

## Capacité de Médecine Tropicale

Paludisme à P.vivax, situation en Guyane française  
Analyse d'un essai clinique  
(Chloroquine 25mg/kg versus 35mg/kg)

Présenté par  
Mr Firas ABBAS

Directeur  
Dr Félix DJOSSOU

Rapporteur  
Dr Pascal MILLET

### JURY

Président  
Membres

Pr D Malvy  
Dr BA Gaüzère  
Dr K Ezzedine  
Dr Th Piston  
Dr MC Receveur

## Remerciements

Pr D.Malvy

Dr P.Millet

Dr F.Djossou

Dr BA Gaüzère

Dr K.Ezzedine

Dr Th. Piston

Dr MC.Receveur

Mme M. Estager

Mme S. Louis

Mme F.Traulé

Mme Chelil

## Paludisme à P.vivax, situation en Guyane française

### Analyse d'un essai clinique (Chloroquine 25mg/Kg versus 35mg/Kg)

#### Résumé

Le traitement curatif d'un accès palustre à P.vivax de l'adulte ou de l'enfant, repose sur la chloroquine donné par voie orale, en l'absence de troubles digestifs pouvant gêner l'administration et/ou l'absorption digestive du médicament. Lorsque la voie orale est impossible, le traitement peut être débuté par quinine par voie injectable.

La posologie de chloroquine recommandée par la 3<sup>ème</sup> conférence de consensus sur le paludisme en Guyane, est de 25mg/Kg répartis en 3 jours. L'observation de plus en plus fréquente de rechutes dans les 4 semaines suivant ce traitement a amené l'équipe médicale locale à s'interroger sur l'occurrence d'une baisse de sensibilité, voir d'une résistance de P.vivax à la chloroquine. Devant ces interrogations et pour tenter de les documenter ; un essai clinique est lancé : **chloroquine 25mg/Kg en 3 jours versus 35mg/Kg en 4 jours**. L'analyse rétrospective des dossiers de 780 accès palustre à P.vivax n'a pas permis de conclure une éventuelle supériorité du protocole « chloroquine 35mg/kg » par rapport à la posologie préconisé par la 3<sup>ème</sup> conférence de consensus sur le paludisme en Guyane en 2002. Néanmoins, un taux d'échec thérapeutique à 6.78% nécessite une surveillance rigoureuse pour déterminer les tendances géographiques et la propagation de la pharmaco résistance.

## Sommaire

- Résumé	p 1
- Introduction	p 2
- Clinique du paludisme à P. vivax :	
Accès de primo infestation	p 4
Accès dit de « tierce bénigne »	p 4
Le paludisme viscéral évolutif à P. vivax ou mixte	p 5
- Diagnostic	p 5
- Traitement du paludisme simple à P. vivax	p 6
- Traitement du paludisme grave à P. vivax	p 6
- Résistance de P. vivax	p 6
- Analyse d'un essai clinique (Chloroquine 25mg/kg versus 35mg/kg) :	
Introduction	p 7
Matériel et méthodes	p 7
Résultats	p 8
Discussion	p 10
Conclusion	p 12
- Bibliographies	p 13
- Annexe – 1 : réponse au traitement. Critères OMS-2006	p 14
- Annexe – 2 : fiche techniques « Nivaquine »	p 15

## Introduction

Pendant les 30 ans qui ont suivi l'après-guerre, le traitement et la chimioprophylaxie du paludisme ont été confortables. Ils reposaient sur quelques médicaments efficaces, simples d'emploi et complémentaires qui permettaient une stratégie adaptée aux différentes situations, grâce à des schémas bien codifiés et faciles à mémoriser. Parmi ces médicaments, la quinine pour les accès pernicieux et la chloroquine pour les accès simples et la prophylaxie de masse, ont eu, dans les pays de tradition latine, une place prépondérante. On comprend qu'on ait cru, dans les années 50. L'éradication du paludisme envisageable à l'horizon 1980-1990 mais ceci a été le grand espoir déçu des années 50 et le paludisme reste toujours la maladie parasitaire mondiale n°1, et plus de 2 milliards d'individus y sont constamment exposés. Le plasmodium vivax est la deuxième espèce la plus importante à l'origine de cas de paludisme chez l'homme, représente près de 40% des cas de paludisme dans le monde et est l'espèce dominante en dehors de l'Afrique. Elle est très répandue dans les zones endémiques du Moyen-Orient, d'Asie, d'Océanie et d'Amérique centrale et du sud. La répartition des formes plasmodiales en Guyane Française montre une prédominance des formes à *P.vivax* (75%); les autres formes étant presque exclusivement des formes à *P.falciparum*. [4-5]

Parmi les quatre espèces de plasmodium qui parasitent l'homme, seul *P.vivax* et *P.ovale* forment des Hypnozoïtes, stades parasitaires hépatiques qui peuvent entraîner de nombreuses rechutes des semaines ou des mois après la primo-infestation. Ainsi, une infestation unique peut provoquer des accès palustres répétés. Ceux-ci affectant le développement et la scolarisation des enfants et ont un effet débilitant sur les adultes, entravant ainsi le développement économique et humain des populations touchées. L'objectif du traitement du paludisme à *P.vivax* et à *P.ovale* est de guérir aussi bien l'infestation sanguine que l'infestation hépatique et de prévenir ainsi rechutes et recrudescence. C'est ce que l'on appelle la cure radicale.

