

Variabilité de l'activité in vitro du proguanil et du cycloguanil sur les stades érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* en fonction des conditions de culture.

M. Ndounga (1, 2), L.K. Basco (2, 3) & P. Ringwald (2, 3)

(1) Laboratoire de pharmacologie, Centre d'études sur les ressources végétales (CERVE), B. P. 1249, Brazzaville, Congo

(2) Laboratoire de recherche sur le paludisme, Laboratoire associé francophone 302, Organisation de coordination pour la lutte contre les endémies en Afrique centrale (OCEAC), BP 288, Yaoundé, Cameroun. Tél. : 237 232 232 ; fax : 237 230 061 ; e-mail : oceac@camnet.cm

(3) Institut de Recherche pour le Développement (IRD, ex-ORSTOM)

Manuscrit n° 2063. "Parasitologie". Reçu le 15 avril 1999. Accepté le 5 octobre 1999.

Summary: Variability of the In Vitro Activity of Proguanil and Cycloguanil on the Erythrocyte Stages of *Plasmodium falciparum* According to Conditions of Culture

The in vitro activity of proguanil, cycloguanil (active metabolite of proguanil), pyrimethamine, and chloroquine was determined for 14 isolates of *Plasmodium falciparum* and the chloroquine-resistant W2 clone. In vitro assays were performed by using different types of RPMI 1640 culture medium and incubation period. The use of the standard RPMI medium or RPMI medium containing low concentrations of folate and para-aminobenzoic acid increases the 50% inhibitory concentrations of cycloguanil and pyrimethamine, as compared with the use of folate- and para-aminobenzoic acid-free RPMI medium. The concentrations of folate and para-aminobenzoic acid did not affect the in vitro activity of proguanil and chloroquine. However, prolongation of the incubation period from 42 to 66 hours decreased the 50% inhibitory concentrations of all test compounds. The weak antagonism in vitro between chloroquine and proguanil or cycloguanil does not seem to have any repercussion on the in vivo efficacy of chloroquine-proguanil combination.

Résumé :

L'activité in vitro du proguanil, du cycloguanil son métabolite actif, de la pyriméthamine et de la chloroquine a été déterminée sur 14 isolats de *Plasmodium falciparum* et le clone chloroquinorésistant W2. Ces tests ont été pratiqués en faisant varier la nature du milieu de culture et la durée du test. L'utilisation d'un milieu RPMI standard ou d'un milieu appauvri en acide folique et en acide para-aminobenzoïque augmente la concentration inhibitrice 50 % du cycloguanil et de la pyriméthamine par rapport à l'utilisation d'un milieu totalement déplété en acide folique et en acide para-aminobenzoïque. La concentration en acide folique et en acide para-aminobenzoïque n'influe pas sur les résultats du proguanil ou de la chloroquine. Par contre, une prolongation du temps du test in vitro de 42 à 66 heures diminue la concentration inhibitrice 50 % pour tous les médicaments. Le faible antagonisme in vitro entre la chloroquine et le proguanil ou le cycloguanil ne semble pas avoir une conséquence sur l'efficacité in vivo de l'association chloroquine-proguanil.

malaria
in vitro test
proguanil
cycloguanil
dihydrofolate reductase
biguanide
antifolate
chloroquine
Plasmodium falciparum
Sub-saharan Africa

paludisme
test in vitro
proguanil
cycloguanil
dihydrofolate reductase
biguanide
antifolinique
Plasmodium falciparum
Afrique intertropicale

Introduction

La découverte du proguanil est le résultat de recherches menées sur les pyrimidines en 1945 (6). Les études pré-cliniques ont montré une efficacité du proguanil contre plusieurs espèces de *Plasmodium* aviaires et simiens et une activité supérieure du proguanil par rapport aux autres antipaludiques disponibles à cette époque. Les premiers échecs prophylactiques et thérapeutiques au proguanil utilisé seul ont été rapportés rapidement après son utilisation dans les années 1950. Ces échecs ainsi que la disponibilité de la chloroquine ont entraîné une chute considérable de l'utilisation du proguanil. Actuellement, le proguanil ne devrait plus être utilisé seul en raison du risque d'apparition rapide de résistance. Néanmoins, le proguanil trouve un regain d'intérêt dans les associations

d'antipaludiques, depuis la fin des années 1980, en particulier avec l'atovaquone pour la thérapeutique et avec la chloroquine pour la prophylaxie du paludisme (18).

