



**HAL**  
open science

# Suivi prospectif d'une cohorte de femmes enceintes chroniquement infectées par le virus de l'hépatite B (VHB) et de leurs enfants en RDP Laos

Vatthanaphone Latthaphasavang

## ► To cite this version:

Vatthanaphone Latthaphasavang. Suivi prospectif d'une cohorte de femmes enceintes chroniquement infectées par le virus de l'hépatite B (VHB) et de leurs enfants en RDP Laos. Virologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1336 . tel-02096567

**HAL Id: tel-02096567**

**<https://theses.hal.science/tel-02096567>**

Submitted on 11 Apr 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE12336

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N°341**

**Evolution, Ecosystème, Microbiologie, Modélisation (E2M2)**

**Spécialité de doctorat** : Epidémiologie clinique

Soutenue publiquement le 19/12/2018, par :

**Vatthanaphone LATTHAPHASAVANG**

---

# **Suivi prospectif d'une cohorte de femmes enceintes chroniquement infectées par le virus de l'hépatite B (VHB) et de leurs enfants en RDP Lao**

---

**Devant le jury composé de :**

VANHEMS, Philippe, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1

GALLAY, Anne, Agence Nationale de Santé Publique, Rapportrice

SOGNI, Philippe, PU-PH, Université Paris Descartes, Rapporteur

MATHERON, Sophie, PU-PH, Université Paris Diderot, Examinatrice

TREPO, Christian, Professeur Émerite, Université Claude Bernard Lyon 1, Examineur

VAN DE PERRE, Philippe, PU-PH, Université de Montpellier, Examineur

DENY, Paul, PU-PH, Université Paris 13, Co-directeur de thèse

JOURDAIN, Gonzague, Chargé de recherches, Institut de recherche pour le développement (IRD), Co-directeur de thèse

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

Président du Conseil Académique

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Didier REVEL

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

Vice-président de la Commission Recherche

M. Fabrice VALLÉE

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie  
Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Ce travail est dédié à ma mère Boungnong LATTHAPHASAVANG pour son soutien moral inconditionnel.

## Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements tout d'abord aux femmes enceintes infectées par le VHB et leurs enfants incluses dans mon étude au Laos. Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans votre participation et j'ai appris beaucoup des entretiens que j'ai eus avec vous.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements ensuite à de nombreuses personnes, collègues et amis, qui ont permis que ce travail de thèse soit réalisé.

A Monsieur le Pr Philippe VANHEMS, je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse, d'avoir toujours été à mes côtés et de m'avoir aidé à surmonter toutes les difficultés. Je suis très sensible à la chance que j'ai eu de pouvoir travailler sous votre encadrement et pour cela je vous en suis reconnaissante.

A Madame Anne GALLAY, vous me faites un grand honneur et plaisir en acceptant d'être la rapportrice de ce travail. Veuillez trouver ici mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Pr Philippe SOGNI, vous me faites un grand honneur et plaisir en acceptant d'être le rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici mes remerciements et mon plus profond respect.

A Madame Sophie MATHERON, Monsieur le Pr Christian TREPO, Monsieur le Pr Philippe VAN DE PERRE, je suis très honorée que vous ayez accepté d'être membres de jury de cette thèse, veuillez trouver ici mes sincères remerciements et mon profond respect.

A Monsieur le Dr Gonzague JOURDAIN, je vous remercie énormément d'avoir accepté de codiriger ce travail de thèse, d'avoir toujours été à mes côtés, d'avoir partagé votre expérience et d'avoir consacré beaucoup de temps pour ce Doctorat. Je vous adresse mes plus sincères remerciements et ma profonde reconnaissance pour votre encadrement, votre conseil et votre soutien.

A Monsieur le Pr Paul DENY, je vous remercie énormément d'avoir accepté de codiriger ce travail de thèse. Votre présence est pour moi un grand honneur. Je vous remercie pour votre gentillesse et votre soutien qui a contribué à la réalisation de ce travail.

A Messieurs les Pr Daniel REINHARZ et Pr Mayfong MAYXAY, un grand merci pour vos enseignements, votre aide et votre précieuse contribution sur les travaux présentés.

La réalisation des travaux présentés dans ce Doctorat a été rendue possible grâce aux soutiens financiers obtenus auprès de la Fondation Mérieux, et de l'Ambassade de France au Laos (Ministère des Affaires Étrangères, France). Veuillez trouver ici mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Pr Yves BUISSON, vous avez eu une grande contribution pour m'encourager à démarrer ce travail de thèse. Grâce à vos enseignements, votre encouragement, vos conseils et votre soutien ce travail a pu démarrer et aboutir. Veuillez trouver ici ma reconnaissance et mes remerciements.

A Monsieur le Pr Michel STROBEL, merci beaucoup pour vos enseignements et votre soutien qui m'a encouragé à réaliser ce travail.

Monsieur le Dr Laurent MALATO, un grand merci pour votre aide pour la correction en français de ma thèse, votre support et vos précieux conseils. Vous avez toujours été auprès de moi pour m'encourager et me soutenir. Veuillez trouver mes sincères remerciements.

A Monsieur le Dr Nicolas STEENKESTE, grâce à votre soutien, vos conseils, la réalisation des travaux présentés dans cette thèse a été possible. Veuillez trouver ma reconnaissance et mes remerciements.

A Monsieur le Dr David DANCE, Monsieur le Pr Paul NEWTON grâce à votre soutien, votre collaboration et vos encouragements, la réalisation des travaux présentés dans cette thèse a été possible. Veuillez trouver mes sincères remerciements.

A Monsieur le Pr Bounthaphany BOUNXOUEI, grâce à votre soutien, votre collaboration et vos conseils, la réalisation des travaux présentés dans cette thèse a été possible. Veuillez trouver ma reconnaissance et mes remerciements.

A l'équipe du personnel du service des maladies infectieuses et tropicales et du service de gynéco-obstétrique de l'hôpital Mahosot le Professeur associé Dr Valy KEOLUANGKHOT, Dr Anan SACKPASEURTH, Dr Phimmason SIRIMANOTHAM, Dr Syvilay THAMMASACK et son équipe, merci beaucoup pour vos aides et vos précieuses contributions sur les travaux présentés. Je vous remercie chaleureusement pour ces échanges d'expériences.

A l'équipe du personnel du service de gynéco-obstétrique de l'hôpital de la Mère et du nouveau-né le Dr Touy CHANTHALANGSY, Dr Ouiphone VIYARATH et à son équipe, un sincère merci pour les nombreuses choses, votre contribution, votre aide.

A toute l'équipe de Center Infectiology Lao-Christophe Merieux (CILM), Dr Ot MANOLIN et son équipe grâce à votre soutien, votre collaboration, des travaux présentés dans cette thèse a été bien réalisée. Veuillez trouver ma reconnaissance et mes remerciements.

A toute l'équipe de PHPT, Chiangmai, Thaïlande le Dr Nicole NGO GIANG HUONG, Dr Woottichai KHAMDUANG, Dr Nicolas SALVODORI, Dr Hélène TREHARD, un grand merci pour vos aides, vos supports et vos précieux conseils. Je vous remercie sincèrement d'avoir créé l'agréable ambiance de travail de ces dernières années, de m'avoir aidée et soutenue de sorte que ce travail soit réalisé efficacement. Veuillez trouver ma reconnaissance et mes remerciements.

Je tiens également à remercier :

**A nos chers amis, nos collègues doctorants**, un grand merci pour vos amitiés, votre encouragement, votre aide et d'avoir partagé votre expérience.

**A mes frères et mes sœurs**, Merci pour votre soutien, vos encouragements, votre compréhension pour mes absences répétées.

## Table des matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS	09
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	12
INTRODUCTION GENERALE	13
CHAPITRE I. RAPPEL SUR L'HEPATITE B	15
I.1. DEFINITION DE L'HEPATITE B	15
I.2. LE VHB	15
I.3. QUELQUES PROTEINES VIRALES IMPORTANTES DU VHB	17
I.3.1 LA POLYMERASE	17
I.3.2 L'ANTIGENE HBC	17
I.3.3 L'ANTIGENE HBE (AGHBE)	17
I.4 MUTANTS D'ÉCHAPPEMENT A LA VACCINATION CONTRE LE VHB	18
I.5 REPLICATION VIRAL DU VHB ET SA PHYSIOPATHOLOGIE	19
I.6 LA VARIABILITE DU VHB	20
I.6.1 LES SEROTYPES	20
I.6.2 LES GENOTYPES	21
I.7. MODE DE TRANSMISSION	22
I.7.1 TRANSMISSION PARENTERALE	22
I.7.2 TRANSMISSION PAR VOIE SEXUELLE	23
I.7.3 TRANSMISSION MERE - ENFANT	23
I.8 CLINIQUE	24
I.8.1 INFECTION AIGUË	24
I.8.2 INFECTION CHRONIQUE	24
I.9 DIAGNOSTIC	26
I.9.1 MARQUEURS SEROLOGIQUES	26
I.9.2 MESURE DE LA CHARGE VIRALE	29
I.10 ATTITUDE THERAPEUTIQUE	30
I.11 HEPATITE B DANS LES CAS PARTICULIERS	33
I.11.1 Co-INFECTION PAR LE VHB ET LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)	33
I.11.2 Co-INFECTION PAR LE VHB ET LE VIRUS DE L'HEPATITE C (VHC)	33
I.11.3 INFECTION CHRONIQUE PAR LE VHB CHEZ LA FEMME ENCEINTE	34



CHAPITRE II : LA SITUATION D'UNE HEPATITE B CHRONIQUE DANS LE CADRE NATIONAL ET LA PRISE EN CHARGE DE L'HEPATITE B CHRONIQUE AU LAOS.	39
II. 1 SITUATION DU VHB AU LAOS	39
II.2. LA PRISE EN CHARGE DU VHB DANS LE SYSTEME DE SANTE AU LAOS	40
II.2.1. GEOGRAPHIE ET REPARTITION DE LA POPULATION	40
II.2.2 LES STRUCTURES DE DISPENSES DE SOINS	41
II.2.3 LES PHARMACIES ET L'ACCES AUX MEDICAMENTS ANTIVIRAUX POUR LE VHB AU LAOS	42
CHAPITRE III : QUESTION DE RECHERCHE DU TRAVAIL DE THESE : TRANSMISSION PERINATALE DU VHB AU LAOS (COHORTE PROSPECTIVE)	48
III.1. OBJECTIF	48
III.2 QUESTIONS PRINCIPALES DE RECHERCHE	48
III.2.1 PREMIER AXE DE RECHERCHE : ÉPIDEMIOLOGIE CLINIQUE	48
III.2.2. DEUXIEME AXE DE RECHERCHE : RECHERCHE OPERATIONNELLE	48
III.2.3. TROISIEME AXE DE RECHERCHE : VIROLOGIE	48
III.3. JUSTIFICATIONS DE L'ETUDE	49
III.4 METHODOLOGIE DE RECHERCHE	50
III.4.1 TYPE D'ETUDE, PARTICIPANTS, LIEU, LA DUREE D'ETUDE ET LE SUIVI CLINIQUE	50
III.4.2 PRELEVEMENTS DE SANG	52
III.4.3 EVALUATIONS BIOLOGIQUES	52
III.4.4 - ASPECTS STATISTIQUES	54
III.5. RESULTATS PRINCIPAUX DE NOTRE PROJET DE RECHERCHE	54
III.5.1 PREMIERE AXE DE RECHERCHE : ÉPIDEMIOLOGIE CLINIQUE : SUIVI DES FEMMES ENCEINTES ET DE LEURS ENFANTS	55
III.5.2. DEUXIEME AXE DE RECHERCHE : RECHERCHE OPERATIONNELLE	61
III.5.3. TROISIEME AXE DE RECHERCHE : VIROLOGIE	67
PERINATAL HEPATITIS B VIRUS TRANSMISSION IN LAO PDR: A PROSPECTIVE COHORT STUDY	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b> <b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
CHAPITRE IV : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	99
CHAPITRE V: PRESENTATION DES TRAVAUX	101

## Liste des abréviations

VHB : Virus de l'hépatite B

HB : Hépatite B

a: Déterminant sérotypique majeur de l'AgHBs

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNccc : ADN circulaire clos de manière covalente ADN-RC : ADN relâché circulaire

AgHBc : Antigène HBc

AgHBe : Antigène HBe

AgHBs : Antigène HBs

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ALAT : Alanine aminotransférase

ASAT : Aspartate aminotransférase

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

DHBV : Duck Hepatitis B Virus

MEV : Mutation d'Echappement à la Vaccination

Ag : Antigène

Ac : Anticorps

PCR : Polymerase Chain Reaction

TDF : fumarate de disoproxil ténofovir

LdT : Telbivudine

ETV : Entecavir

ADV : Adéfovir

LAM : Lamivudine

VIH : Immunodéficience humaine

VHC : Virus de l'hépatite C

VHD : Virus de l'hépatite delta

IFN : Interféron

FDA : Food and Drug Administration des Etat-Unis

APR : Antiretroviral Pregnancy Registry

AN : Analogues Nucléosidiques

GRADE : Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation

AASLD : American Association for the Study of Liver Diseases

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

APASL : Asian Pacific Association for the study of the liver

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

CILM : Centre d'Infectiologie Laos- Christophe Mérieux

EI : Ecart interquartile

HBC : Hépatite B chronique

RDP Lao : République Démocratique Populaire Lao

## Liste des figures

Figure 1 : Structure du VHB

Figure 2 : Génome du VHB

Figure 3 : Cycle de réplication du VHB

Figure 4 : Distribution mondiale des génotypes et sérotypes de HBV

Figure 5 : Evolution de l'infection chronique de l'hépatite B

Figure 6 : Cinétique de marqueurs sériques de l'Hépatite virale B aigue

Figure 7 : Cinétique des marqueurs sériques au cours d'une hépatite virale B chronique

Figure 8 : Localisation de la RDP Lao

Figure 9 : Suivi de l'étude pour les femmes enceintes/mères

Figure 10 : Suivi de l'étude pour les enfants

Figure 11 : Inclusion et suivi des participants

Figure 12 : Arbre phylogénétique utilisant la méthode du voisin-assemblage, construit à partir de 16 séquences de référence du VHB (génotype A-H) et des séquences des 5 enfants infectés et des virus de leurs mères

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Marqueurs sériques, interprétation

Tableau 2 : Indications de traitement pour les patients chroniquement infectés par le VHB

Tableau 3 : Calendrier des consultations et liste des examens complémentaires pour des mères

Tableau 4 : Calendrier de consultation et la liste des examens complémentaires pour des enfants

Tableau 5 : Caractéristiques sociodémographiques des participantes selon leur statut HBeAg

Tableau 6 : Prédicteurs des échecs d'immunoprophylaxie chez les enfants

Tableau 7 : Caractéristiques maternelles et infantiles en fonction de l'échec de l'immunoprophylaxie

Tableau 8 : Caractéristiques des 5 enfants infectés par le VHB

Tableau 9 : Résumé des données concernant les enfants infectés dont les prélèvements ont été vérifiés après l'âge d'un an

## Introduction générale

La transmission périnatale du virus de l'hépatite B (VHB) est un problème majeur de santé publique en particulier en Asie et en Afrique. Malgré l'existence d'un vaccin très efficace depuis plus de trente ans, on estime à deux milliards le nombre de personnes infectées par le VHB et à plus de 257 millions le nombre de celles souffrant d'une hépatite B chronique. Près de 887 000 personnes meurent chaque année des conséquences aiguës ou chroniques de l'hépatite B. Dans les zones de haute endémicité, où le taux de portage de l'antigène de surface du VHB (AgHBs) est supérieur ou égal à 6%, le VHB est transmis très tôt au cours de la vie, le plus souvent par la mère lors de la grossesse et de l'accouchement (transmission verticale), ou au cours de la petite enfance (transmission horizontale) [1]. Lors que l'infection aiguë survient au cours de la première année de vie, le risque de chronicité est maximal (80 à 90%). Il diminue si l'infection survient plus tard dans l'enfance (30 à 50%) et est minime si l'infection survient à l'âge adulte (moins de 5%) [1]. L'infection chronique par le VHB expose ensuite les malades à un risque important de décès par cirrhose et cancer hépatique à l'âge adulte. Ces zones de haute endémicité sont donc particulièrement touchées par les complications de l'hépatite B chronique.

Ce n'est que récemment que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a remis à l'ordre du jour des priorités de santé publique la lutte contre les hépatites virales en vue de l'élimination de la transmission et de leurs complications d'ici 2030. La prévention de ces complications passe par le dépistage des personnes infectées, leur évaluation, leur suivi et un traitement à vie à partir d'un certain stade d'évolution de la maladie. Ce dépistage et cette prise en charge ne sont pas mis en place dans l'immense majorité des pays à faibles et moyens revenus, malgré l'existence de plusieurs médicaments antiviraux efficaces qui inhibent la réplication du VHB.

En ce qui concerne l'élimination de la transmission du VHB, un vaccin très efficace et disponible partout dans le monde à un prix modéré existe depuis la fin des années 1970, et a déjà permis de réduire considérablement les infections chez les enfants nés depuis sa mise en place. Des nouveaux cas d'infection par le VHB subsistent néanmoins et sont à haut risque de développer une infection chronique car essentiellement dus à une transmission périnatale. En effet, la proportion des nouveau-nés vaccinés contre l'hépatite B reste insuffisante dans certaines zones. Par ailleurs les immunoglobulines recommandées en complément du vaccin pour prévenir la transmission périnatale ne sont pas disponibles dans certains pays.

Il est donc essentiel de prévenir l'infection par l'hépatite B, particulièrement chez les nouveau-nés et les enfants, en étudiant et en améliorant les méthodes de prévention puis en les mettant en œuvre dans les systèmes de santé publique.

Au Laos, le problème de la transmission périnatale a été soulevé depuis plusieurs années. Mon travail de thèse a eu pour objectif de décrire la situation dans deux hôpitaux de la capitale afin de déceler d'éventuels problèmes qui se poseraient lors de la mise en œuvre des recommandations de l'OMS.

Le travail est divisé en 5 chapitres :

- Le premier chapitre est un rappel des connaissances actuelles sur l'hépatite B.
- Le second chapitre est consacré à la situation de l'hépatite B chronique au Laos et à sa prise en charge.
- Le troisième chapitre présente les résultats de l'étude de cohorte prospective de femmes enceintes infectées chroniquement par le VHB et de leurs enfants aux Laos qui a été mise en place dans le cadre de ce travail de thèse.
- Le quatrième chapitre propose des conclusions à ce travail et les perspectives ouvertes à la suite de ce travail.
- Le cinquième chapitre présente les communications orales en congrès réalisées au cours de ce travail de thèse.

## Chapitre I. Rappel sur l'hépatite B

Dans ce chapitre, nous résumons des informations importantes nécessaires à la compréhension de cette thèse, notamment la définition de l'hépatite B, une description succincte du virus en cause, les mécanismes de l'infection, les méthodes de diagnostic de l'infection, une description succincte de la maladie hépatique associée à l'infection par le VHB, et son traitement.

### I.1. Définition de l'hépatite B

L'hépatite B est une infection virale causée par le VHB qui infecte les hépatocytes. Elle peut prendre une forme aiguë ou chronique. Les complications de l'infection chronique acquise dans l'enfance apparaissent habituellement après 30-40 ans, sous forme de fibrose et cirrhose hépatique, et de carcinome hépatocellulaire (aussi dit « cancer primitif du foie ») [1].

### I.2. Le VHB

Le VHB est un virus à ADN (acide désoxyribonucléique) appartenant à la famille des *Hepadnaviridae*. La particule virale (virion) se compose d'une enveloppe extérieure lipidique et d'un noyau, une nucléocapside de forme icosaédrique composée de protéines portant l'antigène (Ag) HBc. La nucléocapside entoure l'ADN viral et une ADN polymérase (Figure 1), qui a également une activité de transcriptase inverse. La famille des hépadnavirus (*Hepadnaviridae*) regroupe les virus qui sont responsables de certaines hépatites chez l'homme et chez certains animaux (aviaires et mammifères) [2]. Chaque virus a un hôte spécifique par exemple, les oiseaux (oies, sarcelles, canards) sont susceptibles à l'infection par les virus aviaires de l'hépatite B et quelques canards (canards de Pékin, canards à col vert) sont infectables par le virus du canard DHBV (Duck Hepatitis B Virus) [3, 4].

Le VHB est un virus à ADN circulaire partiellement double brin qui code, en particulier, pour une protéine possédant une activité de transcription inverse. La particule de Dane est sphérique et mesure 42-47 nm de diamètre. Le génome est contenu dans une nucléocapside isocaédrique de 22-25 nm de diamètre enveloppée par une bicouche lipidique associée à des protéines de surface. Cette enveloppe porte notamment l'antigène



de surface HBs, ou protéine HBsAg. Le génome est formé d'ADN circulaire (3200 nucléotides) partiellement double brin (sur les deux tiers de sa longueur). Le virus possède un brin long (L-) d'une longueur de 3,2 kb, et un brin court (S+) de longueur variable : de 50 % à 100 % de la longueur du brin L- (Figure 2). Quatre régions ouvertes ont été identifiées dans le génome de l'HBV codant pour quatre protéines ou familles de protéines correspondant à 4 phases de lectures ouvertes situées sur le brin + : La région S code les protéines d'enveloppe. Une protéine S ou protéine majeure de 24 kDa (= antigène HBs), une protéine moyenne de 34 kDa et une grande protéine de 39 kDa. La région C code la protéine de core p22c de 22 kDa et une protéine non structurale p17e de 17 kDa (= antigène HBe). La région P code l'ADN polymérase virale de 82 kDa. Cette enzyme possède à la fois des activités de transcriptase inverse, d'ADN polymérase ADN-dépendante et de RNase H. La région X code un polypeptide de 145 à 154 acides aminés (dépendant du sous-type du virus). Ce polypeptide ou protéine X est une protéine transactivatrice du génome viral et cellulaire, elle a un potentiel oncogénique [2].

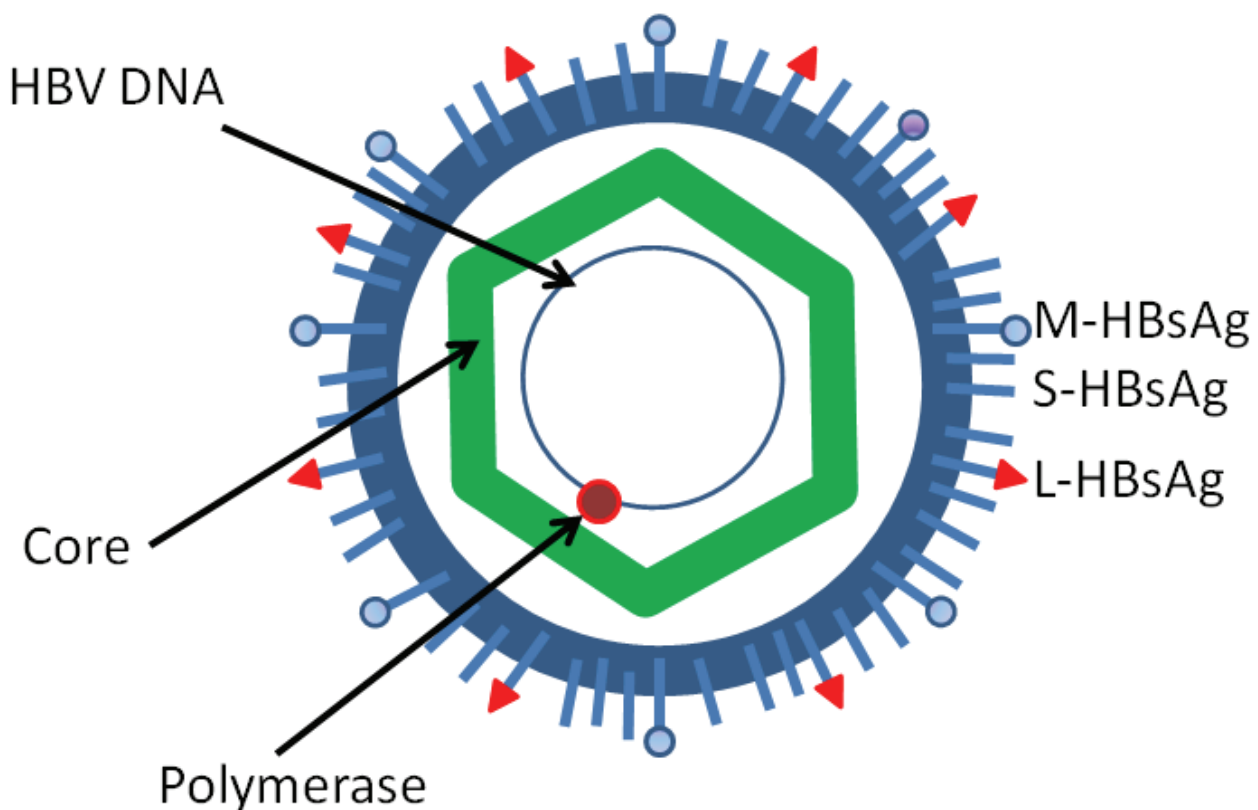


Figure 1: Structure du VHB (schéma copié de [5])

## **I.3. Quelques protéines virales importantes du VHB**

### **I.3.1 La polymérase**

C'est une protéine qui contient d'environ 850 acides aminés (aa) qui joue le rôle important dans les activités suivantes : Polymérase ARN-dépendante (reverse transcriptase), Polymérase ADN-dépendante (réplication) et RNase H [6].

### **I.3.2 L'antigène HBc**

L'AgHBc est une protéine qui compose d'environ de 183 à 185 aa. C'est la protéine structurale de la capsid. IgM anti-HBc sont les premiers marqueurs d'infection au VHB mais ces anticorps vont diminuer rapidement dans le temps sous le seuil de détection. Les anticorps de type IgM anti-HBc peuvent réapparaître lors de réactivation virale. Une réponse B mémoire apparaît médiée par les anticorps de type IgG et persiste à vie, que l'infection soit aiguë ou chronique. La présence des anticorps IgG-anti HBc est le signe d'une infection aiguë en cours, chronique ou d'une infection ancienne et résolue [7, 8]: c'est donc un marqueur de rencontre antérieure avec le virus de l'hépatite B.

### **I.3.3 L'antigène HBe (AgHBe)**

L'antigène HBe est synthétisé en tant que pro-protéine de 25kDa avec en N-terminal les 29 aa supplémentaires codés par la région PréC. C'est une protéine non structurale qui est sécrétée dans le sérum des patients infectés. La présence de l'AgHBe est un marqueur très utile qui pourra indiquer une réplication virale active et à l'établissement de la chronicité [9]. L'AgHBe est très immunogène. La séroconversion anti-HBe marque la fin de la réplication virale et pourrait annoncer le début de la résolution de l'infection. Enfin, des souches de VHB AgHBe (-) peuvent émerger suite à des mutations dans la région PréC. Les souches AgHBe (-) sont maintenant devenues la forme majoritaire des infections chroniques HBV dans le monde [10]:

### **I.3.4 L'antigène HBs (AgHBs)**

L'AgHBs contient environ 226 aa, c'est la protéine qui constitue la partie majeure de l'enveloppe virale. La connaissance de sa structure exacte n'est pas encore claire. L'AgHBs est très immunogène et la présence des marqueurs sérologiques Ac anti-HBs indique une protection naturelle ou celle d'une personne immunisée contre l'infection VHB par la vaccination. La partie du déterminant 'a' qui se trouve dans la protéine de surface est une zone importante qui peut mettre en défaut la reconnaissance de l'AgHBs par les anticorps

anti-HBs et c'est dans cette partie que des mutations d'échappement à la vaccination contre le VHB se présentent [11]. La présence de l'antigène AgHBs dans le sérum est le signe d'une infection en cours qu'elle soit aiguë ou chronique.

#### **I.4 Mutants d'échappement à la vaccination contre le VHB**

Ils se caractérisent par des mutations de l'AgHBs affectant la protection vaccinale. Ces mutants, apparus de novo ou sélectionnés sous la pression immunitaire anti-HBs, dans la population vaccinée, ne sont pas neutralisés par les anti-HBs vaccinaux. Ceci est lié à une mutation, stable, apparue sur la région codante pour la partie hydrophile (boucle externalisée) du déterminant « a » de l'AgHBs. Cette mutation, située entre les acides aminés 124 à 147 (le plus souvent, substitution d'une glycine par une arginine en position 145), modifie l'organisation structurale des épitopes d'enveloppe qui diminue l'affinité de fixation des anti-HBs. La description de mutants d'échappement est très intéressante au plan virologique, sa menace pour l'efficacité vaccinale reste cependant exceptionnelle.

La mutation G145R est la première mutation d'échappement à la vaccination (MEV) contre le VHB qui a été décrite pour la première fois en 1990 [12] et plus tard, plusieurs autres MEV notables (I / T126S, Q129H, G130N, D144A, G145A, sM133T) à différentes positions associées aux infections au VHB ont également été documentées dans plusieurs pays [13–15]. En plus de provoquer un échec immunologique, les MEV sont aussi associés à une infection occulte du VHB [16, 17] et sont susceptibles de réduire la liaison des anticorps dirigés contre la protéine de petite enveloppe de type sauvage dans des conditions expérimentales [18].