## LE CYCLE DU PLASMODIUM (VIVAX)

### SCHIZOGONIE EXOERYTHROCYTAIRE

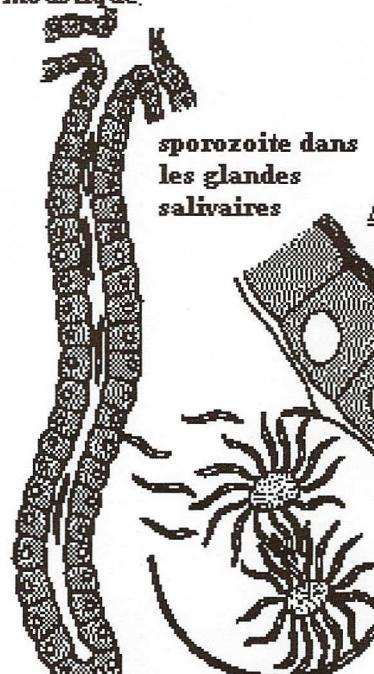
Hypnozoites quiescents dans le foie

p.v+p.o



sporozoites regagnent les hepatocytes

injection des sporozoites avec la salive du moustique.



### SCHIZOGONIE ERYTHROCYTAIRE

Pénétration des merozoites dans les globules rouges

reinvasion des globules rouges par le merozoites

macrogametocyte

microgametocyte

gametocytes dans le repas sanguin chez l'anophèle

macrogamete

exflagellation des microgametes

GAMETOGENESE

### ACCOUPLEMENT

ookinete

ookinete se transforme en oocyste dans le tube digestif du moustique

### SPOROGONIE

## Clinique du paludisme à *P.vivax* [1-8-10]

### **1 - Accès de *primo infestation* à *P.vivax***

L'**incubation** est silencieuse. Elle dure en général 2 à 3 semaines, mais peut s'étendre sur plusieurs mois. Il faut donc s'en méfier, même longtemps après un retour de zone impaludée. Un état précurseur d'inconfort mal défini peut être observé dans les jours précédant la crise. L'**invasion** est progressive, avec passage insensible à la phase d'état d'allure grippale avec une forte composante digestive.

La **phase d'état** est marquée par la **fièvre** (monte progressivement 38°, 38.5°, 39°. Elle est oscillante ou rémittante mais jamais rythmée les premiers jours), le **tableau digestif** (nausées, embarras gastrique, vomissements et diarrhée parfois), l'**état de malaise** (il est important avec frissons, céphalées, myalgie, courbatures et état pseudo-grippal) et les **signes associés** (herpès péri labial qui est très fréquent et bon marqueur de *P.vivax*, urines rares et foncées, tension artérielle basse, rate douloureuse et parfois augmentée de volume, foie un peu augmenté de volume chez l'enfant, anorexie).

**Évolution** : si le diagnostic est fait et le traitement est mis en route, ces signes s'amendent en 24h à 48h. Si l'accès est négligé, 3 possibilités :

- passage progressif à un accès dit de « tierce bénigne » typique dans les jours qui suivent ;
- accès rémittent sévère si l'infestation est importante ;
- passage en quelques semaines ou mois au paludisme viscéral évolutif, si les réinoculations sont subintrantes en l'absence de traitement.

### **2 - Accès dit de « tierce bénigne »**

Il apparaît soit après quelques jours d'évolution de l'accès de *primo-infestation*, soit lors d'une crise de réviviscence shizogonoque, ou à plus long terme, lors d'une vraie récurrence, soit de manière accidentelle lors de l'inoculation d'un paludisme transfusionnel.

C'est le plus typique, la chronologie est rigoureuse, le rythme est régulier et le déroulement est spectaculaire et stéréotypé.

**Prodromes** : ils sont brefs, dans les heures qui précèdent l'accès. Toujours identiques pour chaque malade (malaise, céphalées, herpès péri labial, signes digestifs.....)

**Phase d'état** : elle évolue en 3 phases bien distinctes et spectaculaires :

- 1 - frissons et froid (1h)
- 2 - phase de chaleur (2 à 7h)
- 3 - phase de sueurs (2h)

**Evolution :** le lendemain de l'accès, le malade est apyrétique et soulagé mais reste fatigué et conserve un sentiment d'inconfort. Le jour d'après, nouvel accès identique au précédent, mais, en règle, un peu plus faible. Il est à noter que ces accès débutent surtout en fin d'après-midi (17h-18h). Si l'accès est traité correctement, la fièvre et les signes s'arrêtent en 24 ou 48h.

