

MARQUEURS MOLÉCULAIRES DE RÉSISTANCE AUX MÉDICAMENTS ANTIPALUDIQUES : NÉCESSAIRES MAIS PAS SUFFISANTS POUR UN CHANGEMENT DE POLITIQUE DE SANTÉ

W. MBACHAM, N. NJIKAM

Med Trop 2007 ; 67 : 183-187

RÉSUMÉ • La recherche récente a tenté d'utiliser les marqueurs moléculaires ou les mutations génétiques associés à la résistance pour affiner la surveillance de l'efficacité thérapeutique des médicaments antipaludiques couramment utilisés en permettant de détecter rapidement l'apparition de pharmacorésistance. Pour faire reculer le paludisme, les responsables des programmes antipaludiques nationaux préconisent des stratégies qui visent l'interruption de la transmission et/ou l'amélioration des moyens thérapeutiques. Afin de mettre les marqueurs moléculaires en oeuvre dans les programmes de lutte, il faut prendre en compte deux types de données pour assurer que tout changement de politique en matière de traitement antipalustre est fondé. Il s'agit premièrement des données socio-économiques et deuxièmement des données biomédicales. Jusqu'à présent les principaux marqueurs utilisés pour mesurer l'efficacité clinique des molécules sont les gènes associés soit avec le transport soit avec le métabolisme du produit. En ce qui concerne le paludisme, les gènes qui sont les mieux connus sont la *Pfcr1* et la *Pfmdr1* dans le cas des quinolines et la *dhfr* et la *dhps* dans le cas des antifolates. Certains auteurs ont suggéré l'implication de la *Pf ATPase* dans les nouveaux traitements combinés à base d'artémisinine (TCA). Pour décider ou non de changer de médicament antipalustre, les responsables des programmes de lutte doivent prendre en compte plusieurs facteurs: l'efficacité, la transmissibilité, la dynamique de la maladie, la sécurité, l'épidémie, la tolérance et l'observance. Les marqueurs moléculaires fournissent des informations utiles concernant tous ces facteurs sauf la sécurité, la tolérance et l'observance. Cependant il est toujours nécessaire de valider ces marqueurs par des études *in vitro* et dans des milieux écologiques différents et de montrer qu'ils sont stables dans le temps ou associés à des situations dans lesquelles l'efficacité clinique des médicaments se modifie. Outre les données fournies par ces outils, le pouvoir public doit assurer des campagnes de sensibilisation afin d'informer la population et le personnel soignant et entreprendre des actions de lutte contre la vente illicite des antipaludiques. Ainsi les pouvoirs publics devront toujours engager les ressources nécessaires pour déterminer le bon moment pour changer de politique thérapeutique surtout au niveau du district et dans les zones rurales où des programmes efficaces et économiques sont les plus nécessaires.

MOTS-CLÉS • Paludisme – Marqueurs moléculaires – Résistance – Politique de santé.

MOLECULAR MARKERS FOR MALARIA DRUG RESISTANCE: NECESSARY BUT NOT SUFFICIENT CRITERIA TO DECIDE CHANGE IN TREATMENT POLICY

ABSTRACT • Molecular markers or gene mutations that are associated with resistance have been the recent focus for an attempt to promptly determine the establishment of resistance to known and currently used antimalaria drugs. For control managers, the effective management of malaria would involve strategies of interruption of the malaria transmission and/or improved therapeutic management of malaria. To place molecular markers within the context of control programs requires that one recognises the two data pools necessary for effective evidence-based policy change. These include data on socio-economic determinants on the one hand and biomedical data on the other. The markers for clinical efficacy of drugs have principally been genes either associated with transport or metabolism of the drug. In malaria those that have been the most characterised are the *Pfcr1*, *Pfmdr1* for the quinolines and the *dhfr* and *dhps* genes for the anti-folates. The *Pf ATPase* has been suggested to be involved in the recently developed artemisinin based combination therapies (ACT). To consider changes in drug policy, a control manager needs to address: efficacy, transmissibility, disease dynamics, safety, epidemics, tolerability and compliance. Except for safety and tolerability/compliance, molecular markers do provide useful information. However these markers still have to be validated alongside *in vitro* studies and in many different ecological settings and shown to be stable over time or associated with changing drug efficacy situations. Besides the evidence provided with these tools, the government will be required to ensure a mass education of the population and care providers, and fight against illicit street vendors. The governments will therefore still wary on the resources necessary to occasion an effective switch in drug policy especially at the district level and in the rural areas where meaningful, cost-effective programs are most needed.

