

# La résistance aux antipaludiques

Bruno Pradines<sup>a,\*</sup>, Jérôme Dormoi<sup>a</sup>, Sébastien Briolant<sup>a</sup>, Hervé Bogreau<sup>a</sup>, Christophe Rogier<sup>a</sup>

## RÉSUMÉ

Au cours de leur évolution, les micro-organismes ont su déjouer les pièges qui leur sont tendus par l'environnement et notamment leur hôte (immunité et utilisation de molécules anti-infectieuses). L'émergence et la diffusion de la résistance aux antipaludiques posent un sérieux problème de santé publique. *Plasmodium falciparum* est maintenant résistant à tous les antipaludiques utilisés même aux derniers commercialisés comme les associations à base d'artémisinine. Les échecs prophylactiques ou thérapeutiques entraînent une ré-émergence du paludisme s'accompagnant d'une augmentation de la transmission, de la morbidité et de la mortalité. La connaissance des mécanismes de résistance permet le développement de nouvelles molécules qui diminueront la résistance, d'identifier les cibles de nouveaux antipaludiques et enfin d'identifier des marqueurs moléculaires pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques. La résistance est souvent associée 1) à une altération d'enzymes clé qui sont des cibles d'antipaludiques, 2) à l'altération de l'accumulation de l'antipaludique dans le parasite résultant d'une diminution d'entrée ou d'une augmentation de sortie (efflux) de la molécule, voire aux deux. Des données épidémiologiques, les modes d'action, les mécanismes de résistance et les marqueurs moléculaires de résistance sont présentés pour chaque antipaludique actuellement utilisé.

**Paludisme – *Plasmodium falciparum* – résistance – antipaludiques – marqueurs moléculaires.**

## 1. Introduction

Maladie liée à la pauvreté et cause de celle-ci, le paludisme touche non seulement la santé de milliards d'individus à travers le monde mais affecte également la richesse des pays déjà pauvres où il sévit de manière endémique. Le coût global d'un accès palustre à *Plasmodium falciparum* et *P. vivax* (espèces responsables de la majorité des cas) est difficile à évaluer. Il a été estimé à environ 15 €, soit l'équivalent de 21 jours de travail d'une personne dans la plupart des zones d'endémie. Le paludisme est sans

### **a** Unité de recherche en biologie et épidémiologie parasitaires

Unité de recherche sur les maladies infectieuses et transmissibles émergentes

Unité mixte de recherche 6236

Institut de recherche biomédicale des Armées

Parc Le Pharo – Allée du Médecin-Colonel Jamot

B.P. 60109

13262 Marseille cedex 07

\* Correspondance

bruno.pradines@free.fr

article reçu le 22 mars, accepté le 6 avril 2010.

© 2010 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

## SUMMARY

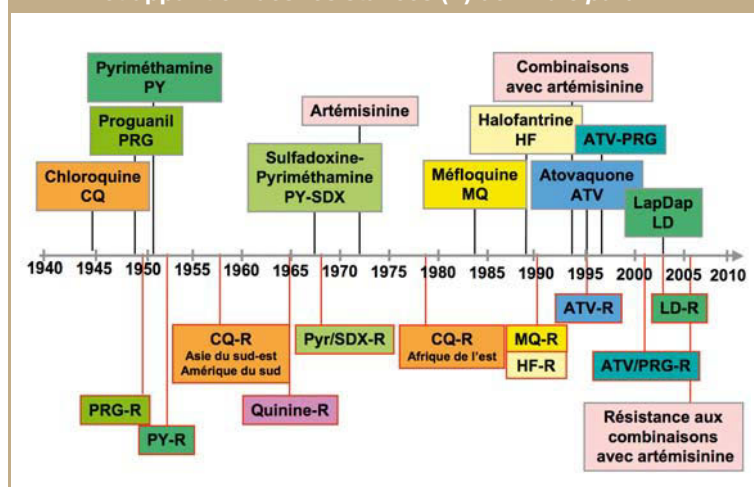
### Antimalarial drugs resistance

Throughout the course of evolution, micro-organisms have thwarted traps set by the environment including those designed by man (immunity and use of anti-infectious drugs). The emergence and spread of antimalarial drug resistance poses a severe and increasing public health threat. The *Plasmodium falciparum* parasite is now resistant to all of the used antimalarial drugs, even to the latest artemisinin-based combination treatments. Failures in prophylaxis or treatments induce the re-emergence of parasite-related morbidity and mortality. Knowledge about resistance mechanisms involved may allow the development of new drugs that minimize or circumvent drug resistance, may allow the identification of new targets for drug development and to identify molecular markers for malaria resistance surveillance. Resistance is often associated with 1) inhibition of alteration of key enzymes that are targets for anti-malarial drugs or 2) alteration of drug accumulation into the parasite which results from reduced uptake of the drug, an increased efflux, or a combination of the two processes. Epidemiological data, mode of action, mechanisms of resistance and resistance molecular markers are presented for each antimalarial drugs used at the present time.

**Malaria – *Plasmodium falciparum* – resistance – antimalarial drug – molecular marker.**

aucun doute le principal frein à l'essor économique de ces régions. On estime à plus de 2 milliards le nombre d'individus exposés au paludisme dans le monde [1] et à plus de 9 milliards d'euros la perte annuelle de PIB due au paludisme en Afrique subsaharienne, région la plus touchée. *P. falciparum* est l'espèce plasmodiale responsable de la plus grande partie de la létalité attribuable au paludisme et serait directement responsable de près d'un million de décès par an sur environ 500 millions de cas, principalement des enfants âgés de moins de 5 ans [1, 2]. *P. falciparum* est responsable de la plus grande part de la morbidité et de la quasi-totalité de la mortalité attribuées aux paludismes, essentiellement chez les enfants de moins de 5 ans. L'accès palustre simple est une affection fébrile qui peut être accompagnée par des frissons, des céphalées et des vomissements. La gravité de la maladie dépend largement du statut immunitaire de la personne infectée; soumise à des infections multiples et répétées, elle développe une immunité partielle de surinfection;

Figure 1 – Introduction des antipaludiques et apparition des résistances (R) de *P. falciparum*.



la prémunition. Cette immunité est de courte durée lorsque les infections cessent. Approximativement 5 à 10 millions d'individus infectés par an développent des formes graves de cette maladie. Ces formes graves du paludisme comprennent l'anémie, des manifestations neurologiques centrales ou des défaillances polyviscérales notamment respiratoires. Au cours de la grossesse, la sensibilité des femmes à l'infection, aux accès palustres simples et aux formes graves est augmentée.

Le développement extrêmement rapide du phénomène de résistance à de nombreux antipaludiques (chloroquine, proguanil ou méfloquine), même aux plus récents (association atovaquone-proguanil ou combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT)) (figure 1) justifie un effort continu de recherche de nouvelles molécules. Depuis les années 1940, les inhibiteurs de la synthèse des folates (sulfonamide et pyriméthamine) (Fansidar®) et les structures amino-4-quinoléines (chloroquine) (Nivaquine®) jouaient un rôle prépondérant dans la thérapie et la chimioprophylaxie de cette maladie. Le contrôle du paludisme fut facilité pendant de nombreuses années par les propriétés exceptionnelles de la chloroquine (CQ) et de la lenteur d'apparition de la chloroquinorésistance [3]. Au début des années 1960, le Programme global d'éradication du paludisme initié par l'Organisation mondiale de la Santé a conduit à une diminution significative de l'endémie palustre. La stratégie suivie, à la fois antivectorielle (assèchement des marais et usage massif d'insecticides tel que le dichlorodiphényltrichloréthane : DDT) et la mise en place d'une prophylaxie et d'une chimiothérapie du paludisme par la CQ, substitué de la quinine, peu toxique et peu chère a permis la disparition du paludisme dans le Sud de l'Europe, au Moyen-Orient et en Amérique du Nord, et une forte réduction de la morbidité palustre dans les régions subtropicales d'Asie et d'Amérique du Sud. Ce programme fut le plus efficace dans les régions où le ratio de reproduction des infections était le plus faible. Son impact dans les zones de paludisme stable, où le niveau de transmission était très élevé (et l'infrastructure des services de santé très limitée) essentiellement regroupées en Afrique intertropicale, fut transitoire et marginal.

Quinze ans plus tard, en 1969, les membres de l'Assemblée de l'Organisation mondiale de la Santé devaient en reconnaître les limites et, dans une certaine mesure, l'échec : les facultés d'adaptation du vecteur et du parasite avaient conduit à la propagation d'anophèles résistantes aux insecticides et de populations plasmodiales résistantes aux antipaludiques. L'extension de la chloroquinorésistance à l'ensemble des zones d'endémie palustre fut suivie par l'apparition et la diffusion de résistances à la plupart des autres antipaludiques non reliés structurellement (agissant donc par des mécanismes d'actions distincts) notamment les antifolates [4]. Aujourd'hui, l'état du paludisme dans le monde (40 % de la population mondiale en zones à risque ; 300 à 500 millions de nouvelles infections chaque année ; 1 million de morts annuelles) est inférieur à celui rapporté par l'Organisation mondiale de la Santé à la fin des années 40 (3 millions de décès et 300 millions de malades). En 1994, à l'initiative du Conseil économique et social des Nations-Unies, et d'un certain nombre d'organismes de recherche, il fut décidé de mettre en place un agenda global de lutte contre le paludisme sur 30 ans. Il peut être espéré que les prochaines décennies verront la mise au point de principes vaccinaux dont il est difficile pour l'heure de prédire à la fois l'éventail de protection et la durée d'action. La chimiothérapie demeurera, au moins pour les 10 prochaines années, une méthode clé pour le contrôle ou l'élimination du paludisme. Seules des molécules à mode d'action originale pourront court-circuiter les résistances alarmantes des parasites circulant aux médicaments actuels.

