présente un intérêt certain dans la prophylaxie du paludisme en association avec la chloroquine. Cependant, des échecs prophylactiques par l'association chloroquine-proguanil sont observés depuis 1991 (5, 27). Une seule mutation ponctuelle sur le gène de la dihydrofolate reductase (DHFR) sur l'acide aminé en position 108 est suffisante pour entraîner une résistance croisée rapide, à la fois au proguanil et à la pyriméthamine (6, 30), avec une proportion importante d'isolats présentant cette mutation dans certains pays (au Kenya, 92 % (28)). Or, actuellement, la pyriméthamine associée à la sulfadoxine est souvent préconisée comme antipaludique de première ligne dans certaines régions (8), bien que des échecs imminents soient à craindre (28). De nouvelles prophylaxies, associant le proguanil, sont aussi proposées : chlorproguanil-dapsone (3), proguanil-atovaquone (24). Cette dernière association a été testée avec succès au Gabon (33). Cet ensemble de données nous amène à craindre une perte d'efficacité prochaine du proguanil !

L'association chloroquine-proguanil pourrait être remplacée par la méfloquine qui induit une protection plus satisfaisante, que ce soit chez des enfants du Kenya (40) ou chez des militaires italiens (11, 31). Mais, si les effets secondaires entraînés par la prise de chloroquine et de proguanil sont peu nombreux et peu sévères (20, 25), avec cependant quelques rares problèmes hématologiques (18), les problèmes, de type neuropsychiatrique, sont nettement plus fréquents avec la méfloquine (12, 15, 35). Si certains les qualifient d'anecdotiques (23), des cas sérieux neurologiques et neuropsychiatriques ont été observés (7, 14, 34). Ces effets secondaires nous amènent à proscrire la méfloquine de l'arsenal prophylactique militaire. L'alternative envisagée serait l'utilisation de la doxycycline qui s'est révélée très efficace en prophylaxie (D. BAUDON, communication personnelle).

Remerciements

Ces travaux ont été subventionnés par la direction centrale du Service de santé des armées et par le Groupe de recherche en parasitologie n° 1077. Les auteurs remercient le Dr V. THULLIEZ (Service de pédiatrie, Hôpital de Libreville) pour le recrutement des patients, D. FOUARD pour son soutien logistique et P. BIGOT, W. DARRIES, M. FORTUNEE, R. GES, J. MOSNIER, D. RAGOT & Y. TRULLEMANS pour leur soutien technique.