Le proguanil est un antifolinique biguanide, métabolisé au niveau du foie par le système du cytochrome P450, et plus particulièrement par la classe des isoenzymes CYP2C19 en un métabolite actif, le cycloguanil (12). Les études pharmacocinétiques ont mis en évidence des facteurs génétiques et ethniques influençant ce métabolisme et conduisant à différencier deux groupes, les bons métaboliseurs qui transforment le proguanil absorbé en cycloguanil et les mauvais métaboliseurs qui métabolisent très peu de proguanil en cycloguanil (25). Le cycloguanil possède un mode d'action original, car il agit aussi bien sur les formes érythrocytaires qu'hépatiques de *P. falciparum*. Le cycloguanil, comme la pyriméthamine, est

un inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR), enzyme qui transforme le dihydrofolate en tétrahydrofolate. La DHFR existe chez la plupart des protozoaires en association avec la thymidylate synthétase dont l'activité est indispensable à la synthèse de l'ADN. Les techniques de biologie moléculaire récentes ont permis de montrer que la résistance au cycloguanil est liée à une double mutation au niveau des codons 108 et 16 du gène codant pour la DHFR (11).

En raison du taux de résistance élevé dans certaines zones d'endémie (en particulier, en Asie et en Amérique du Sud) et de la facilité à sélectionner les souches résistantes au cycloguanil, la surveillance de l'efficacité du cycloguanil *in vitro* et *in vivo* s'impose. Les nombreuses études sur l'efficacité *in vitro* du cycloguanil contre *P. falciparum* sont difficilement comparables en raison des différentes méthodologies utilisées. Si la plupart des auteurs s'accordent à ne plus utiliser du milieu de culture contenant en excès de l'acide folique et de l'acide *para*-aminobenzoïque (PABA) qui inhibent l'activité des antifoliniques, il n'existe pas de consensus pour utiliser des milieux appauvris ou totalement déplétés en acide folique et en PABA. Le même problème se pose pour la durée du test *in vitro* allant de 42 à 72 heures. Les études *in vitro* sur l'efficacité de proguanil sont moins nombreuses et il n'existe pas à notre connaissance d'étude publiée sur l'activité *in vitro* du proguanil ou du cycloguanil en association avec la chloroquine. Les objectifs de la présente étude sont les suivants :

- déterminer l'activité *in vitro* du proguanil et du cycloguanil en fonction du milieu de culture et de la durée du test à l'aide d'isolats et d'un clone de *P. falciparum*;
- comparer l'activité de la chloroquine et de la pyriméthamine dans les mêmes conditions;
- déterminer l'activité *in vitro* de la chloroquine, du proguanil et du cycloguanil en association.

Matériel et méthodes

Les isolats de *P. falciparum* ont été obtenus à partir de malades camerounais consultant au dispensaire catholique de Nlongkak de Yaoundé. La recherche d'une prise d'antipaludique avant la consultation a été effectuée par le test de SAKER-SOLOMONS modifié par MOUNT et coll. (16). Les frottis minces ont été colorés au Giemsa pour la détermination de l'espèce et la densité parasitaire sur la base de 20000 érythrocytes. Dix ml de sang ont été prélevés après consentement des malades ou du tuteur pour les enfants. Les malades ont été inclus dans l'étude si le test urinaire était négatif et si la parasitémie était supérieure à 0,1 %. Les malades ont été traités par l'amodiaquine à la dose de 35 mg/kg. Cette étude a obtenu l'accord du Ministère de la santé publique du Cameroun et du Comité d'éthique du Cameroun.

Pour les tests *in vitro* et les études des interactions médicamenteuses, le clone chloroquino-résistant et résistant aux antifoliniques W2/Indochine a été maintenu en culture continue selon la technique de TRAGER and JENSEN (23). Les parasites ont été synchronisés pour les tests *in vitro* par du D-sorbitol à 5 %.