## 2. Résistance aux antipaludiques et méthodes d'évaluation

Malgré les efforts déployés pour la découverte de nouveaux médicaments antiplasmodiaux et la mise en place effective par les systèmes de santé de combinaisons thérapeutiques pour le traitement antipaludique, *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, y compris contre les ACT [5-7]. Ceci s'explique d'abord par la grande diversité génétique de *P. falciparum* due à un taux élevé de mutations dans son génome et par les masses très importantes de parasites portées par les individus infectés. Même si les mutations capables de conférer une résistance à un nouveau médicament sont extrêmement rares et peu probables, le nombre élevé de parasites infectant les humains fait que ces mutations finissent par apparaître et par être sélectionnées par la pression médicamenteuse. Les erreurs de réplication de l'ADN dans les cellules introduisent des mutations au hasard dans le génome et permettent le processus d'évolution. Ces mutations sont à l'origine de la grande variabilité génétique de *P. falciparum* et lorsque celles-ci ne sont ni létales pour le parasite, ni silencieuses, elles peuvent dans certains cas avantager sa survie en lui permettant par exemple d'échapper au système immunitaire de son hôte, de supporter la présence de molécules toxiques dans son environnement ou de se multiplier plus rapidement que d'autres clones.

Certaines mutations permettent au parasite de survivre en présence d'un antipaludique, qui devient résistant. La muta-

tion est ensuite transmise à ses descendants, générant ainsi une population capable de résister à une molécule. La fréquence des mutations et la vitesse à laquelle les résistances se développent dépendent des caractéristiques de la molécule utilisée, du contexte épidémiologique (intensité de la transmission) et de la façon dont les médicaments sont utilisés. Toutefois le phénotype de résistance acquis après mutation n'est pas toujours un avantage en l'absence de pression médicamenteuse. Ces mutations peuvent avoir un coût en termes de performances biologiques. Lorsque la CQ est supprimée de zones où les parasites sont chloroquinorésistants, les souches sensibles à la CQ pourraient être favorisées par rapport aux souches résistantes et les remplacer en grande partie [8]. Bien que les populations sensibles réapparaissent au détriment des souches résistantes en l'absence de sélection par la CQ, il faut cependant s'attendre à une nouvelle sélection de la population résistante si une monothérapie ou une combinaison thérapeutique à base de CQ est à nouveau utilisée [9].

Ainsi, les autres facteurs favorisant l'émergence de résistances sont i) une mauvaise utilisation des antipaludiques par les individus infectés (automédications abusives, mauvaise observance) conduisant à des traitements incomplets, ii) une indisponibilité des médicaments efficaces ou le déploiement inadéquat des médicaments sous forme de monothérapies et iii) la consommation de contrefaçons sous dosées, facteurs permettant à des parasites viables de survivre à des concentrations sub-optimales d'antipaludiques et d'être sélectionnés pour leur aptitude à résister. Ainsi, des résistances ont émergé contre la majorité des antipaludiques dans la plupart des régions endémiques. Cela concerne aussi bien les anciennes molécules ayant longtemps été utilisées en monothérapie (chloroquine, amodiaquine, sulfadoxine-pyriméthamine, quinine, méfloquine) que certaines des nouvelles molécules utilisées en bithérapie (atovaquone, artesunate, luméfantine).

Plusieurs méthodes sont couramment utilisées pour surveiller la sensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques et objectiver sa résistance [10]. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a défini en 1965 et 1973 la résistance comme la capacité du parasite à survivre et/ou à se multiplier en dépit de l'administration et de l'absorption d'un médicament donné à doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais dans les limites de la tolérance du malade [11, 12]. Il a été ajouté en 1986 que la forme active du médicament devait pouvoir atteindre le parasite ou accéder à l'intérieur de l'érythrocyte infecté pendant la durée nécessaire à son action normale. Il s'agissait de tenir compte du fait que les individus pouvaient différer par leur capacité à métaboliser les antipaludiques comme les sulfonamides et les sulfones, que les molécules antipaludiques pouvaient se lier fortement aux protéines plasmatiques et que des médicaments administrés de façon simultanée pouvaient avoir un effet antagoniste sur l'efficacité de l'antipaludique (e.g. l'acide folique peut altérer l'effet de la sulfadoxine-pyriméthamine). Pour des raisons historiques et pratiques, la définition de la résistance est donc essentiellement clinique et parasitologique. L'OMS a fait des efforts considérables pour standardiser les méthodes d'évaluation d'efficacité de médicaments

antipaludiques pendant les 40 dernières années, mais les recommandations les concernant ont changé plusieurs fois, en fonction de l'avis des experts de chaque époque et de l'avancée des connaissances. La méthode de référence de diagnostic et de surveillance des résistances est donc le test *in vivo* de l'OMS développé en 1965 et révisé en 1967, en 1972, en 1996 et enfin en 2001 [10]. Leur confirmation exige la preuve 1) que les parasites sont recrudescents chez un patient qui a récemment reçu le traitement à dose adaptée et 2) que la concentration sanguine efficace du médicament ou de ses métabolites actifs a été maintenue pour au moins quatre cycles parasitaires [10]. En effet, des résistances apparentes peuvent en fait être dues à des différences interindividuelles de pharmacocinétique des antipaludiques testés. C'est le cas par exemple de l'atovaquone, la méfloquine, l'halofantrine et la luméfantine. Les tests *in vivo* consistent à administrer une dose standard d'antipaludique à des malades infectés par *P. falciparum* et à suivre pendant au moins 28 jours la disparition des manifestations cliniques et de la parasitémie. Les principales limitations des tests *in vivo* sont leur dépendance à 1) l'observance thérapeutique, la posologie et la qualité des médicaments qui doivent normalement être strictement contrôlés au cours des essais, 2) les variations interindividuelles de pharmacocinétique (absorption, élimination, biotransformation-métabolisme du médicament absorbé, prise simultanée d'aliments), 3) l'immunité naturellement acquise des individus qui biaise les résultats vers une meilleure efficacité thérapeutique, 4) l'état nutritionnel du patient qui influence très souvent la pharmacocinétique de l'antipaludique et 5) la sensibilité et la spécificité du diagnostic parasitologique des rechutes ou de l'absence de clairance parasitaire ainsi que de la distinction entre véritable rechute et nouvelle infection.

Les tests *in vivo* impliquent le suivi prolongé d'individus ( $\geq 28$  jours) et donc une logistique importante et des ressources humaines qualifiées pour ce type d'étude clinique. Ils ne permettent de tester qu'un seul médicament par individu et qu'un petit nombre de médicaments par étude.

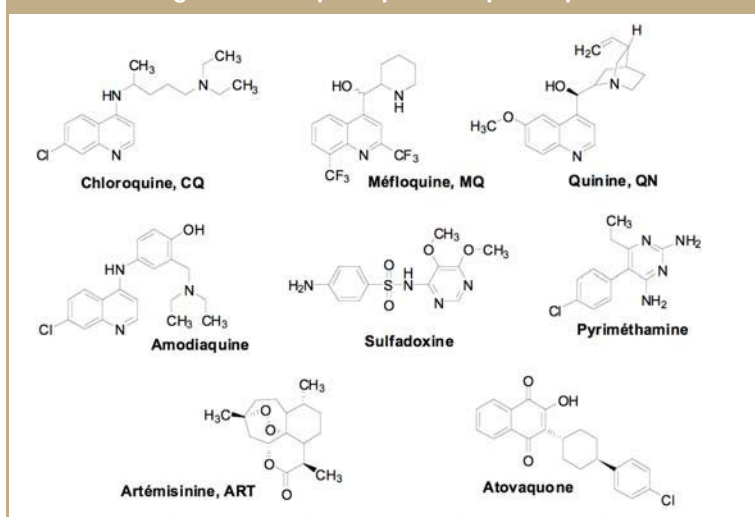
Les tests *in vitro* (i.e. inhibition de la croissance des parasites en culture par des concentrations déterminées d'antipaludiques) permettent d'étudier simultanément la sensibilité de *P. falciparum* à plusieurs antipaludiques en faisant abstraction des facteurs liés au patient comme l'immunité naturellement acquise, l'état nutritionnel, l'observance du traitement et la pharmacocinétique de l'antipaludique. Ils sont cependant chers et complexes à mettre en œuvre, ils nécessitent des infrastructures importantes, des personnels très qualifiés et spécialisés et nécessitent de plus de disposer des parasites vivants. Cela implique des délais brefs de réalisation après le prélèvement des souches et le respect de règles strictes de biosécurité. Par ailleurs, leurs résultats n'ont pas toujours été corrélés aux résultats des tests *in vivo* et ne sont pas toujours reproductibles d'une équipe à l'autre en raison de différences entre les techniques et les protocoles utilisés. Pour ces raisons, les tests *in vitro* sont utilisés pour la surveillance de la chimiosensibilité mais n'ont pas d'utilité en clinique.