Références bibliographiques

- ADERA T, WOLFE MS, MCGUIRE-RUGH K, CALHOUN N & MARUM L - Risk factors for malaria among expatriates living in Kampala, Uganda: the need for adherence to chemoprophylactic regimens. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **52**, 207-212.
- AGNAMEY P, LEROY G, KOUAMOOU J & BRASSEURP - Sensibilité *in vivo* et *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à l'amodiaquine à Bangangte (Ouest Cameroun). *Bull Soc Pathol Exot*, 1995, **88**, 149-151.
- AMUKOYE E, WINSTANLEY PA, WATKINS WM, SNOW RW, HATCHER J *et al.* - Chlorproguanil-dapsone: effective treatment for uncomplicated falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, **41**, 2261-2264.
- ANABWANI GM, ESAMAI FO & MENYA DA - A randomised controlled trial to assess the relative efficacy of chloroquine, amodiaquine, halofantrine and Fansidar in the treatment of uncomplicated malaria in children. *East Afr Med J*, 1996, **73**, 155-158.
- BARNESAJ, ONG EL, DUNBAR EM, MANDAL BK & WILKINS EGL - Failure of chloroquine and proguanil prophylaxis in travellers to Kenya. *Lancet*, 1991, **338**, 1338-1339.
- BASCO LK, EL-DIN DE PECOULAS P, WILSON CM, LE BRAS J & MAZABRAUD A - Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1995, **69**, 135-138.
- BEM JL, KERR L & STUERCHLER D - Mefloquine prophylaxis: an overview of spontaneous reports of severe psychiatric reactions and convulsions. *J Trop Med Hyg*, 1992, **95**, 167-179.
- BRABIN BJ, VERHOEFF FH, KAZEMBE P, CHIMSUKU L & BROADHEAD R - Antimalarial drug policy in Malawi. *Ann Trop Med Parasitol*, 1997, **91**, 113-115.
- BRANDICOURT O, CARME B, GAY F, TURK P & GENTILINI M - Widespread *in vitro* resistance to chloroquine of *Plasmodium falciparum* in the Congo, 1987. *Trop Med Parasitol*, 1991, **42**, 55-59.
- BRASSEUR P, AGNAMEY P, EKOBO AS, SAMBA G, FAVENNEC L & KOUAMOOU J - Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to amodiaquine and chloroquine in central Africa: a comparative study *in vivo* and *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995, **89**, 528-530.
- CALI G - The Italian Army Medical Corps in the United Nations "peace-keeping" operations: Somalia and Mozambique, December 1992 - December 1994. *Med Trop*, 1996, **56**, 400-403.
- CARME B, PEGUET C & NEVEZ G - Compliance with and tolerance of mefloquine and chloroquine + proguanil malaria chemoprophylaxis in French short-term travellers to sub-Saharan Africa. *Trop Med Intern Health*, 1997, **2**, 953-956.
- CHANDENIER J, NDOUNGA M, CARME B, GAY F, MBITSI A *et al.* - Chimiosensibilité *in vivo* et *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à Brazzaville (Congo). *Cahiers Santé*, 1995, **5**, 25-29.
- CLATTENBURG RN & DONNELLY CL - Case study: neuropsychiatric symptoms associated with the antimalarial agent mefloquine. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1997, **36**, 1606-1608.
- COROMINAS N, GASCON J, MEJIAS T, CAPARRÓS F & QUINTO L - Adverse effects associated with antimalarial chemoprophylaxis. *Med Clin (Barc)*, 1997, **108**, 772-775.
- CROFT AM, CLAYTON TC & WORLD MJ - Side effects of mefloquine prophylaxis for malaria: an independent randomized controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997, **91**, 199-203.
- CSHP (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France) - Recommandations sanitaires pour les voyageurs. *BEH*, 1997, **26**, 119.
- ERKSSON B, BJORKMAN A & KEISU M - How safe is proguanil? A post-marketing investigation of side-effects. *Scand J Infect Dis*, 1991, **23**, 489-493.
- GOZAL D, HENGY C & FADAT G - Prolonged malaria prophylaxis with chloroquine and proguanil (chloroguanide) in a non-immune resident population of an endemic area with a high prevalence of chloroquine resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, **35**, 373-376.
- HOEBE C, DE MUNTER J & THIJS C - Adverse effects and compliance with mefloquine or proguanil antimalarial chemoprophylaxis. *Eur J Clin Pharmacol*, 1997, **52**, 269-275.
- HOWELLS RE, GILLESHEM & BENTNS - A comparison of the pyrimethamine and cycloguanil sensitivities of the pre-erythrocytic and erythrocytic stages of drug-sensitive and drug-resistant strains of *Plasmodium yoelii*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1985, **79**, 247-251.