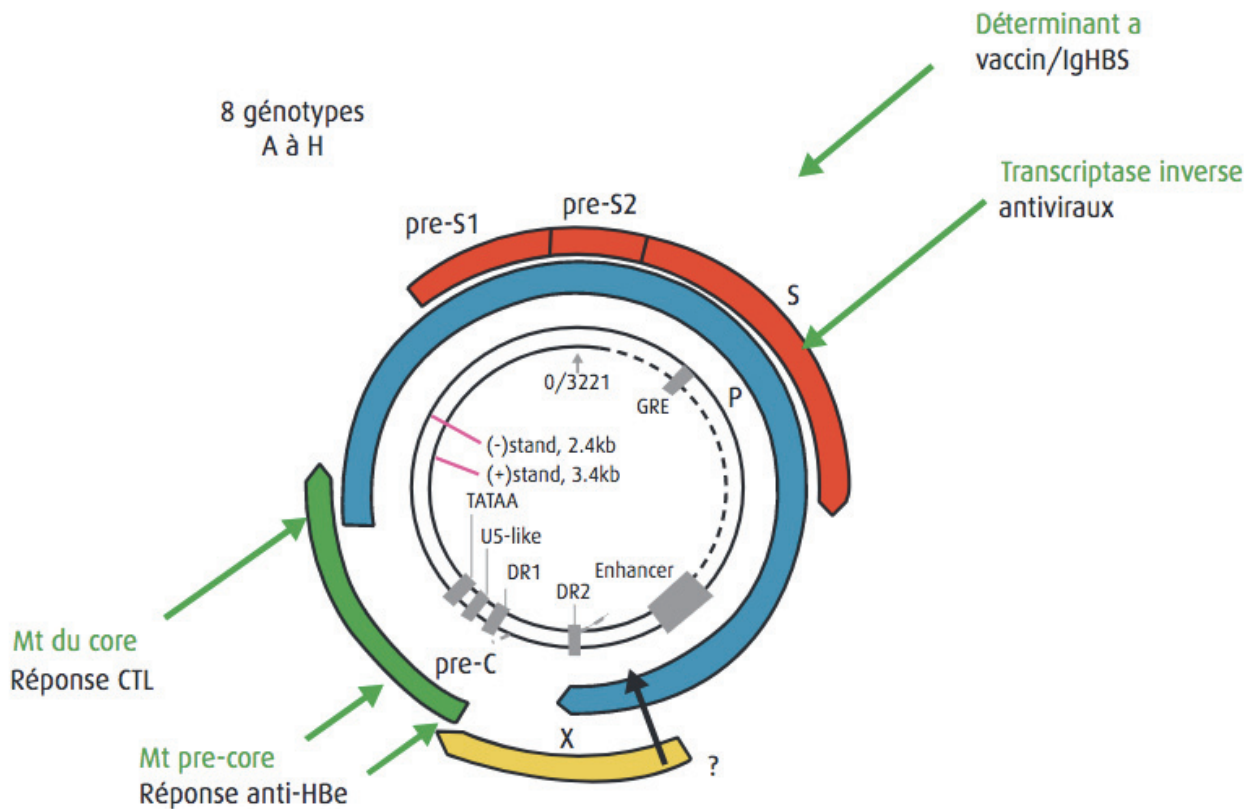


Figure 2 : Génome du VHB (schéma copié de [19])

## I.5 Réplication viral du VHB et sa physiopathologie

La réplication des hépadnavirus est complexe. Elle passe par une phase de transcription inverse ARN > ADN qui la fait apparenter au virus de la mosaïque du chou-fleur (virus à ADN) et aux rétrovirus [20]. Après la fixation du virus sur la cellule, et pénétration l'ADN viral partiellement double brin est transformé en ADN double brin super enroulé (cccDNA pour « covalently closed circular DNA ») qui sert de matrice pour la transcription de quatre ARNm viraux. Le plus grand ARNm, (plus long que le génome viral), est utilisé pour synthétiser de nouvelles copies du génome et pour fabriquer la protéine de capsid et l'ADN polymérase virale. La persistance de l'ADN super enroulé dans la cellule infectée pourrait jouer un rôle majeur dans la chronicité des infections à hépadnavirus[21]. Il y a ensuite synthèse et encapsidation de l'ARN pré-génomique, puis synthèse des brins (-) et (+) de l'ADN viral (Figure 3).

La réponse immunitaire est responsable à la fois des lésions hépatiques et de l'élimination du virus au cours de l'infection par le virus de l'hépatite B. La réponse immunitaire adaptée, en particulier celle des cellules T cytotoxiques spécifiques du virus (CTLs), contribue à la formation de la plupart des lésions hépatiques associées à l'infection par le VHB. Ces CTL tuent les cellules infectées en produisant des cytokines antivirales qui sont capables d'éliminer le virus de l'hépatite B des hépatocytes viables. Bien que l'atteinte hépatique soit initiée et réalisée par les CTLs, les cellules inflammatoires non spécifiques d'un antigène peuvent aggraver les lésions immunopathologiques induites par les CTL, et l'activation des plaquettes sur le site de l'infection peut faciliter l'accumulation des CTLs dans le foie [22].

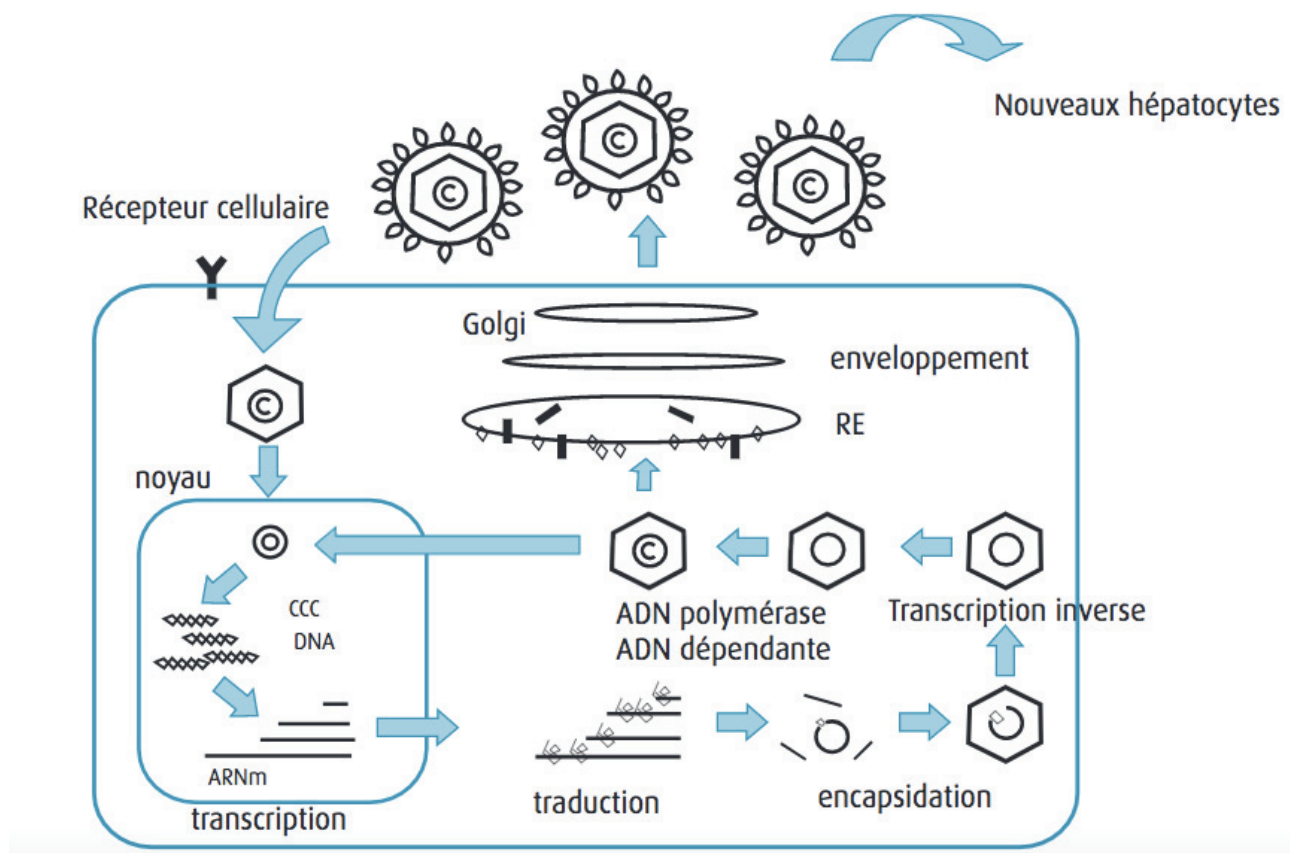


Figure 3 : Le cycle de réplication du VHB (schéma copié de [19])

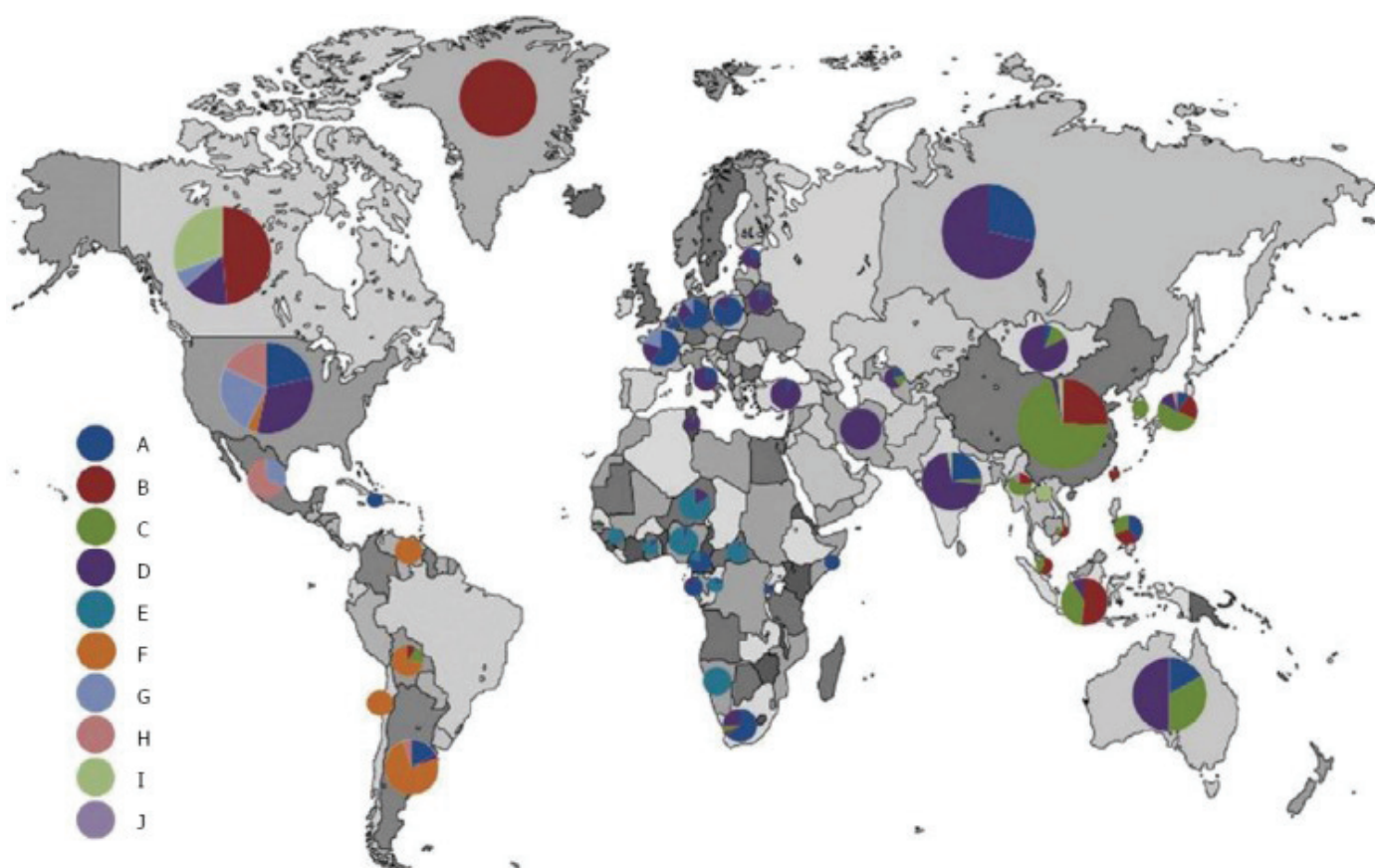
## I.6 La variabilité du VHB

### I.6.1 Les sérotypes

Le virus est divisé en quatre grands (adr, adw, ayr, ayw) sur la base des antigéniques présents sur les protéines de son enveloppe.

## **I.6.2 Les géotypes**

Il existe différents géotypes du VHB correspondant à une variabilité dans les épitopes de l'antigène de surface. Cette variabilité est définie par une hétérogénéité du génome viral. Cette divergence génomique a permis de regrouper les différentes souches du VHB en dix géotypes bien connus (A-J) du génome du VHB ont été définis. La séquence du VHB est caractérisée par des différences de nucléotides > 8% pour le géotype, et de 4% à 8% de différences de nucléotides pour le sous-géotype. Les différents géotypes et sous-géotypes présentent une distribution géographique différente et sont liés à la progression de la maladie, à la progression clinique, à la réponse au traitement antiviral et au pronostic. Le géotype A est répandu en Afrique subsaharienne, en Europe du Nord et en Afrique de l'Ouest ; les géotypes B et C sont plus fréquents en Asie; le géotype C est souvent retrouvé en Asie du Sud-Est; le géotype D est fréquent en Afrique, en Europe, dans les pays méditerranéens et en Inde; le géotype G est signalé en France, en Allemagne et aux États-Unis; et le géotype H est principalement rencontré en Amérique centrale et en Amérique du Sud. Le géotype I a été identifié au Vietnam et au Laos. Le plus récent géotype du VHB, le géotype J, a été identifié dans les îles Ryukyu au Japon. La distribution géographique des géotypes du VHB peut être liée à la voie d'exposition. Par exemple, les géotypes B et C sont plus fréquents dans les régions à forte endémie où la transmission est périnatale ou verticale. D'autres géotypes sont observés dans les régions où la transmission est horizontale [23, 24]



**Figure 4: Distribution mondiale des génotypes et sérotypes de HBV (schéma copié de [24])**

## **I.7. Mode de transmission**

Le VHB peut survivre en dehors du corps pendant au moins 7 jours. Il est résistant à la chaleur et à la sécheresse. Il peut être conservé au moins 15 ans à  $-15^{\circ}\text{C}$ . Il faut de l'eau de javel à 5% de concentration pour être détruit alors que la plupart des virus sont détruits à une concentration de 0,5% [25]. Le virus est susceptible d'infecter toute personne non protégée par la vaccination. La période d'incubation de l'hépatite B est de 75 jours en moyenne, mais peut varier de 30 à 180 jours. Le virus est détectable 30 à 60 jours après la pénétration du virus dans l'organisme [26].

Trois modes de transmission du VHB ont été décrits.

### **I.7.1 Transmission parentérale**

La contagiosité du virus de l'hépatite B est liée à sa présence dans les liquides biologiques des sujets infectés. Des concentrations très élevées de particules virales allant jusqu'à  $10^8$  à  $10^9$  virions par ml sont retrouvées dans les infections aiguës ou chroniques. L'infection pourrait donc se produire par l'utilisation de matériels mal stérilisés lors d'actes chirurgicaux

ou dentaires. Le personnel médical et paramédical non immunisé est donc particulièrement exposé à la contamination notamment dans les unités d'hémodialyse et les laboratoires d'analyses si des précautions très strictes ne sont pas prises. Les toxicomanes intraveineux, les tatouages ou l'utilisation de rasoirs ou d'objets similaires contaminés par du sang infecté peuvent aussi transmettre le virus [21].

D'autre part, le virus ou l'ADN viral ont été mis en évidence dans la salive, dans les urines, les écoulements menstruels ou des sécrétions vaginales et séminales, dans le lait maternel et dans une moindre mesure dans les larmes, la sueur et les selles des patients infectés mais en quantité moindre que dans le sang. Ceci influe sur les modalités de transmission et si la voie sanguine est sans doute la plus fréquente, elle n'est pas seule à prendre en compte [25].

### **I.7.2 Transmission par voie sexuelle**

Des quantités importantes de virions dans les sécrétions sexuelles avec environ  $10^7$  virions par ml. C'est donc une infection sexuellement transmissible aux personnes non vaccinées. en comparaison avec l'infection par le virus de l'immunodéficience acquise (VIH), le risque de contamination par voie sexuelle peut varier de 30 à 80 % pour le VHB et de 0,1 à 10 % pour le VIH [21].

### **I.7.3 Transmission mère - enfant**

Le VHB peut être transmis *in utero* ou pendant l'accouchement [27–29]. Le risque pour le nouveau-né d'être infecté pour le VHB est faible si la réplication virale chez la mère est faible mais très élevé en cas de réplication élevée. La transmission du VHB de la mère à l'enfant peut se faire *in utero*, pendant l'accouchement ou en bas âge par contacts étroits avec la mère. L'infection chronique se développe chez 65 à 90% des nourrissons infectés [27]. En revanche, il n'y a pas d'étude montrant que l'allaitement maternel par une femme infectée par le VHB est une source d'infection. Les concentrations d'ADN viral dans le lait maternel sont en effet très faibles. À la suite d'études comparant des enfants allaités ou non par une mère infectée par le VHB, il est apparu qu'il n'y avait pas d'association du risque d'infection de l'enfant avec l'allaitement maternel et l'Organisation Mondiale de la Santé



(OMS) considère que l'infection de la mère n'est pas une contre-indication à l'allaitement maternel.

## **I.8 Clinique**

Il existe différentes formes cliniques de l'hépatite B.

### **I.8.1 Infection aiguë**

L'hépatite B aiguë chez l'adulte se caractérise par un syndrome pré-ictérique (coloration jaune de la peau et des muqueuses par défaillance d'une enzyme hépatique) qui apparaît plusieurs semaines après la contamination. L'hépatite B aiguë se présente sous différentes formes : une forme asymptomatique ou anictérique dans 60-70 % des cas environ et une forme symptomatique : 30 % des cas [21]. Les sujets sont atteints d'ictère, ils ont les urines foncées, des selles normales ou décolorées. La maladie commence par une légère fièvre, des douleurs mal systématisées, le tout évoquant un état grippal ainsi que des troubles digestifs, une perte d'appétit, des nausées, des vomissements, l'ictère apparaît plus tard permettant d'affirmer le diagnostic. Parfois, un prurit est noté comme dans toutes les formes d'hépatite dont il peut être le premier signe. La maladie dure quelques semaines puis, la plupart des personnes touchées présentent une amélioration progressive. Chez le nourrisson, l'infection est asymptomatique. Quelques très rares formes fulminantes ont été décrites chez le nouveau-né.

### **I.8.2 Infection chronique**

L'infection chronique est définie par la persistance de l'antigène HBs pendant plus de 6 mois. Elle est le plus souvent asymptomatique. Le plus courant des symptômes étant une asthénie, qui peut être due à de multiples étiologie. L'infection au VHB est très souvent découverte tardivement et de manière fortuite. Par exemple, lors d'un don du sang, d'une grossesse ou d'un bilan sanguin. Le portage chronique du VHB est confirmé par l'absence d'anticorps anti-HBs.

L'hépatite B chronique est caractérisée histologiquement par des lésions hépatiques associant nécrose hépatocytaire, infiltrat inflammatoire et fibrose. Ces lésions hépatiques sont dues à un ensemble de réactions immunologiques à médiation principalement cellulaire. La destruction des hépatocytes par le système immunitaire conduit à la libération

d'enzymes hépatiques, comme l'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT). L'augmentation des taux de transaminases sériques qui est facilement détectable signe une cytolysse hépatique importante. Dans le cas d'une hépatite chronique active, la réaction immunologique est dirigée contre les hépatocytes où a lieu la réplication virale et qui expriment à leur surface les antigènes HBc et HBe.

L'évolution de l'infection chronique est souvent décrite en 4 phases qui correspondent à des profils de marqueurs sérologiques spécifiques et dépendent de la réaction immunitaire contre le virus (Figure 5) :

1) la phase "d'immunotolérance" avec inflammation hépatique minime et présence de l'AgHBe avec une réplication virale très importante. Cette phase dure une à plusieurs années. Les patients qui sont dans cette phase sont très contagieux en raison des taux élevés d'ADN du VHB

2) la phase "immune active" correspondant à la maladie chronique active avec risque de progression vers la cirrhose et le cancer du foie. C'est une phase qui présente une séroconversion HBe, au cours de laquelle la réponse immunitaire s'intensifie. Il y a diminution, puis disparition dans le sérum des marqueurs de réplication virale, d'abord l'ADN puis l'antigène HBe.

3) la phase "chronique inactive avec l'antigène HBs positif et l'antigène HBe négatif" (précédemment dénommée état de portage de l'antigène HBs chronique asymptomatique). Elle ne survient pas dans tous les cas. Elle est caractérisée par l'absence des marqueurs de réplication et la présence de l'anticorps anti-HBe. Durant cette phase, l'activité de la maladie hépatique est faible, voire nulle. Mais, il peut se reproduire une réactivation pendant cette phase.

4) La phase de réactivation : À cette phase, peut succéder une phase qui se caractérisera par l'absence de l'AgHBs, et éventuellement l'apparition d'anticorps anti-HBs qui pourront parfois persister transitoirement. Le marqueur de type anticorps anti-HBc reste le plus souvent positif. Ce marqueur peut être parfois absent mais des traces d'ADN viral circulant détectables seulement des techniques de PCR ultra-sensible donc il persiste dans le tissu infecté des cellules comportant l'ADN viral superenroulé pouvant être à l'origine d'une réplication virale comme dans l'infection virale B occulte possiblement à l'origine d'une oncogenèse viro-induite [30].

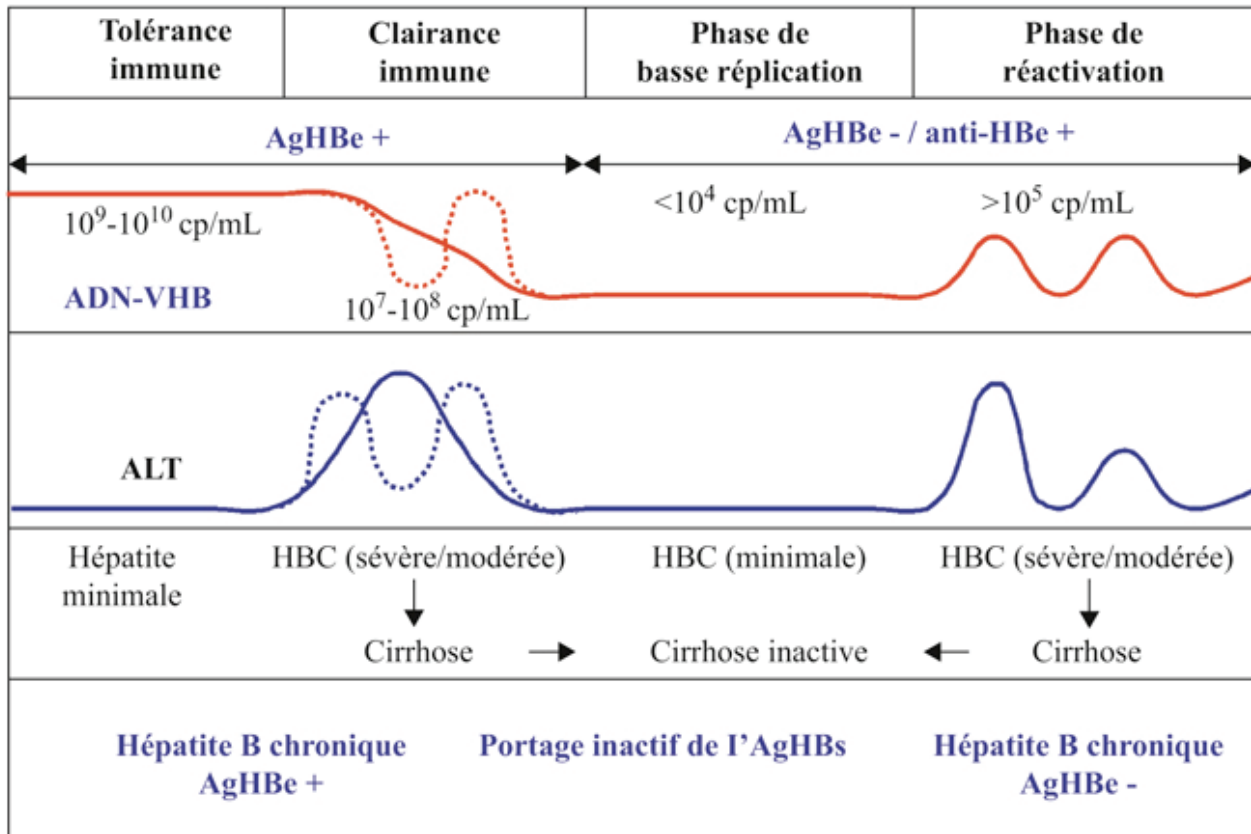


Figure 5 : Evolution de l'infection chronique de l'hépatite B (schéma copié de [31])

## I.9 Diagnostic

Le diagnostic de l'infection est posé sur des critères sérologiques et virologiques.

### I.9.1 Marqueurs sérologiques

Il s'agit des antigènes (Ag), qui constituent un signe direct de la présence du virus et des anticorps (Ac) ou immunoglobulines produites par le système immunitaire.

L'évolution décrite ci-dessous est celle typiquement observée chez l'adulte récemment infecté dont l'infection est résolutive.

Les différents marqueurs de l'hépatite B n'apparaissent pas au même stade de la maladie. Dans un premier temps, on peut détecter l'antigène HBs, qui persiste en général entre une semaine et trois mois. Simultanément, ou peu après, apparaît l'antigène HBe, témoin d'une répliation intense du virus (avec un risque de transmission élevé). Puis apparaissent les anticorps produits par l'organisme. Le premier à apparaître, moins d'un mois après la contamination, est l'anticorps anti-HBc, dirigé contre l'antigène HBc, l'antigène « core » (central) du VHB qui n'est pas détectable dans le sang. Lors de la phase aiguë de l'hépatite

B, l'anticorps anti-HBc est de classe IgM (IgM anti-HBc) ; à l'inverse, une hépatite chronique active se traduit généralement par une augmentation exclusive des anti-HBc de type gamma (IgG anti-HBc). Puis apparaît l'anticorps anti-HBe qui permet habituellement chez l'adulte récemment infecté la clairance de l'antigène HBe. Ce passage de l'état de porteur d'antigène à celui de porteur d'anticorps signe la séroconversion. La séroconversion HBe est le signe que la réplication virale diminue, autrement dit que le virus se reproduit avec moins de vigueur. La séroconversion HBs s'ensuit habituellement (Figure 6).

Après la disparition de l'antigène HBs et l'apparition de l'anticorps anti-HBs, ce dernier pourra demeurer plusieurs années avant de disparaître à son tour. Il ne restera alors que l'anticorps anti-HBc, témoin d'une hépatite ancienne. Si l'antigène HBe persiste au-delà de huit à dix semaines après l'apparition des symptômes de l'hépatite, c'est que la réplication virale se poursuit et qu'une infection chronique se développe. Dans ce cas, l'antigène HBs ne disparaîtra pas et l'anticorps anti-HBs n'apparaîtra pas (Figure 7).

Le passage de l'antigène HBs à l'anti-HBs est observé parfois pendant les 2 dernières phases (spontanément, cette évolution se produit dans 1 % des cas par an). Le porteur inactif souvent appelé « porteur sain » a des transaminases normales, l'antigène HBs est positif, l'antigène HBe est négatif et l'ADN VHB est négatif. Il est contagieux et n'a pas toujours un foie normal à la biopsie.

Evolution des marqueurs (Tableau 1)

- L'antigène HBs prouve que le virus est présent dans l'organisme ; sa persistance plus de deux mois après l'infection fait craindre le passage à une forme chronique.
- L'anticorps anti-HBs est un indicateur d'immunisation contre le VHB.
- L'antigène HBe témoigne de la multiplication du virus et donc d'un risque de contagion important.
- L'anticorps anti-HBe signale la fin de la période de multiplication virale.
- L'anticorps anti-HBc est un signe que l'organisme a, un jour ou un autre, croisé le virus de l'hépatite B mais il ne dit pas si la personne est malade ou guérie.