Il existe enfin des tests « moléculaires ». Il s'agit des méthodes de génotypage (i.e. d'identification des variants génétiques) réalisées sur l'ADN du parasite. Ces méthodes

Tableau I – Marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* selon les antipaludiques.

Médicament	Marqueur de résistance		Niveau de validation
	Gène ou locus	Allèle associé à la résistance ou à la diminution de sensibilité	
Chloroquine	<i>pfcr1</i>	Lys76Thr	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Amodiaquine	<i>pfmdr1</i>	Asn86Tyr	Association <i>in vitro</i>
	<i>pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Méfloquine	<i>pfmdr1</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vivo</i>
Sulfadoxine-Pyriméthamine	<i>pfdhfr</i>	Ser108Asn	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhfr</i>	Triple mutation : Ser108Asn + Asn511le + Cys59Arg	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhps</i>	Ala437Gly	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhps</i>	Double mutation : Ala437Gly + Lys540Glu	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhfr</i> + <i>pfdhps</i>	Quintuple mutation : Ser108Asn ( <i>dhfr</i> ) + Asn511le ( <i>dhfr</i> ) + Cys59Arg ( <i>dhfr</i> ) + Ala437Gly ( <i>dhps</i> ) + Lys540Glu ( <i>dhps</i> )	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfmrp</i>	Lys1466Arg	Association <i>in vivo</i>
Proguanil (cycloguanil)	<i>pfdhfr</i>	Ser108Thr + Ala16Val	Association <i>in vivo</i>
	<i>pfdhfr</i>	Double/triple mutation : Ser108Asn + Asn511le et/ou + Cys59Arg	Association <i>in vivo</i>
Atovaquone	<i>pfcytb</i>	Tyr268Asn ou Tyr268Ser	Association <i>in vivo</i>
Luméfanztrine	<i>pfmdr1</i>	Asn86 & Nombre de copie > 1	Sélection d'allèle en cas d'échec thérapeutique
Quinine	<i>pfmhe-1</i> (ms4760)	Nombre de motifs : DNNND > 2 ou NHNDNHNDDDD < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Doxycycline	<i>pf tetQ</i>	Nombre de motif KYNNNN < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>pf tetQ</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
	<i>pfmdt</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
Artéméthér	<i>pfserca</i>	Ser769Asn	Association <i>in vitro</i> en Guyane

Figure 2 – Les principaux antipaludiques.



ont profité de l'essor de la biologie moléculaire et de la connaissance récente du génome de *P. falciparum*. Il s'agit de chercher les modifications des gènes du parasite impliqués dans sa résistance aux antipaludiques. Ces différents marqueurs moléculaires de résistance sont présentés dans le **tableau I**.

## 3. Les principaux antipaludiques actuels

Les recommandations pour la prophylaxie du paludisme sont présentées chaque année dans le Bulletin épidémiologique hebdomadaire ([http://www.invs.sante.fr/beh/2009/23\\_24/beh\\_23\\_24\\_2009.pdf](http://www.invs.sante.fr/beh/2009/23_24/beh_23_24_2009.pdf)). Ces recommandations s'appuient sur les données du Centre national de référence du paludisme. Les recommandations pour la prise en charge du paludisme d'importation sont revues régulièrement. La dernière révision de la Conférence de consensus date de 2007 ([http://www.sfm.u.org/documents/consensus/rbc\\_paludisme-court.pdf](http://www.sfm.u.org/documents/consensus/rbc_paludisme-court.pdf) et [http://infectiologie.com/site/medias/\\_documents/consensus/2007-paludisme-long.pdf](http://infectiologie.com/site/medias/_documents/consensus/2007-paludisme-long.pdf)). L'essentiel de l'arsenal antipaludique actuel (**figure 2**) agit sur les formes intraérythrocytaires de *P. falciparum*.

### 3.1. Les quinoléines

#### 3.1.1. La chloroquine (CQ)

La CQ est une amino-4-quinoléine de synthèse qui a fait son apparition après la seconde guerre mondiale. Efficace, rapide et bon marché, la CQ s'est imposée comme un remarquable antipaludique. Cependant, dès 1957, les premiers cas de résistance à la CQ sont apparus en Asie et en Amérique du Sud. Cette résistance s'est ensuite rapidement répandue sur les deux continents, puis en Afrique et elle touche aujourd'hui la totalité des zones d'endémie palustre. Pendant plus de 30 ans, la CQ a été le médicament de première ligne pour prévenir et traiter le paludisme. La résistance à la CQ s'est accompagnée d'une augmentation importante de la mortalité due au paludisme [13, 14].

Son activité est liée à ses propriétés d'accumulation sélective dans l'hématie parasitée et sa localisation préférentielle dans la vacuole digestive. La CQ, dont le mécanisme d'action est le plus documenté, est active exclusivement sur les formes érythrocytaires du parasite. La CQ, base soluble, traverse les différentes membranes de l'érythrocyte et du parasite et s'accumule dans la vacuole digestive acide, suivant le gradient de pH. À l'intérieur de la vacuole, la CQ est protonnée et ne peut plus traverser librement la membrane vacuolaire. Prise au piège dans la vacuole, elle y exerce son action létale pour le parasite. Selon ce mécanisme, l'entrée de CQ dans la vacuole est directement dépendante du pH. D'autres hypothèses s'accordent sur l'existence d'un transporteur permettant l'entrée de la CQ dans la vacuole digestive. Des études ont mis en évidence le lien entre l'altération du pH et l'accumulation de CQ. Par exemple, l'inhibition de pompes à protons telles que l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (*P. falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger : PfNHE) localisé dans la membrane plasmique inhiberait

l'accumulation de CQ [15], cependant d'autres études n'ont pas confirmé l'implication de cette pompe dans l'action de la CQ [16]. Le mécanisme d'action de la CQ n'est toujours pas déterminé avec précision mais serait en relation avec l'inhibition de la cristallisation de l'hème en hémotoïne, processus qui permet au parasite de se protéger de la toxicité de l'hème qu'il libère en digérant l'hémoglobine pour en récupérer les acides aminés.

C'est aussi la molécule qui a été la plus étudiée au niveau des marqueurs moléculaires de résistance. De nombreux travaux suggèrent que différents gènes, codant des protéines de transport, sont impliqués dans la résistance à la CQ [17-22]. La biologie moléculaire a permis d'affiner la compréhension de la résistance à la CQ.

Des résultats de transfection [23] ainsi que de nombreuses études établissant une association entre le génotypage d'isolats et leur phénotype [23-25] ont mis en évidence l'implication directe du gène *pfcr1* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) (chromosome 7) dans le phénomène de résistance à la CQ. Il existe plusieurs hypothèses concernant la fonction de PfCRT, la protéine de transport de la membrane de la vacuole digestive codée par *pfcr1*. PfCRT pourrait expulser activement la CQ de la vacuole digestive [26], altérer le pH ou la CQ diprotonée pourrait être transportée passivement à l'extérieur de la vacuole par PfCRT muté [27]. La mutation Lys76Thr du gène *pfcr1* (i.e. remplacement d'un acide aminé lysine par une thréonine au niveau du codon 76) est associée à la résistance à la CQ au point qu'elle est présente dans toutes les souches résistantes. La présence de cette mutation multiplie le risque de résistance *in vivo* à la CQ par 7,2 (odds ratio, OR; intervalle de confiance à 95 %, IC95 % : 4,5-11,5, méta analyse de 12 études) sur un suivi de 28 jours et par 2,1 (OR; IC95 % : 1,5-3,0, méta analyse de 13 études) sur un suivi de 14 jours [28]. Cette mutation est souvent associée à d'autres mutations du même gène (Cys72Ser, Met74Ile, Asn75Glu, Ala220Ser, Gln271Glu, Asn326Ser, Ile356Thr, Arg371Ile) dont les rôles ne sont pas clairement connus. Elles pourraient compenser l'effet de la mutation en position 76 sur la capacité du parasite à se multiplier (fitness). À ce jour, plus de 20 points de mutation de *pfcr1* ont été décrits dans la littérature [23, 27, 29-31]. Les mutations qui sont associées aux phénotypes de résistance à la CQ et à la QN sont localisées au niveau des domaines transmembranaires 1, 4 et 9 de PfCRT [32]. L'existence de souches de *P. falciparum* sensibles à la CQ et portant cependant la mutation Lys76Thr suggère que d'autres gènes pourraient être impliqués dans la résistance à la CQ.