KEY WORDS • Malaria - Molecular Markers - Resistance - Policy.

- Travail du Département de Biochimie, Université de Yaoundé (W.F., Medical Doctor) et de la Fondation Fobang et du Département de Biologie animale et physiologie (N.N., Medical Doctor) Université de Yaoundé I, Cameroun.
- Correspondance : W. MBACHAM, Fobang Foundation Box 8094 Yaounde, Cameroon.
- Courriel : wfm bacham@yahoo.com •
- Article sollicité.

Les difficultés de prise en charge du paludisme proviennent de l'incapacité à améliorer la morbidité et la mortalité à cause de la nature changeante du *Plasmodium falciparum*, principal agent du paludisme (1, 2). Les responsables des Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme (PNLP) ont opté pour le terme « prise en charge » plutôt que contrôle (3) parce que le défi d'éradication a semblé impos-

sible à atteindre. Ces responsables de programme ont choisi le terme «maîtriser» la morbidité et la mortalité pour montrer que la maladie pourrait être très fortement réduite par des approches multidisciplinaires intégrant le contrôle vectoriel, les facteurs humain et parasitaire pour «faire reculer le paludisme» (4, 5). Les parasites du paludisme sont actuellement plus abondants que jamais à cause de l'accroissement de la population mondiale, du réchauffement de la planète et de l'émergence de résistances aux médicaments existants (6). Ceci implique que les deux soucis les plus importants pour ces responsables de programme soient : l'arrêt de la transmission et la guérison du patient.

ARRÊTER LA TRANSMISSION DU PALUDISME

Les scientifiques ont mis au point plusieurs moyens pour réduire les contacts entre les moustiques et les populations : en stérilisant les moustiques, en introduisant des prédateurs biologiques, en utilisant des insecticides etc.. Malgré toutes ces mesures, les densités de vecteurs continuent d'augmenter, à cause de la modification de l'environnement par l'homme (7). Arrêter la transmission par des vaccins ou des médicaments au travers de campagnes de masse est un but altruiste de santé publique qui ne pourrait être efficace que si le taux de couverture de ces actions était supérieur à 80%. Ceci est possible dans des régions où le paludisme est instable. Les moustiquaires imprégnées ont fait leur apparition et ont réduit efficacement le nombre de piqûres de moustiques (8). Malheureusement il y a encore un pas à franchir pour que les populations Africaines acceptent ce concept. Les associations à base de dérivés de l'artémisinine (ACT), grâce à leur activité gamétocydyque, sont d'actualité car elles permettent d'espérer un arrêt de la transmission. On assiste également à une réutilisation des pulvérisations intra domiciliaires avec le DDT ou des pyrethroides pour diminuer la transmission. Il reste cependant nécessaire de poursuivre les recherches dans chaque pays pour identifier les spécificités régionales des vecteurs.

Amélioration de la Prise en Charge Thérapeutique

La prise en charge efficace du paludisme doit répondre à de nombreuses exigences et rencontre de multiples difficultés qui concernent des facteurs allant des comportements humains à la sélection non intentionnelle de mutations induisant des résistances à cause de politiques de santé pas assez fermement mises en œuvre (9). Cela comprend entre autres la fourniture limitée de médicaments efficaces, le déploiement inadéquat de médicaments dans les zones rurales, le haut niveau de transmission et les différences écologiques entre les zones de paludisme pérenne et saisonnier, la mauvaise qualité des soins de santé (10). Cette situation est encore aggravée dans les villes par l'automédication et l'utilisation abusive de médicaments. Il faut penser également aux groupes à risque pour lesquels la prise en charge est compliquée - à savoir les enfants, les femmes enceintes, les patients souffrant de co-infections comme le VIH/Sida, les virus d'hépatites B et C (11) et les voyageurs non immuns

ne prenant pas de traitements préventifs (12). Initialement enthousiastes, les responsables de PNLP ont vite déchanté à cause du coût des interventions efficaces qui limitent leur mise en œuvre (9). Aujourd'hui, certaines de ces difficultés peuvent être surmontées grâce à des fonds provenant de l'aide bilatérale, publique et privée, même si ils ne sont pas encore suffisants.