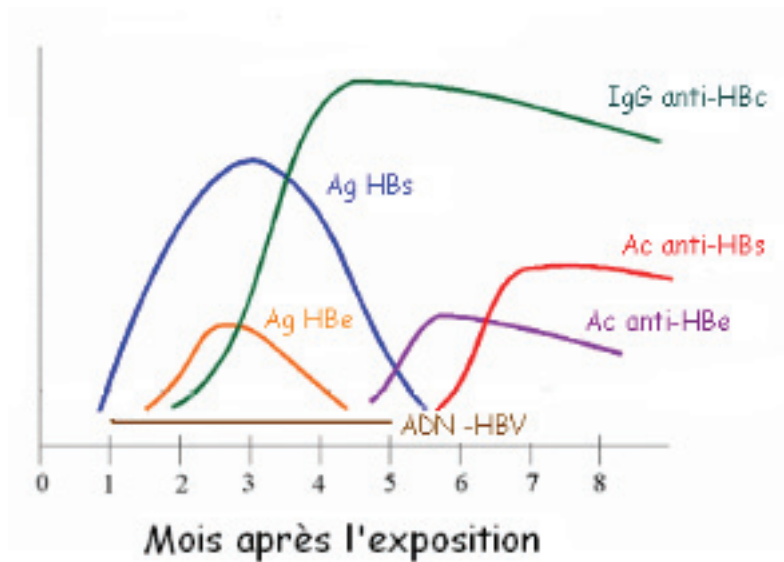


Figure 6. Cinétique de marqueurs sériques de l'Hépatite virale B aiguë (schéma copié de [32])

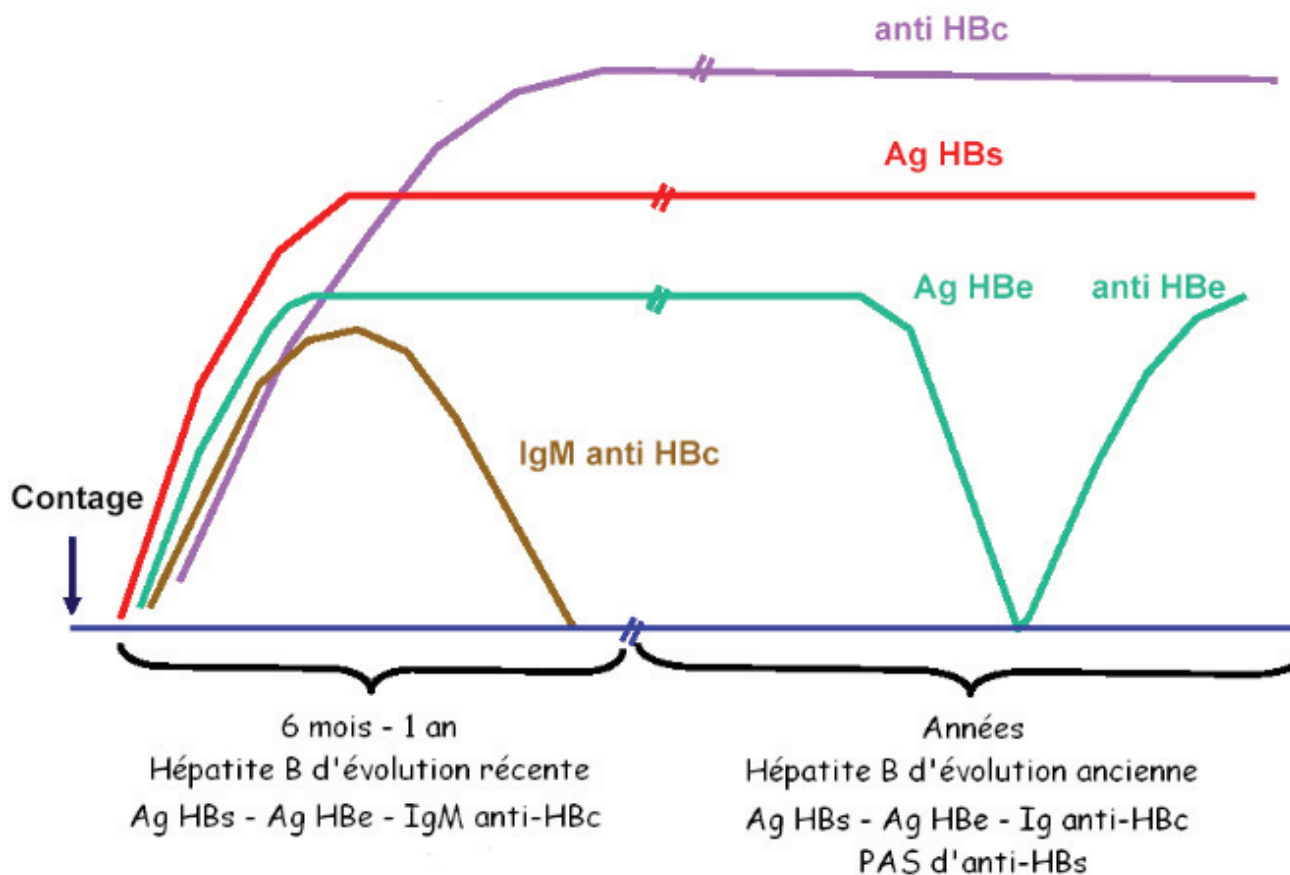


Figure 7: Cinétique des marqueurs sériques au cours d'une hépatite virale B chronique (schéma copié de [32])

Chez les nourrissons infectés, l'évolution est habituellement très différente de celle des adultes récemment infectés. L'antigène HBe persiste. Les anticorps anti-HBe

n'apparaissent pas, signant l'évolution chronique. A l'âge adulte, en Asie du sud-est, la séroconversion de l'antigène HBe est observée typiquement entre 20 et 30 ans mais l'antigène HBs persiste le plus souvent.

## I.9.2 Mesure de la charge virale

La quantification de la charge virale se fait par la mesure de l'ADN du virus dans le sang par l'amplification génomique (PCR ou Polymerase Chain Reaction) qui le test le plus sensibles permettent de détecter des concentrations inférieures à 50 copies/mL.

Le nombre de particules virales est exprimé en puissance de 10 ou en échelle logarithmique. Lorsque la charge virale fluctue entre l'indéteçtabilité et 10 000 copies/ml, soit  $10^4$  ou 4 log, l'hépatite est considérée comme inactive. Au-delà de 100 000 copies/ml, soit  $10^5$  ou 5 log (la charge virale peut aller au-delà de 10 milliards de copies/ml, soit  $10^{10}$  ou 10 log), elle est considérée comme active. Entre 10 000 et 100 000 copies soit entre  $10^4$  et  $10^5$ , ou entre 4 et 5 log, l'interprétation est plus délicate. Dans certains cas, cela correspond à une hépatite inactive ; dans d'autres, à une hépatite active faiblement virémique. Seul un suivi dans le temps permet de se faire une idée. Une charge virale qui passe de 100 000 à 200 000 copies, c'est une charge virale qui ne bouge pas. Pour que l'évolution soit significative, il faut qu'elle soit au moins d'un facteur 10. Au cours d'une réactivation, il existe un décalage temporel avec d'abord une augmentation de la charge viral puis éventuellement une augmentation des transminases. En cas d'hépatite inactive, une augmentation de la charge virale peut donc être annonciatrice d'une réactivation et impose de rapprocher la surveillance.

**Tableau 1 : Marqueurs sériques, interprétation**

Marqueur sérologique	Période d'incubation	Infection aiguë	Infection résolue	Infection chronique	Vaccination
HBsAg	±	+	-	+	-
Anti-HBs	-	-	+	-	+
Anti-HBc (total)	-	±	+	+	-
Anti-HBc-IgM	-	+	-	±	-
HBeAg	±	+	-	±	-
Anti-Hbe	-	-	±	±	-
HBV-DNA	±	+	±	+	-

## I.10 Attitude thérapeutique

L'objectif du traitement de l'infection chronique par le VHB est d'améliorer la qualité de vie et la survie de la personne infectée en prévenant et en limitant la progression de la maladie vers la cirrhose, la cirrhose décompensée, le cancer du foie, le décès et, accessoirement, de limiter le risque de transmission du VHB aux autres (l'approche 'Test and Treat' n'est pas envisageable avec les médicaments disponibles en Asie du Sud-est qui sont potentiellement toxiques à long terme). Le premier objectif peut être atteint si la réplication du VHB est supprimée de manière prolongée, permettant une réduction de l'activité histologique dans le foie, diminuant alors le risque de cirrhose et le risque de carcinome hépatocellulaire (CHC), en particulier chez les patients non cirrhotiques. Cependant, l'infection par le VHB ne peut pas être complètement éradiquée à cause de la persistance de l'ADN circulaire dans le noyau des hépatocytes infectés, et aussi, le génome du VHB s'intègre dans le génome de l'hôte et pourrait favoriser l'oncogenèse et le développement du CHC [33].

L'infection aiguë par le VHB ne nécessite habituellement pas de traitement. Les soins visent alors à préserver le confort du malade, son équilibre nutritionnel, et son hydratation en cas de vomissements et de diarrhée. La plupart des adultes guérissent spontanément de l'infection [34]. Néanmoins, il existe de rares cas d'hépatite B aiguë fulminantes pour lesquelles la mise en route de traitement antiviral pourra être envisagée. Dans ces mêmes formes au pronostic spontanément mauvais, la transplantation hépatique peut également être discutée.

Le traitement est généralement indiqué pour les personnes chroniquement infectées avec persistance d'un taux élevé d'ALT et un niveau élevé d'ADN viral du VHB dans le plasma. Bien qu'aucun des médicaments disponibles ne soit capable d'éliminer l'infection, certains médicaments inhibent la réplication du virus, et préviennent les atteintes du foie comme la cirrhose et le cancer du foie. Les traitements actuellement utilisés sont des médicaments antiviraux tels que le fumarate de disoproxil ténofovir (TDF), ou l'entecavir (ETV), et les modulateurs du système immunitaire tels que l'interféron alpha, Peginterféron alfa-2a. Toutefois, certaines personnes sont beaucoup plus susceptibles de répondre que d'autres possiblement en rapport avec le génotype du virus ou de l'hérédité du patient. Le traitement agit en réduisant la réplication virale. La transplantation hépatique est indiquée en cas de cirrhose sévère, d'hémorragie digestive ou d'encéphalopathie compliquant la cirrhose. Elle pose essentiellement le problème de la récurrence de l'infection par le VHB sur le greffon.

Les indications du traitement reposent généralement sur la combinaison de trois critères : les taux sériques d'ADN du VHB, les taux sériques d'ALT, la sévérité de la maladie hépatique (évaluée cliniquement, par biopsie hépatique ou par des méthodes non invasives). Les indications du traitement doivent également prendre en compte l'âge, l'état de santé, les antécédents familiaux de CHC ou de cirrhose et les manifestations extra-hépatiques (Tableau 2) [35].

Tableau 2 : Indications de traitement pour les patients chroniquement infectés par le VHB

Stades de l'hépatite B chronique	VHB ADN (IU/ml)	ALT	Traitement
Cirrhose décompensée	DéTECTABLE	Quelconque	Traiter
Cirrhose compensée	DéTECTABLE	Quelconque	Traiter
Réactivation sévère de l'hépatite B chronique	DéTECTABLE	Elevé	Traiter
Hépatite B non-cirrotique chronique et Ag HBe positif	> 20000	> 2 x valeur supérieure de la limite de la normale	Observation pendant 3 mois si aucun problème de décompensation hépatique. Traiter si les ALT restent élevées. Obtenir l'histologie ou évaluer la fibrose de manière non invasive <sup>a</sup>
		1–2 x valeur supérieure de la limite de la normale	Évaluer la fibrose de manière non invasive. Surveiller tous les 3 mois. Biopsie si les tests non invasifs suggèrent une fibrose significative, ALT élevées, âge >35 ans ou antécédent familial de CHC ou de cirrhose du foie. Traiter en cas d'inflammation modérée à sévère ou de fibrose significative <sup>a</sup>
		Normal, age <30 (phase d'immuno-tolérance)	Évaluer la fibrose de manière non invasive. Surveiller tous les 3 mois. Biopsie si les tests non invasifs suggèrent une fibrose significative, ou s'il y a un antécédent familial de CHC ou cirrhose. Traiter en cas d'inflammation modérée à sévère ou de fibrose significative <sup>a</sup>
	2000–20,000	Quelconque	Exclure d'autres causes d'ALT élevées. Évaluer la fibrose de manière non invasive. Surveiller tous les 3 mois. Biopsie si les tests non invasifs suggèrent une fibrose significative, âge >35 ans, ALT élevées de façon persistante, ou antécédent familial de CHC ou de cirrhose. Traiter en cas d'inflammation modérée à sévère ou de fibrose significative <sup>a</sup>



	< 2000	Normal	Évaluer la fibrose de manière non invasive. Surveiller tous les 3 mois. Biopsie si les ALT deviennent élevées, si les tests non invasifs suggèrent une fibrose significative, âge >35 ans ou antécédent familial de CHC ou de cirrhose. Traiter en cas d'inflammation modérée à sévère ou de fibrose significative <sup>a</sup>
		> Normal	Exclure d'autres causes d'ALT élevées. Évaluer la fibrose de manière non invasive. Surveiller tous les 3 mois. Biopsie si les tests non invasifs suggèrent une fibrose significative, si les ALT sont constamment élevées, l'âge >35 ans ou s'il y a un antécédent familial de CHC ou cirrhose. Traiter en cas d'inflammation modérée à sévère ou de fibrose significative <sup>a</sup>
Hépatite B chronique non cirrhotique et AgHBe négatif	>2000	> 2x valeur supérieure de la limite de la normale	Observation pendant 3 mois si aucun problème de décompensation hépatique. Traiter si persistance de l'anormalité. Obtenir l'histologie ou évaluer la fibrose de manière non invasive.
		1–2x valeur supérieure de la limite de la normale	Exclure d'autres causes d'ALT élevé. Évaluer la fibrose de manière non invasive. Surveiller tous les 3 mois. Biopsie si les tests non invasifs suggèrent une fibrose significative, l'âge >35 ans, ALT est élevée de façon persistante, ou il y a un antécédent familial de CHC ou cirrhose. Traiter, si inflammation modérée à sévère ou fibrose significative <sup>a</sup>
		Normales	Évaluer la fibrose de manière non invasive. Surveiller tous les 3 mois. Biopsie si ALT devient élevée, les tests non invasifs suggèrent une fibrose significative, l'âge >35 ans ou il y a un antécédent familial de CHC ou cirrhose. Traiter en cas d'inflammation modérée à sévère ou de fibrose significative <sup>a</sup>
	< 2000	> valeurs normales	Exclure d'autres causes d'ALT élevées. Évaluer la fibrose de manière non invasive. Surveiller tous les 3 mois. Biopsie si tests non invasifs suggestifs de fibrose significative, ALT sont constamment élevées, âge >35 ans ou si antécédent familial de CHC ou cirrhose. Traiter en cas d'inflammation modérée à sévère, ou de fibrose significative <sup>a</sup>
		Normales	Évaluer la fibrose de manière non invasive. Surveiller ALT tous les 3-6 mois et/ou l'ADN tous les 6-12 mois. Biopsie si tests non invasifs suggestifs de fibrose significative, ALT sont constamment élevées, âge >35 ans ou si antécédent familial de CHC ou cirrhose. Traiter en cas d'inflammation modérée à sévère, ou de fibrose significative <sup>a</sup>

<sup>(a)</sup> Une inflammation modérée à sévère sur biopsie hépatique reflète soit l'indice d'activité hépatique par le score d'activité Ishak >3/18, soit le score d'activité METAVIR A2 ou A3; Fibrose significative signifie F C2 selon le score de fibrose METAVIR ou le stade C3 de la fibrose d'Ishak. Une fibrose significative est estimée par des marqueurs non invasifs : C8 kPa (par Fibroscan) ou APRI C1.5. Une cirrhose est estimée par des marqueurs non invasifs : C11 kPa (par Fibroscan) ou APRI C2.0

## **I.11 Hépatite B dans les cas particuliers**

### **I.11.1 Co-infection par le VHB et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)**

L'hépatite B et le VIH partagent des modes de contamination similaires tels que la transmission par voie parentérale, voie sexuelle et transmission de la mère à l'enfant. Pour cette raison, la co-infection par le VIH et le VHB est élevée dans les pays où l'infection par le VHB est généralement acquise à l'adolescence ou à l'âge adulte. Ce n'est pas le cas dans les pays à haute prévalence où l'infection par le VHB est essentiellement acquise dans la petite enfance. Chez les patients co-infectés VHB-VIH le risque de passage de l'hépatite aiguë B à la chronicité est augmenté ; la réactivation du VHB chez les porteurs inactifs du VHB est plus fréquente [36]; les séroconversions spontanées HBs ou HBe sont moins fréquentes ; la progression de la maladie hépatique vers la fibrose est plus rapide et le risque de carcinome hépatocellulaire est plus élevé [37].

### **I.11.2 Co-infection par le VHB et le virus de l'hépatite C (VHC)**

VHB et VHC partagent le même tropisme hépatique. L'évolution vers la sévérité de la maladie hépatique et un développement plus rapide vers les stades de fibroses, cirrhoses et CHC plus rapide sont observés que chez les cas co-infectés VHB-VHC en comparant avec des cas de mono-infection quelle que soit par le HBV ou le HCV [38]. Les recommandations de l'«European Association for the Study of the Liver, Association» (EASL) en 2017 mentionnent le risque de réactivation du VHB pendant ou après l'élimination du VHC par les antiviraux à action directe (AAD), qui ont pour cible des protéines non structurales spécifiques du virus de l'hépatite C et induisent une perturbation de la réplication et de l'infection virales. En effet, ceux-ci ont une efficacité plus élevée contre le VHC et un manque d'activité contre le VHB [39].

### **I.11.3 Infection chronique par le VHB chez la femme enceinte**

Lorsque les femmes chroniquement infectées par le VHB sont en âge de procréer et qu'elles nécessitent un traitement antiviral, la question de la grossesse devrait idéalement être discutée avant la survenue d'une grossesse. Un traitement à base d'interféron (IFN) avant la grossesse pourrait être proposé car du fait de son effet anti-prolifératif, le traitement par IFN est contraindiqué pendant la grossesse. Cependant cette stratégie n'est pas souvent réalisable, en particulier dans les pays à ressources limitées. En réalité une importante proportion des femmes apprennent qu'elles sont infectées pendant la grossesse. Chez les femmes enceintes infectées par le VHB qui ont besoin d'un traitement antiviral ou chez les femmes qui ont une grossesse non programmée alors qu'elles sont déjà sous traitement antiviral, il faut considérer les risques et les avantages pour la mère et le fœtus. Si un traitement est prescrit pour une durée courte pour prévenir la transmission verticale du VHB, le risque d'exacerbation de la maladie hépatique à l'arrêt du traitement (avec élévation des d'ALT) doit être aussi considéré. Il faut aussi élaborer un plan à long terme pour la prochaine grossesse et le traitement de la femme [40, 41]

#### **I.11.3.1 Traitement antiviral pour les femmes enceintes infectés par le VHB**

Pendant la grossesse, l'interféron est contraindiqué. La lamivudine est classée dans la catégorie C de la FDA mais les données acquises chez les femmes enceintes, notamment grâce à l'Antiretroviral Pregnancy Registry ont montré que le risque d'anomalies congénitales n'était pas plus élevé que dans la population générale ; cependant le risque de résistance du VHB à la lamivudine est élevé et ce traitement n'est plus recommandé. L'entécavir est aussi classé dans la Catégorie C et les données pendant la grossesse sont limitées. Seul le fumarate de ténofovir disoproxil est classé Catégorie B et les données recueillies par l'Antiretroviral Pregnancy Registry sont rassurantes. C'est donc le médicament de choix pendant la grossesse. Les principaux facteurs de risque sont l'AgHBe maternel et une charge virale élevée [42–44]. Pour prévenir la transmission de la mère à l'enfant pendant la grossesse et la période post-natale, l'utilisation d'un traitement court par analogues nucléosidiques (AN) a été proposé pour diminuer la réplication virale. Plusieurs études ont évalué cette approche, en commençant le traitement à partir du deuxième ou du troisième trimestre de la grossesse. Plusieurs études cliniques non randomisées ou sans insu ont été étudié l'efficacité et la tolérance de la LAM, le LdT ou le TDF [45–48]. Plus récemment, deux essais cliniques randomisées ont apporté plus d'information sur l'efficacité et la tolérance du TDF chez la femme enceinte pour prévenir la transmission du VHB à

l'enfant [49, 50]. Dans ces deux études récentes, les taux de transmission de la mère à l'enfant étaient différents. (2% dans une étude qui a été réalisée en Thaïlande et 7% [49] dans une étude réalisée en Chine [50]). Ces enfants n'avaient reçu qu'une association HBIG et le vaccin anti VHB et étaient nés de mère ayant un AgHBe positif. Cette différence pourrait être liée à la proportion des femmes enceintes qui avaient une charge virale > 200 000 UI/L au moment de l'accouchement et le taux de naissance par césarienne, qui étaient plus élevés dans l'étude réalisée en Chine que dans celle réalisée en Thaïlande. Par ailleurs, le calendrier vaccinal des nourrissons était aussi différent (Cinq doses dans l'étude réalisée en Thaïlande (à la naissance, 1,2,4 et 6 mois après la naissance) et trois doses dans l'étude réalisée en Chine (à la naissance, 1 et 6 mois après la naissance)). Néanmoins la question de l'impact du schéma vaccinal dans la protection de l'enfant n'est pas évident dans cette étude. En effet l'OMS, recommande une dose à la naissance du vaccin contre le VHB suivi d'au moins deux doses ultérieures.

### **I.11.3.2 Recommandations internationales quant à la prévention de la transmission du VHB de la mère à l'enfant**

➤ **Recommandations de "Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL)" [35]**

(La force des recommandations reflète la qualité des preuves sous-jacentes, classées dans l'un des trois niveaux, selon le système GRADE : élevé (A), modéré (B) ou faible (C). Le système GRADE propose deux niveaux de recommandation : fort (1) et faible (2)).

- La question de la grossesse et de la santé materno-fœtale doit être notifiée chez les femmes chroniquement infectées par le VHB à l'âge de procréer, en particulier lorsqu'un traitement antiviral est envisagé. Le plan de traitement doit être entièrement discuté avec le patient et ses proches, en particulier en ce qui concerne les risques de maladie hépatique maternelle, le développement fœtal, la transmission verticale du VHB, le plan à long terme pour le traitement et la grossesse. L'HBeAg maternel, l'état de l'ADN du VHB et le taux d'ALT doivent être vérifiés pendant la grossesse (A1).

- Chez les femmes enceintes chroniquement infectées par le VHB qui ont besoin d'un traitement antiviral, le TDF est le médicament de choix pour le traitement antiviral du premier au troisième trimestre de la grossesse. Il s'agit d'un médicament classé dans la catégorie B pour les femmes enceintes avec des données de sécurité adéquates chez les femmes séropositives avec moins de risque de présenter la résistance virale (B1).

- Pour réduire du risque de transmission mère-enfant qui se produit pendant la période périnatale, l'AN à court terme prescrit chez les femmes enceintes chroniquement infectées par le VHB à partir de 28 à 32 semaines de grossesse est recommandé, utilise soit le TDF ou LTd pour les mères avec l'ADN du VHB au-dessus de  $6-7 \log_{10}$  UI / ml (B2). Comme la transmission du VHB pourrait se produire même avec des taux d'ADN du VHB maternel plus bas, les AN pourraient être administrés après discussion avec le patient, même chez les patients ayant des taux d'ADN plus faibles. Les AN peuvent être arrêtés à la naissance et lorsque l'allaitement commence, s'il n'y a pas de contre-indication à l'arrêt des AN (B2).

- L'allaitement maternel n'est pas déconseillé pendant le traitement des AN chez les mères. Pour ceux qui ont des fluctuations d'ALT apparues pendant la période de traitement, la poursuite du traitement antiviral selon l'état de la maladie du foie maternel peut être indiqué (B2).

➤ **Recommandations de l' "European Association for the Study of the Liver (EASL)" [39]**

Les preuves et les recommandations contenues dans ce guide ont été classées en fonction de «Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation (GRADE) system». La force des recommandations (forte: 1, faible: 2) reflète donc la qualité (grade) des preuves sous-jacentes (I, II-1, II-2, II-3, III).

- Le dépistage de l'AgHBs au cours du premier trimestre de la grossesse est fortement recommandé (niveau de preuve 1, grade de recommandation 1) :

- Chez une femme en âge de procréer, sans fibrose avancée, qui prévoit une grossesse dans un proche avenir, il peut être prudent de retarder le traitement jusqu'à la naissance de l'enfant (niveau de preuve II-2, grade de la recommandation 2).

- Les femmes enceintes chroniquement infectées par le VHB qui présentent une fibrose avancée ou d'une cirrhose. Il est recommandé de les mettre sous thérapie par TDF (niveau de preuve II-2, grade de recommandation 1).

- Chez les femmes enceintes qui sont déjà sous traitement par AN, le TDF doit être continué ou changé pour le TDF si elles sont déjà traitées par d'autres molécules (niveau de preuve II-2, grade de la recommandation 1).

- Chez toutes les femmes enceintes ayant des taux d'ADN du VHB élevés ( $>200\ 000$  UI / mL) ou AgHBs  $> 4 \log_{10}$  UI / mL, la prophylaxie antivirale avec TDF devrait débuter à S24-28 de la grossesse et se poursuivre jusqu'à 12 semaines après l'accouchement (niveau 1, grade de la recommandation 1).

- L'allaitement n'est pas contre-indiqué chez les femmes AgHBs positives qui ne sont pas encore traitées ou sous traitement par TDF ou sous un traitement prophylactique à base de TDF (niveau de preuve III, grade de recommandation 2).

➤ **Recommandations de «the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) [51] (Guidelines for Treatment of Chronic Hepatitis B)**

L'AASLD suggère d'utiliser un traitement antiviral pour réduire le risque de transmission périnatale de l'hépatite B chez les femmes enceintes qui présentent un Ag HBs positif et dont le taux d'ADN du VHB est > 200 000 UI/mL. Les antiviraux recommandés sont LAM, LTd ou TDF à démarrer à S28 - 32 semaines de la grossesse. Le traitement peut être arrêté à la naissance ou continuer jusqu'à trois mois après l'accouchement avec la surveillance des exacerbations d'ALT tous les 3 mois pendant 6 mois. Pour les femmes enceintes atteintes d'hépatite B immunoactive, le traitement doit être basé sur des recommandations pour les femmes non-enceintes. L'allaitement n'est pas contre-indiqué. Ces antiviraux sont excrétés de manière minimale dans le lait maternel et ne sont pas susceptibles de provoquer une toxicité significative. Le risque inconnu d'exposition à un faible niveau chez le nourrisson devrait être discuté avec les mères. La césarienne n'est pas indiquée en raison de données insuffisantes pour soutenir le bénéfice.

➤ **Recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [52]**

Le TDF est l'antiviral préféré pour prévenir la transmission du VHB de la mère à l'enfant car cette molécule a un meilleur profil de résistance et des données plus complètes sur l'innocuité chez les femmes enceintes infectées par le VHB. La sécurité de l'ETV pendant la grossesse n'est pas connue et le traitement à base d'IFN est contre-indiqué. Pour la prévention de la transmission du virus de la mère à l'enfant, la stratégie la plus importante est d'administrer la première dose du vaccin contre l'hépatite B le plus tôt possible après la naissance, de préférence dans les 24 heures, suivies d'au moins deux doses ultérieures opportunes [53].

En conclusion, le traitement à court terme par le TDF en première intention est recommandé par les associations internationales sur les hépatites pour les femmes enceintes qui ont une charge virale du VHB élevée. L'objectif du traitement anti viral est de diminuer la charge

virale chez la mère pour réduire le risque de contamination de son enfant in utero, pendant et après l'accouchement. Il n'y a pas encore de consensus sur la durée ; la date de début et la date d'arrêt du traitement antiviral mais la plupart des recommandations préconisent de démarrer le traitement vers le début du troisième trimestre (S24 – S32 de la grossesse) et de l'arrêter à l'accouchement ou 12 semaines après l'accouchement. Le traitement ne sera arrêté que chez les femmes sans élévation d'ALT et sans fibrose hépatique/cirrhose préexistante. En effet, la poursuite du traitement par AN après l'accouchement peut être nécessaire en fonction de l'état de la maladie hépatique maternelle. Pour les femmes qui arrêteront le traitement, il est observé une élévation des ALT, dû au rebond de réplication virale [42, 44–46]. L'allaitement maternel n'est pas déconseillé chez les mères présentant une infection chronique par le VHB si les nouveau-nés ont reçu une immunoprophylaxie postnatale appropriée.

## **Chapitre II : la situation d'une hépatite B chronique dans le cadre national et la prise en charge de l'hépatite B chronique au Laos.**

### **II. 1 Situation du VHB au Laos**

Le Laos est un pays à forte prévalence. Il n'y a pas eu d'enquête systématique en population générale pour estimer la prévalence de l'hépatite B chronique au Laos mais les données disponibles montrent que la prévalence tant chez les adultes que les enfants est relativement élevée.