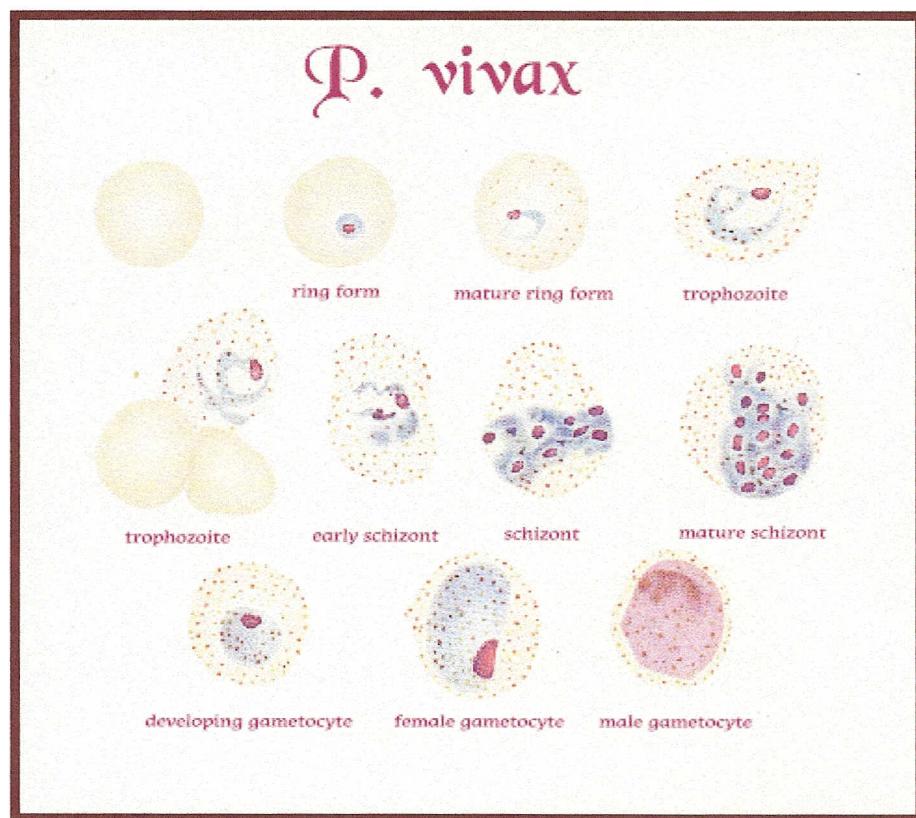
### 3 - Le Paludisme Viscéral Evolutif à *P.vivax* ou mixte

C'est l'ancienne « cachexie palustre » qui frappe essentiellement l'enfant.

Les signes cliniques sont : **fébricule permanent, subictère ou ictère franc, splénomégalie très importante (signe majeur), anémie sévère, leuco-neutropénie, asthénie profonde avec anorexie, retard staturo-pondéral et cachexie progressive.**

### Diagnostic [1-6-7-8]

L'accès palustre est défini par le portage de plasmodium asexué par un patient présentant ou ayant présenté un épisode fébrile (confirmé ou notion de....) dans les 24heures précédentes. Le diagnostic individuel et le suivi thérapeutique reposent sur l'examen parasitologique du sang par microscope (frottis mince et goutte épaisse : FMGE) et les tests de diagnostic rapide (TDR) qui dépistent des antigènes sériques spécifiques des plasmodium par une technique d'immunochromatographie sur sang total dont il existe des présentations commerciales très simples d'utilisation et d'interprétation (leur sensibilité au-dessous de densités parasitaires de 500/ $\mu$ l est faible).



## **Traitement du paludisme simple à P.vivax [1-6-8]**

### ***1 - infestation par les stades sanguins***

Pour le paludisme à P.vivax chloroquinosensible, la dose orale habituelle de chloroquine, qui est de 25mg de base/Kg de poids corporel, est bien tolérée et efficace. En ce qui concerne le paludisme à P.vivax chloroquinorésistant ; peu de données existent sur les réponses au traitement tel que l'amodiaquine, méfloquine et les dérivés de l'artémisine.

### ***2 - stade hépatique de l'infestation***

Pour obtenir une cure radicale, il faut prévenir les rechutes en administrant de la primaquine pendant 14 jours. La dose orale habituelle chez l'adulte est de 15mg de base/jour (0.25mg/Kg de poids corporel par jour). Le risque hémolytique (faible) impose que soit cherché un déficit en G6PD.

## **Traitement du paludisme grave à P.vivax [1-6-8]**

Bien que le paludisme à P.vivax soit considéré comme bénin, avec un taux de létalité très faible, il peut également très occasionnellement entraîner une maladie fébrile et débilitante. Il peut également très occasionnellement entraîner une maladie grave comme le paludisme à P.falciparum. Les manifestations du paludisme grave à P.vivax qui ont été rapportés sont les suivants : neuro-paludisme, anémie sévère, thrombocytopénie et pancytopénie graves, ictère, rupture de la rate, insuffisance rénale aiguë et syndrome de détresse respiratoire aiguë. Une anémie sévère et un œdème aigu du poumon ne sont pas rares. Les mécanismes sous-jacents de ces manifestations ne sont pas tout à fait élucidés. Le traitement et la prise en charge rapides et efficaces des cas doivent être les mêmes que pour les cas de paludisme graves et compliqués à falciparum.

## **Résistance de P.vivax [1-2-3]**

La résistance est l'aptitude d'une souche de plasmodium à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures à celles ordinairement recommandée, mais comprises dans les limites de tolérance du sujet. La résistance de P.vivax aux médicaments est rare et généralement limitée à la chloroquine, résistance qui a été rapportée pour la première fois à la fin des années 80 en Papouasie-Nouvelle-Guinée et en Indonésie. On a depuis observé au Brésil, en Colombie, en Ethiopie, au Guatemala, au Guyana, en Inde, en république de Corée, au Myanmar, aux îles Salomon, en Thaïlande et en Turquie une véritable chloroquinorésistance en foyers (avec des concentrations du sang total en chloroquine + déséthylchloroquine supérieures à 100ng/ml le jour où l'on a constaté l'échec), ou des échecs prophylactiques et/ou thérapeutiques qui ne sont pas nécessairement liés à une véritable résistance.(1-3-9)