L'application efficace d'une politique d'utilisation des médicaments repose sur deux sources fondamentales d'information qui sont de nature socio-économique et biomédicale. La gestion concertée des efforts de lutte dépend de la qualité du recueil de ces deux types de données complémentaires qui laisse encore à désirer. Les responsables de la lutte contre le paludisme devraient donc se concentrer sur 7 aspects essentiels de la prise en charge de la maladie, à savoir l'efficacité, la résistance, la transmission, l'inocuité des traitements, les épidémies, la tolérance et les coûts (13).

CONTEXTE SOCIO-ÉCONOMIQUE

La plupart des Africains doivent encore apprendre à distinguer les accès palustres des fièvres d'autres origines, et être dissuadés d'avoir recours à une prescription abusive du médecin ou à une automédication dès l'apparition d'un état fébrile banal. Cet objectif ne pourra être atteint que par l'éducation car les patients, quel que soit leur niveau d'instruction, n'ont pas compris ce qu'est le paludisme (14). La perception de cette maladie et de ses causes est encore énigmatique dans l'esprit des ruraux comme dans celui de membres de la famille de responsables de PNLP confrontés à un état fébrile. Les uns comme les autres utilisent directement la quinine, traitement réservé aux cas de paludisme compliqué. Pour la plupart des gens, la disparition de la fièvre signifie guérison de la maladie. Pour la plupart des Africains, le meilleur médicament est celui qui guérit magiquement en une seule prise (15). Comme la prise complète des médicaments nécessite une persévérance qui manque à la plupart des Africains, pour être acceptable un traitement doit être court et rapidement efficace contre les symptômes. En pratique, les posologies inadéquates, les interactions médicamenteuses, la mauvaise adhérence au traitement, la mauvaise qualité des médicaments et les diagnostics erronés empêchent une mise en œuvre efficace des politiques de santé en Afrique (6, 16).

L'ÉMERGENCE DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

Le séquençage du génome d'agents pathogènes semble avoir apporté de nouvelles approches pour leur prise en charge et leur surveillance. Dans le cas du paludisme, cela a concerné particulièrement les gènes de deux types de protéines impliquées dans le mécanisme d'action de médicaments ou dans la résistance du Plasmodium. Il s'agit d'une part de protéines cibles de médicaments impliquées dans le métabolisme parasitaire et d'autre part de protéines de transport capables de chasser la molécule médicamenteuse (17).

Tableau I- Besoins en données biomédicales pour la conduite d'une politique de médicaments antipaludiques.

Stratégie	Informations	Marqueurs moléculaires
Efficacité	Prévalence des résistances	*
	Diffusion géographique des résistances aux traitements de 1ère et 2nde intention	*
	Demi-vie du médicament	
	Absorption du médicament - Pharmacocinétique	
	Evolution de la diffusion des résistances	*
	Amélioration des taux d'hémoglobine	
Transmission	Structure génétique de la population parasitaire	*
	Potentiel du médicament à induire la génèse de gamétocytes	*
	Taux de gamétocytes indétectables pendant l'inter-saison	*
	Durée de la saison de transmission	
Dynamique de la maladie	Ratio de l'évolution des paludismes non compliqués vers les formes compliquées	
	Vulnérabilité génétique, forme compliquée du paludisme	*
	Immunité de groupe	*
	Changements climatiques	
Prévalence des résistances en zones rurales versus urbaines		*
Inocuité	Effets sur les fœtus et les nouveaux-nés	
	Femmes enceintes	
	Co-morbidités	
	Voyageurs non immuns	
Epidémies	Dose unique, action rapide, courte durée de traitement	
	Incapacité du médicament à sélectionner des résistances	*
	Effets secondaires minimes	
	Informations sur les résistances locales	*
	Incapacité du médicament à induire la génèse de gamétocytes	*
	Soulagement rapide des symptômes	
Tolérance/Compliance	Efficacité perçue -Soulagement symptomatique	
	Effets secondaires	
	Durée du traitement	
	Complexité du traitement	

Des mutations peuvent altérer le fonctionnement normal de ces protéines. La preuve d'un lien de cause à effet entre ces mutations et la résistance a été apportée par des croisements génétiques (18). L'identification de ces mutations chez les parasites résistant aux concentrations thérapeutiques sanguines et la démonstration que ces mutations sont liées à des échecs en font des marqueurs moléculaires des résistances. On considère souvent que les mutations des gènes de ces protéines impliquées dans le métabolisme parasitaire ou le transport des médicaments sont des marqueurs de résistance. Parfois les mutations sont simples, d'autres fois elles sont multiples, comme sur les gènes *pfmdr I* et *Pfcr* responsables de la résistance aux quinoléines. Dans d'autres cas, les mutations concernent plusieurs gènes comme les *dhfr* et *dhps* entraînant une résistance aux anti-foliques (19, 20). Il est enfin possible que ce soit l'augmentation du nombre de copies de gènes comme *Pfmdr* (18) qui induise des résistances à la méfloquine, à la luméfanantrine et à des dérivés de l'artémisinine (21, 22).