Le vaccin contre le VHB a été incorporé dans le Programme élargi de vaccination à partir de 2001 et la dose à la naissance rajoutée en 2004. La prévalence actuelle chez les adultes reflète donc la transmission périnatale antérieure. Une enquête conduite entre 2003 et 2005 à Vientiane chez 13 897 donneurs de sang montrait une séroprévalence de l'AgHBs de 8,7% [54]. 44,7% des donneurs de sang chroniquement infectés (positifs pour HBsAg) étaient aussi positifs pour l'antigène e (AgHBe) [55]. Les données de l'infection par le VHB chez les femmes enceintes varient en fonction des sites de recherches. Une étude réalisée en milieu hospitalier en 2013 a montré une prévalence de 8.2% [56]. En revanche une enquête national réalisé chez les femmes enceintes dans un milieu communautaire a montré une prévalence plus bas de 2,9% [57]. Des données rétrospective recueillies au service de laboratoire de l'hôpital Mahosot pour analyser tous les résultats d'AgHBs par test rapide proposé systématiquement à toutes les femmes enceintes lors de leur première consultation prénatale du 2008 à 2014 varient de 4,6% à 6,2% [58].

Chez l'enfants une prévalence d'une infection par le VHB chez l'enfant de 9-16 mois est de 0,5% et 4,6% chez l'enfant de 1- 4 ans [56], 1,7% chez l'enfant de 5-9 ans [57]. En 2011 la proportion de l'administration d'une vaccination contre le VHB une dose à la naissance est seulement dans 34% pour la raison que la plupart des femmes laotienne accouchent à domicile [51]. La proportion des enfants avec anticorps anti-HBs a été estimé à 66% chez les enfants de 9 - 16 mois [56].

Au Laos, l'infection par le VHB reste une des causes principales du carcinome hépatocellulaire. D'après l'Agence internationale de recherche sur le cancer de l'OMS (Globocan 2012), le cancer du foie est le cancer dont l'incidence est la plus élevée au Laos [60]. La prévention primaire et secondaire du cancer du foie reste donc une préoccupation majeure.



Au Laos, le test d'AgHBs des femmes enceintes et la vaccination contre l'hépatite B des proches contacts sont recommandés mais sont à la charge des familles (prix du vaccin VHB environ 10 dollars US par dose). La vaccination anti-hépatite B à la naissance est gratuite pour tous les nouveau-nés. Les femmes qui n'accouchent pas à l'hôpital peuvent venir faire vacciner leur enfant gratuitement à l'hôpital ou dans les centres de santé. De plus, un service de consultation à domicile pour vacciner le bébé contre VHB a été mis en place depuis 2010. En revanche, les immunoglobulines contre le VHB (HBIG) ne sont pas disponibles au Laos, en relation avec leur coût et la logistique nécessaire (notamment durée de conservation limitée après sa production et le chaîne du froid). Il n'existe pas de recommandations nationales pour la prise en charge de l'infection à VHB au Laos et les médecins se réfèrent dans la plupart des cas à celles de l'*Asian Pacific Association for the Study of the Liver* (Association Asie-Pacifique pour l'étude du foie) ou APASL. Les médicaments antiviraux potentiellement disponibles pour le traitement de l'hépatite B chronique sont les suivants : lamivudine (LAM), adéfovir (ADV), entécavir (ETV), ténofovir disoproxil fumarate (TDF) et Peg-interferon Alfa-2a (PegIFN Alfa-2a). La prévention de la transmission verticale du VHB utilisant un analogue nucléos(t)idique chez les femmes enceintes avec charge virale du VHB élevée ou positive pour l'AgHBe n'est pas encore mise en pratique au Laos.

## **II.2. La prise en charge du VHB dans le système de santé au Laos**

### **II.2.1. Géographie et répartition de la population**

Le Laos est un pays de 236 800 km<sup>2</sup> avec 7 millions d'habitants dont 58% vivent en zone rurale donc faiblement peuplé (30 hab./km<sup>2</sup>) [61]. Il est enclavé au cœur de la péninsule de l'Asie du Sud-Est et partage ses frontières avec la Thaïlande à l'ouest, le Cambodge au sud, le Vietnam à l'est, le Myanmar et la Chine au nord (Figure 8)



Figure 8: Localisation de la RDP Lao [62]

## II.2.2 Les structures de dispenses de soins

Au Laos, le système de santé est très majoritairement assuré par le secteur public. C'est un système pyramidal à trois niveaux : un niveau central (Ministère de la santé), un niveau provincial (bureau de santé provincial) et un niveau district (bureau de santé du district, hôpital de district et centres de soins primaires). Le système opérationnel (structures de soins) doit assurer des dispenses de soins selon une organisation décentralisée en province, district et en centres de santé couvrant plusieurs villages.

L'infrastructure médicale dans le pays est ainsi composée de 4 hôpitaux centraux ; 16 hôpitaux provinciaux pour 17 provinces ; 130 hôpitaux de district pour 143 districts, et 860 centres de santé pour environ 10 000 villages.

Concernant la prise en charge des patients infectés par le VHB, les trois hépatologues qui exercent au Laos sont à l'hôpital central de la capitale Vientiane (Hôpital Mahosot). Pour les

diagnostics et les prescriptions, le rôle des médecins généralistes (6 années d'études) sera essentiel même si le nombre de médecin généralistes est limité au Laos (1,3 médecin pour 1000 habitants) comme dans de nombreux pays de l'Asie du Sud-est [63].

En ce qui concerne le diagnostic du VHB au Laos, les tests rapides de différentes marques sont largement utilisés du fait de leur faible coût et de leur facilité d'utilisation pour le dépistage. L'Elisa n'est disponible que dans un hôpital de référence (Hôpital Mahosot) et au Centre d'infectiologie Laos-Mérieux dans la capitale de Vientiane.

Pour le suivi des patients sous traitement antiviral, la mesure de la charge virale ADN du VHB n'est disponible qu'au Centre d'Infectiologie Laos-Mérieux. L'échographie abdominale et la mesure du niveau de transaminases sont disponibles dans beaucoup des hôpitaux de tous niveaux au Laos. En revanche, le Fibroscan n'est pas disponible dans le pays.

### **II.2.3 Les pharmacies et l'accès aux médicaments antiviraux pour le VHB au Laos**

L'organisation générale du secteur pharmaceutique au Laos relève du Département de l'Alimentation et de la Pharmacie (DAP) du ministère de la santé. La liste nationale des médicaments essentiels en RDP Lao est basée sur celle proposée par l'OMS.

Les pharmacies sont classées en fonction de la qualification du professionnel :

- une pharmacie de niveau I est tenue par un pharmacien diplômé
- une pharmacie de niveau II par un assistant pharmacien
- une pharmacie de niveau III par un professionnel de santé non qualifié

Le traitement pour traiter l'hépatite B n'est disponible que dans les pharmacies de niveau I très majoritairement situées dans la capitale Vientiane. En l'absence de guidelines nationales pour la prise en charge de l'hépatite B, avec un nombre limité de médecins connaissant l'hépatite B, un accès limité aux médicaments, la prise en charge de l'hépatite B chronique au Laos reste difficile dans un système de soins national déjà fortement sollicité par d'autres priorités telles que la malaria, la tuberculose ou bien encore le VIH.

Avant de démarrer notre projet de recherche une première investigation pour avoir une idée sur la prévalence de l'hépatite B chez les femmes enceintes à l'hôpital Mahosot qui est un des deux sites de recherche de notre projet a été effectuée et les résultats de cette investigation a été publié en 2017 dans le journal *Hepatitis Research and Treatment*.

## Research Article

# Prevalence of Hepatitis B Virus Infection among Pregnant Women Attending Antenatal Clinics in Vientiane, Laos, 2008–2014

Marc Choisy,<sup>1,2</sup> Sengdeuane Keomalaphet,<sup>3</sup> Kinnaly Xaydalasouk,<sup>1</sup> Fabrice Quet,<sup>3</sup> Vatthanaphone Latthaphasavang,<sup>3,4</sup> and Yves Buisson<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MIVEGEC, Université de Montpellier, CNRS 5290, IRD 224, Montpellier, France

<sup>2</sup>Oxford University Clinical Research Unit, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>Institut de la Francophonie pour la Médecine Tropicale (IFMT), Vientiane, Laos

<sup>4</sup>Department of Infectious Diseases, Mahosot Hospital, Vientiane, Laos

Correspondence should be addressed to Yves Buisson; [yvesbuisson@hotmail.com](mailto:yvesbuisson@hotmail.com)

Academic Editor: Annarosa Floreani

Copyright © 2017 Marc Choisy et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The Lao People's Democratic Republic (PDR) is still considered a highly endemic country for hepatitis B, mainly due to perinatal transmission of hepatitis B virus (HBV), despite efforts made since 2004 for universal immunization of newborns. The prevalence of HBV surface antigen (HBsAg) carriage in pregnant women is a relevant marker for the risk of mother-to-child HBV transmission. This study aimed to assess the changes in prevalence of HBV infection among pregnant women attending the Mahosot Prenatal Clinic (Vientiane Capital). *Methods.* A retrospective study was performed in the Mahosot Hospital Laboratory to collect and analyze all the results of HBsAg testing in pregnant women from 2008 to 2014. *Results.* Of a total of 13,238 tested women of mean age of 26 years, 720 women (5.44% [95 CI: 5.1–5.8%]) were found HBsAg positive, the annual prevalence ranging from 4.6% to 6.2%. A slight but steady and significant decrease in prevalence over the 7 years of the study could be documented. *Conclusion.* Although below the 8% hyperendemic threshold, the HBsAg prevalence observed in pregnant women in Vientiane reflects a high risk of HBV perinatal transmission and call for a widespread infant immunization with an HBV vaccine birth dose.

## 1. Background

The Lao People's Democratic Republic (PDR) is assumed to be highly endemic for hepatitis B. The prevalence rate of chronic infection with hepatitis B virus (HBV) was estimated at 8.7% in 13,897 blood donors in 2003–2005 [1]. As in other countries in Southeast Asia, the mother-to-child transmission is considered the main route of infection: a sero-epidemiological study conducted in 2011 among 398 pregnant women in two major cities, Luang Prabang and Vientiane, revealed a seroprevalence of antibodies anti-HBc and HBV surface antigen (HBsAg) equal to 49.5% and 8.2%, respectively [2]. The former marker reflects past exposure, whereas the latter reflects current infections.

The occurrence of HBV infection early in life increases the risk of progression to chronic liver disease, the development of cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. It is now well accepted that universal immunization of newborns is the most effective way to eliminate hepatitis B [3]. The first strategy was to vaccinate all children born to mothers infected with HBV. It involves a systematic screening for HBV markers of infection (HBsAg) and replication (HBeAg) in pregnant women, followed, if positive, by active-passive immunization of the newborn within the first 24 hours of life, combining hepatitis B vaccine and hepatitis B immunoglobulin (HBIG) injected in two different sites. This strategy may reduce by 75–90% the mother-to-child HBV transmission [4], but it is difficult to generalize in highly endemic areas because of its

high cost. For low-income countries, universal vaccination strategy for children without prenatal screening is the only way to control HBV infection and prevent its long-term sequelae [5]. In line with WHO recommendations, vaccination against hepatitis B was introduced in the expanded program on immunization (EPI) of the Lao PDR in 2001. In 2004, the administration of a birth dose was introduced to lower, by 2012, the prevalence of HBsAg under the threshold of 2% in children under 5 years [6]. However in 2011, only 34% of infants had received a birth dose of hepatitis B vaccine for the reason that most Lao women gave birth at home without medical assistance [7]. The offer of free vaccination of newborns during the postpartum in the nearest health center or in the district hospital is rarely exploited. The situation appears more favourable in urban areas where women have better access to health facilities. In 2001, a serological screening of HBsAg among the pregnant women has been initiated in the prenatal clinic of the Mahosot Hospital, the main university hospital in Vientiane capital, as a relevant indicator for the risk of maternal-foetal transmission of HBV. The test is performed for all women attending antenatal clinics for 45,000 LAK (about 5.5 US dollars). This study aimed to analyze the HBsAg testing results collected for seven consecutive years to estimate the residual risk of perinatal HBV infection in Vientiane.

## 2. Methods

**2.1. Study Population.** A retrospective study was conducted at the laboratory of the Mahosot Hospital where the HBsAg screening tests are performed. It covered all archived results from pregnant women attending the antenatal clinic, available from 2008: 1684 results in 2008, 1830 in 2009, 2023 in 2010, 2209 in 2011, 1894 in 2012, 1154 in 2013, and 2444 in 2014. The only usable data were the age of women, the date of blood sampling, and the result of HBsAg testing. Women who have had multiple deliveries during the study period underwent HBsAg screening every time. Considering that every pregnancy is a risk of mother-to-child transmission, duplicates have not been removed.

**2.2. Detection of HBsAg.** The venous blood samples were taken at the antenatal clinic and sent the same day to the hospital laboratory for testing. During the early years, HBsAg was detected by an immunochromatographic 1-step test, the HEXAGON HBsAg (Human GmbH, Wiesbaden, Germany). Since December 2012, the detection of HBsAg was made with the ELISA kit HBsAg (Human GmbH, Wiesbaden, Germany) following the instructions provided by the manufacturer. Doubtful or indeterminate results were excluded from the analysis.

**2.3. Data Analysis.** The temporal trend of the mean age of pregnant women attending Mahosot Hospital was modeled by a linear regression model. The temporal trend of the prevalence and the age effect on the prevalence were modeled by a logistic regression model using time and age as explanatory variables and the positivity to HBsAg as the response variable. Naturally, we expect the HBsAg positive rate to

decay with age. Collinearity between age and time variables may lead to confounding effects affecting the significance tests on these two variables. In order to correct for such confounding effects, we employed sequential likelihood ratio tests as suggested by Faraway [8]. Time  $\times$  age interaction and polynomial terms (up to degree 3) for explanatory variables were considered and tested.

The overall level of seroprevalence in this study was compared with levels of seroprevalence observed in two other surveys recently conducted in Laos by Fisher's exact tests.

All analyses were done with the R software, version 3.3.0 [9].

## 3. Results

A total of 13,238 pregnant women were tested for HBsAg during the seven years from 2008 to 2014 (mean:  $1891 \pm 380$  women per year). Their mean age was 26 years (SD 4.96, range 13–48 years) and steadily increased from 26.18 (standard error: 0.12) years in 2008 to 27.32 (SE: 0.10) years in 2014 at a constant rate of 2.261 (95 CI: 1.755–2.767) month per year ( $F = 76.74$ ,  $df = 1$  and  $13,237$ ,  $p < 2.2e - 16$ ); see Figure 1.

HBsAg carriage was detected in 720 pregnant women, corresponding to an overall rate of 5.44% (95 CI: 5.1–5.8). The logistic regression model showed a significant general decrease of the prevalence from 2008 to 2014 (Chi-square = 5.1992;  $df = 1$ ;  $p = 0.0226$ ; Table 1 and Figure 2) with a relative decrease of prevalence of 4.438%/year (95 CI: 0.673–8.218%). Age did not have any significant effect on the prevalence (see Table 1), neither did the age  $\times$  time interaction (Chi2 = 2.0197;  $df = 1$ ;  $p = 0.1553$ ). Furthermore, polynomial terms (up to degree 3) did not increase the fit significantly (Chi2 = 0.5387,  $df = 1$ ,  $p = 0.4630$  for degree 2; Chi2 = 0.0766,  $df = 1$ ,  $p = 0.7820$  for degree 3). In consequence, Table 1 shows the final selected model without interaction and without polynomial terms.

## 4. Discussion

The main objective of this study was to evaluate the potential risk of mother-to-child HBV transmission from routine screening results conducted in pregnant women at the antenatal clinic in Vientiane. The secondary objective was to determine whether this risk has remained stable or if it has changed over the past seven years.

The first observation is that the overall prevalence rate of HBsAg carriage, equal to 5.44% among these pregnant Lao women, is lower than the 8% threshold that defines the high endemicity level [10]. Interestingly, large differences are observed when comparing it to the results of two recent surveys conducted in Laos: it is significantly lower than the 8.2% rate reported among 388 pregnant women tested in 2011 in Luang Prabang and Vientiane [2] but significantly higher than the 2.9% rate established in a 2012 nationwide survey conducted on 965 mothers [11]. How can such discrepancies be explained? By analyzing these two surveys, some differences in sociodemographic characteristics of the study populations can be noted. Our study population is similar to that recruited in 2011 [2], but it greatly differs

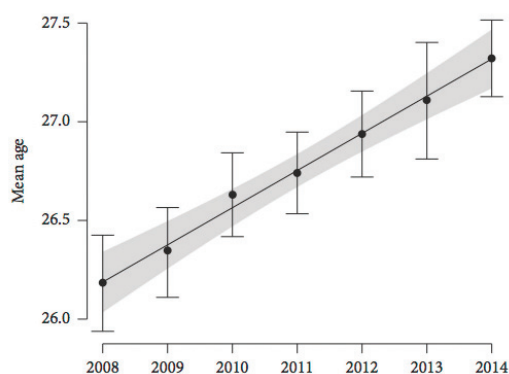


FIGURE 1: Increase of the mean age of pregnant women attending Mahosot Hospital from 2008 to 2014. Dots and vertical bars show estimates and their 95% confidence intervals from data. Black curve and grey area show the prediction of the linear regression model and its 95% confidence interval.

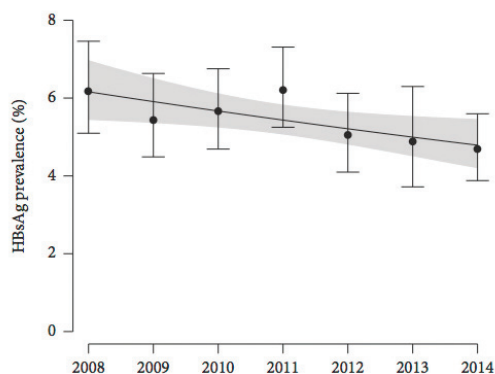


FIGURE 2: HBsAg prevalence as a function of time. Dots and vertical bars show estimates and their 95% confidence intervals from data. Black curve and grey area show the prediction of the logistic regression model and its 95% confidence interval.

from the nationwide prevalence survey conducted on a probability sampling of mothers of whom 71% were farmers [11]. These data support the hypothesis of an inhomogeneous distribution of HBV infection between the urban (33%) and rural (67%) components of the population of Lao PDR [12]. In contrast to observations that show HBsAg carriage rates are significantly higher in rural than in urban areas, such as in Mongolia [13] or Vietnam [14], Laos' situation would be comparable to that of northern Gabon where HBsAg prevalence (12.9% in urban areas versus 7.6% in rural areas) seems to be linked to high population density in the main city and significant population movements related to trade with neighboring countries [15]. Whether the urban populations are more heavily exposed to sources of HBV infection or more extensively screened for HBsAg carriage would deserve to be clarified. Further studies are needed to specify the prevalence

of HBV infection in Laos according to region, ethnicity, and rural or urban lifestyles.

Another important result of this retrospective study is to highlight a decreasing trend in the HBsAg prevalence rates among pregnant women consulting in Vientiane capital that is modest but significant. This trend cannot be credited to the routine HBV immunization of infants, the first beneficiaries of which have not yet reached the age of 15 years. Indeed, the HBsAg positivity rate does not appear lower in younger age groups, unlike a similar retrospective study in Thailand, where vaccination of newborns was introduced in 1992, showing a significant decrease of HBsAg prevalence in pregnant women under the age of 20 years [16]. Furthermore, despite a concurrent increasing trend in the mean age of pregnant women attending Mahosot Hospital, the logistic regression revealed that this increasing trend in mean age had no effect on the decreasing trend in prevalence.

In Hong Kong, the slight decrease of the HBsAg prevalence in pregnant women observed between 1983 and 1995 was explained by several factors besides vaccination: the reduction of the risk of nosocomial transmission by using disposable syringes, the systematic screening of blood donors, and the behavioral changes induced by the AIDS prevention program [17]. In Laos, blood safety has been improved with routine screening of HBsAg in donors performed by the National Blood Transfusion Center (Lao Red Cross, Vientiane) and Control Programs against HIV infection/AIDS have been implemented by the National committee for the control of AIDS (NCCA) established in 1988, but these measures have no direct impact on perinatal transmission. Despite the remarkable progress made by the Lao PDR to achieve the WHO objectives of hepatitis B control, it is likely that the decrease of HBsAg prevalence will be much faster when girls vaccinated at birth will be of childbearing age, that is, from 2025 onwards. However, several solutions should be considered in order to enhance the current incomplete immunization coverage of children, such as strengthening mobile vaccination teams in remote areas or providing an additional dose of HBV vaccine at 10 years of age [2].

Several limitations should be considered. First, despite its large size, the study population is not a representative sample of the whole Lao population. Indeed, these are women living in urban areas in the capital of Laos, having the financial ability to pay for antenatal care and HBsAg screening. However, the homogeneity of this recruitment for seven consecutive years allows using this population as a relevant indicator of the evolutionary trend of the HBV endemic status. Several studies have shown that low socioeconomic status was a risk factor for HBV infection [18]. So we can assume that pregnant women who do not attend the antenatal clinic and cannot undergo the HBV screening for lack of economic means have a higher HBsAg prevalence.

Another limitation is that laboratory tests have been limited to the detection of HBsAg, without checking the markers of viral replication, as HBe antigen or HBV DNA, for economic reasons. The presence of HBeAg in HBsAg positive pregnant women increases the risk of perinatal transmission of HBV. In Southeast Asia, over 30% of the HBsAg positive

TABLE 1: Estimates and significance of the logistic regression model explaining the positivity to HBsAg as a function of age and year. Polynomial terms to the third order were not significant and thus not included in the final model. Probabilities presented here account for potential confounding; see Materials and Methods for further detail.

	Estimate	Std. error	Chisq value	Pr(>Chisq)
Intercept	85.550251	38.790690	—	—
Year	-0.043927	0.019298	5.1992	0.0226
Age	-0.002616	0.007763	0.1138	0.7358

women are presumed to remain HBeAg carriers between 20 and 39 years, therefore at high risk of transmission [19].

The HBsAg detection method can also be questioned because it used a rapid chromatographic immunoassay for the first 5 years (2008–2012) and then ELISA (2013–2014). The performance of the rapid test HEXAGON HBsAg has been evaluated in Madagascar at 95.6% for sensitivity and 96.3% for specificity [20]. All HBsAg rapid tests have in common a low sensitivity that makes them unsuitable for HBsAg detection at low concentrations. The analytical sensitivity of the ELISA test used, estimated <0.13 International Units/milliliter, is 5 to 10 times higher than that of rapid tests [21]. Thus, the substitution by ELISA at the end of 2012 could have been followed by an increasing prevalence of HBsAg, but this was not observed. On the contrary, despite the use of a more sensitive test in 2013–2014, there is a general trend of decreasing prevalence. Therefore, the real decrease is probably greater than that observed. Moreover, given that the risk of HBV perinatal transmission positivity correlates with the viral load of the mother [22], it can be assumed that all women at high risk of HBV transmission are detected, even using a rapid test of low sensitivity.

## 5. Conclusion

The prevalence of HBsAg among women attending antenatal care in Vientiane capital remains high, although it is below the 8% threshold of hyperendemicity. Despite a weak decreasing trend, such prevalence level of chronic HBV infection in pregnant women highlights a persistent risk of HBV perinatal transmission and encourages the strengthening of the birth dose vaccine coverage against hepatitis B in Lao PDR. Getting a clearer understanding of HBV epidemiology in the general Lao population would require other studies like this one from various subsamples of the general Lao population.

## Conflicts of Interest

There are no financial conflicts of interest.

## Authors' Contributions

Sengdeuane Keomalaphet, Kinnaly Kaydalasouk, Vatthaphone Lathphasavang, and Yves Buisson contributed to the study design; Sengdeuane Keomalaphet and Kinnaly Kaydalasouk conducted the entire investigation; Fabrice Quet and Marc Choisy performed the statistical analysis; Vatthaphone Lathphasavang participated in coordination of the

study; Fabrice Quet, Marc Choisy, and Yves Buisson drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Associate Professor Bounthapany Bounsouei, Director of Mahosot Hospital, and the heads of the hospital laboratory, Dr. Amphai Phialuangraj, Dr. Xaybandith Vongsaravanh, and Dr. Pathila Iinthep-phavong, for their help in achieving this investigation. Marc Choisy is supported by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and the Wellcome Trust of Great Britain (106680/Z/14/Z).

## References

- [1] P. Jutavijittum, A. Yousukh, B. Samountryet et al., "Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections among Lao blood donors," *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, vol. 38, no. 4, pp. 674–679, 2007.
- [2] A. P. Black, P. Nouanthong, N. Nanthavong et al., "Hepatitis B virus in the Lao People's Democratic Republic: a cross sectional serosurvey in different cohorts," *BMC Infectious Diseases*, vol. 14, article 457, 2014.
- [3] D.-S. Chen, "Hepatitis B vaccination: the key towards elimination and eradication of hepatitis B," *Journal of Hepatology*, vol. 50, no. 4, pp. 805–816, 2009.
- [4] H.-L. Chen, L.-H. Lin, F.-C. Hu et al., "Effects of maternal screening and universal immunization to prevent mother-to-infant transmission of HBV," *Gastroenterology*, vol. 142, no. 4, pp. 773–781.e2, 2012.
- [5] E. Franco, B. Bagnato, M. G. Marino, C. Meleleo, L. Serino, and L. Zaratti, "Hepatitis B: epidemiology and prevention in developing countries," *World Journal of Hepatology*, vol. 4, no. 3, pp. 74–80, 2012.
- [6] M. Rani, B. Yang, and R. Nesbit, "Hepatitis B control by 2012 in the WHO Western Pacific Region: rationale and implications," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 87, no. 9, pp. 707–713, 2009.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention, "Hepatitis B vaccine birthdose practices in a country where hepatitis B is endemic—Laos, December 2011–February 2012," *Morbidity and Mortality Weekly Report*, vol. 62, no. 29, pp. 587–590, 2013.
- [8] J. J. Faraway, *Extending the Linear Model with R*, Chapman & Hall, 2006.
- [9] R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, 2016.

- [10] J. Hou, Z. Liu, and F. Gu, "Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 50–57, 2005.
- [11] A. Xeuatvongsa, K. Komada, T. Kitamura et al., "Chronic hepatitis B prevalence among children and mothers: results from a nationwide, population-based survey in Lao People's Democratic Republic," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 2, Article ID e88829, 2014.
- [12] P. Messerli, A. Heinimann, M. Epprecht, S. Phonesaly, C. Thiraka, and N. Minot, Eds., *Socio-Economic Atlas of the Lao PDR—An Analysis Based on the 2005 Population and Housing Census*, Swiss National Center of Competence in Research (NCCR) North-South, University of Bern, Bern, Switzerland; Geographica Bernensia, Vientiane, Laos, 2008.
- [13] D. Davaalkham, T. Ojima, P. Nymadawa et al., "Seroepidemiology of hepatitis B virus infection among children in Mongolia: results of a nationwide survey," *Pediatrics International*, vol. 49, no. 3, pp. 368–374, 2007.
- [14] V. T.-T. Nguyen, M.-L. McLaws, and G. J. Dore, "Highly endemic hepatitis B infection in rural Vietnam," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 22, no. 12, pp. 2093–2100, 2007.
- [15] M. Makuwa, A. Mints-Ndong, S. Souquière, D. Nkoghé, E. M. Leroy, and M. Kazanji, "Prevalence and molecular diversity of hepatitis B virus and hepatitis delta virus in urban and rural populations in northern Gabon in Central Africa," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, no. 7, pp. 2265–2268, 2009.
- [16] S. Pradutkanchana, K. Nasongkla, J. Pradutkanchana, and U. Heembai, "A ten-year trend of the prevalence of hepatitis B surface antigen in pregnant women at Songklanagarind Hospital," *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*, vol. 22, pp. 111–114, 2005.
- [17] L. C. Kwan, Y. Y. Ho, and S. S. Lee, "The declining HBsAg carriage rate in pregnant women in Hong Kong," *Epidemiology and Infection*, vol. 119, no. 2, pp. 281–283, 1997.
- [18] Y. Zhang, W. Fang, L. Fan et al., "Hepatitis B surface antigen prevalence among 12 393 rural women of childbearing age in Hainan Province, China: a cross-sectional study," *Virology Journal*, vol. 10, article 25, 2013.
- [19] J. J. Ott, G. A. Stevens, and S. T. Wiersma, "The risk of perinatal hepatitis B virus transmission: hepatitis B e antigen (HBeAg) prevalence estimates for all world regions," *BMC Infectious Diseases*, vol. 12, article 131, 2012.
- [20] F. Randrianirina, J.-F. Carod, E. Ratsima, J.-B. Chrétien, V. Richard, and A. Talarmin, "Evaluation of the performance of four rapid tests for detection of hepatitis B surface antigen in Antananarivo, Madagascar," *Journal of Virological Methods*, vol. 151, no. 2, pp. 294–297, 2008.
- [21] H. Scheiblauer, M. El-Nageh, S. Diaz et al., "Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes," *Vox Sanguinis*, vol. 98, no. 3, part 2, pp. 403–414, 2010.
- [22] K. W. Cheung, M. T. Y. Seto, and S. F. Wong, "Towards complete eradication of hepatitis B infection from perinatal transmission: review of the mechanisms of in utero infection and the use of antiviral treatment during pregnancy," *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 169, no. 1, pp. 17–23, 2013.