Les solutions de chloroquine diphosphate (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA), de cycloguanil base et de proguanil chlorhydrate (Zeneca Pharma, Cergy, France) ont été préparées dans de l'eau stérile distillée. Les solutions de pyriméthamine base (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) ont été préparées dans de l'éthanol. Les concentrations finales (25 à 1600 nM pour la chloroquine, 1600 à 102400 nM pour le proguanil, et 12,8 à 51200 nM pour le cycloguanil et la pyriméthamine) ont été distribuées en triple dans des plaques de 96 puits. Les hématies parasitées ont été préalablement lavées

3 fois dans du milieu RPMI sans acide folique et sans PABA. Le culot globulaire a été mis en suspension dans du milieu RPMI contenant 10 % de sérum humain AB (provenant de donneur européen), 25mM d'HEPES et 25mM NaHCO₃ à un hémocrite de 1,5% et une parasitémie initiale comprise entre 0,1 à 1 %. Si la parasitémie est supérieure à 1 %, les érythrocytes parasités ont été dilués avec des érythrocytes de donneurs sains pour aboutir à une parasitémie de 0,6 %. Le microtest isotopique a été utilisé dans cette étude (20). Trois milieux de culture différents ont été utilisés, du milieu RPMI standard contenant 1 mg/l d'acide folique et 1 mg/l de PABA, du milieu RPMI appauvri en acide folique (0,01 mg/l) et en PABA (0,5 µg/l) et du milieu RPMI sans acide folique et sans PABA. Les tests ont été pratiqués sur 42 h et sur 66 h. Les résultats sont exprimés en concentrations inhibitrices 50 % (CI₅₀) correspondant à l'inhibition de l'incorporation de 50 % de l'hypoxanthine tritiée par rapport aux témoins. La CI₅₀ est déterminée à l'aide du logiciel Prism™ (GraphPad Software, Inc., San Diego, Californie, USA). Les valeurs sont comparées par le test non-paramétrique t de Wilcoxon.

La chloroquine a été associée avec le proguanil et le cycloguanil pour déterminer la nature de leur interaction *in vitro*. Préalablement, la CI₅₀ du clone W2 aux 3 médicaments a été déterminée. Les concentrations de départ correspondant à dix fois la CI₅₀ de chaque médicament ont été mélangées deux à deux selon 3 ratios (v/v 1:3; 1:1; et 3:1) (3). Les concentrations finales ont été obtenues par dilution dichotomique. Pour chaque expérimentation, la CI₅₀ de chaque médicament A et B utilisé seul a été déterminée ainsi que la CI₅₀ des associations selon les 3 ratios. Les valeurs obtenues permettent de tracer des isobogrammes ayant pour abscisse et ordonnée une valeur unitaire correspondant à la CI₅₀ des médicaments A et B testés seuls. Les autres points sont calculés à partir des rapports de la CI₅₀ du médicament A en association/CI₅₀ médicament A testé seul et de la CI₅₀ du médicament B en association/CI₅₀ médicament B testé seul. Si la ligne joignant les points est diagonale, l'association est additive. Une ligne concave indique que l'association est synergique et une ligne convexe indique que l'association est antagoniste.

Résultats

Les CI₅₀ de 14 isolats de *P. falciparum* ont été déterminées en faisant varier la teneur en acide folique et en PABA du milieu de culture et la durée du test. Quelle que soit la durée du test, les CI₅₀ de la pyriméthamine et du cyclogua-

Figure 1.

Influence des différents milieux RPMI sur les valeurs de la concentration inhibitrice 50% de l'isolat 73/96 pour le proguanil (PRO), le cycloguanil (CYC) et la pyriméthamine (PYR).
Influence of different RPMI media on the values of 50% inhibitor concentration of the 73/96 isolate for proguanil (PRO), cycloguanil (CYC) and pyrimethamine (PYR).

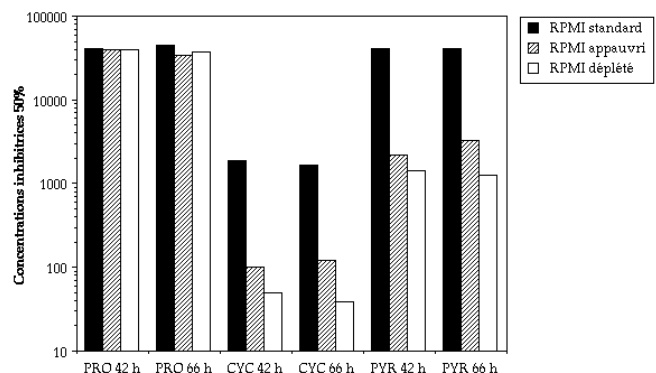


Tableau I.