Bien avant la découverte de *pfcr1*, les études réalisées pour élucider la base moléculaire de la résistance à la CQ avaient conduit à identifier le gène *pfmdr1*. Le gène *pfmdr1* (chromosome 5) code la P-glycoprotéine homologue (Pgh1), une protéine de la superfamille des ABC transporteurs, homologue des pompes d'efflux de médicaments présentes dans des cellules résistantes aux anticancéreux [33]. Cinq points de mutation ont été décrits au niveau des 5 codons suivants : N86Y, Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y [34]. La mutation Asn86Tyr a aussi été associée à la résistance à la chloroquine dans certaines études et pas d'autres. La présence de cette mutation est associée à une multiplication du risque de résistance *in vivo* à la

chloroquine par 2,2 (OR; IC95 % : 1,6-3,1, méta analyse de 11 études) sur un suivi de 14 jours et par 1,8 (OR; IC95 % : 1,3-2,4, méta analyse de 11 études) sur un suivi de 28 à 42 jours [28]. Ces associations étaient cependant considérées comme fragiles. En effet, dans plusieurs études, la mutation Asn86Tyr a été trouvée préférentiellement associée à la mutation Lys76Thr du gène *pfcr1*. La combinaison de ces deux mutations (*pfmdr1* Asn86Tyr + *pfcr1* Lys76Thr), multiplie le risque de résistance *in vivo* à la chloroquine par 3,9 (OR; IC95 % : 2,6-5,8, méta analyse de 5 études) [28], ce qui ne diffère pas de ce qui a été observé pour la mutation *pfcr1* Lys76Thr prise isolément (OR de 2,1 à 7,2). Le rôle du gène *pfmdr1* dans la résistance à la chloroquine, est donc controversé et ne peut être que limité [35]. Le polymorphisme de *pfmdr1* ne semble pas directement lié au phénotype de résistance à la CQ mais semble moduler son niveau de résistance *in vitro* [36].

Le gène *pfmrp* (chromosome 1) code un ABC transporteur de la membrane vacuolaire qui pourrait être un transporteur de glutathion conjugué aux catabolites toxiques de la dégradation de l'hème [37,38]. Deux mutations His191Tyr et Ser437Ala semblent être associées à une diminution de sensibilité *in vitro* à la CQ [39-42].

### 3.1.2. La quinine (QN)

La QN était utilisée par les médecins avant même que le paludisme soit une maladie parasitaire reconnue. La QN reste le principal antipaludique recommandé dans le traitement du paludisme grave et chez la femme enceinte en Europe et en Afrique. Elle est un antipaludique efficace cliniquement contre des souches résistantes à la CQ ou à la méfloquine (MQ). Les premiers cas documentés de résistance à la QN ont été rapportés dans les années 1960 au Brésil et en Asie du Sud-Est [43,44] puis deviennent moins rares depuis les années 1980 en Asie, Amérique du Sud et en Afrique [45-48]. En Asie du Sud-Est, la QN est utilisée en association avec la tétracycline [49,50] ou la clindamycine [51]. Elle est associée maintenant dans le traitement du paludisme en Guyane. La QN se lie aussi à l'hème [52] et inhibe la cristallisation de l'hème [53]. Le complexe quinine-hème est capable d'endommager les membranes parasitaires par peroxydation lipidique [54] et par libération d'hème en présence de glutathion [55]. La sensibilité des isolats à la QN est généralement indépendante de celle à la CQ ou à la MQ. Cela suggère que les mécanismes de résistance à la QN sont différents de ceux de la résistance à la CQ ou à la MQ. Le phénotype de réponse à la QN semble affecté par les gènes *pfcr1* [56] et *pfmdr1* [36]. L'introduction expérimentale de mutations sur *pfmdr1* a été associée *in vitro* à une résistance à la QN [39]. Alors que la surexpression *in vitro* du gène *pfmdr1* entraîne une résistance à la fois à la QN et à la MQ [57,58], les isolats résistants à la MQ sont le plus souvent sensibles à la QN et vice versa [59]. Cependant, la QN reste efficace contre des souches résistantes à la CQ, indiquant que les phénotypes de réponse à la QN sont sans doute affectés par d'autres gènes. Cette hypothèse est étayée par l'identification de 5 gènes supplémentaires associés significativement à la réponse à la QN d'isolats de *P. falciparum* provenant de trois continents différents [39]. Le polymorphisme du gène *pfmhe-1* semble associé à la résistance à la QN [60,61].

Des répétitions en tandem de motifs peptidiques de *pNHE-1* (codé par la région microsatellite intragénique *ms4760*) ont été trouvées associées à des diminutions de sensibilité *in vitro* d'isolats ou de clones de *P. falciparum* adaptés à la culture. Ce gène code un échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  situé dans la membrane plasmique du parasite (contrairement aux autres transporteurs impliqués dans la résistance aux quinoléines qui sont localisés dans la membrane vacuolaire) qui pourrait réguler le pH cytoplasmique ou de la vacuole digestive du parasite. Des perturbations de ce pH liées à ce transporteur pourraient altérer l'activité de la QN [62]. Si ces observations sont confirmées *in vivo*, les profils de répétitions pourraient devenir des marqueurs moléculaires de baisse de sensibilité ou de résistance à la QN.

### 3.1.3. L'amodiaquine (AQ)

L'AQ a récemment connu un regain d'intérêt, dans le traitement de l'accès simple, en association avec les dérivés de l'artémisinine (ACT) et plus particulièrement en association avec l'artésunate, leur combinaison ayant un pouvoir synergique puissant. Le mode d'action de l'AQ semble être le même que celui de la CQ. L'accumulation de l'AQ est corrélée à celle de la CQ et est aussi diminuée chez les isolats chloroquinorésistants [63]. Des résistances croisées à CQ et AQ ont été observées *in vivo* et *in vitro* [64], cependant il existe des souches qui ne présentent pas de résistance croisée *in vitro* [65]. Les taux d'échecs parasitologiques et cliniques à l'AQ sont plus faibles que ceux à la CQ, dans le traitement d'enfants en Gambie [66] et au Sénégal, au Cameroun, au Gabon et au Congo [67,68]. L'AQ semble plus efficace que la CQ même dans des zones où la résistance à la CQ est élevée [69]. Il semblerait que l'utilisation de l'AQ dans les ACT sélectionnerait des parasites de sensibilité diminuée à la monodéséthylamodiaquine, le métabolite actif de l'AQ, suggérant une perte d'efficacité rapide de cette association en Afrique [70]. Du fait de sa toxicité pour le foie et la moelle osseuse dans les traitements de longue durée, elle n'est pas recommandée en prophylaxie.

Peu d'études ont exploré les bases moléculaires de la résistance à l'AQ, les études réalisées font l'hypothèse de certains points communs entre l'AQ et la CQ. La résistance à l'AQ semble être liée aux gènes *pfcr1* [52] et *pfmdr1* [71-73]. La présence de la mutation *Asn86Tyr* sur *pfmdr1* multiplie le risque de résistance *in vivo* à l'amodiaquine par 5,4 (OR; IC95 % : 2,6-11,2, méta analyse de 6 études) [28] et par 7,9 ( $p < 0.01$ ) le risque d'échec thérapeutique par la combinaison amodiaquine plus sulfadoxine-pyriméthamine [74].

### 3.1.4. La méfloquine (MQ)

Autre molécule de synthèse, la méfloquine est un arylaminoalcool. Elle a fait son apparition à la fin des années 1970. Elle reste une des molécules recommandée pour la prophylaxie en zone de poly-résistance. La MQ a été utilisée avec efficacité sur des souches poly-résistantes de *P. falciparum* [75] et notamment comme traitement de première ligne d'accès simples de paludisme en Thaïlande après la QN. Depuis, il a été observé une diminution de son efficacité dans certaines régions [76], et notamment l'apparition et la propagation de souches résistantes en

Asie [77]. Elle reste très largement utilisée en Asie associée à l'artésunate. Cependant, même des résistances à l'association artésunate-MQ se sont développées sur le continent asiatique [78-80].

Des études ont montré une association entre la résistance à la MQ et l'amplification du nombre de copies de *pfmdr1* dans le génome [81-83], une mutation sur *pfmdr1* [84], ou les deux [57]. L'augmentation du nombre de copies du gène *pfmdr1* (de 1 à 2 copies ou plus) a été associée à la résistance à la MQ avec un risque de résistance *in vivo* multiplié par 8,6 (OR; IC95 % : 3,3-22,9) et à un risque significativement élevé de résistance *in vivo* à l'association artésunate-méfloquine [28,85]. Cependant l'association entre le nombre de copies de *pfmdr1* dans le génome ou des mutations sur *pfmdr1* n'est pas absolue [86] suggérant l'existence d'autres mécanismes de résistance pour MQ qui impliquent des gènes encore méconnus [87]. De plus, l'association entre diminution de sensibilité à la MQ et augmentation du nombre de copies de *pfmdr1* n'a jamais été montré pour des souches provenant du continent Africain. Lorsque le nombre de copie du gène *pfmdr1* est augmenté, sa séquence nucléotidique est généralement dépourvue de mutation (allèle dit «sauvage») [84].