## **Chapitre III : Question de recherche du travail de thèse : Transmission périnatale du VHB au Laos (cohorte prospective)**

### **III.1. Objectif**

Evaluer le taux de transmission du VHB de la mère à l'enfant et d'éventuelles difficultés à la mise en œuvre de la prévention de la transmission mère-enfant du virus de l'hépatite B dans deux hôpitaux de référence du Laos.

### **III.2 Questions principales de recherche**

#### **III.2.1 Premier axe de recherche : Épidémiologie clinique**

- Quelle est la proportion de femmes enceintes à haut risque de transmettre l'infection VHB à leur enfant qui justifieraient une intervention spécifique ?
- Quelles sont les caractéristiques cliniques, biologiques, sérologiques et virologiques des femmes enceintes infectées par le VHB ?
- Quelle est le taux de transmission du VHB de la mère à l'enfant ?
- Quelle est la proportion de nourrissons correctement immunisés à l'âge de 6 mois ?

#### **III.2.2. Deuxième axe de recherche : recherche opérationnelle**

Quels sont les obstacles à la mise en œuvre des recommandations nationales pour la prévention de la transmission périnatale du VHB ?

#### **III.2.3. Troisième axe de recherche : virologie**

En cas d'infection VHB chez un enfant vacciné, existe-t-il des mutations pouvant expliquer un échappement à la vaccination ?

### III.3. Justifications de l'étude

- Le mode principal de transmission du VHB dans les pays à forte endémie comme le Laos est la transmission de la mère à l'enfant [1].
- Le cancer du foie est le cancer dont l'incidence est la plus élevée au Laos [60] et la majorité de ces cancers sont des hépatocarcinomes cellulaires associés à l'infection par le virus de l'hépatite B
- L'infection néonatale par le VHB peut être prévenue par immunoprophylaxie active (vaccin) et passive (HBIG), commençant le plus tôt possible après sa naissance. Cependant les HBIG ne sont pas disponibles au Laos, comme dans de nombreux pays en développement.
- Même si l'utilisation d'antiviraux pour prévenir la transmission périnatale du VHB a été proposée depuis plus de dix ans [60], les recommandations varient selon les pays et les experts et l'OMS a décidé de ne pas recommander cette approche en 2015 dans ses premières guidelines concernant la prise en charge de l'hépatite B. L'efficacité de la telbivudine pour prévenir la transmission du VHB de la mère à l'enfant a été fortement suggérée par une étude non randomisée en Chine [65]. Les résultats de deux études randomisées récentes ont montré une bonne tolérance et une bonne efficacité du fumarate de ténofovir disoproxil pour prévenir la transmission du VHB de la mère à l'enfant. Cependant, à l'arrêt du traitement antiviral, un rebond de la réplication du VHB se produit, accompagné, dans certains cas, d'une réactivation immunitaire avec destruction plus ou moins importante d'hépatocytes que reflète une élévation du taux d'ALT sérique. Ces exacerbations de la maladie hépatique ont été asymptomatiques dans les études cliniques et aucun cas d'insuffisance hépatique sévère n'a été rapporté en utilisant cette approche [49, 50]. Dans la plupart des études cliniques pour prévenir la transmission périnatale du VHB, le traitement prophylactique par analogues nucléosidiques a été étudié de façon concomitante avec le vaccin et les HBIG mais les immunoglobulines anti-VHB ne sont pas disponibles au Laos comme dans beaucoup d'autres pays du monde. De nouvelles études seront donc nécessaires pour savoir si l'association d'un traitement antiviral prophylactique de la mère et le vaccin est suffisante pour prévenir toutes les transmissions périnatales. Notre étude clinique a donc aussi pour but d'évaluer les conditions d'accès à la prévention par le vaccin, la gestion des stocks de vaccin, et la formation des personnels de santé impliqués dans la mise en place d'études cliniques futures.

## **III.4 Méthodologie de recherche**

### **III.4.1 Type d'étude, participants, lieu, la durée d'étude et le suivi clinique**

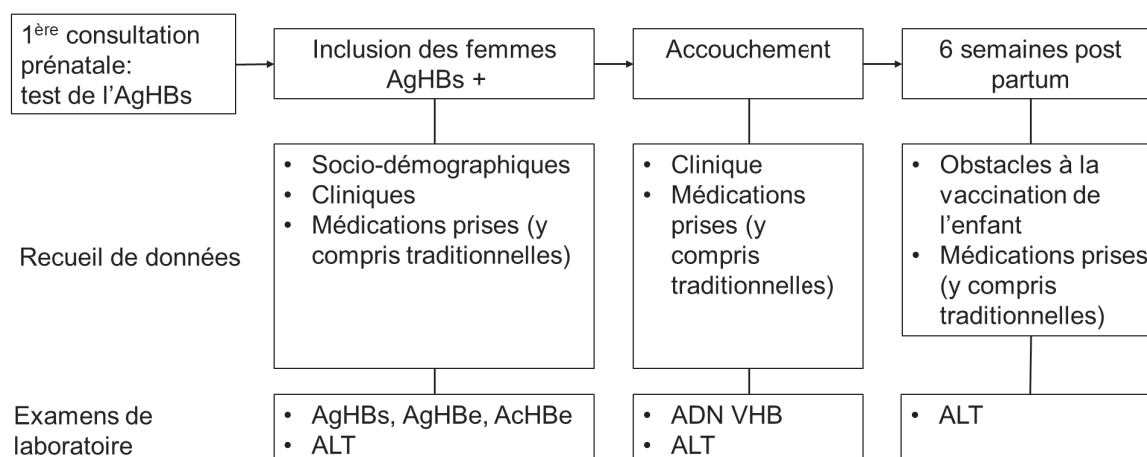
Notre étude de cohorte a été réalisée dans le service de la consultation prénatale de l'hôpital Mahosot, à Vientiane, à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2015, puis à l'hôpital de la mère et des nouveau-nés de Vientiane, à partir du 9 avril 2015. Lors de leur première consultation prénatale, toutes les femmes enceintes ont été systématiquement testées pour les anticorps au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et pour l'antigène HBs (AgHBs) témoin de l'infection par VHB.

Toutes les femmes enceintes présentant un résultat positif pour le test AgHBs ont été informées de l'étude lors de la deuxième consultation périnatale et invitées à participer avec leur(s) futur(s) enfant(s).

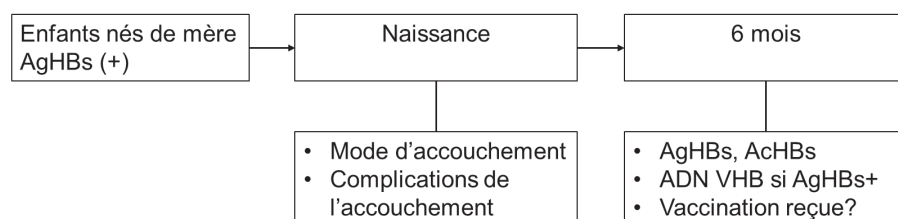
Les critères d'inclusion étaient les suivants : grossesse, âge  $\geq 18$  ans, confirmation de la positivité de l'AgHBs, volonté d'amener le futur enfant aux consultations de suivi prévues jusqu'à l'âge de 6 mois après l'accouchement, et consentement éclairé. L'âge, le niveau de scolarité, les antécédents médicaux pour le VHB, les traitements concomitants, y compris le statut d'infection par le VHB du mari / partenaire et d'autres membres de la famille ont été enregistrés.

Les consultations chez la mère étaient programmées à l'inclusion, lors de l'accouchement et six semaines après l'accouchement (Figure 9), et chez l'enfant à la naissance et à l'âge de 6 mois pour évaluation clinique et détermination du statut infectieux VHB (Figure 10). Conformément aux recommandations nationales pour la santé de la mère et de l'enfant au Laos, tous les nouveau-nés devaient recevoir le vaccin de l'hépatite B par voie intramusculaire à la naissance, à l'âge de 6, 10 et 14 semaines. Le vaccin offert par le programme national pendant la période de cette étude était Euvax B 10 g, LG Life Sciences Ltd. Corée pour la dose à la naissance et le vaccin pentavalent (Easyfive -TT, Panacea Biotec, Inde) à l'âge de 6, 10 et 14 semaines. Les immunoglobulines anti-HB (HBIG) n'ont été proposées aux enfants à la naissance car elles n'ont jamais reçu d'autorisation de mise sur le marché et ne font pas partie de la liste des médicaments essentiels disponibles au Laos.

Le calendrier des consultations et la liste des examens complémentaires programmés à chaque consultation des mères et des enfants sont détaillés dans les tableau 3 et 4 ci-dessous :



**Figure 9 : Suivi de l'étude pour les femmes enceintes/mères dans une cohort prospective à Vientiane**



**Figure 10 : Suivi de l'étude pour les enfants nés des mères ayant l'AgHBs positive dans une cohort prospective à Vientiane**

**Tableau 3 : Calendrier de consultations et liste des examens complémentaires pour les femmes enceintes/mères dans une cohort prospective à Vientiane**

	Jour d'inclusion	Accouchement	6 semaines après l'accouchement
ALT	X	X	X
Ag HBs	X		
Ag HBe	X		
Ac anti-HBe	X		
ADN du VHB		X	
Conservation du plasma à - 80°C	X	X	X

**Tableau 4 : Calendrier des consultations et liste des examens complémentaires pour les enfants nés des mères ayant l'AgHBs positive dans une cohort prospective à Vientiane**

Prélèvements chez l'enfant	6 mois
Ag HBs	X
Ac anti-HBs	X
ADN-VHB pour les enfants AgHBs positifs	X
Conservation du plasma à - 80°C	X

### III.4.2 Prélèvements de sang

**Pour les femmes :** A l'entrée dans l'étude, le sang périphérique a été recueilli en partie dans un tube sec (sans anticoagulant) et en partie dans un tube contenant de l'éthylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Le tube sec a été immédiatement envoyé et traité au laboratoire de l'hôpital Mahosot ou l'hôpital de la mère et le nouveau-né pour le dosage d'ALT. Le tube EDTA a été envoyé au laboratoire du Centre d'Infectiologie Mérieux Laos (CILM). Les échantillons ont été centrifugés et le plasma aliquoté pour conservation à -80°C pour être analysés pour la présence d'AgHBs, AgHBe ou anti-HBe, mesure de la charge virale ADN-VHB ou analyse phylogénétique selon les cas.

**Pour les enfants :** Le sang périphérique recueilli dans un tube EDTA à l'âge de 6 mois a été immédiatement envoyé au laboratoire du CILM pour la recherche d'AgHBs et d'AcHBs. Les échantillons ont été centrifugés et 1-2 aliquots de plasma conservés à -80°C pour la mesure de la charge virale VHB ainsi que pour l'analyse phylogénétique chez les enfants infectés par le VHB.

### III.4.3 Evaluations biologiques

Pour la recherche d'AgHBs permettant le dépistage de l'infection par VHB chez les femmes enceintes, le test rapide OneSite HBsAg (CTK Biotech, Inc, USA), un test rapide HBsAg (Boson Biotech, Fujian, Chine) ou un kit HBsAg Elisa (Human GmbH, Wiesbaden, Allemagne) ont été utilisés à l'hôpital Mahosot. En revanche, à l'Hôpital de la Mère et du nouveau-né, le test rapide Boson HBsAg a été utilisé à l'exclusion d'autres tests.

Le taux d'ALT a été mesuré par l'automate HumaStar 600 (Human company, Germany).

Les échantillons ont été testés pour l'AgHBs pour confirmation de l'infection par VHB chez les femmes en utilisant les kits Monolisa de Biorad (Etats Unis) au Centre d'Infectiologie

Laos-Christophe-Mérieux (CILM) de même que la recherche d'anticorps HBs (Ac anti-HBs), d'antigène HBe (AgHBe) et d'anticorps HBe (Ac anti-HBe).

Les acides nucléiques ont été extraits de 550 microlitres de plasma en utilisant le kit Arrow Viral NA (DiaSorin, Irlande) et la machine NorDiag Arrow (Irlande).

La charge d'ADN-VHB a été mesurée par polymerase chain reaction (PCR) en temps réel (FTD Hepatitis B DNA de Fast-Track Diagnostics, Luxembourg, limite de détection <50 UI / mL).

La partie de gène S a été amplifiée par PCR et, si nécessaire, par PCR nichée. Le premier cycle de PCR a été réalisé en utilisant 5 ul d'extrait d'ADN, les amorces pol1M-pol2M et le mélange maître HotStarTaq dans un volume final de 50 ul. Les conditions de cyclage thermique comprenaient une première étape d'activation à 95°C pendant 15 minutes suivie de 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, un recuit à 55°C pendant 30 secondes et une extension à 72°C pendant 1 minute et une extension finale à 72°C pendant 10 minutes. La taille des amplicons obtenus était de 1011 pb.

Le second cycle de PCR a été réalisé avec 5 ul des produits de PCR du premier cycle et des amorces Pol3M et Pol4M dans un volume final de 50 ul. Les conditions de cyclage thermique comprenaient une première étape d'activation à 95 ° C pendant 15 minutes, puis 35 cycles de dénaturation à 94 ° C pendant 30 secondes, un recuit à 55 ° C pendant 30 secondes et une extension à 72 ° C pendant 1 minute et une extension finale à 72 ° C pendant 10 minutes. La taille de l'amplicon était de 808 pb.

Les produits amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et visualisés avec GelRed. La purification des amplicons a été effectuée en utilisant le kit de purification QIAquick PCR (Hilden, Allemagne).

Le premier tour de purification des amplicons a été séquencé en utilisant des amplicons pol1M, pol2M, B1 et B2 et du second tour avec des amorces Pol3M ou Pol4M comme suit: 1 min à 96 ° C puis 30 cycles de dénaturation à 96 ° C pendant 10 secondes, recuit à 50 ° C pendant 5 secondes et extension / terminaison à 60 ° C pendant 4 min. Les produits de séquençage ont été analysés sur un analyseur génétique ABI 3100 (Applied Biosystems, USA).

Les séquences ont été alignées à l'aide de la méthode d'alignement multiple ClustalW disponible dans la version 7.0.26 de l'analyse génétique évolutive moléculaire (MEGA). L'analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant la méthode « Neighbor-Joining

method » et l'arbre a été construit à partir de 16 séquences de référence du VHB (génotype A-H) et de 10 échantillons. La robustesse des groupes phylogénétiques a été évaluée par 1 000 réplicats bootstrap.

Les analyses de la divergence évolutive entre les séquences ont été réalisées à l'aide du modèle de probabilité composite maximale [66] avec MEGA7

#### **III.4.4 - Aspects statistiques**

Il s'agissait d'une cohorte observationnelle pour étudier les facteurs éventuellement associés à l'échec de l'immunisation des enfants contre le VHB, défini comme étant soit un test AgHBs positif, soit un taux d'anticorps anti-HBs <10 UI / L [53] à 6 mois.

La taille de l'échantillon a été calculée pour fournir suffisamment de puissance pour détecter une association entre un facteur de risque tel qu'un test AgHBe positif et le risque d'infection. En supposant une différence d'au moins 20% de transmission chez les femmes AgHBe positives versus 5% chez les femmes AgHBe négatives [67], 151 paires mère-enfant étaient nécessaires pour détecter au moins 93% de différence, en supposant que 45% des femmes enceintes AgHBs positives seraient positives pour AgHBe [55]. Compte tenu du taux de perte de vue estimé à 5% des femmes et leurs enfants six mois après l'accouchement, 71 femmes enceintes AgHBe positives et 88 femmes enceintes AgHBe négatives devaient être incluses, soit 159 femmes au total.

Les données continues ont été résumées par la médiane avec les 25 et 75 percentiles (écart interquartile ou EI) et les données catégorielles par un nombre, un dénominateur et un pourcentage. Les variables catégorielles ont été comparées en utilisant le test exact de Fisher et les variables continues en utilisant le test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Il était prévu de mener des analyses multivariées si le nombre d'événements d'intérêt (infections infantiles) était suffisant. Tous les tests étaient bilatéraux et  $p < 0,05$  était considéré comme statistiquement significatif. Les données ont été analysées en utilisant Stata/SE 13.0.

#### **III.5. Résultats principaux de notre projet de recherche**

Notre projet de recherche a pu répondre à nos trois questions principales de recherche comme suit.

### III.5.1 Première axe de recherche : Épidémiologie clinique : suivi des femmes enceintes et de leurs enfants

#### Caractéristiques des femmes enceintes à l'inclusion

Du 1er janvier 2015 au 3 mars 2017, 160 femmes enceintes positives au test AgHBs ont été recrutées (Figure 11). Cependant, la présence de l'AgHBs lors du test Elisa n'a pas été confirmée chez 7 femmes. Le Tableau 5 présente les caractéristiques des 153 participantes restantes. L'âge médian des femmes (EI) était de 28 ans (24 à 30 ans) et l'âge gestationnel de 25 semaines (19 à 31 ans). Aucune des femmes ne présentait de symptômes de maladie hépatique. Sur les 153 femmes, 106 (69%) n'étaient pas au courant de leur infection par le VHB et 116 (76%) ne connaissaient pas le statut VHB de leur mari.

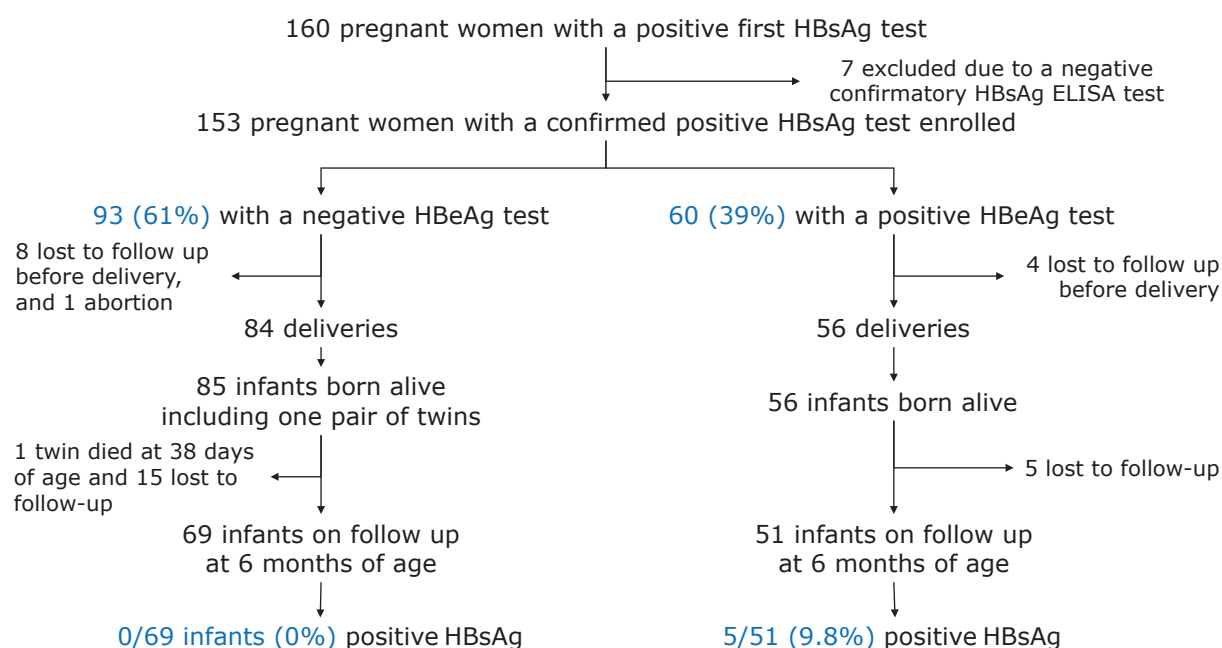


Figure 11 : Inclusion et suivi des participants dans une étude de cohort à Vientiane

Soixante femmes (39%) (IC à 95%: 31% à 47%) avaient un test AgHBe positif. L'âge médian des femmes avec AgHBe positif était moins élevé que si le test HBeAg négatif : médiane 26 ans contre 28 ans ( $p = 0,02$ ). A noter qu'une femme co-infectée par le VIH recevait un traitement antirétroviral comprenant de la lamivudine, du fumarate de ténofovir



disoproxil et du lopinavir/ritonavir. Deux autres femmes recevaient de l'acide arachidonique, un traitement dont l'efficacité pour traiter d'une infection par le virus de l'hépatite B n'est pas documenté. Le taux d'ALT médian n'était pas significativement différent selon le statut AgHBe : 23U /L chez les femmes enceintes AgHBe positives contre 19U/ L chez les femmes négatives ( $p = 0,13$ ).

### **Suivi des femmes enceintes**

Une femme a eu un avortement spontané et 12 autres ont été perdues de vue avant l'accouchement. Parmi les 140 femmes restantes qui ont accouché dans le cadre de l'étude, 20 (14%) ont été perdues de vue avec leur enfant et de ce fait la consultation de l'enfant à l'âge de six mois n'a pas été réalisée (Tableau 5). La raison était que la femme avait déménagé dans une autre province (voir suivi des participants, figure 11). Les caractéristiques à l'inclusion des femmes qui ont été perdues de vue n'étaient pas significativement différentes de celles qui ont continué l'étude.

### **Caractéristiques à l'accouchement et à la consultation postpartum de 6 semaines**

Au moment de l'accouchement, la médiane d'ADN du VHB chez la mère était de 4,90  $\log_{10}$  UI /mL, de 8,00  $\log_{10}$  UI / mL chez les mères AgHBe positives et de 4,00  $\log_{10}$  UI / mL chez les mères AgHBe négatives ( $p < 0,001$ ). Cinquante et une des 60 femmes positives pour l'AgHBe (85%) avaient une charge virale supérieure à 200 000 UI / mL (ou 5,3  $\log_{10}$  UI / mL), comparativement à 13 de ces 93 femmes (14%) des mères AgHBe négatives ( $p < 0,001$ ). Le taux d'ALT médian était de 15 UI /L chez les femmes HBeAg positives et de 16 U /L chez les femmes AgHBe négatives ( $p = 0,20$ ).

Parmi les 140 mères qui ont accouché dans l'étude, 12 (9%) ont présenté les complications obstétricales suivantes : six cas de rupture prolongée des membranes, deux cas de prééclampsie, deux cas de présentation par le siège, un cas de placenta prævia, un cas d'absence de dilatation du col. En outre, 29 femmes (21%) ont accouché par césarienne avec une distribution similaire selon le statut d'AgHBe des femmes, 13 femmes sur 56 (23%) chez les femmes AgHBe positives et 16 sur 84 (19%) chez les femmes AgHBe négatives ( $p = 0,67$ ). Lors de la consultation post-partum de 6 semaines, le taux d'ALT médian était de 15 UI / L chez les mères AgHBe positives et de 14 UI/L chez les mères AgHBe négatives ( $p$

= 0,70) (Tableau 5). Toutes les femmes enceintes sont restées asymptomatiques jusqu'à six mois après l'accouchement.

**Tableau 5 : Caractéristiques sociodémographiques des femmes enceintes infectés par le VHB et leurs enfants selon le statut d'AgHBe de ces femmes durant le cohort à Vientiane**

Variables	Total	Femme enceintes AgHBe négatives	Femme enceintes AgHBe positives	P
<b>Femmes enceintes à l'inclusion</b>				
Nombre (No.) de femmes avec données disponibles	153	93 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	
Age — ans — médiane (EI)	28 (24 to 30)	28 (25 to 31)	26 (23 to 29)	0.02
Parité <sup>b</sup> — médiane (EI)	2 (1 to 3)	2 (1 to 3)	2 (1 to 3)	0.75
Age gestationnel — Semaines médiane (EI)	25 (19 to 31)	24 (18 to 30)	27 (19 to 32)	0.32
Antécédent d'avortement — No. (%)	63 (41)	39 (42)	24 (40)	0.87
Infection par le VHB connue avant la grossesse — No. (%)	47 (31)	26 (28)	21 (35)	0.38
Revenue familiale— USD/mois médiane (EI)	450 (375 to 625)	450 (375 to 625)	450 (312 to 625)	0.67
Ayant un membre de sa famille infecté par le VHB — No. (%)	45 (29)	28 (30)	17 (28)	0.69
Ayant un membre de sa famille décédé par cancer du foie — No. (%)	10/45 (22)	5/28 (18)	5/17 (29)	0.50
Age du partenaire — ans — médiane (EI)	31 (28 to 34)	31 (29 to 34)	31 (28 to 34)	0.62
Statut VHB du partenaire — No. (%)				0.69
AgHBs positive	15 (10)	9 (10)	6 (10)	
AgHBs négative	21 (14)	11 (12)	10 (17)	
Ne sait pas	117 (76)	73 (78)	44 (73)	
ALT — UI/L — médiane (EI)	21 (16 to 27)	19 (15 to 27)	23 (17 to 28)	0.13
<b>Caractéristiques des mères à l'accouchement</b>				
No. de femmes avec données disponibles	140	84	56	
Mode de l'accouchement — No. (%)				0.67
Vaginal	111 (79)	68 (81)	43 (77)	
Césarienne	29 (21)	16 (19)	13 (23)	
Age gestationnel — Semaines				
No. de femmes avec données disponibles	130	76	54	
Médiane (EI)	39 (38 to 40)	39 (38 to 40)	39 (39 to 40)	0.34
Age gestationnel <37 semaines No. (%)	10 (8)	6 (8)	4 (7)	1
Complications à l'accouchement <sup>c</sup> — No. (%)	12 (8)	5 (6)	7 (12)	0.22
ALAT — UI/L				

No. de femmes avec données disponibles	120	73	47	
Médiane (EI)	16 (13 to 18)	16 (14 to 18)	15 (12 to 16)	0.20
VHB ADN ( $\log_{10}$ UI/mL) à l'accouchement ou à l'inclusion				
No. de femmes avec données disponibles	153	93	60	
Médiane (EI)	4.90 (3.40 to 8.00)	4.00 (3.20 to 4.90)	8.00 (7.25 to 8.75)	<0.001
>5.3 $\log_{10}$ UI/mL (ou >200000 UI/ml)	65 (42)	14 (15)	51 (85)	<0.001
<b>Caractéristiques des mères 6 semaine après l'accouchement</b>				
No. de mères avec données disponibles	100	57	43	
ALAT — UI/L — Médiane (EI)	15 (13 to 19)	14 (12 to 19)	15 (13 to 19)	0.70
<b>Caractéristiques des enfants</b>				
No. d'enfants avec données disponibles	140	84	56	
Sexe — no. (%)				0.08
Féminin	72 (51)	38 (45)	34 (61)	
Masculin	68 (49)	46 (55)	22 (39)	
Poids à la naissance — grammes — médiane (EI)	3200 (3000-3400)	3200 (3000-3500)	3150 (2900-3400)	0.86
<b>Enfants infectés par le VHB et la séroprotection à l'âge de 6 mois</b>				
No. d'enfants avec données disponibles	120	69	51	
AgHBs Positive— no. (%)	5 (4)	0 (0)	5 (10)	0.01
Ac anti-HBs $\geq 10$ UI/L — no. (%)	105 (88)	62 (90)	43 (84)	0.41

<sup>a</sup> Sauf indication contraire

<sup>b</sup> Inclut la grossesse actuelle

<sup>c</sup> 6 Rupture de membranes prolongée, 2 prééclampsie, 2 présentations siège, 1 placenta prævia, 1 absence de dilatation de col utérine

## Discussion

Parmi les 153 femmes enceintes positives pour l'AgHBs incluses dans notre étude, 60 femmes (39%) (IC à 95% : 31% à 47%) étaient AgHBe positives. La présence l'AgHBe est un facteur prédictif bien connu du risque de transmission du VHB de la mère à l'enfant [42, 68, 69], en partie du fait que la charge virale est alors très élevée, en partie du fait que les AgHBe transmis à l'enfant pendant la vie intra-utérine serait un facteur facilitant l'infection de l'enfant.

Cette prévalence estimée, 39%, est assez proche de celle rapportée par une étude de donneurs de sang au Centre de don de sang du Laos [55]. Elle est aussi similaire à

l'estimation de la prévalence de l'AgHBe de 45% dans une étude réalisée à la frontière entre Thaïlande et Birmanie [70], et 33% et dans une étude réalisée en Chine, 34% [71]

## **Conclusion**

La proportion des femmes infectées par le VHB à haut risque de transmettre le virus du VHB de la mère à l'enfant est élevée comme celles des pays voisins. Pour diminuer le nombre de nouveaux cas d'infection par le VHB, la prévention de la transmission du VHB de la mère à l'enfant doit inclure l'administration du vaccin le plus rapidement après la naissance pour tous les nouveau-nés. L'administration d'HBIG au nouveau-né et/ou d'antiviraux à la femme enceinte infectée par le VHB en cas de test AgHBe positif ou de charge ADN VHB élevée devrait être envisagée.

### **Difficultés rencontrées durant la réalisation de cette partie d'étude**

Après avoir rédigé le protocole de cette étude en collaboration avec mes directeur et co-directeur de thèse, je me suis rendue sur site pour la mise en place de l'étude. Les ressources pour la recherche au Laos et le budget de l'étude étant limités, j'ai réalisé moi-même le recrutement de toutes les patientes et tous les patients, les prélèvements de sang et le suivi des mères et des enfants en parallèle au développement et à l'analyse de l'étude sous supervision de mes directeurs de thèse.