Comme outils de surveillance, ces marqueurs génétiques permettent d'envisager la cartographie rapide au niveau national des profils de résistance aux antipaludiques (23). Si

ils sont suffisamment corrélés aux échecs thérapeutiques, ils peuvent aider à prévoir leur importance dans un endroit donné ou en situation d'épidémie (24). Ces marqueurs ne peuvent pas encore servir au niveau individuel car la détection de parasites mutants ne signifie en aucun cas que le patient ne répondra pas au traitement, étant donné que l'issue dépend également de l'immunité, de la pharmacocinétique et d'autres facteurs internes (22, 25-27). Cependant, la difficulté d'obtenir une connaissance précise des profils de réponse au traitement dans n'importe quelle situation est maintenant compensée par l'utilisation de ces marqueurs dans des situations d'épidémies, de guerre et de changement de politiques de santé (26). Comme ces données sont généralement obtenues après l'établissement des nouvelles politiques de santé, elles pourraient être utilisées pour décider de poursuivre une politique médicamenteuse ou de changer de traitement lorsque les mutations deviennent trop fréquentes (28, 29). Le fait qu'aucun marqueur génétique ne soit clairement associé à la résistance à la plupart des nouvelles combinaisons thérapeutiques (ACT) pose un nouveau défi à la recherche afin que de tels marqueurs soient identifiés, validés et puissent être utilisés dans les décisions de politique de santé. Ces

recherches devraient faire appel aux ressources de la génomique car il est reconnu que dans le cas des artémisinines un gène peut ne pas être le seul facteur de résistance (19, 20). Le concept de biosciences ou de marqueurs moléculaires fournit une bonne base pour la traçabilité de l'évolution ou la surveillance d'une expression phénotypique de phénomènes biologiques. Le tableau I liste les besoins de données pouvant servir à l'établissement d'une politique de santé grâce à la description de marqueurs moléculaires

La pression médicamenteuse n'est pas la même pour les populations rurales et urbaines car, dans les villes, les gens ont accès à des traitements plus nombreux que dans les campagnes.

TÂCHES DES GOUVERNEMENTS RESTANTS À ACCOMPLIR

Une fois que les bonnes décisions sont prises quant à l'identification des résistances, il reste à déployer la nouvelle politique de santé au niveau national. Par exemple, au Cameroun, il est nécessaire que le gouvernement adapte la politique du médicament en fonction de l'indice de pauvreté et de son impact sur les résistances médicamenteuses (PIDR en anglais). Cet indice donne des indications sur les chances de succès d'une politique du médicament dépendant du pouvoir d'achat de la population. Cette politique ne peut réussir que si le traitement est perçu comme bon marché par les populations rurales. Si ce n'est pas le cas, et à moins que le gouvernement ne soit prêt à subventionner les médicaments, il faudra chercher des alternatives, comme des associations à base de chloroquine et d'agents réverseurs des résistances qui seraient plus abordables financièrement pour les populations rurales (30). La politique de santé doit aussi prendre en compte les habitudes d'automédication ou, même lorsque les prescriptions sont correctement établies, le fait que les patients ne prennent pas bien leur traitement à cause de l'existence de médicaments de mauvaise qualité sur le marché parallèle (31). Les gouvernements doivent à la fois combattre le marché parallèle et améliorer la perception que les gens ont du paludisme. Alors que beaucoup d'Africains attribuent la maladie ou la mort à la sorcellerie ou à la vengeance directe d'un parent, il est primordial que le gouvernement continue d'éduquer les masses, notamment quant à l'origine microbienne de la plupart de nos maladies tropicales et leur fournisse une base scientifique pour expliquer leur(s) traitement(s) (32).