Influence de la durée du test *in vitro* sur les résultats des concentrations inhibitrices 50% (CI₅₀) effectuées sur 14 isolats de *Plasmodium falciparum*.
 Influence of the length of *in vitro* test on the results of 50% inhibitor concentrations (CI₅₀) conducted on 14 isolates of *Plasmodium falciparum*.

médicaments	CI ₅₀ (nM)		p
	42heures	66heures	
proguanil	28 500 6020 - 58800	23 500 4 410 - 42600	< 0,05
cycloguanil	27,1 12,8 - 132,5	25,3 12,8 - 155,3	NS
pyriméthamine	105,9 12,8 - 2290	95,3 12,8 - 2280	< 0,05
chloroquine	213 68,9 - 678	192 49,9 - 669	NS

Les résultats sont exprimés en moyenne géométrique (extrêmes). Les tests *in vitro* ont été effectués avec du RPMI sans acide folique et sans PABA pour le proguanil, le cycloguanil et la pyriméthamine et avec du RPMI standard pour la chloroquine.

NS : non significatif.

nil baissent lorsque les tests sont effectués avec du milieu RPMI appauvri en acide folique et en PABA ou du milieu RPMI sans acide folique ou sans PABA par rapport au milieu RPMI normal ($p < 0,05$) (figure 1). Cette différence est également significative entre le milieu RPMI appauvri et le milieu RPMI sans acide folique et sans PABA ($p < 0,05$). Aucune différence n'est observée en fonction du milieu de culture pour le proguanil ou pour la chloroquine. Pour les 4 médicaments testés, les moyennes des CI₅₀ sont systématiquement inférieures lorsque les tests sont pratiqués sur 66 heures, par rapport aux tests effectués sur 42 heures : mais cette différence n'est statistiquement significative que pour le proguanil et la pyriméthamine (tableau I). Des résultats similaires sont obtenus avec le clone W2, en modifiant le milieu de culture et en variant le temps du test.

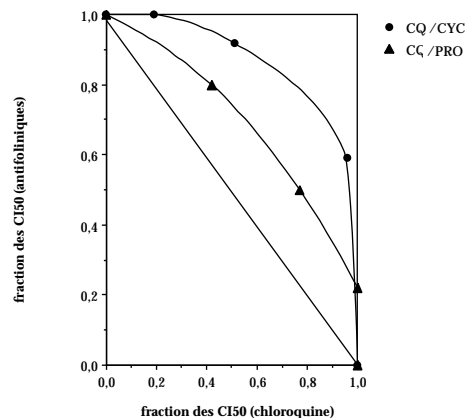
Les interactions médicamenteuses ont été étudiées sur 66 h en utilisant le clone W2 et du RPMI sans acide folique et sans PABA pour ne pas interférer avec les résultats des CI₅₀ du cycloguanil et pour pouvoir en comparer les résultats entre eux. Les valeurs moyennes (\pm déviation standard) des CI₅₀ des différentes molécules, effectuées à partir de 3 à 6 expérimentations, sont les suivantes : chloroquine, $367,7 \pm 32,6$ nM; cycloguanil, 1820 ± 692 nM; proguanil, 38100 ± 6990 nM. Les combinaisons entre la chloroquine et le proguanil, ainsi que la combinaison entre la chloroquine et le cycloguanil, sont faiblement antagonistes *in vitro* (figure 2).