### **Difficultés pendant la période d'inclusion**

Cette étude clinique a demandé une organisation et une coopération entre plusieurs secteurs. Avant de démarrer cette étude, j'ai pris contact avec les autorités et les personnels de santé concernés (Hôpital Mahosot, Vientiane) pour discuter la mise en place de cette étude. J'ai reçu l'autorisation de l'hôpital et du Comité national d'éthique du Laos le 1<sup>er</sup> janvier 2015. Après 4 mois d'inclusion, le nombre des cas de femmes enceintes infectées par le VHB incluses dans notre étude étant inférieur à ce que nous avons estimé, nous avons décidé d'élargir notre site de recherche à un hôpital supplémentaire. L'Hôpital de la Mère et du nouveau-né a été choisi en raison du nombre important de femmes venant en consultation prénatale dans cet hôpital. Une nouvelle demande d'autorisation au Comité national d'éthique du Laos a été faite, et la réponse favorable a été obtenue en 1 mois.

Les deux sites de l'étude se situent environ à 15 Km de distance l'un de l'autre, et la route qui les relie est de mauvaise qualité. Les déplacements sur les sites ont donc été optimisés, notamment en demandant aux médecins et aux infirmières sur place de recenser les femmes ayant un AgHBs positif. Les rendez-vous avec les patientes ont été ensuite pris par téléphone. L'ouverture de ce site supplémentaire a donc permis de recruter le nombre de patientes nécessaires dans notre projet de recherche et de finir le suivi des mères et de leurs enfants avec 2 mois de retard par rapport à ce qui était initialement prévu dans le protocole.

### **Difficultés pour le suivi des mères et de leurs enfants**

La principale difficulté rencontrée pour le suivi des mères et de leurs enfants a été le déménagement de certaines femmes incluses dans l'étude pour des raisons familiales. Par ailleurs, certaines femmes ont accouché dans d'autres hôpitaux, en dehors de nos sites de recherche, ce qui a nécessité des déplacements pour récupérer les prélèvements hors des deux sites de recherche. Enfin, certaines femmes ne sont pas venues au rendez-vous. Plusieurs ont néanmoins pu être recontactées et sont venues en consultation après appel téléphonique. Certains prélèvements après l'accouchement ont été faits à domicile.

### **Difficultés pour l'analyse des échantillons au laboratoire**

La recherche des anticorps anti-HBs et de l'AgHBs chez les mères et les enfants de l'étude était externalisée à un laboratoire agréé pour ce type de test. Les kits pour faire l'Elisa pour la recherche de l'AcHBs et de l'AgHBs chez les enfants de l'étude ont été en rupture de stock vers la fin de l'étude. Ces kits ne sont pas habituellement disponibles au Laos, il faut donc les commander à l'étranger et suivre de longues procédures (2-3 mois), ce qui a ralenti l'obtention des statuts VHB des enfants de l'étude et, en conséquence l'analyse et la rédaction des résultats.

### **III.5.2. Deuxième axe de recherche : recherche opérationnelle**

Quels sont les difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre des recommandations nationales pour la prévention de la transmission périnatale du VHB ?

Au total, 141 nouveau-nés, dont une paire de jumeaux, sont nés dans l'étude. Parmi les 112 nouveau-nés pour lesquels le délai entre la naissance et l'heure d'administration du vaccin contre le VHB était disponible, 110 (98%) ont reçu le vaccin dans les 24 heures suivant la naissance. Le délai médian entre la naissance et l'administration du vaccin était de 6 heures (EI 3 à 13), avec 95 (72%) dans les 12 heures suivant la naissance. Un nouveau-né a reçu le vaccin 26 heures après la naissance car le vaccin n'était pas disponible dans la salle d'accouchement et un autre nouveau-né a reçu le vaccin 3 jours après la naissance car, en raison d'une détresse respiratoire sévère à la naissance, le vaccin a été considéré comme contre-indiqué.

La consultation de l'étude après celle de la naissance était prévue à l'âge de 6 mois et 120 nourrissons se sont rendus à cette consultation. Des données sur l'administration du vaccin à la naissance, 6, 10 et 14 semaines étaient disponibles pour 119 (99%) enfants. Un enfant infecté par le VHB, identifié comme C2 dans le tableau 8 ci-dessous, n'a reçu le vaccin anti-HB qu'à la naissance et à l'âge de 6 semaines.

#### **Evaluation de statut infectieux VHB et du statut de l'immunité contre le VHB chez les enfants**

##### **Caractéristiques associées à l'infection de l'enfant**

Sur les 120 enfants évalués à l'âge de 6 mois, cinq cas étaient positifs pour AgHBs (4,2%, IC<sub>95%</sub> : 1,4% à 9,5%). Cependant, tous les enfants infectés étaient nés de mères AgHBe positive ; ainsi, le risque d'infection estimé était de 9,8% (IC à 95%: 3,3% à 21,4%) chez les enfants nés de mères AgHBe positives et à 0% pour les enfants nés de mères AgHBe négative ( $p = 0,01$ ). La charge d'ADN du VHB à l'accouchement des mères des 5 enfants infectés présentait des allant de 8,6 à 9,2 log<sub>10</sub> UI /mL (Tableau 8).

La charge ADN VHB et la positivité de l'AgHBe étaient associées au risque d'infection chez les enfants ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,01$ , respectivement). L'âge maternel, le mode d'accouchement, le sexe de l'enfant, la parité et le temps écoulé entre la naissance et la vaccination contre le VHB n'étaient pas significativement associés au risque d'infection (Tableau 6).

**Tableau 6 : Caractéristiques des mères et des enfants associées avec l'infection de l'enfant à l'évaluation à l'âge de 6 mois après la naissance**

	HBsAg négatif chez l'enfant	HBsAg positif et détection de l'ADN VHB chez l'enfant	P
<b>Caractéristiques des mères</b>			
No. de femmes enceintes avec données disponibles	115 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	
Age — ans — Médiane (EI)	28 (24 to 30)	26 (24 to 30)	0.71
Parité <sup>b</sup> — Médiane (EI)	2 (1 to 3)	1 (1 to 3)	0.56
Mode de l'accouchement — No. (%)			
Vaginal	92 (80)	4 (80)	1.00
Césarienne	23 (20)	1 (20)	
Complications à l'accouchement <sup>c</sup> — No. (%)	8 (7)	1 (20)	0.32
Ayant un membre de sa famille infecté par le VHB— No. (%)	38 (33)	0 (0)	0.21
Antécédent d'avortement — No. (%)	50 (43)	2 (40)	1.00
ADN VHB (log <sub>10</sub> UI/mL) à l'accouchement — Médiane (EI)	4.60 (3.38 to 7.90)	8.90 (8.80 to 8.90)	<0.001
>5.3 log <sub>10</sub> UI/mL— No. (%)	48 (42)	5 (100)	0.02
Statut AgHBe positive de la mère — No. (%)	46 (40)	5 (100)	0.01
<b>Caractéristiques des enfants</b>			
Sexe féminin de l'enfant — No. (%)	59 (51)	3 (60)	1.00
Poids à la naissance - Médiane (EI) – Kg	3,2 (2,9 to 3,4)	3,1 (2,9 à 3,2)	0.77
Temps écoulé entre la naissance et la vaccination contre le VHB — Heures (données disponibles pour 112 infants)	107	5	
— Médiane (EI)	6 (2 to 13)	16 (10 to 18)	0.12
>12 heures — No. (%)	29 (27)	3 (60)	0.14
>12 heures ou absence de données — No. (%)	37/115 (32)	3/5 (60)	0.33

### Caractéristiques associées à l'échec de l'immunisation par vaccin

Les titres d'anticorps anti-HBs ont été mesurés dans le sérum des 120 enfants âgés de 6 mois : 105 enfants (88%) avaient un titre d'anticorps anti-HBs  $\geq 10$  UI /L. Parmi 15 (12%) des cas dont le titre d'anticorps anti-HBs était  $< 10$  UI /L, 5 cas étaient positifs pour l'AgHBs. Les 10 cas non infectés ont été convoqué pour être de nouveau vaccinés contre le VHB (Tableau 7).

**Table 7 : Caractéristiques des mères et des enfants associées à l'échec de l'immunoprophylaxie définie comme un titre d'anticorps anti-HBs <10 UI /L à l'évaluation à l'âge de 6 mois après la naissance**

	Immunoprophylaxie		P-value
	Succès	Echec	
<b>Caractéristiques maternelles</b>			
No. de femmes enceintes avec données disponibles	105 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	
Age — ans — Médiane (EI)	28 (25 to 30)	27 (24 to 32)	0.84
Parité <sup>b</sup> - Médiane (EI)	2 (1 to 3)	2 (1 to 2)	0.17
Mode d'accouchement — No. (%)			
Vaginal	83 (79)	13 (87)	0.73
Césarienne	22 (21)	2 (13)	
Complications à l'accouchement <sup>c</sup> — No. (%)	7 (7)	2 (13)	0.31
Ayant un membre de sa famille infecté par le VHB— No. (%)	34 (32)	4 (27)	0.80
Antécédent d'avortement — no. (%)	45 (43)	7 (47)	0.79
VHB ADN (log <sub>10</sub> UI/mL) à l'accouchement— Médiane (EI)	4.60 (3.30 to 7.99)	7.30 (4.90 to 8.80)	0.03
>5.3 log <sub>10</sub> UI/mL— No. (%)	43 (41)	10 (67)	0.09
Statut d'AgHBe positive chez la mère — No. (%)	43 (41)	8 (53)	0.41
<b>Caractéristiques des enfants</b>			
Sexe féminin — No. (%)	55 (52)	7 (47)	0.78
Poids à la naissance —gramme	3200 (3000 to 3500)	3000 (2800 to 3300)	0.18
Temps écoulé entre la naissance et la vaccination contre le VHB (données disponibles pour 112 enfants)	99	13	
Médiane (EI)			
>12 heures — No. (%)	5 (2 to 13)	12 (6 to 18)	0.03
>12 heures ou absence de données — No. (%)	26 (26)	6 (46)	0.19
	32/105 (30)	8/15 (53)	0.09



**Table 8 : Répartition du nombre d'enfants en fonction du statut de la mère vis-à-vis de l'Ag HBe et des délais de vaccination à la naissance**

	Délais de vaccination	Mère AgHBe positif	Mère AgHBe négatif
<b>115 enfants non infectés</b>			
105 enfants AC anti HBs $\geq$ 10 UI/L	Délai < 12h	28	44
	Délai $\geq$ 12h	15	18
10 enfants AC anti HBs < 10 UI/L	Délai < 12h	0	4
	Délai $\geq$ 12h	3	3
<b>5 enfants infectés</b>	Délai < 12h	2	0
	Délai $\geq$ 12h	3	0

## Discussion

Sur les 141 enfants nés de 140 mères avec une infection chronique par le VHB dans cette étude, 120 enfants ont été évalués pour l'infection par le VHB à l'âge de six mois. Parmi ces 120 enfants, 5 (4%) étaient infectés. Comme dans de nombreux pays, les nouveau-nés n'avaient pas accès à HBIg anti-HBV. Tous les 5 enfants infectés sont nés d'une mère ayant un test AgHBe positif dont le taux d'infection était de 5/51 (9,8%) chez les enfants nés de mères ayant AgHBe positives. Le taux d'infection des enfants nés des mères ayant d'AgHBe positive constaté par notre étude est proche à celui rapporté dans la plupart des études où les nourrissons ont également reçu à la fois le vaccin anti-HB et les HBIg, de 7% à 11% [50, 65, 72], bien que des études très récentes aient rapporté des taux de transmission plus faibles : 2% en Thaïlande [49], 4,5% à Hong Kong [73].

Le risque relativement faible de transmission observé dans notre étude pourrait être lié à la courte durée entre la naissance et la première administration du vaccin anti-HB, à l'absence de procédures invasives (amniocentèse), au faible pourcentage de césariennes, et/ou aux variations d'échantillonnage.

Après 6 mois, 15 des 120 enfants (12%) (y compris les 5 nourrissons infectés de manière chronique) présentaient des anti-HBs < 10 UI/L. Le pourcentage des enfants ayant un niveau

protecteur d'anticorps contre le VHB à 6 mois, 88% des cas, semble supérieur au pourcentage de <66% indiqué dans deux études menées au Laos [56, 74]. Cependant, le pourcentage de succès de la prophylaxie immunitaire est plus faible que celui rapporté par des essais cliniques menées en Thaïlande [49] ou en Chine [65, 75, 76] où ces pourcentages étaient proches de 100%.

Parmi les 15 enfants ayant une réponse insatisfaisante au vaccin, tous les enfants, sauf un avaient été vaccinés conformément aux recommandations. Les raisons spécifiques de l'échec de la prophylaxie immunitaire n'ont pas pu être déterminées mais un problème de qualité du vaccin au moment de l'utilisation ne peut être exclu, comme indiqué ci-dessous. La livraison du fabricant au centre national de vaccination et de ce centre aux hôpitaux est assurée par des professionnels spécialement formés pour préserver la qualité du vaccin. Cependant, il peut arriver que les flacons de vaccin entrent en contact étroit avec des packs de glace congelés lorsqu'ils sont acheminés au service de maternité ou pour d'autres transferts effectués par des personnels qui ne sont pas conscients des risques de congélation. En effet, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande de stocker le vaccin contre le VHB de 2°C à 8°C et les propriétés immunogènes du vaccin contre le VHB sont définitivement perdues si le vaccin a été congelé, même pendant une courte période de temps [77].

## **Conclusion**

Au Laos, la vaccination contre le VHB à la naissance a été incluse dans le programme élargi de vaccination depuis 2004 mais le succès de la mise en œuvre de cette stratégie est partiel : dans notre étude, nous avons vu que le vaccin n'était pas toujours disponible dans la salle d'accouchement, et il y avait un malentendu sur les contre-indications du vaccin contre le VHB (détresse fœtale, petit poids de naissance), et nous questionnons la qualité du vaccin au moment de son utilisation en cas de contact étroit du vaccin avec des « icepacks » congelés. Ces événements mentionnés pourraient être considérés comme des obstacles à la mise en œuvre efficace des recommandations nationales pour la prévention de la transmission périnatale du VHB. La lutte contre l'hépatite B au Laos passe par la prévention de la transmission périnatale et doit rester une préoccupation prioritaire des autorités de santé. Il faut assurer que le stock de vaccins dans les salles de maternité et de vaccination soit satisfaisant tant d'un point de vue de la quantité que de la qualité. Renforcer les connaissances, attitudes et pratiques des personnels de santé quant à l'utilisation du vaccin

contre le VHB, et envisager sans doute l'utilisation d'HBIG et/ou d'antiviraux aux femmes enceintes dont la charge d'ADN VHB est élevée et ou le test AgHBe positif.

### **III.5.3. Troisième axe de recherche : Virologie**

En cas d'infection VHB chez un enfant vacciné, existe-t-il des mutations pouvant expliquer un échappement à la vaccination ?

#### **Origine des infections chez les enfants infectés**

Chaque mère et chaque enfant ont été identifiés comme étant M et C, respectivement, suivis d'un numéro spécifiant le couple mère-enfant. L'analyse phylogénétique des séquences du VHB (Figure 12) a montré que quatre enfants infectés par le VHB avaient un virus très proche de celui de leur mère (3,3%, 95% IC 0,5 à 7%), d'un autre un cas présentait une souche virale différente de celle de sa mère. Pour les 4 enfants infectés, deux avaient un génotype B et 2 un autre génotype C. Les caractéristiques des cinq enfants infectés sont montrées dans le tableau 4.

#### **Analyse des mutations dans le déterminant «a» d'AgHBs**

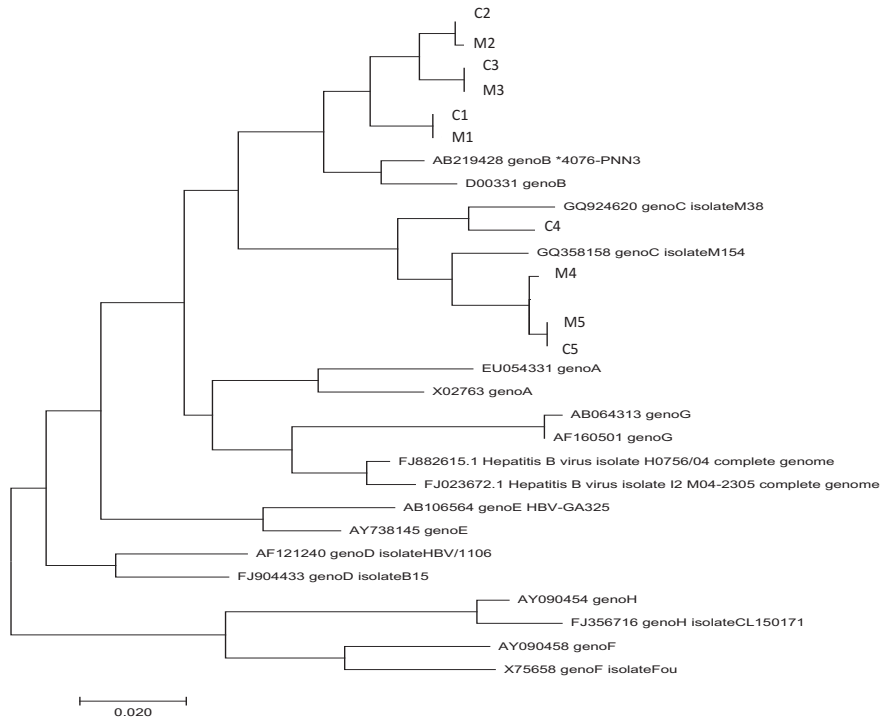
Le séquençage du gène S du VHB des virus des enfants infectés et de leurs mères n'a montré aucune mutation chez l'enfant et la mère de la paire 3 (C3 - M3) ; les mêmes mutations M133I chez l'enfant et la mère de la paire 1 (C1-M1) ; les autres mutations M133T, G145GR ou G145GA nous n'avons que trouvés chez les enfants des autres paires (tableau 4).

**Tableau 8: Caractéristiques des 5 enfants infectés par le VHB à l'évaluation à l'âge de 6 mois après la naissance**

N	Sexe	Mode d'accouchement	Age gestationnel à l'accouchement	Statut AgHBe de la mère	Durée de la naissance – 1 <sup>ère</sup> dose de naissance du vaccin VHB (heurs)	Série du vaccin contre le VHB	VHB-ADN (log <sub>10</sub> )		Génotype du VHB		Gene variants	
							Maternel - à l'accouchement	Enfant - à l'âge de 6 mois	Mère	Enfant	Maternel - Accouchement	Enfant - 6 mois
C1	M	Césarienne	40	Positive	3	Completed	8.90	9.23	B	B	M133I	M133I
C2	M	Vaginal	39	Positive	18	Uncompleted	9.20	8.40	B	B	Non	M133T
C3	F	Vaginal	38	Positive	19	Completed	8.80	8.75	B	B	Non	Non
C4	F	Vaginal	39	Positive	10	Completed	8.90	7.72	C	C	Non	G145G/R
C5	F	Vaginal	40	Positive	16	Completed	8.60	8.90	C	C	Non	G145G/A

1  
2  
3  
4  
5

**Figure 12: Arbre phylogénétique utilisant la méthode du voisin-assemblage, construit à partir de 16 séquences de référence du VHB (génotype A-H) et des séquences des 5 enfants infectés et des virus de leurs mères**



6  
7

## 8 Discussion

9 Les analyses phylogénétiques ont montré que l'un des cinq enfants infectés présentait  
10 une souche virale différente de celle de la mère. La raison spécifique de l'absence de  
11 prophylaxie n'a pas été déterminée, mais un problème de qualité du vaccin ne peut  
12 être exclu, comme indiqué ci-dessus.

13 Chez 4 des 5 enfants infectés, des mutations du gène de surface du VHB ont été  
14 trouvées, une observation compatible avec le rôle possible de ces mutations dans le  
15 risque d'infection. Pour les 4 enfants infectés, deux avaient un génotype B et 2 un  
16 autre génotype C avec le gène de mutation de surface G145G/R, G145G/A, M133T,  
17 M133I (Table 4). On soupçonne que ces mutations sont associées à une mutation  
18 échappant au vaccin [13, 14, 78, 79]

19

## 20 **Conclusion**

21 Malgré l'absence de HBIg, le taux de transmission du VHB de la mère à l'enfant  
22 constaté par notre étude était relativement faible. Pourtant des recommandations  
23 internationales récentes ont recommandé d'utiliser le traitement antiviral maternel  
24 pour prévenir la transmission de la mère à l'enfant du VHB. Dix enfants non infectés  
25 n'étaient pas protégés de manière satisfaisante à 6 mois, restant exposés au risque  
26 d'infection. Par ailleurs, un enfant de notre étude n'avait pas été infecté par le virus de  
27 la mère, ce qui indique un échec de la vaccination, qui pourrait être dû à la congélation  
28 du vaccin pendant le transport et / ou la présence de MEV chez cet enfant.

29

## 30 **Les difficultés rencontrées pour l'analyse phylogénétique**

31 L'analyse phylogénétique des cinq enfants infectés et de leurs mères, a retrouvé que  
32 2 enfants ne présentaient pas le même virus que celui de leurs mères. Devant ce  
33 constat, l'hypothèse d'une contamination de l'enfant par un autre membre de la famille  
34 après la naissance a été soulevée. Néanmoins, nous avons d'abord voulu éliminer un  
35 éventuel échange de tube ou une éventuelle contamination des échantillons de la  
36 mère ou de l'enfant par d'autres échantillons au cours de l'analyse. Pour cela, un  
37 nouveau prélèvement de sang de ces deux enfants a été effectué, suivi d'une nouvelle  
38 analyse phylogénétique. Leurs mères ont donc été recontactées et la situation leur a  
39 été expliquée. Les deux mères ont acceptées que leur enfant soit prélevé à nouveau.

40 Pour l'un des enfants (C2), le virus de l'hépatite B retrouvé dans le deuxième  
41 prélèvement était le même que le virus retrouvé initialement chez sa mère. Il est donc  
42 probable qu'il y ait eu une erreur au cours de la manipulation au laboratoire. Pour  
43 l'autre enfant (C4), il n'y avait pas d'ADN VHB (charge virale du VHB indétectable)  
44 dans son second prélèvement, le test AgHBs était négatif, les anticorps anti-HBs ont  
45 été identifiés, le test des anticorps anti-HBc était positif). Nous n'avons donc pas pu  
46 réaliser d'analyse phylogénétique (Tableau 9).

47

48

49 **Tableau 9 : Résumé des données concernant les enfants infectés dont les**  
 50 **prélèvements ont été vérifiés après l'âge d'un an**

	AgHBs (Elisa)	HBV DNA (log <sub>10</sub> )	Anticorps anti-HBs (Elisa)	Anticorps anti-HBc (Elisa)	Phylogénétique du VHB	Conclusion
<b>C2</b>						
1 <sup>er</sup> prélèvement sanguin à l'âge de 6 mois	Positif	8.4	Négatif	Non fait <sup>a</sup>	Virus différent de celui de sa mère	Infection chronique
2 <sup>ème</sup> prélèvement sanguin à l'âge de 35 mois	Positif	7.6	Négatif	Non fait	Virus similaire à celui de sa mère	Infection chronique
<b>C4</b>						
1 <sup>er</sup> prélèvement sanguin à l'âge de 6 mois	Positif	7.72	Négatif	Non fait <sup>a</sup>	Virus différent de celui de sa mère	Infection
2 <sup>ème</sup> prélèvement sanguin à l'âge de 34 mois	Négatif	Indélectable	Positif (106 IU/L)	Positif	Non disponible	« Résolution » spontanée de l'infection

51 <sup>a</sup> Les anticorps anti-HBc sont transférés passivement de la mère à l'enfant pendant la vie intra-  
 52 utérine et persistent chez l'enfant pendant au moins un an et demi  
 53



54

55 Article soumis et accepté pour la publication au journal : PLoS ONE

56 **Perinatal hepatitis B virus transmission in Lao PDR:**

57 **a prospective cohort study**

58

59 Vatthanaphone Latthaphasavang <sup>1</sup>, Philippe Vanhems <sup>2,3,4</sup>, Nicole Ngo-Giang-Huong  
60 <sup>5,6,7</sup>, Philavanh Sibounlang <sup>8</sup>, Phimpha Paboriboune <sup>8</sup>, Laurent Malato <sup>8</sup>, Valy  
61 Keoluangkhot <sup>1</sup>, Syvilay Thammassack <sup>1</sup>, Nicolas Salvadori <sup>5,6</sup> Woottichai Khamduang  
62 <sup>6</sup>, Nicolas Steenkeste <sup>9</sup>, Christian Trépo <sup>9, 10</sup>, Paul Dény <sup>10,11,12</sup>, Gonzague Jourdain  
63 <sup>5,6,7</sup>

64

65 **\* Corresponding author**

66 Vatthanaphone Latthaphasavang

67 Email: oy1laos@gmail.com

68

69 <sup>1</sup> Mahosot hospital, Xiengneun village, Sisatanak district, Vientiane capital, Lao PDR

70 <sup>2</sup> Claude Bernard University Lyon 143 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69100  
71 Villeurbanne, France

72 <sup>3</sup> Emerging Pathogens Laboratory, Fondation Mérieux, Centre International de  
73 Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, UCBL1,  
74 Lyon, France

75 <sup>4</sup> Infection Control and Epidemiology Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon,  
76 France

77 <sup>5</sup> Institut de recherche pour le développement (IRD, France), PHPT, 187/10,  
78 Changklan Rd., Changklan, Muang, Chiang Mai 50100, Thailand.

79 <sup>6</sup> Chiang Mai University, Faculty of Associated Medical Sciences, 110 Intawaroroj Rd.,  
80 Sripoom, Chiang Mai 50200, Thailand.

81 <sup>7</sup> Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard T.H. Chan School of  
82 Public Health, 677 Huntington Ave, Boston, MA 02115, USA.

83 <sup>8</sup> Center Infectiology Lao Christophe-Mérieux, Kaoyod village, Sisatanak district,  
84 Vientiane capital, Lao PDR.

85 <sup>9</sup> Fondation Mérieux, 17 rue Bourgelat, 69002 Lyon, France

86 <sup>10</sup> INSERM U\_1052 UMR CNRS 5286 – Cancer Research center of Lyon, 69424  
87 cedex, France

88 <sup>11</sup> Université Paris 13, UFR Santé Médecine Biologie Humaine, Groupe des Hôpitaux

89 <sup>12</sup> Universitaire de Paris Seine Saint Denis, Service de Microbiologie, France

90

## 91 **Abstract**

92 **Background:** Mother-to-child transmission of hepatitis B virus (HBV) is the main  
93 cause of new infections worldwide. We aimed at assessing the percentage of infants  
94 successfully immunized in two major hospitals in Vientiane, Lao PDR where HB  
95 immune globulin (HBIG) is not available.

96 **Methods:** We studied a prospective cohort of chronically HBV infected pregnant  
97 women and their infants until 6 months post-partum from January 2015 to March 2017.  
98 All infants received HB vaccine at birth and 6, 10 and 14 weeks thereafter, and HBV

99 status was assessed at 6 months of age. HBV surface gene sequencing was  
100 performed in infected mother-infant pairs.

101 **Results:** Of 153 mothers with HB surface antigen (HBsAg), 60 (39%) had detectable  
102 serum HBe antigen (HBeAg). HBeAg positive pregnant women were younger than  
103 those negative (median age 26 versus 28 years;  $p=0.02$ ) and had a significantly higher  
104 HBV viral load at delivery (median 8.0 versus 4.0  $\log_{10}$  IU/mL,  $p < 0.001$ ). Among the  
105 120 infants assessed at 6 months of age, 5 (4%) were positive for HBsAg and had  
106 detectable HBV viral load by polymerase chain reaction. All were born to mothers with  
107 HBeAg and viral load  $>8.5 \log_{10}$  IU/mL. However, only four (3.3%, 95% CI 0.5% to 7.0  
108 %) had a virus strain closely related to their mother's strain. HBV surface gene  
109 mutations were detected in 4 of the 5 infected infants. Anti-HBs antibody levels were  
110 below 10 IU/L in 10 (9%) uninfected infants at 6 months of age.

111 **Conclusions:** Mother-to-child transmission occurred less frequently than expected  
112 without the use of HBIG. Adding HBIG and/or maternal antiviral prophylaxis may have  
113 prevented some of these infections. The observation of unsatisfactory levels of anti-  
114 HBs antibodies in 9% of the uninfected infants at 6 months highlights the need for  
115 improvement of the universal immunization procedures.

116

117

## 118 Introduction

119

120 An estimated 257 million people are chronically infected with hepatitis B virus (HBV)  
121 worldwide (1). Mother-to-child transmission accounts for the majority of new chronic  
122 HBV carriers, especially in Asia. HBV can be transmitted *in utero*, during delivery (2–  
123 4) or during infancy and later. About 80–90% of infants infected at birth will develop  
124 chronic HBV infection, and 20–30% of adults who are HBV-chronically infected will  
125 experience serious complications including liver fibrosis, cirrhosis, hepatocellular  
126 carcinoma (HCC) and liver-related death (1). HBV Genotypes B and C are common  
127 in South-East Asia. Perinatal exposure plays a key role in viral transmission (5).  
128 Combination of hepatitis B immunoglobulin at birth and vaccine is highly effective: with  
129 this strategy, several studies have observed that more than 85% of infants born to  
130 HBV-infected mothers were not infected (6–12).