Dans la refonte de sa politique de santé, le gouvernement devrait envisager d'assouplir les quotas d'importation des médicaments. Il pourrait également choisir de subventionner les médicaments pour tous les cas diagnostiqués parasitologiquement comme des cas de paludisme ou bien établir un kit combinant diagnostic gratuit et traitement. Lorsque c'est le cas, la prise en charge à domicile pourrait être intensifiée en incluant un test de diagnostic bon marché pouvant être effectué à la maison. S'il faut envisager un traitement présomptif, la maman doit avoir le médicament à sa disposition à la maison et être en mesure de « reconnaître » les symptômes du paludisme. Le gouvernement doit assumer de nombreuses responsabilités : aider les populations à bien

suivre les traitements en introduisant des médicaments d'utilisation simple, définir la prévalence de la morbidité du paludisme et savoir où focaliser son attention. En cas d'augmentation des cas de paludisme dans une population, les données de consommation de médicaments, des études de prescription, des audits de dossiers de patients et une recherche concrète de l'efficacité du traitement doivent être pratiqués régulièrement. Il faudrait organiser régulièrement des ateliers sur l'utilisation des médicaments et l'évolution des résistances pour les praticiens et les populations (16).

Les programmes de contrôle de la maladie devraient collaborer avec les organisations de financement et les ONG locales avec formation sur site de groupes petits et grands. Les niveaux de compétence et de connaissance, des soignants comme des populations à soigner, la localisation et le nombre de groupes d'experts dans une région capables de conduire des groupes de discussion doivent être encouragés comme partie prenante de l'établissement de la politique de santé. La répétition et l'extension des groupes de formations aux vendeurs de médicament incluant l'éthique, l'attention aux patients et les risques de fraude devrait faire partie des priorités des ministres de la santé.

MARCHER SUR LA CORDE RAIDE : RÉALITÉS DE LA PRISE EN CHARGE

Tous ces faits devraient fournir au gouvernement suffisamment d'informations pour faciliter la mise en œuvre d'un usage efficace des antipaludiques. Celle-ci comprend la création de directives standards de traitements et d'une liste des médicaments antipaludiques essentiels. Les gouvernements devraient créer des Comités Pharmaceutiques et Thérapeutiques et inclure des formations de pharmacologie dans la formation médicale continue ainsi que des programmes éducatifs destinés aux infirmiers et médecins. Ils devraient également développer des programmes d'intervention de petits groupes sur les vendeurs de médicaments de rue dont les produits se limitent souvent à ceux pouvant supporter les températures ambiantes. Les produits qu'ils vendent sont moins chers car ils n'ont pas de charges à payer (stockage). Les gouvernements devraient encourager le consommateur à s'impliquer dans l'éducation à la santé, tout particulièrement parce que les populations africaines doivent aussi contribuer à la pharmacovigilance. La collaboration entre recherche du secteur privé et du secteur public devrait mettre l'accent sur le suivi des indicateurs pharmaceutiques pour évaluer les réformes de la politique de santé et leur impact.

Pour que les marqueurs moléculaires soient utiles dans le déploiement des nouvelles combinaisons (ACT), il faut les identifier rapidement, les valider, les accepter et les appliquer sur le terrain malgré une dégradation du contexte socio-économique local. Cela ne pourra se faire qu'à condition qu'un effort global soit fourni. Les marqueurs sont en effet de merveilleux indicateurs pour la surveillance de la maladie. Seuls, ils ne peuvent cependant suffire à conduire une politique médicamenteuse, seulement l'orienter.