Discussion

Bien que les tests *in vitro* ne reflètent pas toutes les conditions *in vivo*, ils restent le meilleur moyen de déterminer le niveau de sensibilité d'un isolat (19, 20). Cependant, la diversité des tests *in vitro* ayant des méthodologies différentes rend difficile la comparaison des données publiées (1, 2, 8 et 17). L'influence de la concentration en acide folique et en PABA sur les résultats des tests *in vitro* aux antifoliques avait été démontrée par SIXSMITH et coll. (22). Les valeurs des CI₅₀ de la pyriméthamine étaient multipliées d'un facteur 10, lorsqu'un milieu RPMI standard est utilisé, mais les auteurs avaient conclu qu'une concentration physiologique d'acide folique (10 $\mu\text{g/l}$) et de PABA (0,5 $\mu\text{g/l}$) ne modifiait pas les résultats des tests *in vitro* (27). Dans notre étude, le rapport des CI₅₀ entre un milieu RPMI standard et un milieu RPMI appauvri est de 11,7 pour la pyriméthamine et de 9,4 pour le cycloguanil. En outre, l'utilisation d'un milieu RPMI totalement dépleté en acide folique et en PABA, comparé au milieu appauvri, baisse encore les CI₅₀ de la pyriméthamine d'un rapport de 2,8 et celles du cycloguanil d'un rapport de 3,2. La standardisation des tests *in vitro* nécessite la prise en compte

Figure 2.

Interaction *in vitro* entre le proguanil (PRO), le cycloguanil (CYC) et la chloroquine (CQ) en utilisant le clone chloroquino-résistant W2. Les abscisses et les ordonnées sont exprimées en valeur unitaire correspondant à la concentration inhibitrice 50% du médicament testé seul.
 In vitro interaction among proguanil (PRO), cycloguanil (CYC) and chloroquine (CQ) by using the W2 chloroquino-resistant clone.



des sérums utilisés. Bien que le sérum soit utilisé à une dilution de 10 % dans le test, les concentrations de PABA peuvent dépasser les 200 $\mu\text{g/l}$ chez des sujets sains, ce qui a conduit certains auteurs à dialyser le sérum (15 et 21). Il reste à élucider la représentativité du test *in vitro* par rapport au *vivo*. Un test utilisant du milieu sans acide folique et sans PABA permettra d'obtenir les CI₅₀ les plus basses mais occultera l'influence des concentrations physiologiques d'acide folique et de PABA présentes chez le malade. Outre le milieu de culture, la durée du test modifie les résultats. Contrairement à SIXSMITH et coll. (22), nous avons trouvé une différence, non seulement pour les antifoliques et la chloroquine, mais aussi pour la quinine et la dihydroartémisinine (données non publiées). Cette différence peut être liée au mécanisme d'action du médicament, au développement non synchrone des isolats ou à une mauvaise croissance des isolats au-delà de 48 heures, ce qui entraînera une baisse des valeurs témoins et par conséquent une baisse artificielle de la CI₅₀.

WATKINS et coll. (26) avaient déterminé sur 42 heures la CI₅₀ au proguanil de 7 isolats du Kenya et de 3 isolats d'Asie du Sud-Est. Les valeurs extrêmes variaient entre 7 000 et 20 000 nM, ce qui correspond à des valeurs légèrement inférieures aux nôtres. WATKINS et coll. (26) avaient également soulevé l'hypothèse d'un mode d'action différent entre le proguanil et le cycloguanil, ce qui semble être confirmé par notre étude. Les concentrations d'acides foliques et de PABA ne modifient pas les valeurs de la CI₅₀ du proguanil et l'activité du proguanil est indépendante de la résistance *in vitro* au cycloguanil pour les 14 isolats. Les études cliniques corroborent cette hypothèse car l'utilisation du proguanil chez des sujets mauvais métaboliseurs permet une bonne protection en prophylaxie et un traitement efficace (13 et 14). Toutes les études moléculaires et biochimiques récentes ont confirmé l'action spécifique du cycloguanil au niveau de la DHFR, contrairement au proguanil, mais le mécanisme d'action du proguanil reste à déterminer (5, 8, 9 et 10). Les concentrations plasmatiques du proguanil obtenues en prophylaxie (200 mg/jour) sont en moyenne de l'ordre de 800 nM et de 6 000 nM lorsque le proguanil était utilisé en thérapeutique à la dose de 1 600 mg/jour (26). Bien que le proguanil se concentre 4 à 6 fois plus dans les érythrocytes que dans le plasma, les concentrations obtenues restent insuffisantes pour expliquer l'action du proguanil en particulier pour les isolats présentant une CI₅₀ élevée (7). Contrairement à l'association proguanil-atovaquone qui est synergique *in vitro*, l'interaction de la chloroquine avec le proguanil ou le cycloguanil est faiblement antagoniste (4). Néan-

moins, cet antagonisme ne devrait pas avoir de répercussion pharmacologique et clinique, car aucune concentration de la chloroquine n'augmente la CI_{50} du cycloguanil ou de proguanil au-delà de la CI_{50} du cycloguanil ou proguanil utilisé seul et vice versa (26). Un antagonisme *in vitro* entre la chloroquine et la pyriméthamine avait déjà été décrit (24).