131

132 Liver cancer incidence in Lao People’s Democratic Republic (Lao PDR) is one of the  
133 highest in the world in relation with a high incidence of cholangiocarcinoma and a high  
134 prevalence of HCC linked to chronic HBV infection (13). In pregnant women presenting  
135 for antenatal care, HBV prevalence estimates have ranged between 2.9% and 8.2%  
136 (14–16), depending on settings. For hepatitis B (HB) immunization, the national  
137 recommendation is to administer a monovalent dose within 24 hours of birth (birth  
138 dose), followed by a dose of pentavalent vaccine at 6, 10, and 14 weeks of age,  
139 regardless of maternal HBV status. However, studies have shown that in several areas  
140 of Lao PDR the HepB-BD is not administered to all newborns. For example, in 37  
141 health facilities surveyed in five provinces, the HepB-BD coverage was 74%

142 (interquartile range (IQR): 39%–97%) (17). Furthermore, only 66% of children aged 9  
143 to 16 months had sufficient anti-HBs antibody levels in a study conducted in two  
144 vaccination clinics located in urban areas: Luang Prabang Provincial Hospital and the  
145 Vientiane Mother and Child Central Hospital (15).

146 We assessed the percentage of infants successfully immunized in an observational  
147 cohort conducted in two major hospitals in Vientiane, Lao PDR where HB immune  
148 globulin (HBIG) is not available although the administration of HBIG in addition to the  
149 vaccine can halve the risk of transmission according to Lee and coll.'s metanalysis of  
150 10 studies (18)

151

152

153

## 154 **Materials and Methods**

155

### 156 **Participants and clinical follow up**

157 The cohort study was implemented at the antenatal care clinic of Mahosot Hospital,  
158 Vientiane from January 1, 2015, and then at the Vientiane Mother and Newborn  
159 Hospital from April 9, 2015. At these clinics, pregnant women are routinely screened  
160 for both Human Immunodeficiency Virus (HIV) and HBV infections at their first prenatal  
161 visit.

162 All pregnant women with an HBsAg positive test were informed of the study at the  
163 second antenatal care visit and invited to participate with their future infants. The  
164 inclusion criteria were: pregnancy, age  $\geq 18$  years, confirmed HBsAg positivity, and  
165 agreeing and able to bring the future infant at the planned follow up visits until 6 months  
166 after delivery. We excluded those women who have difficulties to bring their infant for  
167 follow-up. If they agreed, they were requested to provide a formal written consent.  
168 Age, education level, medical history, receipt of concomitant treatments and HBV  
169 infection status of husband/partner and other family members were recorded.

170 Maternal study visits were scheduled at enrollment, delivery and six weeks after  
171 delivery, and infant visits at birth and 6 months of age for clinical evaluation and  
172 determination of HBV infection status. All infants were to receive HB vaccine  
173 intramuscularly, at birth and at 6, 10 and 14 weeks following national guidelines for HB  
174 immunization. Each vaccination is immediately recorded in an individual card.  
175 Immunization was conducted using the vaccines offered by the national program, free  
176 of charge for the families i.e. a monovalent vaccine for the HepB-BD (Euvax B® 10

177 µg, LG Life Sciences Ltd. Korea) and as part of an pentavalent vaccine (Easyfive -TT  
178 ®, Panacea Biotec, India) at 6, 10 and 14 weeks of age. HB immune globulin (HBIG),  
179 which has not been registered in Lao PDR, is not available for infants born to HBV-  
180 infected mothers.

### 181 **Laboratory methods**

182 Women approached for this study were pregnant women found HBsAg positive in the  
183 screening program (using the OnSite HBsAg rapid test by CTK Biotech, Inc, USA;  
184 sensitivity 100% and specificity 100% claimed to the manufacturer, the rapid test by  
185 Boson Biotech, Fujian, China; sensitivity and specificity unknown, or a HBsAg Elisa kit  
186 (Human GmbH, Wiesbaden, Germany) at Mahosot Hospital, and using the Boson  
187 HBsAg rapid test at the Mother and Newborn Hospital. Alanine aminotransferase  
188 (ALT) levels were measured using the HumaStar 600 automate (Human company,  
189 Germany).

190 Laboratory testing was centralized at the Center of Infectiology Laos Mérieux (CILM)  
191 for HBsAg (confirmation in pregnant women, and infants), HBe antigen (HBeAg), HB  
192 surface antibody (anti-HBs), and HBe antibody (anti-HBe) testing using Monolisa  
193 assays from Biorad (United States).

194 Nucleic acids were extracted from 550 microliters of plasma using the Arrow Viral NA  
195 kit, (DiaSorin, Ireland) and the NorDiag Arrow machine (Ireland) following  
196 manufacturer`s instructions.

197 HBV Deoxyribonucleic acid (DNA) load was measured using real-time PCR (real-time  
198 polymerase chain reaction) (FTD Hepatitis B DNA from Fast-Track Diagnostics,  
199 Luxembourg, detection limit < 50 UI/mL).

200 Partial Surface gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and, if  
201 necessary, nested PCR. The first round PCR was performed using 5 ul of DNA extract,  
202 pol1M-pol2M primers and HotStarTaq master mix in a final volume of 50ul. The thermal  
203 cycling conditions included a first step of activation at 95°C for 15 min followed with 35  
204 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds and  
205 extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 10 minutes. The size of  
206 amplicons obtained was 1011 bp.

207 The second round PCR was performed with 5 ul of the first-round PCR products and  
208 Pol3M and Pol4M primers in a final volume of 50uL. The thermal cycling conditions  
209 included a first step of activation at 95°C for 15 min then 35 cycles of denaturation at  
210 94°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds and extension at 72°C for 1  
211 min then and a final extension at 72°C for 10 minutes. The amplicon size was 808 bp.

212 Amplified products were separated by 1% agarose gel electrophoresis and visualized  
213 with GelRed. Purification of amplicons was performed using the QIAquick PCR  
214 purification kit (Hilden, Germany).

215 Purified first-round amplicons were sequenced using with pol1M, pol2M, B1 and B2  
216 and second-round amplicons with Pol3M or Pol4M primers as follows: 1 min at 96°C  
217 then 30 cycles of denaturation at 96°C for 10 seconds, annealing at 50°C for 5 seconds  
218 and extension/termination at 60°C for 4 min. Sequencing products were analyzed on  
219 an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA).

220

221 Sequences were aligned using the ClustalW multiple alignment method available  
222 within the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 7 version 7.0.26.  
223 Phylogenetic analysis was conducted using the Neighbor-Joining method and tree



224 was constructed from 16 HBV reference sequences (genotype A-H) and the  
225 sequences of the 5 infected infants and their mothers' viruses. Phylogenetic groups  
226 robustness was evaluated through 1,000 bootstrap replicates.

227 Analyses of evolutionary divergence between sequences were conducted using the  
228 Maximum Composite Likelihood model (19) with MEGA7.

229

### 230 **Statistical considerations**

231 This was an observational cohort to study factors possibly associated with infant HBV  
232 immunization failure, defined as either a positive HBsAg test or an anti-HBs antibody  
233 level <10 IU/L (20) at 6 months of age.

234 The sample size was calculated to provide enough power to detect an association  
235 between a risk factor such as HBeAg positive test and the risk of infection. Assuming  
236 a difference of at least 20% between a 25% transmission rate from HBeAg positive  
237 women and a 5% transmission rate from HBeAg negative women (6) and a 45%  
238 proportion of HBeAg positive pregnant women among those HBsAg positive (21), a  
239 total of 151 mother-infant pairs was needed to provide at least 93% power to detect a  
240 significant difference, using a two-sided alpha of 0.05. Taking into account that 5% of  
241 the infants may not be available at 6 months, 71 HBeAg positive and 88 HBeAg  
242 negative pregnant women had to be enrolled, i.e. 159 women overall.

243 Continuous data were summarized by medians and interquartile ranges (IQR), and  
244 categorical data by frequencies and percentages. The 95% confidence intervals (CI)  
245 of the proportions were calculated using the Clopper-Pearson method. The  
246 association between maternal and infant characteristics and infant HBV infection or  
247 immunoprophylaxis failure was assessed using Fisher's exact test for categorical

248 variables and Wilcoxon-Mann-Whitney test for continuous variables. It was planned to  
249 conduct multivariate analyses only if the number of events of interest was sufficient.  
250 All tests were two-sided and  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Data  
251 were analyzed using Stata/SE 13.0.

## 252 **Ethical considerations**

253 The study was approved on 25 December 2014 by the National Ethic Committee for  
254 Health Research, Vientiane, Lao PDR (Study Number: 055 NIOPH/NECHR).

255

## 256 **Results**

257

### 258 **Study participants at enrollment and follow up**

259 From January 1, 2015 to March 3, 2017, 160 women with a first HBsAg positive test  
260 were enrolled. However, the positive HBsAg result was not confirmed in 7 of those 115  
261 tested with a rapid test. Table 1 provides the characteristics of the remaining 153  
262 participants. The women's median age (IQR) was 28 years (24 to 30) and gestational  
263 age 25 weeks (19 to 31). None had symptoms of liver disease. Of the 153 women,  
264 106 (69%) were unaware of their HBV infection, and 116 (76%) did not know their  
265 husband's HBV status.

266 A total of 60 women (39%) had a positive HBeAg test. They were younger than those  
267 with a negative HBeAg test: median age 26 versus 28 years ( $p = 0.02$ ). One HIV co-  
268 infected woman was receiving tenofovir disoproxil fumarate, lamivudine and  
269 lopinavir/ritonavir to treat her HIV infection, and two women previously received  
270 arachidonic acid, a treatment with unproven efficacy on HBV. The median ALT level

271 was not significantly different according to HBeAg status: 23 U/L in the HBeAg-positive  
 272 pregnant women versus 19 U/L in those negative (p =0.13) (Table 1).

273

274 **Table 1: Socio-demographic characteristics of the participants according to**  
 275 **maternal HBeAg status.**

276

Variables	Total	Negative HBeAg women	Positive HBeAg women	p-value
<b>Women at baseline</b>				
No. of women with data	153	93 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	
Age — years — Median (IQR)	28 (24 to 30)	28 (25 to 31)	26 (23 to 29)	0.02
Parity <sup>b</sup> Median (IQR)	2 (1 to 3)	2 (1 to 3)	2 (1 to 3)	0.75
Gestational age — weeks Median (IQR)	25 (19 to 31)	24 (18 to 30)	27 (19 to 32)	0.32
History of abortion — no. (%)	63 (41)	39 (42)	24 (40)	0.87
HBV infection known before pregnancy — no. (%)	47 (31)	26 (28)	21 (35)	0.38
Family income — USD/month Median (IQR)	450 (375 to 625)	450 (375 to 625)	450 (312 to 625)	0.67
Having family members infected with HBV— no. (%)	45 (29)	28 (30)	17 (28)	0.69
Who died of liver cancer	10/45 (22)	5/28 (18)	5/17 (29)	0.50
Partner's age — years —Median (IQR)	31 (28 to 34)	31 (29 to 34)	31 (28 to 34)	0.62
Partner's HBV status — no. (%)				0.69
HbsAg positive	15 (10)	9 (10)	6 (10)	
HBsAg negative	21 (14)	11 (12)	10 (17)	

Does not know	117 (76)	73 (78)	44 (73)	
ALT — U/L — Median (IQR)	21 (16 to 27)	19 (15 to 27)	23 (17 to 28)	0.13
<b>Maternal characteristics at delivery</b>				
No. of women with data	140	84	56	
Mode of delivery — no. (%)				0.67
Vaginal	111 (79)	68 (81)	43 (77)	
Cesarean	29 (21)	16 (19)	13 (23)	
Gestational age — weeks				
No. of women with data	130	76	54	
Median (IQR)	39 (38 to 40)	39 (38 to 40)	39 (39 to 40)	0.34
Gestational age <37 weeks — no. (%)	10 (8)	6 (8)	4 (7)	1
Complications at delivery <sup>c</sup> — no. (%)	12 (8)	5 (6)	7 (12)	0.22
ALT — U/L				
No. of women with data	120	73	47	
Median (IQR)	16 (13 to 18)	16 (14 to 18)	15 (12 to 16)	0.20
HBV DNA load (log <sub>10</sub> IU/mL) at delivery or at inclusion				
No. of women with data	153	93	60	
Median (IQR)	4.90 (3.40 to 8.00)	4.00 (3.20 to 4.90)	8.00 (7.25 to 8.75)	<0.001
>5.3 log <sub>10</sub> IU/mL (>200,000 IU/ml)	65 (42)	14 (15)	51 (85)	<0.001
<b>Maternal characteristics 6 weeks after delivery</b>				
No. of women with data	100	57	43	
ALT — U/L — Median (IQR)	15 (13 to 19)	14 (12 to 19)	15 (13 to 19)	0.70
<b>Infant characteristics</b>				

No. of infant with data	140	84	56	
Sex — no. (%)				0.08
Female	72 (51)	38 (45)	34 (61)	
Male	68 (49)	46 (55)	22 (39)	
Weight — grams — Median (IQR)	3200 (3000-3400)	3200 (3000-3500)	3150 (2900-3400)	0.86
<b>Infant HB infection and seroprotection at 6 months of age</b>				
No. of infant with data	120	69	51	
Positive HBsAg — no. (%)	5 (4)	0 (0)	5 (10)	0.01
Anti-HBs antibodies $\geq 10$ IU/L — %	105 (88)	62 (90)	43 (84)	0.41
Negative HBsAg and Anti-HBs antibodies $< 10$ IU/L — %	10 (9)	7 (70)	3 (30)	0.02

277 <sup>a</sup> Except otherwise specified, <sup>b</sup> The current pregnancy is included, <sup>c</sup> 6 prolonged  
278 rupture of membranes, 2 preeclampsia, 2 breech presentation, 1 placenta previa and  
279 1 absence of dilatation of the cervix.

280

281 One woman experienced spontaneous abortion and 12 others (7.8%) were lost to  
282 follow up before delivery. Of the remaining 140 women who delivered in the study, 20  
283 (14%) were lost to follow up with their infants by the 6-month postpartum visit. The  
284 main reason for loss to follow-up was moving to another province (see participant  
285 follow up in Figure 1). The baseline characteristics of mothers lost to follow up by 6  
286 months postpartum were not significantly different from those who completed the study  
287 follow up.

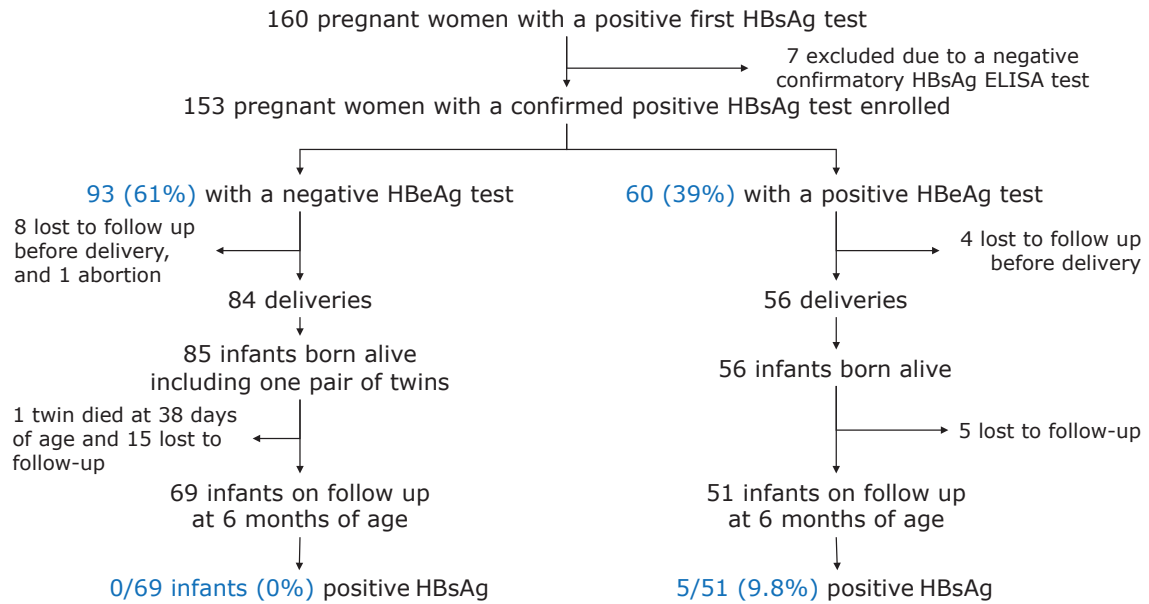
288

289

290

291 **Figure 1-Enrollment and follow up of participants**

292



293

294

295 **Characteristics at delivery and at the 6-week postpartum visit**

296 At time of delivery, the median maternal HBV DNA load was 4.90 log<sub>10</sub> IU/mL overall,  
297 8.00 log<sub>10</sub> IU/mL in HBeAg-positive mothers and 4.00 log<sub>10</sub> IU/mL in HBeAg negative  
298 mothers (p <0.001). Fifty-one of the 60 HBeAg positive mothers (85%) had a viral load  
299 greater than 200,000 IU/mL (5.3 log<sub>10</sub> IU/mL) compared to 14 of the 93 HBeAg  
300 negative women (15%) (p <0.001). The median ALT level was 15 U/L in HBeAg  
301 positive women and 16 U/L in those HBeAg negative (p =0.20).

302 Of the 140 mothers, 12 (9%) experienced obstetrical complications: 6 prolonged  
303 rupture of membranes, 2 preeclampsia, 2 breech presentation, 1 placenta previa and  
304 1 absence of dilatation of the cervix, with similar distribution among HBeAg positive  
305 and negative women. Also, 13 of 56 (23%) HBeAg positive and 16 of 84 (19%) HBeAg  
306 negative women delivered by cesarean section (p =0.67), and there was a twin

307 delivery. At the 6-week postpartum visit, the median ALT level was 15 U/L in HBeAg  
308 positive mothers and 14 U/L in those negative ( $p = 0.70$ ) (Table 1). All pregnant women  
309 remained asymptomatic until 6-month postpartum.

310

### 311 **Vaccine administration**

312 A total of 141 infants including a pair of twins were included in the study and  
313 information on time of vaccine administration after birth was available for 112  
314 newborns. Of these, 110 (98%) received the HepB-BD within 24 hours of life. The  
315 median time from birth to vaccine administration was 6 hours (IQR 3 to 13), with 80  
316 (71%) within 12 hours after birth. One newborn received vaccine 26 hours after birth  
317 because the vaccine was not available at the delivery room, and another newborn 3  
318 days after birth because of experiencing fetal distress, which was erroneously  
319 considered as a vaccine contra-indication.

320 Of 120 infants seen at 6 months of age, 119 (99%) had records of HB vaccine  
321 administration at birth and at 6, 10 and 14 weeks in the Pregnancy-Infant Health Book  
322 and one infant, identified as C2 in this paper, received HB vaccine only at birth and 6  
323 weeks of age.

324

### 325 **Infant HBsAg and anti-HBs**

326 Of the 120 infants assessed at 6 months of age, five infants were found positive for  
327 HBsAg, i.e. 4.2% (95% CI 1.4% to 9.5%). All infected infants were born to HBeAg  
328 positive mothers; thus, the estimated risk of infection was 9.8% (95% CI 3.3% to  
329 21.4%) in infants born to HBeAg positive mothers and 0% (95% CI 0% to 5.2%) in  
330 those born to HBeAg negative mothers ( $p = 0.01$ ). The mothers of the 5 infected infants

331 had HBV DNA loads at delivery ranging from 8.6 to 9.2 log<sub>10</sub> IU/mL (see Table 4 for  
 332 details). Higher HBV DNA load at delivery and HBeAg positivity were associated with  
 333 a higher risk of infant infection (p <0.001 and p =0.01, respectively). Maternal age,  
 334 mode of delivery, infant sex, parity, and time from birth to HepB-BD were not  
 335 significantly associated with the risk of infection (Table 2).

336

337 **Table 2: Maternal and infant characteristics according to infant HBV infection**  
 338 **status**

339

Women characteristics	HBsAg negative infant	HBsAg positive infant	p-value
No. of women and infants with data available	115 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	
Age — years — Median (IQR)	28 (24 to 30)	26 (24 to 30)	0.71
Parity <sup>b</sup> — Median (IQR)	2 (1 to 3)	1 (1 to 3)	0.56
Mode of delivery — no. (%)			
Vaginal	92 (80)	4 (80)	1.00
Cesarean	23 (20)	1 (20)	
Complications at delivery — no.(%)	8 (7)	1 (20)	0.32
Having family members infected with HBV— no. (%)	38 (33)	0 (0)	0.21
History of abortion — no. (%)	50 (43)	2 (40)	1.00
HBV DNA load at delivery— Median (IQR)	4.60 (3.38 to 7.90)	8.90 (8.80 to 8.90)	<0.001
>5.3 log <sub>10</sub> IU/mL— no. (%)	48 (42)	5 (100)	0.02
Positive HBeAg status — no. (%)	46 (40)	5 (100)	0.01
<b>Infants characteristics</b>			



Female sex — no. (%)	59 (51)	3 (60)	1.00
Median (IQR) Weight at birth — grams	3190 (2900 to 3400)	3100 (2900 to 3200)	0.77
Time from birth to HBV vaccine — hours (data available for 112 infants)	107	5	
Median (IQR)	6 (2 to 13)	16 (10 to 18)	0.12
>12 hours — no. (%)	29 (27)	3 (60)	0.14
>12 hours or no records — no. (%)	37/115 (32)	3/5 (60)	0.33

340 <sup>a</sup> Except otherwise specified, <sup>b</sup> The current pregnancy is included.

341

342 Anti-HBs antibodies titers measured in the serum were  $\geq 10$  IU/L in 105 infants (88%)  
343 at 6 months of age. Among the 15 with anti-HBs antibody titers  $< 10$  IU/L, 5 were  
344 positive for HBsAg. The other 10 (9%) were contacted for additional vaccine  
345 administration (Table 3).

346

347 **Table 3: Maternal and infant characteristics according to immunoprophylaxis**  
348 **failure**

349

Women characteristics	Infant immunoprophylaxis success	Infant immunoprophylaxis failure	p-value
No. of women and infants with data available	105 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	
Age — years — Median (IQR)	28 (25 to 30)	27 (24 to 32)	0.84
Parity <sup>b</sup> — Median (IQR)	2 (1 to 3)	2 (1 to 2)	0.17
Mode of delivery — no. (%)			
Vaginal	83 (79)	13 (87)	0.73

Cesarean	22 (21)	2 (13)	
Complications at delivery <sup>c</sup> — no. (%)	7 (7)	2 (13)	0.31
Having family members infected with HBV— no. (%)	34 (32)	4 (27)	0.80
History of abortion — no. (%)	45 (43)	7 (47)	0.79
HBV DNA load — Median (IQR)	4.60 (3.30 to 7.99)	7.30 (4.90 to 8.80)	0.03
>5.3 log <sub>10</sub> IU/mL— no. (%)	43 (41)	10 (67)	0.09
Positive HBeAg status — no. (%)	43 (41)	8 (53)	0.41
<b>Infants characteristics</b>			
Female sex — no. (%)	55 (52)	7 (47)	0.78
Median (IQR) Weight at birth —grams	3200 (3000 to 3500)	3000 (2800 to 3300)	0.18
Time from birth to HBV vaccine — hours (data available for 112 infants) Median (IQR)	99	13	
Median (IQR)	5 (2 to 13)	12 (6 to 18)	0.03
>12 hours — no. (%)	26 (26)	6 (46)	0.19
>12 hours or no records — no. (%)	32/105 (30)	8/15 (53)	0.09

350 <sup>a</sup> Except otherwise specified, <sup>b</sup> The current pregnancy is included.

351

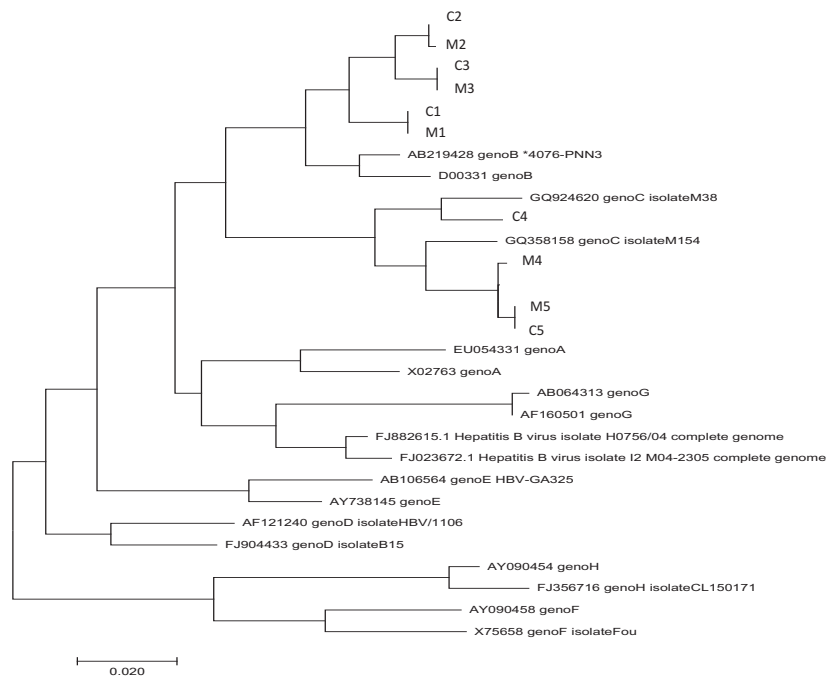
### 352 **Origin of infant infections**

353 The five infected infants' relevant characteristics are summarized in Table 4. Each  
354 mother and infant were identified as M and C, respectively, followed by a number  
355 specifying the mother-infant pair. The phylogenetic analysis of HBV sequences (Figure  
356 2) showed that four infected infants had a virus very closely related their mother's  
357 (3.3%, 95% CI 0.5 to 7.0%) while one infant, identified as C4 in Table 4 and Figure 2,

358 was infected by a viral strain was not closely related to her mother's strain although  
359 both strains were of HBV genotype C.

360

361 **Figure 2: Phylogenetic tree using the Neighbor-Joining method, constructed**  
362 **from 16 HBV reference sequences (genotype A-H) and the sequences of the 5**  
363 **infected infants and their mothers' viruses**



364

365

**Table 4: Characteristics of the 5 HBV infected infants**

N	Sex	Delivery mode	Gestational age at birth	Maternal HBeAg status	Time from birth to HBV vaccine (hours)	HBV vaccine schedule	Maternal HBV DNA (load - log <sub>10</sub> ) at delivery	Infant HBV DNA load - log <sub>10</sub> at 6 months of age	Maternal HBV genotype	Infant HBV genotype	Gene variants detected in mother at delivery	Gene variants detected in infant at 6 months of age
C1	M	Cesarean	40	Positive	3	Completed	8.90	9.23	B	B	M133I	M133I/
C2	M	Vaginal	39	Positive	18	Uncompleted	9.20	8.40	B	B	None	M133T
C3	F	Vaginal	38	Positive	19	Completed	8.80	8.75	B	B	None	None
C4	F	Vaginal	39	Positive	10	Completed	8.90	7.72	C	C	None	G145G/R
C5	F	Vaginal	40	Positive	16	Completed	8.60	8.90	C	C	None	G145G/A

## 370 **Analysis of mutations in the HBsAg “a” determinant**

371 The HBV Surface gene sequencing of the viruses of infected infants and their mothers  
372 showed no mutations in both infant and mother of pair 3; the *M133I* mutations in both  
373 the infant and mother of pair 1; and either *M133T*, *G145G/R* or *G145G/A* in the infants  
374 of the other pairs (Table 4).

375

## 376 **Discussion**

377

378 The proportion of women with HBeAg (39%) among HBsAg positive women was  
379 similar to that reported in recent studies in Asia (11,12). Of 141 infants born to 140  
380 HBV chronically infected mothers in this study, 120 were assessed for HBV infection  
381 at six months of age and, of those 120 infants, 5 (4%) were found infected. As in many  
382 settings in the world, newborns had no access to HB immune globulin. As expected,  
383 all 5 infected infants were born to a mother who tested positive for HBeAg during  
384 pregnancy. The infection rate among infants born to HBeAg positive mothers was  
385 similar to that reported in most studies where infants received HBIG, i.e. from 7% to  
386 11% (11,22–24), though two recent studies reported low rates of transmission: 2% in  
387 Thailand (12) and 4.5% in Hong Kong (25). The relatively low risk of transmission  
388 observed in our study could be related to the short duration between birth and first  
389 administration of HB vaccine, the lack of invasive procedures, the low percentage of  
390 cesarean sections, or sampling variations.