RÉFÉRENCES

- 1 - SWATI P, ANUSHA M, AZADEH S *et Coll* - Serial Analysis of Gene Expression in *Plasmodium falciparum* Reveals the Global Expression Profile of Erythrocytic Stages and the Presence of Anti-Sense Transcripts in the Malarial Parasite. *Am Soc Cell Biol* 2001 ; **12** : 3114-25.
- 2 - WHO - International Travel and Health, December 12, 2002. <http://www.who.int/ith/Countrylist03.html>.
- 3 - MBACHAM WF - Malaria: Myths, Mistakes and Management. *Biodiagnosics and Therapy* 1998 ; **2** : 4-10.
- 4 - NABARRO DN, TAYLER EM - The «Roll Back Malaria Campaign». *Science* 1998 ; **280** : 2067-8.
- 5 - WHO - Roll Back Malaria Infosheet, March 2002 www.rbm.who.int.
- 6 - BLOLAND PB - Drug Resistance in Malaria. *WHO* 2001.
- 7 - SINA B - MIM Symposium on insecticide resistance in African malaria vectors. *TDR News* 2001 ; **65** : 14.
- 8 - HII JL, SMITH T, VOUNATSOU P *et Coll* - Area effects of bednet use in a malaria endemic area in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001 ; **95** : 7-13.
- 9 - TALISUNA AO, BLOLAND P, D'ALESSANDRO U - History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clin Microbiol Rev* 2004 ; **17** : 235-54.
- 10 - NUWAHA F - The challenge of chloroquine-resistant malaria in Sub-Saharan Africa. *Health Policy Plan* 2001 ; **16** : 1-12.
- 11 - OLLIARO PL, TAYLOR WR - Antimalarial compounds: from bench to bedside. *J Exp Biol* 2003 ; **206** : 3753-9.
- 12 - RASTI N, WAHLGREN M, CHEN Q - Molecular aspects of malaria pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004 ; **41** : 9-26.
- 13 - WHITE NJ - Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest* 2004 ; **113** : 1084-92.
- 14 - BROOKER S, CLARKE S, POLACK S, COX J - The Micro-Spatial epidemiology of malaria in an epidemic-prone area of Western Kenya. London School of Hygiene and Tropical Medicine. Malaria Centre Report 2002-2003. 2003 ; 3-4.
- 15 - WHO - Malaria, Other vector borne and parasitic disease - 2002. http://www.wpro.who.int/pdt/rem53/rd/02_MVP_1.pdf.
- 16 - GARDNER B - Talking shop in Wellcome News Malaria Supplement/Research Reports p 28. - 2002. www.wellcome.ac.uk/en/malaria/Theparasite/pbdrug1.htm
- 17 - RANFORD-CARTWRIGHT LC, BALFE P, CARTER R, WALLIKER D - *Mol Biochem Parasitol* 1991 ; **46** : 185-7.
- 18 - SU X, KIRKMAN LA, FUJIOKA H, WELLEMS TE - Complex polymorphisms in an ~330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell* 1997 ; **91** : 593-603.
- 19 - MU J, FERDIG MT, FENG X *et Coll* - Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol* 2003 ; **49** : 977-89.
- 20 - VOLKMAN SK, SABETI PC, DECAPRIO D *et Coll* - A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet* 2007 ; **39** : 113-9.
- 21 - PRICE RN, UHLEMANN AC, BROCKMAN A *et Coll* - Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet* 2004 ; **364** : 438-47.
- 22 - PRICE RN, UHLEMANN AC, VAN VUGT M *et Coll* - Molecular and pharmacological determinants of the therapeutic response to artemether-lumefantrine in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect Dis* 2006 ; **42** : 1570-7.
- 23 - RINGWALD P, BICKII J, BASCO LK - *In vitro* Activity of Antimalarials Against Clinical Isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde. *Am J Trop Med Hyg* 1996 ; **55** : 254-8.
- 24 - DJIMDE AA, DOLO A, OUATTARA A *et Coll* - Molecular diagnosis of resistance to antimalarial drugs during epidemics and in war zones. *J Infect Dis* 2004 ; **190** : 853-5.
- 25 - DJIMDE A, DOUMBO OK, CORTESE JF *et Coll* - A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* 2001 ; **344** : 257-63.
- 26 - DJIMDE AA, DOUMBO OK, TRAORE O *et Coll* - Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2003 ; **69** : 558-63.
- 27 - DZINJALAMALA FK, MACHESO A, KUBLIN JG *et Coll* - Blood folate concentrations and in vivo sulfadoxine-pyrimethamine failure in Malawian children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2005 ; **72** : 267-72.
- 28 - KUBLIN JG, CORTESE JF, NJUNJU EM *et Coll* - Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* 2003 ; **187** : 1870-5.
- 29 - LAUFER MK, PLOWE CV - Withdrawing antimalarial drugs: impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Resistance Updat* 2004 ; **7** : 279-88.
- 30 - DOWLE J - Combination therapy can prolong therapeutic life in Roll Back Malaria News *RBM News* 2001 ; **4**.
- 31 - MARSH VM, MUTEMI WM, MUTURI J, MARSH K - Changing home treatment of childhood fevers by training shop keepers in rural Kenya. *Tropical Medical International Health* 1999 ; **4** : 383-9.
- 32 - WINSTANLEY P AND WATKINS B - From Molecules to Policy - Wellcome News Malaria Supplement/Research Reports. www.wellcome.ac.uk/en/malaria/Theparasite/pbdrug1.htm. 1999 ; p 33.