L'association de deux médicaments a pour but d'augmenter leur efficacité et de retarder l'apparition de résistance. Plusieurs concepts peuvent être avancés pour le choix d'une association d'antipaludiques. Le premier est l'association de deux médicaments ayant une action synergique et des demi-vies d'élimination similaires. C'est le cas de l'association sulfadoxine-pyriméthamine. Plus récemment, un autre concept a été proposé (28). Par analogie aux traitements antituberculeux et antiviraux, les associations médicamenteuses devraient combiner des médicaments ayant un mode d'action et des sites d'action différents. C'est dans ce cadre que se place l'association chloroquine-proguanil, dont le mode d'action de chaque médicament est totalement différent et le spectre d'activité complémentaire. Les mécanismes de résistance développés par le parasite sont également différents ce qui réduit le risque d'une double résistance.

Conclusion

Ce travail fait ressortir les difficultés de standardisation des tests *in vitro*. Les études pratiquées confirment l'influence de l'acide folique et du PABA sur les résultats des tests *in vitro* du cycloguanil et de la pyriméthamine, aussi bien avec des isolats de *P. falciparum* qu'avec le clone W2. La durée du test modifie également les résultats. Les résultats obtenus avec le proguanil par rapport au cycloguanil semblent confirmer l'activité intrinsèque du proguanil. Bien que l'interaction entre la chloroquine et le proguanil ou le cycloguanil ne mette pas en évidence une synergie *in vitro*, l'association chloroquine-proguanil reste un schéma adapté pour la prophylaxie du paludisme en Afrique en raison du spectre d'activité et des sites d'action différents pour les 2 médicaments.

Remerciements

Nous remercions Sœur Solange MÉNARD et tout le personnel du dispensaire de Nlongkak pour leur participation au recrutement des malades et J. БИСКИИ pour sa collaboration. Cette étude a été financée par le laboratoire Zeneca Pharma.