# Le traitement de l'accès palustre simple à *Plasmodium vivax* de l'adulte et de l'enfant en Guyane Française

## Analyse d'un essai clinique

### Introduction

Le traitement curatif d'un accès palustre à *P.vivax* de l'adulte ou de l'enfant, repose sur la chloroquine (nivaquine) donnée par voie orale, en l'absence de troubles digestifs (vomissements, diarrhée) pouvant gêner l'administration et/ou l'absorption digestive du médicament. Lorsque la voie orale est impossible, le traitement peut être débuté par Quinine par voie injectable (et non pas par nivaquine\* injectable). La posologie recommandée par la 3<sup>ème</sup> conférence de consensus sur le paludisme en Guyane, est de 25mg/Kg répartis en 3 jours, soit par exemple : 10mg/Kg aux J1 et J2, puis 5mg/Kg à J3. L'observation de plus en plus fréquente de rechutes dans les 4 semaines suivant ce traitement a amené l'équipe médicale locale à s'interroger sur l'occurrence d'une baisse de sensibilité, voire d'une résistance de *P.vivax* à la chloroquine. Devant ces interrogations et pour tenter de les documenter ; un essai clinique est lancé : **chloroquine 25mg/Kg versus 35mg/kg**. Lorsque le traitement par chloroquine est de 35mg/Kg, il peut être préconisé sur 4 jours, soit par exemple : 10mg/Kg aux J1, J2 et J3, puis 5mg/Kg à J4.une « fiche technique nivaquine » est renseignée par patient.

### Matériel et méthodes

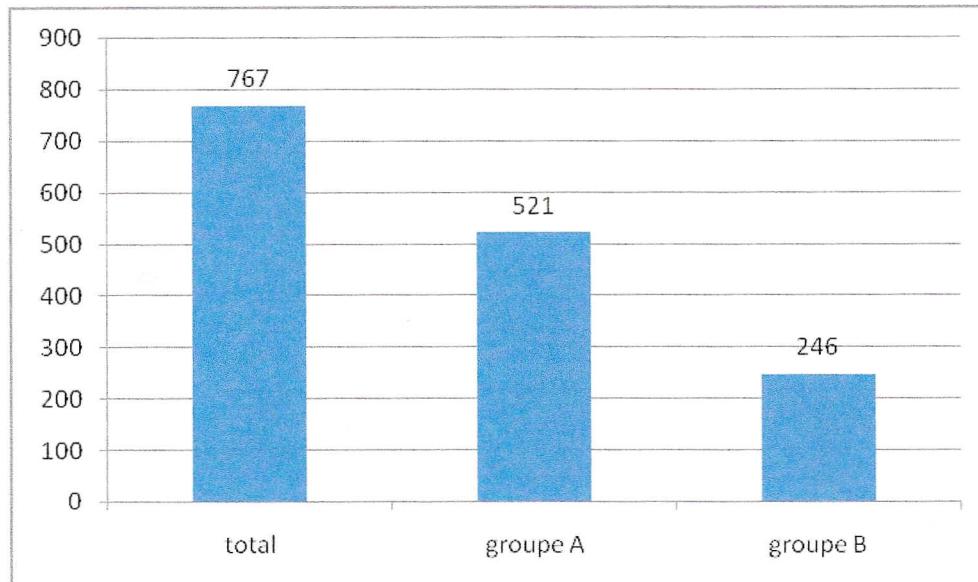
Tous les dossiers « exploitables » de patients hospitalisés au centre hospitalier de Cayenne ou soignés par les postes et centres de santé pour un accès palustre simple à *P.vivax* exclusif et traités par chloroquine entre le 1<sup>er</sup> janvier 2006 et le 31 décembre 2008. Le diagnostic de paludisme à *P.vivax* était retenu devant l'association des critères cliniques définis par l'organisation mondiale de la santé (OMS) [1] et une confirmation parasitologique microscopique (FM-GE) ou par test de diagnostic rapide. [1]

Les paramètres analysés sont le taux de réponse clinique adéquate et le taux d'échec thérapeutique précoce et tardif au traitement après J0 selon les critères de L'OMS [annexe-1].

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test de chi-deux Pearson.