Au cours des dernières années, de nouvelles quinoléines ont fait leur apparition sur le marché des antipaludiques, essentiellement utilisées en association avec les dérivés de l'artémisinine (luméfantrine, pyronaridine, pipéraquline). L'augmentation du nombre de copies du gène *pfmdr1* (de 1 à 2 copies ou plus) a été associée à la résistance à la luméfantrine [84]. Les résistances à l'AQ (associée à la mutation *Asn86Tyr* et à une copie unique du gène *pfmdr1* dans le génome du parasite) d'une part et à la MQ ou la luméfantrine (associées à une augmentation du nombre de copie du gène *pfmdr1*, sans mutation) d'autre part semblent sélectionnées de façon opposées [73, 84].

## 3.2. Dérivés de l'artémisinine (ART)

L'artémisinine (ART) est un alcaloïde naturel extrait de l'armoise *Artemisia annua*. Bien que les vertus de cette plante soient connues en Chine depuis plus de 2000 ans, elle n'a été étudiée en Occident qu'à partir des années 1970 et introduite dans la pharmacopée antipaludique à la fin de la décennie. Il a pourtant fallu attendre le début des années 1990, et les graves problèmes de chloroquinorésistance, pour qu'elle soit utilisée hors de Chine et de Birmanie. En 2001, l'OMS considérait que l'ART était «le plus grand espoir mondial contre le paludisme». Elle agit très rapidement ( $C_{\text{max}}$  par voie orale  $< 2$  h et demi-vie  $< 1$  h) mais elle ne permet pas d'éliminer complètement tous les parasites, d'où la nécessité de l'associer à d'autres antipaludiques (ACT). Depuis 2001, plus de 60 pays ont adopté officiellement les ACT en traitement de première ligne [88, 89]. Différentes associations sont commercialisées ou en cours d'évaluation (artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine, artésunate-amodiaquine, artemether-luméfantrine, artésunate-méfloquine, artésunate-chloro-proguanil-dapsone, artésunate-atovaquone-proguanil, dihydroartémisinine-pipéraquline et artésunate-pyronaridine). L'utilisation des ACT s'est accompagnée d'une diminution drastique de la transmission, de la morbidité et de la mortalité par paludisme dans de nombreuses

zones d'endémie [1, 90]. Mais déjà, les premiers cas d'échecs cliniques aux ACT ont été identifiés en Asie du Sud-est [5-7].

C'est un pont endoperoxyde (O-O) qui est à la base de l'activité de l'ART et de ses dérivés, les analogues qui en sont dépourvus étant inactifs. En présence du fer de l'hème, ces ponts se rompent pour former un radical libre de type alkyl qui forme un lien covalent avec l'hème. L'ART peut donc être considérée comme un composé pro-oxydant. De plus, l'alkylation de protéines spécifiques par l'ART a été montrée [91]. Une de ses cibles appartiendrait à la famille des protéines de contrôle tumoral (TCTP) [92]. Une autre pourrait être la PfATPase6 (PfSERCA), une enzyme ATPase calcium-dépendante, essentielle pour la survie du parasite [93, 94]. En 2002-2003, la mutation Ser769Asn de ce gène a été trouvée associée à une diminution de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à l'artéméter (concentration inhibitrice 50 % > 30 nmol/L) en Guyane mais pas au Cambodge ni au Sénégal [93]. Cette mutation n'a pas été trouvée associée à la résistance *in vivo* à l'artésunate à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande [7]. De plus, ce gène présente une grande diversité génétique qui serait associée à des zones géographiques [95, 96].

### 3.3. Hydroxynaphtoquinones : atovaquone (ATV)

Les premières évaluations de l'ATV dans les accès simples de *P. falciparum* ont montré une bonne réponse, mais associée à un taux de recrudescence élevé [97] pouvant atteindre 30 % [98]. Afin d'éviter l'apparition rapide de résistances à l'atovaquone, sa combinaison avec le proguanil a été développée. Cette association est synergique *in vitro* [99, 100] et l'efficacité clinique de cette association a largement été démontrée [101, 102]. Cette association atovaquone-proguanil (ratio 2,5-1) est désormais commercialisée sous le nom de Malarone®. Elle est recommandée en prophylaxie dans les zones de résistance à la chloroquine et de multi-résistance et dans le traitement de l'accès simple à *P. falciparum* en France. L'atovaquone est une naphtoquinone analogue du coenzyme Q qui tue le parasite en inhibant indirectement la dihydroorotate réductase, quatrième enzyme de la synthèse des bases pyrimidines [103, 104]. L'atovaquone se lie au complexe bc1 (complexe III), responsable de l'oxydation de l'ubiquinone générée par différentes déshydrogénases et de la réduction du cytochrome c, qui est ensuite lui-même oxydé par la cytochrome c oxydase [105]. L'analyse de la séquence d'acides aminés constituant le cytochrome b plasmodial montre qu'il diffère de celui des autres organismes [106]. Le proguanil, qui seul n'a aucune action sur le potentiel membranaire de la mitochondrie, augmente la capacité de l'atovaquone à collapser ce potentiel lors de l'association [100]. Ceci explique l'efficacité de cette association dans des régions où de nombreux échecs au proguanil sont observés [98]. *Pfcytb* (génomme mitochondrial) code le cytochrome b qui est la cible moléculaire de l'atovaquone. Ses mutations Tyr268Asn et Tyr268Ser induisent une diminution très importante de la sensibilité du cytochrome b à l'atovaquone et sont associées à la résistance du parasite à

cette molécule [107, 108]. Ces mutations sont très rares dans les populations générales de *P. falciparum* et elles ne sont généralement détectées qu'à l'occasion des échecs thérapeutiques ou prophylactiques de l'association atovaquone-proguanil [109-111].

### 3.4. Cyclines : doxycycline (DOX)

La DOX, un antibiotique de la famille des cyclines, est recommandée en prophylaxie dans les zones de multi-résistances ou en association à la méfloquine ou la quinine dans le traitement de l'accès simple ou de l'accès grave à *P. falciparum* [112, 113]. Les tétracyclines agiraient en diminuant l'activité enzymatique de la dihydroorotate déshydrogénase chez *P. falciparum* [114, 115], probablement en inhibant sa synthèse. La DOX diminue le taux de nucléotides et de désoxynucléotides [116]. Il est à noter que certains antibiotiques dont la DOX et l'azithromycine peuvent inhiber la synthèse protéique par inhibition de certaines fonctions de l'apicoplaste (un reliquat possible d'un chloroplaste) chez *P. falciparum* [117, 118]. Il a été décrit quelques isolats avec des sensibilités *in vitro* diminuées à la DOX [119] mais aucune résistance *in vivo* de *P. falciparum* à la DOX n'a cependant encore été décrite à ce jour [112, 113]. Différents gènes pourraient être impliqués dans la diminution de sensibilité *in vitro* à la DOX des isolats de *P. falciparum* [120]. *PftetQ* (*P. falciparum* tetracycline resistance TetQ gene) coderait une protéine de la famille des GTPases et possède des similitudes avec des gènes impliqués dans la résistance de bactéries aux cyclines. *Pfmdt* (*P. falciparum* multidrug transporter gene) coderait une protéine de transport membranaire de médicaments analogue à la tetracycline resistance protein TetA, une pompe d'efflux responsable de la résistance de bactéries à la doxycycline. Un nombre de copies supérieur à un du gène *pftetQ* ou du gène *pfmdt*, ainsi qu'un nombre de répétitions inférieur à trois d'un motif de six acides aminés (KYNNNN) de la protéine codée par *pftetQ* ont été trouvées associées à une diminution de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à la doxycycline [120].

### 3.5. Antifoliniques : pyriméthamine (PY) et proguanil (PRG)

L'invasion de l'Indonésie par les Japonais pendant la seconde guerre mondiale a privé les armées alliées de leur unique source d'antipaludique, la quinine. Ceci a conduit à une recherche intensive et au développement du proguanil. Le succès du PRG [121] a stimulé la recherche sur les dérivés des pyrimidines et la synthèse de la PY [122]. Cependant, leur efficacité a rapidement diminué en raison du développement rapide d'une résistance du parasite contre cette famille de molécules. Dans les années 50, dans une étude menée en Tanzanie, la PY était administrée tous les mois en prophylaxie à des habitants d'un village rural. Initialement, il n'y avait pas d'échec clinique. Au troisième mois, on notait 8 % d'échecs cliniques puis 37 % au cinquième mois. Au bout d'un an, on recensait plus de 50 % d'échecs cliniques après une prise hebdomadaire de PY [123]. Après huit ans, on notait 20 à 40 % d'échecs cliniques à la PY lors de son introduction à 20 km du village initial, 3 à 15 % d'échecs entre 20 et

75 km, et un cas d'échec à plus de 225 km du lieu originel de pression médicamenteuse. Cette émergence très rapide de la résistance à la PY en réponse à une pression locale a été suivie rapidement par une propagation de la résistance à la PY. La PY a été alors associée à un sulfonamide, la sulfadoxine (SFX). Il y a moins de cinq ans, cette association était encore recommandée par la plupart des pays africains pour le traitement de première ligne de l'accès simple à *P. falciparum*. Malheureusement, la résistance à l'association SFX/PY s'est étendue rapidement. Cette association connaît actuellement un regain d'intérêt pour son utilisation en prophylaxie (traitement préventif intermittent) chez les enfants et les femmes enceintes en zone d'endémie [124, 125].