Références bibliographiques

- ANG HH, CHAN KL & MAK JW - Susceptibility studies of *Plasmodium falciparum* isolates and clones against cycloguanil and pyrimethamine using the modified *in vitro* microtechnique. *J Parasitol*, 1996, **82**, 1029-1031.
- BASCO LK, RAMILIARISOA O & LE BRAS J - *In vitro* activity of pyrimethamine, cycloguanil, and other antimalarial drugs against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, **50**, 193-199.
- BERENBAUM MC - A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis*, 1978, **137**, 122-130.
- CANFIELD CJ, PUDNEY M & GUTTERIDGE WE - Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Exp Parasitol*, 1995, **80**, 373-381.
- CORTESE JF & PLOWE CV - Antifolate resistance due to new and known *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutations expressed by yeast. *Mol Biochem Parasitol*, 1998, **94**, 205-214.
- CURD FHS, DAVEY DG & ROSE FL - Studies on antimalarial drug. X. Some biguanides derivatives as new types of antimalarial substances with both therapeutic and causal prophylactic activity. *Ann Trop Med Parasitol*, 1945, **39**, 208-216.
- EDSTEIN MD, VEENENDAAL JR, SCOTT HV & RIECKMANN KM - Steady-state kinetics of proguanil and its active metabolite, cycloguanil, in man. *Chemotherapy*, 1988, **34**, 385-392.
- ERIKSSON B, LEBBAD M & BJÖRKMANN A - *In vitro* activity of proguanil, chlorproguanil and their main metabolite against *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1989, **83**, 488.
- FIDOCK DA & WELLEMS TE - Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**, 10931-10936.
- FIDOCK DA, NOMURA T & WELLEMS TE - Cycloguanil and its parent compound proguanil demonstrate distinct activities against *Plasmodium falciparum* malaria parasites transformed with human dihydrofolate reductase. *Mol Pharmacol*, 1998, **54**, 1140-1147.
- FOOTE SJ, GALATAS D & COWMAN AF - Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**, 3014-3017.
- HOSKINS JM, SHENFIELD GM & GROSS AS - Relationship between proguanil metabolic ratio and *CYP2C19* genotype in a Caucasian population. *Br J Clin Pharmacol*, 1998, **46**, 499-504.
- KANEKO A, BERGQVIST Y, KALKOA M, KANEKO O, KOBAYAKAWA T *et al* - Intrinsic efficacy of proguanil against falciparum and vivax malaria independent of the metabolite cycloguanil. *J Infect Dis*, 1999, **179**, 974-979.
- MBERU EK, WANSOR T, SATO H, NISHIKAWA Y & WATKINS WM - Japanese poor metabolizers of proguanil do not have an increased risk of malaria chemoprophylaxis breakthrough. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995, **89**, 658-659.
- MILHOUS WK, WEATHERLY NF, BOWDRE JH & DESJARDINS RE - *In vitro* activities of and mechanisms of resistance to antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985, **27**, 525-530.
- MOUNT DL, NAHLEN BL, PATCHEN LC & CHURCHILL FC - Adaptations of the Saker-Solomons test: Simple, reliable colorimetric field assays for chloroquine and its metabolites in urine. *Bull World Health Organ*, 1989, **67**, 295-300.
- PETERSEN E, HOGH B, HANSON AP, BJORKMAN A & H FLACKS - *In vitro* and *in vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Liberia to pyrimethamine, cycloguanil and chlorcycloguanil. *Ann Trop Med Parasitol*, 1990, **84**, 563-571.
- RADLOFF PD, PHILLIPS J, NKEYI M, HUTCHINSON D, KREMSNER PG - Atovaquone and proguanil for *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*, 1996, **347**, 1511-1514.
- RINGWALD P & BASCO LK - Comparison of *in vivo* and *in vitro* tests of resistance in patients treated with chloroquine in Yaoundé, Cameroon. *Bull World Health Organ*, 1999, **77**, 34-43.
- RINGWALD P, BICKEL J & BASCO LK - *In vitro* activity of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaoundé, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 1996, **55**, 254-258.
- SCHAPIRA A, BYGBJERG IC, JEPSEN S, FLACHS H & BENTZON MW - The susceptibility of *Plasmodium falciparum* to sulfadoxine and pyrimethamine: correlation of *in vivo* and *in vitro* results. *Am J Trop Med Hyg*, 1986, **35**, 239-245.
- SIXSMITH DG, WATKINS WM, CHULAY JD & SPENCER HC - *In vitro* antimalarial activity of tetrahydrofolate dehydrogenase inhibitors. *Am J Trop Med Hyg*, 1984, **33**, 772-776.
- TRAGER W & JENSEN JB - Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 1976, **193**, 673-675.
- TSOKA JM, FREESE JA, ROSSOUW EJ, SHARP BL & APPLETON CC - Action of the chloroquine/pyrimethamine combination on southern African isolates of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *S Afr J Sci*, 1997, **93**, 295-296.
- WARD SA, HELSBY NA, SKJELBO E, BROSEN K, GRAM LF & BREKENRIDGE AM - The activation of the biguanide antimalarial proguanil co-segregates with mephenytoin oxidation polymorphism - a panel study. *Br J Clin Pharmacol*, 1991, **31**, 689-692.
- WATKINS WM, SIXSMITH DG & CHULAY JD - The activity of proguanil and its metabolites, cycloguanil and *p*-chlorophenylbiguanide, against *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Ann Trop Med Parasitol*, 1984, **78**, 273-278.
- WATKINS WM, SIXSMITH DG, CHULAY JD & SPENCER HC - Antagonism of sulfadoxine and pyrimethamine antimalarial activity *in vitro* by *p*-aminobenzoic acid, *p*-aminobenzoylglutamic acid and folic acid. *Mol Biochem Parasitol*, 1985, **14**, 55-61.
- WHITE NJ - Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Res Updates*, 1998, **1**, 3-9.