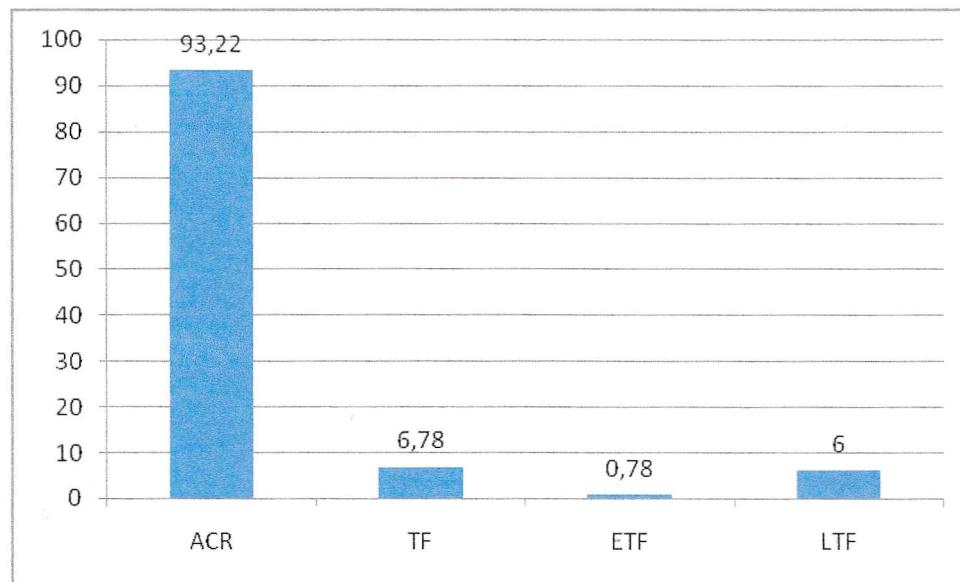
## Résultats

767 accès palustre à *P.vivax* ont été étudiés chez 648 patients. 521 accès ont été traités par chloroquine 25mg/Kg (groupe A), contre 246 accès traités par chloroquine 35mg/Kg (groupe B).



Accès palustres inclus : groupe A (25mg/Kg). Groupe B (35mg/kg)

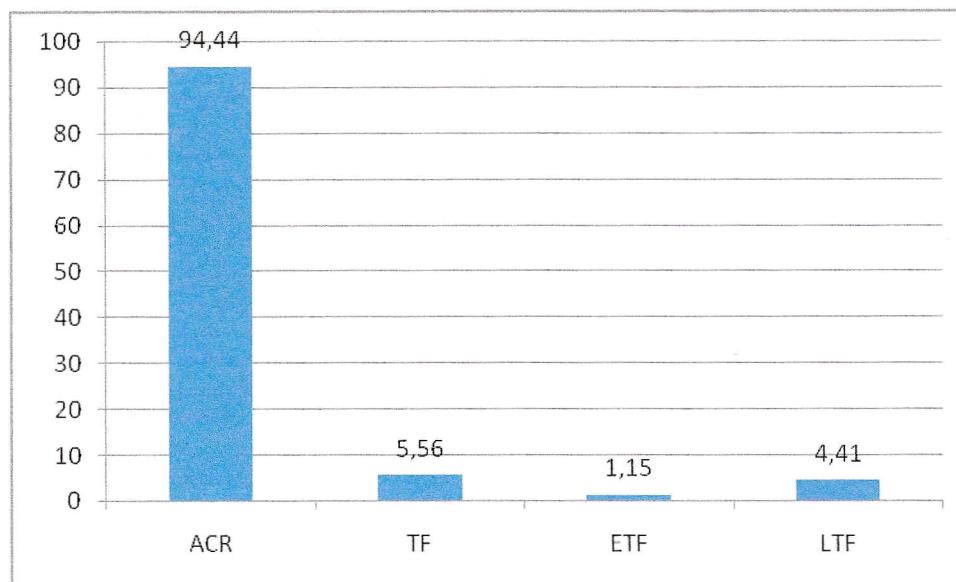
Sur l'ensemble des accès à *P.vivax* traité ; on retrouve 93.22% de réponses cliniques adéquates (715 p) et 6.78 % d'échecs thérapeutiques (52 p) dont 0.78% d'échec thérapeutique précoce et 6% d'échec thérapeutique tardif.



Moyenne générale de la réponse au traitement par Chloroquine (%)

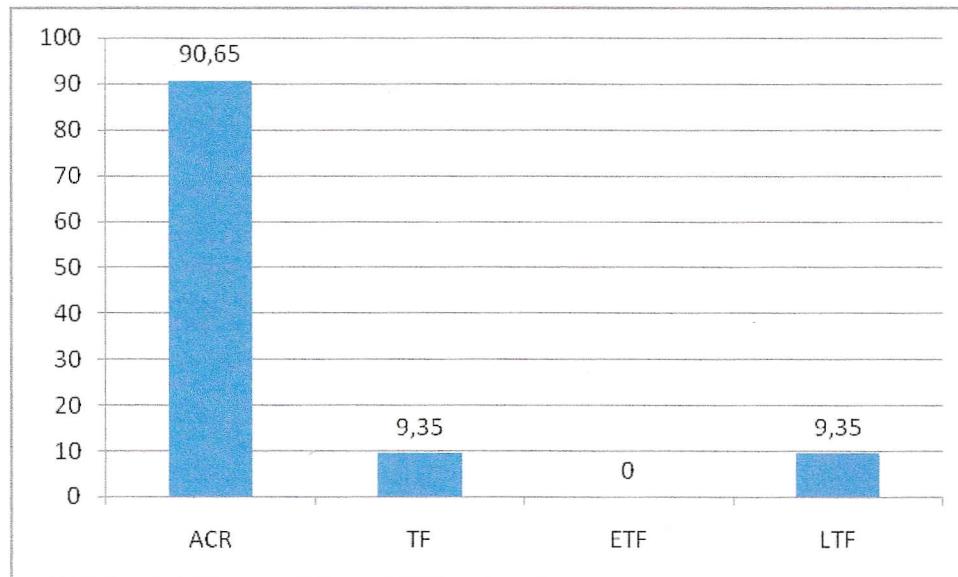
**ACR** : réponse clinique adéquate (Appropriate Clinical Response), **TF** : échec thérapeutique (Treatment Failure), **ETF** : échec thérapeutique précoce (Early Treatment Failure), **LTF** : échec thérapeutique tardif (Late Treatment Failure)

Dans le groupe A ; 492 réponse cliniques adéquates sont constatées soit 94.44% contre 29 échecs thérapeutiques soit 5.56% (ETF=1.15%, LTF=4.41%).