Le PRG est associé à la chloroquine en prophylaxie. Mais, de plus en plus de souches sont résistantes à la chloroquine et au métabolite actif du PRG, le cycloguanil (CYG). Le CYG et la PY agissent sur la voie des folates. Leur structure chimique est relativement similaire à celles des analogues de la pyrimidine [122]. Le CYG et la PY sont des inhibiteurs de la dihydrofolate déshydrogénase (DHFR) chez *P. falciparum*, une enzyme appartenant à la voie de synthèse des folates qui est essentielle à la synthèse de l'ADN [126, 127]. L'enzyme de souches modérément et très résistantes à la PY fixent de 15 à 500 fois moins la PY que celle de souches sensibles [128]. Il est vraisemblable que des mutations sur le gène DHFR altèrent la structure de la protéine et diminuent son affinité pour la PY et le CYG conduisant à une résistance aux inhibiteurs de la DHFR. *Pfdhfr* est le gène (chromosome 4) qui code la DHFR. La mutation Ser108Asn du gène de la DHFR est associée à la résistance de *P. falciparum* aux antifoliques [129, 130]. La présence de cette mutation multiplie le risque de résistance *in vivo* à la SFX/PY par 2,2 (OR; IC95 % : 1,4-3,3, méta analyse de 18 études) [28]. Les mutations additionnelles Asn51Ile, Cys59Arg ou Ile164Leu augmentent cette résistance, l'association des quatre mutations étant responsable du niveau le plus élevé de résistance aux antifoliques et à l'association SFX/PY. La triple mutation des codons 108, 51 et 59 est souvent observée en Afrique ou en Asie chez les souches résistantes à la SFX/PY. Cette triple mutation multiplie le risque de résistance *in vivo* à la SFX/PY par 4,3 (OR; IC95 % : 3,0-6,3, méta analyse de 16 études) [28]. C'est généralement cette triple mutation qui est considérée comme le meilleur facteur prédictif de la résistance *in vivo* à la SFX/PY. La détection de la mutation Ser108Asn est quant à elle prédictive de la présence des deux autres mutations. En Amérique du Sud, la mutation du codon 59 est moins fréquente et la mutation Cys50Arg la remplacerait. La mutation Ile164Leu mais aussi les mutations Asn188Lys, Ser189Arg et Val213Ala, sont plus rares et peuvent être associées à des niveaux élevés de résistance à la PY.

De plus, une autre mutation Lys1466Arg sur le gène *pfmrp* (cf 3.1.1) serait impliquée dans la sensibilité à l'association SFX/PY [131]. PFMRP serait aussi un transporteur de folate et la forme mutée 14466Arg permettrait un efflux plus important du folate intraérythrocytaire, diminuant ainsi la compétition entre le folate et la PY et une meilleure efficacité clinique de la SFX/PY.

### 3.6. Antifoliques : sulfones (dapsone) et sulfonamides (sulfadoxine)

Les sulfones et les sulfonamides ont été très utilisés pendant la seconde guerre mondiale puis nettement moins avec l'utilisation de la CQ et de la PY. Le plus utilisé des sulfonamides en Afrique est la sulfadoxine (SFX) en association avec la PY. Les sulfones et les sulfonamides inhibent la dihydroptéroate synthase (DHPS) de *P. falciparum* [132, 133]. La DHPS est une autre enzyme de la voie des folates qui est inhibée par la SFX et la dapsone dont elle est la cible moléculaire [129, 130]. Ces composés sont des analogues du PABA et agissent comme inhibiteurs compétitifs de la DHPS [133]. Les antifoliques et les sulfamides agissant à deux niveaux de la même voie métabolique. Cela explique l'effet synergique qu'ils ont en association (22, 23). Cette enzyme est bifonctionnelle. Son expression chez *E. coli* et sa purification indiquent une protéine de 83 kDa alors que par gel filtration, sa masse moléculaire est estimée entre 207 et 246 kDa, ce qui suggère que cette enzyme est formée de 2 à 3 sous-unités [133]. Le gène de la DHPS a été cloné en 1994 [134, 135]. L'analyse de séquences du gène de la DHPS montre des différences d'acides aminés entre des souches sensibles et résistantes à la SFX [134, 135]. Les mutations Ser436Ala, Ser436Phe, Ala437Gly et Lys540Glu du gène *dhps* confèrent une résistance à la SFX [136, 137]. En particulier, la mutation isolée Ala437Gly et la double mutation Ala437Gly + Lys540Glu sont respectivement associées à une multiplication du risque de résistance *in vivo* à la SFX/PY par 1,5 (OR; IC95 % : 1,0-2,4, méta analyse de 12 études) et 3,9 (OR; IC95 % : 2,6-5,8, méta analyse de 10 études) [28]. Les mutations Ala581Gly et Ala613Thr/Ser sont rares, en particulier en Afrique, mais pourraient être associées à des degrés élevés de résistance. La combinaison de la triple mutation *dhfr* Ser108Asn + Asn51Ile + Cys59Arg et de la double mutation *dhps* Ala437Gly + Lys540Glu (« quintuple mutation ») multiplie le risque de résistance *in vivo* à la SFX/PY par 5,2 (OR; IC95 % : 3,2-8,8, méta-analyse de 3 études) [28].

## 4. Avenir

Les récents progrès dans l'identification et le développement de nouvelles molécules devraient permettre d'avoir un choix plus important d'antipaludiques. Ceci devrait partiellement résoudre le dilemme auquel font face la plupart des agences de contrôle du paludisme : distribuer à grande échelle les antipaludiques les plus efficaces et minimiser le développement et l'extension des résistances. D'autre part, il est nécessaire de surveiller efficacement l'apparition et la diffusion des résistances aux antipaludiques en associant tests *in vivo*, tests *in vitro*, identification des marqueurs moléculaires et pharmacocinétiques, à l'échelle d'un pays, d'un continent ou du monde comme le préconise le réseau WWARN (WorldWide Antimalarial Resistance Network) qui associe cliniciens, biologistes, chercheurs, épidémiologistes, biostatisticiens [138-140]. Il est nécessaire d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires pour les antipaludiques actuellement utilisés en traitement de première ligne et de les valider par rapport à l'efficacité thérapeutique parasito-clinique des



antipaludiques (i.e. par tests *in vivo*). Le développement des méthodes de biologie moléculaire haut débit, la disponibilité des séquences nucléotidiques de génomes de *P. falciparum* et la collaboration étroite entre chercheurs fondamentaux, cliniciens et responsables des programmes nationaux de lutte contre le paludisme sont les principaux atouts pour le développement de marqueurs moléculaires de résistances de *P. falciparum* aux antipaludiques. Cela

devrait faciliter l'identification et la validation de marqueurs moléculaires de la résistance à l'artésunate et aux autres dérivés de l'artémisinine. Il faut renforcer les équipes qui réalisent les tests *in vitro* qui sont les seuls à permettre actuellement d'évaluer la sensibilité des isolats de *P. falciparum* à tous les antipaludiques et aux associations.