22. KREMSNERPG, WINKLER S, BRANDTS C, GRANIGER W & BIENZLE U - Curing of chloroquine-resistant malaria with clindamycin. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, **49**, 650-654.
23. LOBEL HO & KOZARSKY PE - Update on prevention of malaria for travelers. *J Am Med Assoc*, 1997, **278**, 1767-1771.
24. LOOREESUWAN S, VIRAVAN C, WEBSTER HK, KYLE DE, HUTCHINSON DB & CANFIELD CJ - Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **54**, 62-66.
25. LUZZI GA & PETO TE - Adverse effects of antimalarials. An update. *Drug Saf*, 1993, **8**, 295-311.
26. MARTIN J, MORAND C, M'BAYE PS, OGER E & ABGRALL J - Résistance de *Plasmodium falciparum* à l'association chloroquine-proguanil : un cas en provenance du Bénin. *Presse Méd*, 1992, **21**, 678.
27. MILLER JH, BYERS M, WHITEOAK R & WARREL DA - Imported falciparum malaria in British troops returning from Kenya. *J R Army Med Corps*, 1994, **140**, 119-123.
28. NZILA-MOUNDA A, MBERU EK, SIBLEY CH, PLOWE CV, WINSTANLEY PA & WATKINS WM - Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates : correlation between pyrimethamine and chlorocycloguanil activity *in vitro* and point mutations in dihydrofolate reductase domain. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, **42**, 164-169.
29. OMS - *Voyages internationaux et santé. Vaccinations exigées et conseils d'hygiène*. Genève, Org mond de la Santé, 1997, 112 p.
30. PARZY D, DOERIG C, PRADINES B, RICO A, FUSAI T & DOURY JC - Proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* isolates: assessment by mutation-specific PCR and *in vitro* susceptibility testing. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **57**, 646-650.
31. PERAGALLO MS, SABATINELLI G, MAJORI G, CALI G & SARNICOLA G - Prevention and morbidity of malaria in non-immune subjects; a case-control study among Italian troops in Somalia and Mozambique, 1992-1994. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997, **91**, 343-346.
32. PRADINES B, ROGIER C, FUSAI T, TALL A, TRAPEJF & DOURY JC - Sensibilité *in vitro* de 85 isolats de *Plasmodium falciparum* dans la région de Fatick, Sénégal. *Méd Trop*, 1996, **56**, 141-145.
33. RADLOFF PD, PHILIPPS J, NKEYI M, HUTCHINSON D & KREMSNER PG - Atovaquone and proguanil for *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*, 1996, **447**, 1511-1514.
34. VAN RIEMSDIJK MM, VAN DER KLAUW MM, PEPPLINKHUIZEN L & STRICKER BH - Spontaneous report of psychiatric effects to mefloquine in the Netherlands. *Br J Clin Pharmacol*, 1997, **44**, 105-107.
35. VAN RIEMSDIJK MM, VAN DER KLAUW MM, VAN HEEST JA, REEDEKER FR & LIGTHELM RJ - Neuro-psychiatric effects of antimalarials. *Eur J Clin Pharmacol*, 1997, **52**, 1-6.
36. SARROUY J, CELLIER C, MIGLIANI R, TODESCO A, FAVIER G *et al.* - Chimio prophylaxie du paludisme à *Plasmodium falciparum* par une association de 100mg de chloroquine et 200mg de proguanil par jour dans une zone III de chloroquinorésistance (Gabon). *Bull Soc Pathol Exot*, 1991, **84**, 80-93.
37. SOKHNACS, MOLEZ JF, NDIAYE P, SANE B & TRAPE JF - Tests *in vivo* de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine au Sénégal : évaluation de la résistance et estimation de l'efficacité thérapeutique. *Bull Soc Pathol Exot*, 1997, **90**, 83-89.
38. WARD SA, WATKINS WM, MBERU E, SAUNDERS JE & KOECH DK - Inter-subject variability in the metabolism of proguanil to the active metabolite cycloguanil in man. *Br J Clin Pharmacol*, 1989, **27**, 781-787.
39. WATKINS WM, MBERU EK, NEVILL CG, WARD SA & BRECKENRIDGE - Variability in the metabolism of proguanil to the active metabolite cycloguanil in healthy Kenyan adults. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1990, **84**, 492-495.
40. WEISS T, OLOO AJ, JOHNSON A, KOECH D & HOFFMAN SL - Daily primaquine is effective for prophylaxis against *falciparum* malaria in Kenya: comparison with mefloquine, doxycycline, and chloroquine plus proguanil. *J Infect Dis*, 1995, **171**, 1569-1575.
41. WETSTEYN JC & DE GEUS A - Comparison of three regimens for malaria prophylaxis in travellers to East Central, and Southern Africa. *Br Med J*, 1993, **307**, 1041-1043.
42. WETSTEYN JC & DE GEUS A - Comparison of three malaria chemoprophylactic regimens in residents in East, Central and Southern Africa. A prospective, randomized multicentre trial in the Netherlands. *Trop Geogr Med*, 1995, **47**, 103-106.
43. WINKLER S, BRANDTS C, WERNSDORFER WH, GRANIGER W, BIENZLE U & KREMSNERPG - Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Gabon. Activity correlations between various antimalarials. *Trop Med Parasitol*, 1994, **45**, 214-218.
44. WOLDAY D, KIBREAB T, BUKENYA D & HODES R - Sensitivity of *Plasmodium falciparum* *in vivo* to chloroquine and pyrimethamine-sulfadoxine in Rwandan patients in a refugee camp in Zaire. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995, **89**, 654-656.