(%) Réponse thérapeutique du groupe A (chloroquine 25mg/kg).

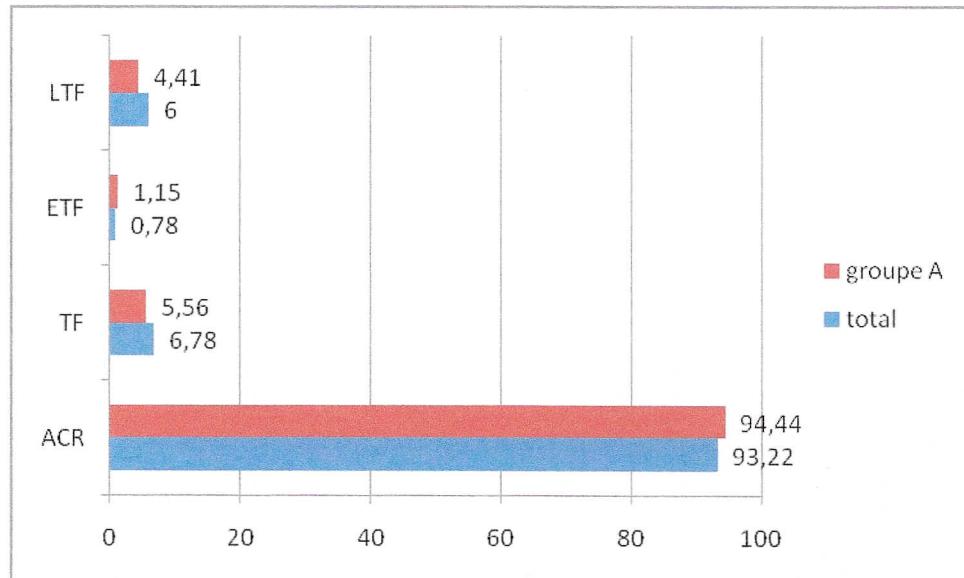
Dans le groupe B ; on constate 223 réponses cliniques adéquates soit 90.65% contre 23 échecs thérapeutiques soit 9.35% (ETF=0, LTF=9.35%)



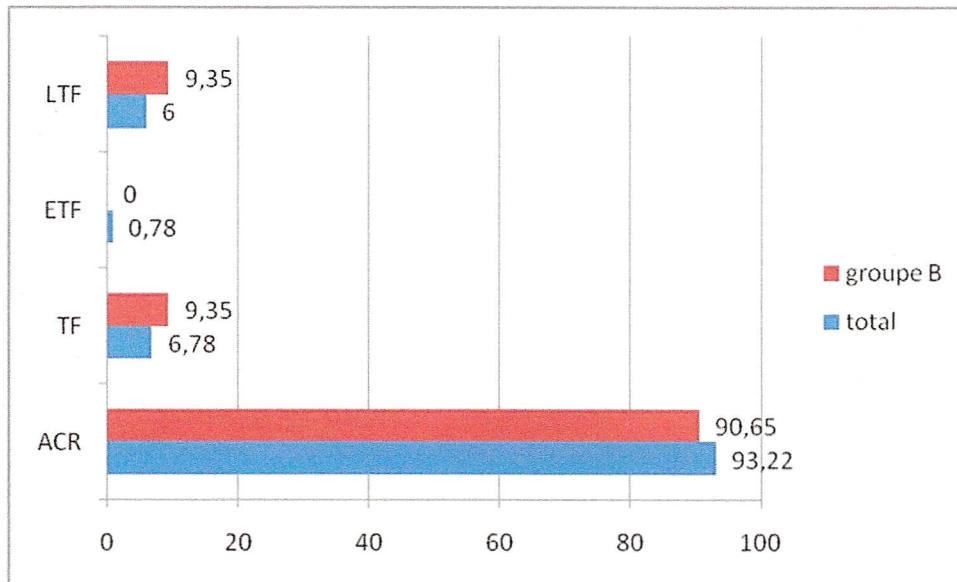
(%) Réponse thérapeutiques du groupe B (chloroquine 35mg/kg).