Conflit d'intérêt : aucun

## Références

- [1] WHO. The world malaria report 2008. Geneva: World Health Organization; 2008. WHO/HTM/GMP/2008.1.
- [2] Snow RW, Guerra CA, Noor AM, et al. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005;434:214-17.
- [3] Wellems T, Plowe C. Chloroquine-resistance malaria. *J Infect Dis* 2001;184:770-6.
- [4] Yuthavong Y. Basis for antifolate action and resistance in malaria. *Microb Infect* 2002;4:175-82.
- [5] Noedl H, Se Y, Schaecher K, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008;359:2619-20.
- [6] Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis* 2008;14:716-9.
- [7] Dondorp A, Nosten F, Yi P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009;361:455-67.
- [8] Hayward R, Saliba KJ, Kirk K. Pfmdr1 mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiology* 2005;55:1285-95.
- [9] Noranate N, Durand R, Tall A, et al. Rapid dissemination of *Plasmodium falciparum* drug resistance despite strictly controlled antimalarial use. *PlosOne* 2007;2:e139.
- [10] WHO. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring: 1996-2004. Geneva: World Health Organization; 2005. WHO/HTM/MAL/2005.1103.
- [11] WHO. Resistance of malaria parasites to drugs: World Health Organization; 1965.
- [12] WHO. Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. Report of a WHO Scientific Group.: World Health Organization; 1973.
- [13] Trape JF, Pison G, Preziosi MP, et al. Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. *C R Acad Sci III* 1998;321:689-97.
- [14] Trape JF. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001;64(1-2 Suppl):12-7.
- [15] Wunsch S, Sanchez CP, Gekle M, et al. Differential stimulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*. *J Cell Biol* 1998;140:335-45.
- [16] Bray PG, Ward SA, Ginsburg H. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, chloroquine uptake and drug resistance: inconsistencies in a newly proposed model. *Parasitol Today* 1999;15:360-3.
- [17] Pradines B, Pages JM, Barbe J. Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance. *Curr Drug Targets - Infect Disorders* 2005;5:411-31.
- [18] Henry M, Alibert S, Orlandi-Pradines E, et al. Chloroquine resistance reversal agents as antimalarial drugs. *Curr Drug Targets* 2006;7:935-48.
- [19] Henry M, Alibert S, Rogier C, et al. Inhibition of efflux of quinolines as new therapeutic strategy in malaria. *Current Topics Med Chem* 2008;8:563-78.
- [20] Alibert-Franco S, Pradines B, Mahamoud A, et al. Efflux mechanism, a new target to combat multidrug resistant pathogen. *Current Med Chem* 2009;16:301-17.
- [21] Pradines B, Parquet V, Orlandi-Pradines E. ABC transporters in *Plasmodium* and their involvement in resistance to antimalarial drugs. In *ABC Transporters in Microorganisms*, Ponte-Sucre A. (ed), Caister Academic Press, Wymondham, UK, 2009, 113-28.
- [22] Pradines B. ABC proteins involved in protozoan parasite resistance. In *ABC Transporters and Multidrug Resistance*, Boumendjel A., Boutonnat J., Robert J. (eds), J Wiley & Sons Inc., 2009, 195-238.
- [23] Fidock DA, Nomura T, Talley AK, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000;6:861-71.
- [24] Chen N, Russell B, Staley J, et al. Sequence polymorphisms in *pfcr* are strongly associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 2001;183:1543-5.
- [25] Basco LK, Ringwald P. Analysis of the key *pfcr* point mutation and *in vitro* and *in vivo* response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. *J Infect Dis* 2001;183:1828-31.
- [26] Sanchez CP, McLean JE, Stein W, et al. Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry* 2004;43:16365-73.
- [27] Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, et al. Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Mol Cell* 2004;15:867-77.
- [28] Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, et al. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. *Malar J* 2009;8:89.
- [29] Chen N, Kyle DE, Pasay C, et al. Pfcr Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3500-5.
- [30] Durrand V, Berry A, Sem R, et al. Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (Pfcr) and their relationship to chloroquine resistance *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol* 2005;136:273-85.
- [31] Cooper RA, Hartwig CL, Ferdig, MT. Pfcr is more than the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance gene: A functional and evolutionary perspective. *Acta Trop* 2005;94:170-80.
- [32] Cooper RA, Lane KD, Deng B, et al. Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. *Mol Microbiol* 2007;63:270-82.
- [33] Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, et al. Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science* 1999;244:1184-6.
- [34] Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, et al. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1990;345:255-8.
- [35] Duraisingh M, Cowman A. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop* 2005;94:181-90.
- [36] Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, et al. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2000;403:906-9.
- [37] Raj DK, Mu J, Jiang H, et al. Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *J Biol Chem* 2009;284:7687-96.
- [38] Klokouzas A, Tiffert T, van Schalkwyk D, et al. *Plasmodium falciparum* expresses a multidrug resistance-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:197-201.
- [39] Mu J, Ferdig MT, Feng X, et al. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol* 2003;49:977-89.
- [40] Henry M, Briolant S, Fontaine A, et al. *In vitro* activity of ferroquine is independent of polymorphisms in transport protein genes implicated in quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2755-9.

- [41] Parquet V, Briolant S, Torrentino-Madamet M, et al. Atorvastatin is a promising partner for antimalarial drugs in treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2248-52.
- [42] Ursing J, Zakeri S, Gil JP, et al. Quinoline resistance associated polymorphisms in the *pfcr1*, *pfmdr1* and *pfmrp* genes of *Plasmodium falciparum* in Iran. *Acta Trop* 2006;97:352-6.
- [43] Bjorkman A, Phillips-Howard PA. The epidemiology of drug-resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:177-80.
- [44] Giboda M., Denis MB. Response of Kampuchean strains of *Plasmodium falciparum* to antimalarials: *in-vivo* assessment of quinine and quinine plus tetracycline; multiple drug resistance *in vitro*. *J Trop Med Hyg* 1988;91:205-11.
- [45] Harinasuta T, Bunnag D, Lasserre R. Quinine resistant falciparum malaria treated with mefloquine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990;21:552-7.
- [46] Jelinek T, Schelbert P, Löscher T, et al. Quinine resistant falciparum acquired in east Africa. *Trop Med Parasitol* 1995;46:38-40.
- [47] Tish KN, Pillans PI. Recrudescence of *Plasmodium falciparum* malaria contracted in Lombok, Indonesia after quinine/doxycycline and mefloquine: case report. *N Z Med J* 1997;110:255-6.
- [48] Pradines B, Pistonne T, Ezzedine K, et al. Quinine-resistant malaria in traveler returning from Senegal. *Emerg Infect Dis* 2010;16:546-8.
- [49] Duarte EC, Fontes CJ, Gyorkos TW, et al. Randomized controlled trial of artesunate plus tetracycline versus standard treatment (quinine plus tetracycline) for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54:197-202.
- [50] Looreesuwan S, Wilairatana P, Vanijanonta S, et al. Efficacy of quinine-tetracycline for acute uncomplicated falciparum malaria in Thailand. *Lancet* 1992;339:369.
- [51] Kreamer PG. Clindamycin in malaria treatment. *J. Antimicrob Chemother* 1990;25:9-14.
- [52] Gushimana Y, Doepner B, Martinez-Hackert E, et al. Kinetics of quinine-deuteriohematin binding. *Biophys Chem* 1993;47:153-62.
- [53] Dorn A, Vippagunta S, Matile H, et al. An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerization by quinoline antimalarials. *Biochem Pharmacol* 1998;55:727-36.
- [54] Sugioka Y, Suzuki M. The chemical basis for the ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex induced lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1074:19-24.
- [55] Atamna H, Ginsburg H. Heme degradation in the presence of glutathione. *J Biol Chem* 1995;270:24876-83.
- [56] Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr1* mutations. *Science* 2002;298,210-3.
- [57] Peel SA, Bright P, Yount B, et al. A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (*pfmdr1*) *Plasmodium falciparum in vitro*. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:648-58.
- [58] Cowman AF, Galatis D, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1143-7.
- [59] Ang HH, Chan KI, Mak JW. Variability in schizonticidal drug susceptibility amongst clones and isolates of *Plasmodium falciparum* Chemotherapy 1997;43:142-7.
- [60] Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, et al. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol* 2004;52:985-97.
- [61] Henry M, Briolant S, Zettor A, et al. *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 transporter is involved in reduced susceptibility to quinine. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1926-30.
- [62] Bennett TN, Patel J, Ferdig MT, et al. *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity and quinine resistance. *Mol Biochem Parasitol* 2007;153:48-58.
- [63] Bray PG, Hawley SR., Ward SA. 4-aminoquinoline resistance of *Plasmodium falciparum*: insights from the study of amodiaquine uptake. *Mol Pharmacol* 1996;50:1551-8.
- [64] Bjorkman A, Phillips-Howard PA. Drug-resistant malaria: mechanisms of development and inferences for malaria control. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:323-4.
- [65] Geary TG, Jensen JB. Lack of cross-resistance to 4-aminoquinolines in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum in vitro*. *J Parasitol* 1983;69:97-105.
- [66] Muller O, Van Hensbroek MB, Jaffar S, et al. A randomized trial of chloroquine, amodiaquine, and pyrimethamine/sulfadoxine in Gambian children with uncomplicated malaria. *Trop Med Int Health* 1996;1:124-32.
- [67] Brasseur P, Agnamey P, Ekobo AS, et al. 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;89:528-30.
- [68] Brasseur P, Guiguemde R, Diallo S, et al. Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in west and central Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:645-50.
- [69] Olliaro P, Nevill C, LeBras J, et al. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *Lancet* 1996;348:1196-201.
- [70] Nawaz F, Nsobya SL, Kiggundu M, et al. Selection of parasites with diminished drug susceptibility by amodiaquine-containing antimalarial regimens in Uganda. *J Infect Dis* 2009;200:1650-7.
- [71] Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, et al. Association between mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and *in vivo* amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:155-61.
- [72] Holmgren G, Gil J.P, Ferreira PM, et al. Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria *in vivo* is associated with selection of *pfcr1* 76T and *pfmdr1* 86Y. *Infect Gen Evol* 2006;6:309-14.
- [73] Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, et al. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:991-7.
- [74] Marfurt J, Muller I, Sie A, et al. The usefulness of twenty-four molecular markers in predicting treatment outcome with combination therapy of amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine against falciparum malaria in Papua New Guinea. *Malar J* 2008;7:61.
- [75] Palmer KJ, Holliday SM, Brogden RN. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1993;45:430-75.
- [76] Fontanet AL, Johnston DB, Walker AM, et al. High prevalence of mefloquine-resistant falciparum malaria in eastern Thailand. *Bull World Health Organ* 1993;71:377-83.
- [77] Uhlemann AC, Krishna S. Antimalarial multi-drug resistance in Asia: mechanisms and assessment. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;295:39-53.
- [78] Shah NK, Akler AP, Sem R, et al. Molecular surveillance for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*, Cambodia. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1637-40.
- [79] Carrara VI, Zwang J, Ashley EA, et al. Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the Northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment. *PlosOne* 2009;4:4451.
- [80] Rogers WO, Sem R, Tero T, et al. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J* 2009;8:10.
- [81] Cowman AF, Galatis D, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1143-7.
- [82] Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet* 2004;364(9432):438-47.
- [83] Duraisingh M, Cowman A. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop* 2005;94:181-90.
- [84] Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, et al. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol* 2000;108:13-23.
- [85] Lim P, Alker AP, Khim N, et al. *Pfmdr1* copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia. *Malar J* 2009;8:11.
- [86] Lim AS., Galatis D, Cowman AF. *Plasmodium falciparum*: amplification and overexpression of *pfmdr1* is not necessary for increased mefloquine resistance. *Exp Parasitol* 1996;83:295-303.