## Discussion

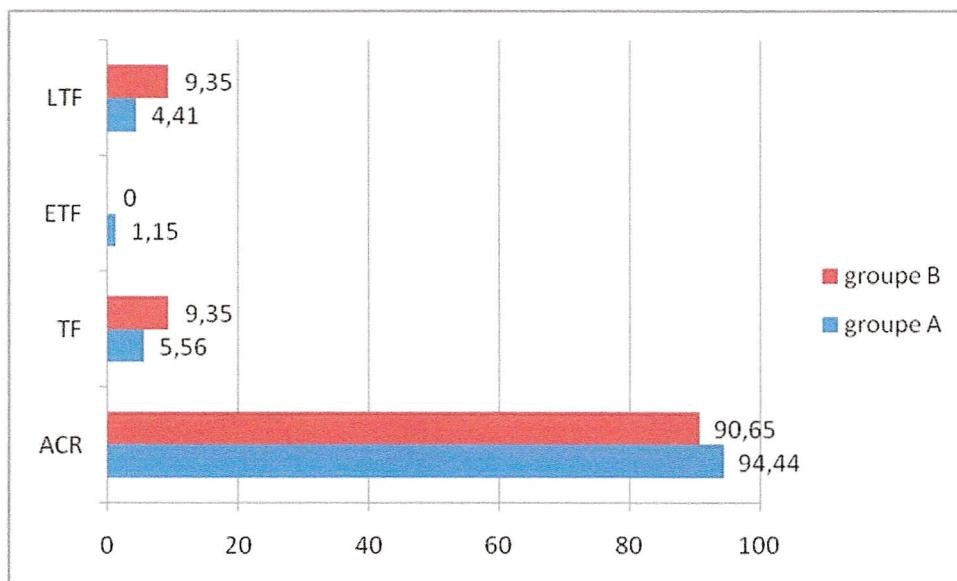
Cette étude, du fait de son caractère rétrospectif, accuse quelques biais méthodologique. Premièrement, seuls 4 centres de santé ont assumé une traçabilité exploitable des fiches techniques destinée au suivi de cette étude. [annexe-2] Deuxièmement, aucun dosage de la chloroquinémie n'a été réalisé au moment de la récurrence des 119 accès « récidivants » inclus dans cet essai clinique. Enfin, il n'a pas été possible de vérifier l'observance du traitement en dehors des patients ayant bénéficié d'une hospitalisation. Quoi qu'il en soit, L'étude comparative des résultats entre le groupe A avec la moyenne générale, entre le groupe B avec la moyenne générale et entre le groupe A avec le groupe B ne permet pas de conclure une supériorité du protocole (chloroquine 35mg/kg) par rapport au protocole préconisé par la 3<sup>ème</sup> conférence de consensus sur le paludisme en Guyane française (25mg/kg). Le taux de réponse clinique adéquate et le taux de « rechute » des 2 groupes sont semblables et comparables à la moyenne générale de l'ensemble des dossiers traités. Par ailleurs, un taux d'échec thérapeutique à 6.78% peut évoquer la présence de souche(s) de *P.vivax* chloroquinorésistante(s).



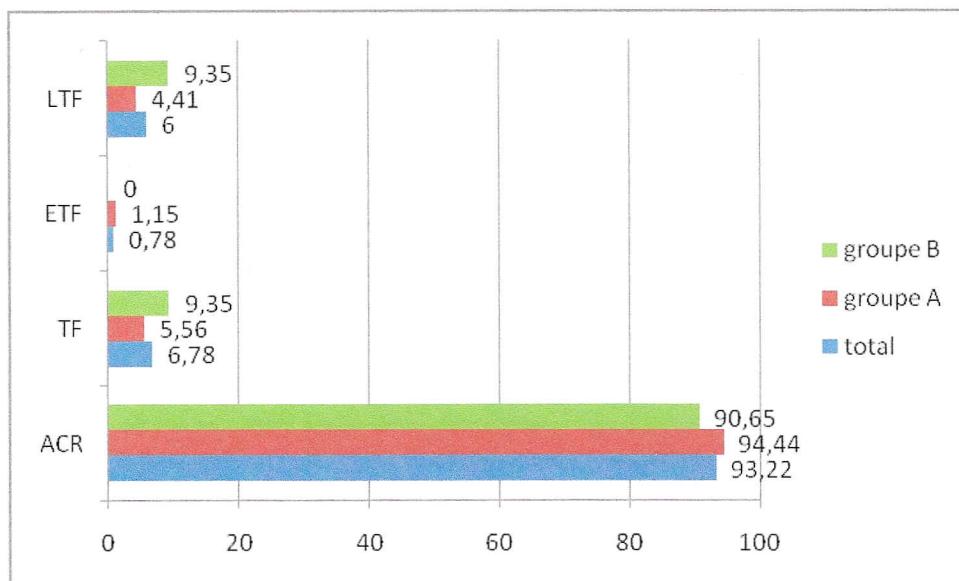
(%) Réponse au traitement : comparatif entre le groupe A et la moyenne générale



(%) Réponse au traitement : comparatif entre le groupe B et la moyenne générale



(%) Réponse au traitement : comparatif entre le groupe B et le groupe A



(%) Réponse au traitement : comparatif entre le groupe A, le groupe B et la moyenne générale

## Conclusion

Il n'existe actuellement aucun test réalisable au chevet du malade pour déterminer la sensibilité de la plasmodie aux antipaludiques. Une surveillance est donc nécessaire pour déterminer les tendances géographiques de cette sensibilité et l'émergence et la propagation de la pharmaco résistance. Les renseignements obtenus permettront d'orienter les choix en manière de traitement et d'anticiper les caractéristiques futures de la résistance.

Le génotypage du *P.vivax* peut permettre de distinguer un ré infestation par les formes hépatiques d'une recrudescence et de l'acquisition d'une nouvelle infestation, mais il n'est pas possible de faire la distinction de manière fiable entre une rechute et une recrudescence, car elles sont issues de la même infestation. Toute infestation à *P.vivax* qui réapparaît dans les 28 jours, quelle qu'en soit l'origine, doit être résistante à la chloroquine à condition qu'un traitement suffisant ait été administré. Dans le cas de la chloroquine, une absorption suffisante peut être confirmée par la mesure de la concentration dans le sang total au moment de la récurrence. Toute infestation à *P.vivax* qui s'est développée *in vivo* alors que la concentration du sang en chloroquine était  $>100\text{ng/ml}$  doit être chloroquinorésistante. La culture *in vitro* à court terme permet l'évaluation de la sensibilité *in vitro*. Il n'y a pas pour l'instant de marqueur moléculaire identifié pour la chloroquinorésistance.

## Bibliographies

1. Guidelines for the treatment of malaria. (OMS). P8-13, p165-208, p253-261.
2. World malaria report. (OMS-2006).
3. C.T.Daniel-Ribeiro, M.V.guimaraes Lacerda & J.Oliveira-Ferreira. Paludisme dû à plasmodium vivax en Amazonie brésilienne : quelques aspects de son épidémiologie, de ses manifestations cliniques et des réactions immunitaires naturellement acquises. Bull. soc. Pathol., Exot., 2008, 101, 3, 143-248.
4. Le point d'épidémiologie.Invs-Cire Antilles Guyane. 2007-n°10.
5. Le point d'épidémiologie. Invs-Cire Antilles Guyane.2009-n°1-2-3.
6. 3<sup>ème</sup> conférence de consensus sur le paludisme en Guyane française. 5 et 6 octobre 2002.
7. B.Carme. Les parasitoses humaines en Guyane française. La presse médicale 2001. Vol.30, p1601-1608.
8. JL. Jacquemin. Clinique, thérapeutique et prophylaxie du paludisme. Cours master européen. (valence-Espagne).mars 2007.
9. J.Lebras, Ch. Longuet et G.Chammot. Transmission humaine et résistance des plasmodies. La revue du praticien. 1998, 48, p258-263.
10. J.E.Touzé, P.Héno, L.Fourcade et H.N'guyen. Accès palustre simple. La revue du praticien. 1998, 48, p268-272.

## Annexe – 1

## Réponse au traitement après j0 : critères OMS-2006

<b>A.C.R</b> <b>Réponse Clinique Adéquate (Appropriate Clinical Response)</b> l'un ou l'autre des 2 critères ci- contre	Frottis négatif à j14 (sans tenir compte de la température) en l'absence de signes E.T.F/L.T.F.  température $>37,5^\circ$ à j14 (sans tenir compte de la parasitémie) en l'absence de signes E.T.F/L.T.F.
<b>E.T.F</b> <b>Echec thérapeutique précoce (Early Treatment failure)</b> constatation d'1 ou plusieurs des 4 critères ci-contre	Aggravation des signes cliniques à j1, j2 ou j3 en présence d'une parasitémie persistante.  parasitémie plus importante à j2 qu'à j0 (sans tenir compte de la température).  Température $>37,5^\circ$ à j3 en présence d'une parasitémie persistante (et d'une élévation thermique notable en zone de transmission modérée).  Parasitémie à j3 $>25\%$ de son chiffre initial à j0
<b>L.T.F</b> <b>Echec thérapeutique Tardif (Late Treatment Failure)</b> constatation de l'une ou l'autre des critères ci-contre	Signes de sévérité ou aggravation des signes cliniques, n'importe quel jour de j4 à j14 en l'absence de signe antérieur d'E.T.F.  En zone de forte transmission : $T^\circ > 37,5^\circ$ n'importe quel jour de j4 à j14 sans avoir rencontré de signe d'E.T.F.  En zone de faible transmission : parasitémie + avec $T^\circ > 37,5^\circ$ n'importe quand j24-j28 sans avoir rencontré de signe antérieur d'E.T.F.
<b>L.P.F</b> <b>Echec Parasitologique Tardif (Late Parasitological Failure)</b>	En zone de forte transmission : parasitémie à j14 avec une $T^\circ < ou = 37,5^\circ$ en l'absence de tout signe E.T.F/L.T.F.  En zone de transmission modérée : parasitémie n'importe quel jour de j7 à j28 avec une $T^\circ \leq 37,5^\circ$ en l'absence de signe E.T.F/L.T.F.

## Annexe – 2

Patient (Identité)

Poids

Nom et prénom du prescripteur

Grade

Date et Signature

**FIT 012b : Fiche technique « Nivaquine »**Il s'agit bien d'un accès palustre à *Plasmodium vivax*  ou *malariae* ECG **Traitemennt à 25 mg/kg** 

Prescription : Une prise quotidienne de 10 mg/kg J1 et J2, puis 5 mg/kg J3, puis stop

Jour	Jour 1 =	Jour 2 =	Jour 3 =
NIVAQUINE : .....comp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Traitemennt à 35 mg/kg** 

Prescription : Une prise quotidienne de 10 mg/kg J1, J2, J3, puis 5 mg/kg J4, puis stop

Jour	Jour 1 =	Jour 2 =	Jour 3 =	Jour 4 =
NIVAQUINE : .....comp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Surveillance**

	Jour 1 =			Jour 2 =			Jour 3 =			Jour 4 =		
	H0	H8	H16									
Température												
Conscience												
F. respiratoire												
T. artérielle												
Pulsations												
Glycémie capillaire												
Couleur urines												
Parasitémie												
Diurèse de 24h												
Observations												
Signature IDE												

	Jour 8 ( $\pm 1$ ) =	Jour 15 ( $\pm 2$ ) =	Jour 22 ( $\pm 3$ ) =	Jour 29 ( $\pm 4$ ) =
Signes cliniques de rechute				
Parasitémie				

01.01.2007. Protocole de prise en charge de l'accès palustre à *P. vivax* ou *malariae*. Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne. Maladies infectieuses et tropicales (Dr F. Djossou).