- [87] Jeffress M, Fields S. Identification of putative *Plasmodium falciparum* mefloquine resistance genes. *Mol Biochem Parasitol* 2005;139:133-9.
- [88] Nosten F, White NJ. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(suppl 6):181-92.
- [89] Eastman RT, Fidock DA. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:864-74.
- [90] Nyarango PM, Gebremeskel T, Mebrahtu G, et al. A steep decline of malaria morbidity and mortality trends in Eritrea between 2000 and 2004: the effect of combination of control methods. *Malar J* 2006;5:33.
- [91] Yang YZ, Little B, Meshnick SR. Alkylation of proteins by artemisinin. *Biochem Pharmacol* 1994;48:569-74.
- [92] Bhisutthibhan J, Pan XQ, Hossler PA, et al. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J Biol Chem* 1998;273:16192-8.
- [93] Jambou R, Legrand E, Niang M, et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in-vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 2005;366:1960-3.
- [94] Legrand E, Vojney B, Meynard JB, et al. Resistance to dihydroartemisinin. *Emerg Infect Dis* 2007;13:808-9.
- [95] Bertaux L, Quang Le H, Sinou V, et al. New PfATP6 mutations found in *Plasmodium falciparum* isolates from Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4570-1.
- [96] Jambou R, Martinelli A, Pinto J, et al. Geographic structuring of the *Plasmodium falciparum* Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (PfSERCA) gene diversity. *PlosOne* 2010;5:9424.
- [97] Chiodini PL, Conlon CP, Hutchinson DB, et al. Evaluation of atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:1073-8.
- [98] Looareewusan S, Vivaran C, Webster HK, et al. 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;54:62-6.
- [99] Canfield CJ, Pudney M, Gutteridge WE. Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum in vitro*. *Exp Parasitol* 1995;80:373-81.
- [100] Srivatava IK, Vaidya AB. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1334-1.
- [101] Looareesuwana S, Chulay JD, Canfield CJ, et al. Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:533-41.
- [102] Hogh B, Ckarke PD, Camus D, et al. Atovaquone-proguanil versus chloroquine-proguanil for malaria prophylaxis in nonimmune travellers: a randomised, double-blind study. *Lancet* 2000;356:1888-94.
- [103] Ittarat I, Asawamahasakda W, Meshnick SR. The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *Exp Parasitol* 1994;79:50-6.
- [104] Ittarat I, Asawamahasakda W, Bartlett M, et al. Effects of atovaquone and other inhibitors on *Pneumocystis carinii* dihydroorotate dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:325-8.
- [105] Fry M, Pudney M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-(trans-4-(4'-chlorophenyl)cyclohexyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* 1992;43:1545-53.
- [106] Vaidya AB, Lashgari MS, Pologe LG, et al. Structural features of *Plasmodium falciparum* cytochrome b that may underlie susceptibility to 8-aminoquinolines and hydroxynaphthoquinones. *Mol Biochem Parasitol* 1993;58:33-42.
- [107] Ekala MT, Khim N, Legrand E, et al. Sequence analysis of *Plasmodium falciparum* cytochrome b in multiple geographic sites. *Malar J* 2007;6:164.
- [108] Musset L, Pradines B, Parzy D, et al. Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:110-5.
- [109] Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, et al. Malarone treatment failure and *in vitro* confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar J* 2002;1:1.
- [110] Musset L, Bouchaud O, Matheron S, et al. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome b codon mutations. *Microb Infect* 2006;8:2599-604.
- [111] Savini H, Bogreau H, Bertaux L, et al. First case of emergence of atovaquone-proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* during treatment in a traveller in Comoros. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2283-4.
- [112] Briolant S, Almeras L, Fusai T, et al. Cyclines and malaria. *Med Trop* 2007;67:86-96.
- [113] Briolant S, Fusai T, Rogier C, et al. Tetracycline antibiotics in malaria. *Open Trop Med J* 2008;1:31-46.
- [114] Krungkai J. Purification, characterization and localisation of mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase in *Plasmodium falciparum*, human malaria parasite. *Biochem Biophys Acta* 1995;1243:351-60.
- [115] Prapunwattana P, O'sullivan WJ, Yuthavong Y. Depression of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase activity *in vitro* culture. *Mol Biochem Parasitol* 1988;27:119-24.
- [116] Yeo AET, Rieckmann KH, Christopherson RI. Indirect inhibition by antibiotics of nucleotide and deoxynucleotide biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998;29:24-6.
- [117] Dahl EL, Rosenthal PJ. Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3485-90.
- [118] Goodman CD, Su V, McFadden GI. The effects of anti-bacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2007;152:181-91.
- [119] Briolant S, Baragatti M, Parola P, et al. Multinormal *in vitro* distribution model suitable for the distribution of *Plasmodium falciparum* chemosusceptibility to doxycycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:688-95.
- [120] Briolant S, Wurtz N, Zettor A, et al. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to doxycycline is associated with *pfetQ* sequence polymorphism and copy numbers of *pfetQ* and *pfmdt*. *J Infect Dis* 2010;201:153-9.
- [121] Curd FHS, Davey DG, Rose FL. Studies on synthetic antimalarial drugs. X. Some biguanide derivatives as new types of antimalarial substances with both therapeutic and causal prophylactic activity. *Ann Trop Med Parasitol* 1945;39:208-16.
- [122] Falco EA, Goodwin LG, Hitchings GH, et al. 2:4-diaminopyrimidines - a new series of antimalarials. *Br J Pharmacol Chemotherap* 1951;6:185-200.
- [123] Clyde DF, Shute GT. Resistance of *Plasmodium falciparum* in Tanganyika to pyrimethamine administered at weekly intervals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1957;51:505-13.
- [124] Aponte JJ, Schellenberg D, Egan A, et al. Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants: a pooled analysis of six randomised, placebo-controlled trials. *Lancet* 2009;374:1533-42.
- [125] Parikh S, Rosenthal PJ. Intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy: is sulfadoxine-pyrimethamine the right drug? *Clin Pharmacol Ther* 2010;87:169-2.
- [126] Sano G, Morimatsu K, Horii T. Purification and characterization of dihydrofolate reductase of *Plasmodium falciparum* expressed by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* 1994;63:265-73.
- [127] Sirawaraporn W, Sathitkul T, Sirawaraporn R, et al. Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1124-9.
- [128] Zolg JW, Plitt JR, Chen GX, et al. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1989;36:253-62.
- [129] Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, et al. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol* 2001;17:582-8.
- [130] Hyde J. Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop* 2005;94:191-206.
- [131] Dahlstrom S, Veiga MI, Martensson A, et al. Polymorphism in PfMRP1 (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 1) amino acid 1466 associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2553-6.
- [132] Zhang Y, Meshnick SR. Inhibition of *Plasmodium falciparum* dihydropterotate synthetase and growth *in vitro* by sulfa drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:267-71.

- [133] Triglia T, Menting JGT, Wilson C, et al. Mutations of dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:13944-9.
- [134] Triglia T, Cowman AF. Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:7149-53.
- [135] Brooks D, Wang P, Read M, et al. Sequence variation in the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase : dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. Eur J Biochem 1994;224:397-405.
- [136] Wang P, Lee CS, Bayoumi R, et al. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. Mol Biochem Parasitol 1997;89:161-77.
- [137] Wang P, Read M, Sims PFG, et al. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilisation Mol Microbiol 1997;23:979-86.
- [138] Sibley CH, Barnes KI, Plowe CV. The rationale and plan for creating a World Antimalarial Resistance Network (WARN). Malaria J 2007;6:118.
- [139] Sibley CH, Barnes KI, Watkins WM, et al. A network to monitor antimalarial drug resistance: a plan for moving forward. Trends Parasitol 2008;24:43-8.
- [140] Plowe CV, Roper C, Barnwell JW, et al. World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: molecular markers for drug resistant malaria. Malar J 2007;6:121.