391

392 After 6 months of age, 15 of the 120 infants (12%) (including the 5 chronically infected  
393 infants) had anti-HBs <10 UI/L. The percentage of infants (88%) successfully  
394 immunized, i.e. who achieved a protective level of antibodies at 6 months of age,  
395 seemed higher than the <66% percentage reported in two studies conducted in Laos  
396 PDR (15,26). However, the percentage of immune prophylaxis success was low in  
397 comparison with recent clinical studies in Thailand (12) or China (22,24,27) where the  
398 percentages of uninfected infants with satisfactory antibody levels after immunization  
399 were close to 100%.

400

401 Phylogenetic analyses showed that four of the five infants had a virus strain closely  
402 related to their mother's strain with high bootstrap values, whereas one harbored a  
403 virus strain different from her mother's strain. This is consistent with a possible  
404 horizontal transmission and a possible facilitating role of maternal HBeAg transferred  
405 to the infant *in utero*. All but 1 of the 15 infants with unsatisfactory response to vaccine  
406 received immunization according to national recommendations. The reasons for  
407 failures are unclear. Vaccine delivery from the manufacturer to the National Vaccine  
408 Center and from this center to hospital well-baby clinics is handled by professionals  
409 specifically trained to preserve the quality of vaccines. However, we suspected that  
410 vaccine vials may have entered in close contact with frozen icepacks when delivered  
411 from the well-baby clinic to the maternity unit or during other transfers by staffs who  
412 may not be aware of the risk of freezing HB vaccine. Indeed, the World Health  
413 Organization (WHO) recommends storing HB vaccine from 2°C to 8°C as HB vaccine  
414 immunogenic properties are definitively lost if the vaccine has been frozen, even for  
415 a short period of time (28).

416

417 Mutations of the HBV surface gene were found in 4 of the 5 infected infants (2 with  
418 HBV genotype B and 2 genotype C): *G145G/R*, *G145G/A*, *M133T*, *M133I* (Table 4),  
419 all suspected to be associated with vaccine escape mutation (29–32).

420

421 One hundred and six (69%) mothers did not know about their HBV infection status  
422 before pregnancy and 116 (76%) pregnant women did not know about their husband's  
423 HBV status. This supports introduction of screening in the general population as  
424 recommended by WHO for countries with high HBV prevalence (33).

425

426 A limitation was that our study was conducted in an urban area and the results may  
427 not reflect the situation nationwide. Indeed, for various reasons, including affordability  
428 of antenatal care and distance from health care facilities, a significant proportion of  
429 pregnant women do not deliver in health care facilities. Due to Ethics Committee  
430 requirements, only adult women (more than 18 years) were included, and the rate of  
431 transmission from younger women may have been different if there had been enrolled.  
432 Another limitation was the low number of infected infants limiting the possibility to  
433 conduct multivariable analyses to identify risk factors for transmission other than  
434 maternal HBeAg. The proportion of loss to follow up notified was high but the  
435 comparison of the baseline characteristics of those lost to follow up and the others did  
436 not indicate differences.

437

438

439

440

## 441 **Conclusion**

442 In this first study describing HBV perinatal transmission in Lao PDR, we observed a  
443 relatively low rate of MTCT considering the lack of HBIg. Maternal antiviral treatment  
444 may have prevented four infections acquired from the mothers. However, one infant  
445 was infected by a virus unrelated to her mother's virus, strongly suggesting  
446 immunization failure, and 10 uninfected infants had unsatisfactory levels of anti-HBs  
447 antibodies at 6 months. This supports the need for more intensive measures to prevent  
448 mother-to-child transmission through the use of immune globulin and/or maternal  
449 antiviral prophylaxis, but also the need for improvement of the universal immunization  
450 procedures.

451

## 452 **Acknowledgements**

453 We would like to thank the mothers and their infants who participated in the study. The  
454 authors would like to thank Prof. Ass Bounkong Syhavong, Prof. Ass Bounthaphany  
455 Bounxoei, Dr Tui Chanthalangsy, Dr Ot Manolin, Prof. Daniel Reinharz, Prof. Ass  
456 Mayfong Mayxay, Dr Anthony Black, Dr Ouiphone Viyarath and Dr Phimmasone  
457 Sirimanotham for facilitating the study.

458

459



460

## 461 **References**

- 462 1. Hepatitis B [Internet]. World Health Organization. [cited 2018 Jun 15]. Available from:  
463 <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
- 464 2. Stevens CE, Beasley RP, Tsui J, Lee WC. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N*  
465 *Engl J Med*. 1975 Apr 10;292(15):771–4.
- 466 3. Xu D-Z, Yan Y-P, Choi BCK, Xu J-Q, Men K, Zhang J-X, et al. Risk factors and mechanism of  
467 transplacental transmission of hepatitis B virus: a case-control study. *J Med Virol*. 2002 May;67(1):20–6.
- 468 4. Wong VC, Lee AK, Ip HM. Transmission of hepatitis B antigens from symptom free carrier mothers to  
469 the fetus and the infant. *Br J Obstet Gynaecol*. 1980 Nov;87(11):958–65.
- 470 5. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J*  
471 *Gastroenterol*. 2014 May 14;20(18):5427–34.
- 472 6. Beasley RP, Hwang LY, Lee GC, Lan CC, Roan CH, Huang FY, et al. Prevention of perinatally  
473 transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. *Lancet*. 1983  
474 Nov 12;2(8359):1099–102.
- 475 7. Lo K-J, Tsai Y-T, Lee S-D, Wu T-C, Wang J-Y, Chen G-H, et al. Immunoprophylaxis of Infection with  
476 Hepatitis B Virus in Infants Born to Hepatitis B Surface Antigen-Positive Carrier Mothers. *Journal of Infectious*  
477 *Diseases*. 1985 Oct 1;152(4):817–22.
- 478 8. Hsu H-M, Chen D-S, Chuang C-H, Lu JC-F, Jwo D-M, Lee C-C, et al. Efficacy of a Mass Hepatitis B  
479 Vaccination Program in Taiwan: Studies on 3464 Infants of Hepatitis B Surface Antigen—Carrier Mothers.  
480 *JAMA*. 1988 Oct 21;260(15):2231–5.
- 481 9. Chen H-L, Lin L-H, Hu F-C, Lee J-T, Lin W-T, Yang Y-J, et al. Effects of maternal screening and  
482 universal immunization to prevent mother-to-infant transmission of HBV. *Gastroenterology*. 2012  
483 Apr;142(4):773-781.e2.
- 484 10. Zhang L, Gui X, Teter C, Zhong H, Pang Z, Ding L, et al. Effects of hepatitis B immunization on  
485 prevention of mother-to-infant transmission of hepatitis B virus and on the immune response of infants towards  
486 hepatitis B vaccine. *Vaccine*. 2014 Oct 21;32(46):6091–7.
- 487 11. Pan CQ, Duan Z, Dai E, Zhang S, Han G, Wang Y, et al. Tenofovir to Prevent Hepatitis B Transmission  
488 in Mothers with High Viral Load. *N Engl J Med*. 2016 Jun 16;374(24):2324–34.
- 489 12. Jourdain G, Ngo-Giang-Huong N, Harrison L, Decker L, Khamduang W, Tierney C, et al. Tenofovir  
490 versus Placebo to Prevent Perinatal Transmission of Hepatitis B. *N Engl J Med*. 2018 08;378(10):911–23.

- 491 13. International Agency for research on Cancer. Lao People's Democratic Republic [Internet]. [cited 2018  
492 Jun 15]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)
- 493 14. Xeuatvongsa A, Komada K, Kitamura T, Vongphrachanh P, Pathammavong C, Phounphenghak K, et al.  
494 Chronic Hepatitis B Prevalence among Children and Mothers: Results from a Nationwide, Population-Based  
495 Survey in Lao People's Democratic Republic. Roques P, editor. PLoS ONE. 2014 Feb 28;9(2):e88829.
- 496 15. Black AP, Nouanthong P, Nanthavong N, Souvannaso C, Vilivong K, Jutavijittum P, et al. Hepatitis B  
497 virus in the Lao People's Democratic Republic: a cross sectional serosurvey in different cohorts. BMC Infect  
498 Dis. 2014 Aug 23;14:457.
- 499 16. Choisy M, Keomalaphet S, Xaydalasouk K, Quet F, Latthaphasavang V, Buisson Y. Prevalence of  
500 Hepatitis B Virus Infection among Pregnant Women Attending Antenatal Clinics in Vientiane, Laos, 2008–2014.  
501 Hepatitis Research and Treatment. 2017;2017:1–5.
- 502 17. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatitis B vaccine birthdose practices in a country  
503 where hepatitis B is endemic - Laos, December 2011-February 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2013 Jul  
504 26;62(29):587–90.
- 505 18. Lee C, Gong Y, Brok J, Boxall EH, Gluud C. Effect of hepatitis B immunisation in newborn infants of  
506 mothers positive for hepatitis B surface antigen: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2006 Feb  
507 9;332(7537):328–36.
- 508 19. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [Internet]. [cited  
509 2018 Jul 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC491989/>
- 510 20. WHO\_position\_paper\_HepB.pdf [Internet]. [cited 2018 Jul 12]. Available from:  
511 [http://www.who.int/immunization/topics/WHO\\_position\\_paper\\_HepB.pdf](http://www.who.int/immunization/topics/WHO_position_paper_HepB.pdf)
- 512 21. Jutavijittum P, Andernach IE, Yousukh A, Samounry B, Samounry K, Thammavong T, et al. Occult  
513 hepatitis B infections among blood donors in Lao PDR. Vox Sang. 2014 Jan;106(1):31–7.
- 514 22. Han G-R, Cao M-K, Zhao W, Jiang H-X, Wang C-M, Bai S-F, et al. A prospective and open-label study  
515 for the efficacy and safety of telbivudine in pregnancy for the prevention of perinatal transmission of hepatitis B  
516 virus infection. J Hepatol. 2011 Dec;55(6):1215–21.
- 517 23. Chen H-L, Lee C-N, Chang C-H, Ni Y-H, Shyu M-K, Chen S-M, et al. Efficacy of maternal tenofovir  
518 disoproxil fumarate in interrupting mother-to-infant transmission of hepatitis B virus. Hepatology. 2015  
519 Aug;62(2):375–86.
- 520 24. Han G-R, Jiang H-X, Yue X, Ding Y, Wang C-M, Wang G-J, et al. Efficacy and safety of telbivudine  
521 treatment: an open-label, prospective study in pregnant women for the prevention of perinatal transmission of  
522 hepatitis B virus infection. J Viral Hepat. 2015 Sep;22(9):754–62.

- 523 25. Cheung KW, Seto MTY, Kan ASY, Wong D, Kou KO, So PL, et al. Immunoprophylaxis Failure of  
524 Infants Born to Hepatitis B Carrier Mothers Following Routine Vaccination. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018  
525 Jan;16(1):144–5.
- 526 26. Jutavijittum P, Yousukh A, Saysanasongkham B, Samounry B, Samounry K, Toriyama K, et al. HIGH  
527 RATE OF HEPATITIS B VIRUS MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION IN LAO PEOPLE’S  
528 DEMOCRATIC REPUBLIC. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2016 Mar;47(2):214–8.
- 529 27. Han G-R, Jiang H-X, Wang C-M, Ding Y, Wang G-J, Yue X, et al. Long-term safety and efficacy of  
530 telbivudine in infants born to mothers treated during the second or third trimesters of pregnancy. *Journal of Viral*  
531 *Hepatitis*. 2017 Jun 1;24(6):514–21.
- 532 28. MLM\_module1.pdf [Internet]. [cited 2018 Jul 12]. Available from:  
533 [http://www.who.int/immunization/documents/MLM\\_module1.pdf](http://www.who.int/immunization/documents/MLM_module1.pdf)
- 534 29. Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradsamee P, Poovorawan Y. Variants within the “a”  
535 determinant of HBs gene in children and adolescents with and without hepatitis B vaccination as part of  
536 Thailand’s Expanded Program on Immunization (EPI). *Tohoku J Exp Med*. 2001 Mar;193(3):197–205.
- 537 30. Ogata N, Cote PJ, Zanetti AR, Miller RH, Shapiro M, Gerin J, et al. Licensed recombinant hepatitis B  
538 vaccines protect chimpanzees against infection with the prototype surface gene mutant of hepatitis B virus.  
539 *Hepatology*. 1999 Sep;30(3):779–86.
- 540 31. Khamduang W, Gaudy-Graffin C, Ngo-Giang-Huong N, Jourdain G, Moreau A, Borkird T, et al.  
541 Analysis of residual perinatal transmission of hepatitis B virus (HBV) and of genetic variants in human  
542 immunodeficiency virus and HBV co-infected women and their offspring. *J Clin Virol*. 2013 Oct;58(2):415–21.
- 543 32. Yan B, Lv J, Feng Y, Liu J, Ji F, Xu A, et al. Temporal trend of hepatitis B surface mutations in the  
544 post-immunization period: 9 years of surveillance (2005–2013) in eastern China. *Scientific Reports* [Internet].  
545 2017 Dec [cited 2018 Aug 2];7(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-07085-z>
- 546 33. Hellard ME, Chou R, Easterbrook P. WHO guidelines on testing for hepatitis B and C – meeting targets  
547 for testing. *BMC Infectious Diseases* [Internet]. 2017 Nov [cited 2018 Aug 23];17(S1). Available from:  
548 <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2765-2>
- 549

## Chapitre IV : Conclusions générales et perspectives

L'ensemble des travaux présentes dans ce travail avait pour but d'améliorer les connaissances sur la biologie, la virologie et les caractéristiques cliniques de l'infection par le VHB chez les femmes enceintes et leur enfant. En effet, une meilleure compréhension des difficultés à la mise en place de la prévention de la transmission mère-enfant du virus de l'hépatite B dans deux hôpitaux de références du Laos pourra permettre d'identifier des solutions et de diminuer la transmission.

La première partie de mon travail a concerné l'épidémiologie clinique et biologique des femmes enceintes infectées par le VHB. La proportion des femmes à haut risque de transmettre le virus du VHB à leur enfant était élevée dans notre étude (plus d'un tiers). Toutes les femmes incluses dans l'étude étaient asymptomatiques, et aucune n'a présenté de perturbation majeure des transaminases durant l'étude. Ces femmes n'ont donc pas besoin de traitement antiviral pour elle-même à ce stade de leur maladie. Néanmoins, du fait de leur réplication virale élevée, elles sont considérées à haut risque de transmettre le VHB à leurs enfants. Donner le vaccin contre le VHB le plus rapidement possible à la naissance pour tous les nouveau-nés a déjà permis de diminuer le nombre de nouveau cas d'infection par le VHB. En absence d'HBsIg dans le pays la prescription d'un traitement antiviral aux femmes enceintes infectées par le VHB avec une charge virale élevée doit être envisagé

Dans le deuxième axe de notre projet de recherche nous avons identifié les obstacles et les difficultés à la mise en œuvre des recommandations nationales pour la prévention de la transmission périnatale du VHB. Selon les données disponibles au Laos; de nombreux enfants ont encore un taux d'AcHBs insuffisant pour les protéger contre le VHB. Cette étude a permis d'identifier plusieurs situations qui pourraient expliquer ce constat, telles que : l'indisponibilité du vaccin dans certaines salles d'accouchement, des malentendus sur les contre-indications du vaccin contre le VHB (détresse foetal, petit poids de naissance du nouveau-né), des questions sur la qualité du vaccin au moment de son utilisation, notamment le risque de congélation du vaccin quand il est en contact avec des packs de

glace congelés, ce qui peut entraîner une perte de ses propriétés immunogènes. Il serait donc nécessaire d'améliorer le stockage du vaccin dans la salle de maternité et la salle de vaccination en termes de quantité et de qualité et de renforcer les connaissances des personnels de santé sur le stockage, l'utilisation et les contre-indications du vaccin contre le VHB.

Dans le troisième axe de notre projet nous avons cherché à identifier des mutations pouvant expliquer un échappement à la vaccination. Un échec du vaccin peut être liée au stade de l'infection de la mère (le risque est plus important si elle a une charge viral élevée), a une absence ou une mauvaise vaccination de l'enfant, ou à la mauvaise qualité du vaccin injecté. Néanmoins il existe des virus de l'hépatite B porteurs de mutations qui pourrait être liées à un échappement à la vaccination.

## Chapitre V: Présentation des travaux

Participation à des congrès : Communication orale

- 1) 7 - 9 Octobre 2015 : Présenter un premier résultat du projet sur la transmission périnatale du VHB en RDP Lao : Cohort prospective au 1<sup>er</sup> symposium régional sur les hépatites B et C et l'accès aux traitements à Vientiane, RDP Lao.
- 2) 26 - 27 Octobre 2015: Etre co-conférencier sur le sujet "Expert Recommendations and Ethical Concerns for the Evaluation of Recommendations" au "Symposium Ethics in Research for International Development: Environment, Societies and Health in the Mekong Basin) à Vientiane, RDP Lao.

Gonzague JOURDAIN,<sup>(a,b,c)</sup> medical epidemiologist, Vatthanaphone  
LATTHAPHASAVANG,<sup>(d)</sup> medical doctor and public health specialist, Woottichai  
KHAMDUANG,<sup>(a,b)</sup> virologist, and Nicole NGO-GIANG-HUONG,<sup>(a,b,c)</sup> virologist

(a) Institut de Recherche pour le Développement (IRD), France

(b) Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Thailand);

(c) Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, Massachusetts

(d) Mahosot Hospital, Vientiane, Lao PDR; Claude Bernard Lyon 1 University

- 3) 10 - 12 Oct 2016: Perinatal transmission of HBV in Vientiane: A study in Hepatitis B chronically infected pregnant women. Perinatal transmission, national guidelines evolution, studies to be conducted au "2<sup>nd</sup> Regional Symposium on Viral Hepatitis" à Vientiane, RDP Lao.
- 4) 22 - 24 Novembre 2017: "Challenges for hepatitis B vaccination at birth in Lao PDR" au «2017 Mekong Hepatitis Symposium»
- 5) 5 - 7 September 2018 : Perinatal hepatitis B virus transmission in Lao PDR: a prospective cohort study au «2018 Mekong Hepatitis Symposium ».

## Références pour le manuscrit de thèse :

1. Hépatite B. World Health Organization. <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Accessed 31 Jul 2018.
2. Virus de l'hépatite B. Wikipédia. 2017. [https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Virus\\_de\\_l%27h%C3%A9patite\\_B&oldid=142086010](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Virus_de_l%27h%C3%A9patite_B&oldid=142086010). Accessed 15 Oct 2018.
3. Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*. 1980;36:829–36.
4. Lambert V, Cova L, Chevallier P, Mehrotra R, Trepo C. Natural and experimental infection of wild mallard ducks with duck hepatitis B virus. *J Gen Virol*. 1991;72 ( Pt 2):417–20.
5. Hepatitis B virus. Wikipedia. 2018. [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Hepatitis\\_B\\_virus&oldid=858766988](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Hepatitis_B_virus&oldid=858766988). Accessed 17 Oct 2018.
6. Radziwill G, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol*. 1990;64:613–20.
7. Gerlich WH, Uy A, Lambrecht F, Thomssen R. Cutoff Levels of Immunoglobulin M Antibody against Viral Core Antigen for Differentiation of Acute, Chronic, and Past Hepatitis B Virus Infections. *J CLIN MICROBIOL*. 1986;24:6.
8. Rodella A, Galli C, Terlenghi L, Perandin F, Bonfanti C, Manca N. Quantitative analysis of HBsAg, IgM anti-HBc and anti-HBc avidity in acute and chronic hepatitis B. *J Clin Virol*. 2006;37:206–12.
9. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2003;38:1075–86.
10. Chen CY, Crowther C, Kew MC, Kramvis A. A valine to phenylalanine mutation in the precore region of hepatitis B virus causes intracellular retention and impaired secretion of HBe-antigen. *Hepatol Res*. 2008;38:580–92.
11. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet Lond Engl*. 1989;2:588–91.
12. Carman WF, Karayiannis P, Waters J, Thomas HC, Zanetti AR, Manzillo G, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *The Lancet*. 1990;336:325–9.

13. Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradsamee P, Poovorawan Y. Variants within the “a” determinant of HBs gene in children and adolescents with and without hepatitis B vaccination as part of Thailand’s Expanded Program on Immunization (EPI). *Tohoku J Exp Med.* 2001;193:197–205.
14. Khamduang W, Gaudy-Graffin C, Ngo-Giang-Huong N, Jourdain G, Moreau A, Borkird T, et al. Analysis of residual perinatal transmission of hepatitis B virus (HBV) and of genetic variants in human immunodeficiency virus and HBV co-infected women and their offspring. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2013;58:415–21.
15. Cooreman MP, Leroux-Roels G, Paulij WP. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci.* 2001;8:237–47.
16. Raimondo G, Pollicino T, Romanò L, Zanetti AR. A 2010 update on occult hepatitis B infection. *Pathol Biol.* 2010;58:254–7.
17. Yong-lin Y, Qiang F, Ming-shun Z, Jie C, Gui-ming M, Zu-hu H, et al. Hepatitis B surface antigen variants in voluntary blood donors in Nanjing, China. *Viol J.* 2012;9:82.
18. Huang C-H, Yuan Q, Chen P-J, Zhang Y-L, Chen C-R, Zheng Q-B, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *J Hepatol.* 2012;57:720–9.
19. Zoulim F. Nouveaux tests virologiques et leurs applications dans la prise en charge de l’hépatite B chronique. *Presse Médicale.* 2006;35:317–26.
20. Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:651–93.
21. INSERM\_hepatitesvir2.pdf. [http://lara.inist.fr/bitstream/handle/2332/1374/INSERM\\_hepatitesvir2.pdf?sequence=2](http://lara.inist.fr/bitstream/handle/2332/1374/INSERM_hepatitesvir2.pdf?sequence=2). Accessed 12 Oct 2018.
22. Iannacone M, Sitia G, Isogawa M, Marchese P, Castro MG, Lowenstein PR, et al. Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nat Med.* 2005;11:1167–9.
23. Liu C-J, Kao J-H. Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J. *Semin Liver Dis.* 2013;33:97–102.
24. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol.* 2014;20:5427–34.
25. HeBOOC: การอบรมโรคตับอักเสบบีออนไลน์. <https://www.hebooc.org/menu.php?lang=TH>. Accessed 12 Oct 2018.



26. Hépatite B. World Health Organization. <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Accessed 12 Oct 2018.
27. Stevens CE, Beasley RP, Tsui J, Lee WC. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med*. 1975;292:771–4.
28. Xu D-Z, Yan Y-P, Choi BCK, Xu J-Q, Men K, Zhang J-X, et al. Risk factors and mechanism of transplacental transmission of hepatitis B virus: a case-control study. *J Med Virol*. 2002;67:20–6.
29. Wong VC, Lee AK, Ip HM. Transmission of hepatitis B antigens from symptom free carrier mothers to the fetus and the infant. *Br J Obstet Gynaecol*. 1980;87:958–65.
30. Chemin I, Zoulim F, Merle P, Arkhis A, Chevallier M, Kay A, et al. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. *J Hepatol*. 2001;34:447–54.
31. Michel M-L. Immunopathogenèse et approches vaccinales thérapeutiques de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B. *Virologie*. 2014;18:25–33.
32. Hureaux JM Peigue-Lafeuille H. *Traité de virologie médicale*. Edition ESTEM. ESTEM. 2003.
33. Pollicino T, Saitta C, Raimondo G. Hepatocellular carcinoma: the point of view of the hepatitis B virus. *Carcinogenesis*. 2011;32:1122–32.
34. Hollinger FB, Lau DT-Y. Hepatitis B: the pathway to recovery through treatment. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35:425–61, x.
35. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, Abbas Z, Chan HLY, Chen CJ, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatol Int*. 2016;10:1–98.
36. Koblin BA, Taylor PE, Rubinstein P, Stevens CE. Effect of duration of hepatitis B virus infection on the association between human immunodeficiency virus type-1 and hepatitis B viral replication. *Hepatology*. 1992;15:590–2.
37. Interaction between HIV and hepatitis B. <https://insights-ovid-com.gate2.inist.fr/pubmed?pmid=9386822>. Accessed 14 Oct 2018.
38. Potthoff A, Manns MP, Wedemeyer H. Treatment of HBV/HCV coinfection. *Expert Opin Pharmacother*. 2010;11:919–28.
39. English-report.pdf. <http://www.easl.eu/medias/cpg/management-of-hepatitis-B-virus-infection/English-report.pdf>. Accessed 2 Aug 2018.
40. Pan CQ, Lee HM. Antiviral therapy for chronic hepatitis B in pregnancy. *Semin Liver Dis*. 2013;33:138–46.

41. Patton H, Tran TT. Management of hepatitis B during pregnancy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11:402–9.
42. Wen W-H, Chang M-H, Zhao L-L, Ni Y-H, Hsu H-Y, Wu J-F, et al. Mother-to-infant transmission of hepatitis B virus infection: significance of maternal viral load and strategies for intervention. *J Hepatol*. 2013;59:24–30.
43. Kubo A, Shlager L, Marks AR, Lakritz D, Beaumont C, Gabellini K, et al. Prevention of vertical transmission of hepatitis B: an observational study. *Ann Intern Med*. 2014;160:828–35.
44. Ding Z, Kang W, Lu L, Shen L, Zhao Z, Huang G, et al. [Evaluation on the efficacy of prevention programs and relevant factors targeting mother-to-infant transmission on hepatitis B virus in Yunnan province]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi*. 2014;35:114–6.
45. Pan CQ, Mi L-J, Bunchorntavakul C, Karsdon J, Huang WM, Singhvi G, et al. Tenofovir disoproxil fumarate for prevention of vertical transmission of hepatitis B virus infection by highly viremic pregnant women: a case series. *Dig Dis Sci*. 2012;57:2423–9.
46. Celen MK, Mert D, Ay M, Dal T, Kaya S, Yildirim N, et al. Efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate in pregnancy for the prevention of vertical transmission of HBV infection. *World J Gastroenterol*. 2013;19:9377–82.
47. Greenup A-J, Tan PK, Nguyen V, Glass A, Davison S, Chatterjee U, et al. Efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate in pregnancy to prevent perinatal transmission of hepatitis B virus. *J Hepatol*. 2014;61:502–7.
48. Yu M-M, Jiang Q, Ji Y, Wu K-H, Ju L-L, Tang X, et al. Comparison of telbivudine versus lamivudine in interrupting perinatal transmission of hepatitis B virus. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2014;61:55–60.
49. Jourdain G, Ngo-Giang-Huong N, Harrison L, Decker L, Khamduang W, Tierney C, et al. Tenofovir versus Placebo to Prevent Perinatal Transmission of Hepatitis B. *N Engl J Med*. 2018;378:911–23.
50. Pan CQ, Duan Z, Dai E, Zhang S, Han G, Wang Y, et al. Tenofovir to Prevent Hepatitis B Transmission in Mothers with High Viral Load. *N Engl J Med*. 2016;374:2324–34.
51. Terrault NA, Bzowej NH, Chang K-M, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B: Hepatology, Month 2015. *Hepatology*. 2016;63:261–83.
52. World Health Organization, Global Hepatitis Programme. Guidelines for the prevention, care, and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. 2015.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059_eng.pdf?ua=1&ua=1). Accessed 23 Aug 2018.

53. WHO\_position\_paper\_HepB.pdf.  
[http://www.who.int/immunization/topics/WHO\\_position\\_paper\\_HepB.pdf](http://www.who.int/immunization/topics/WHO_position_paper_HepB.pdf). Accessed 12 Jul 2018.
54. Jutavijittum P, Yousukh A, Samounry B, Samounry K, Ounavong A, Thammavong T, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections among Lao blood donors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2007;38:674.
55. Jutavijittum P, Andernach IE, Yousukh A, Samounry B, Samounry K, Thammavong T, et al. Occult hepatitis B infections among blood donors in Lao PDR. *Vox Sang*. 2014;106:31–7.
56. Black AP, Nouanthong P, Nanthavong N, Souvannaso C, Vilivong K, Jutavijittum P, et al. Hepatitis B virus in the Lao People's Democratic Republic: a cross sectional serosurvey in different cohorts. *BMC Infect Dis*. 2014;14:1.
57. Xeuatvongsa A, Komada K, Kitamura T, Vongphrachanh P, Pathammavong C, Phounphenghak K, et al. Chronic Hepatitis B Prevalence among Children and Mothers: Results from a Nationwide, Population-Based Survey in Lao People's Democratic Republic. *PLoS ONE*. 2014;9:e88829.
58. Choisy M, Keomalaphet S, Xaydalasouk K, Quet F, Latthaphasavang V, Buisson Y. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection among Pregnant Women Attending Antenatal Clinics in Vientiane, Laos, 2008–2014. *Hepat Res Treat*. 2017;2017:1–5.
59. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatitis B vaccine birthdose practices in a country where hepatitis B is endemic - Laos, December 2011-February 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013;62:587–90.
60. International Agency for research on Cancer. Lao People's Democratic Republic.  
[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx). Accessed 15 Jun 2018.
61. Laos Population (2018) - Worldometers. <http://www.worldometers.info/world-population/laos-population/>. Accessed 2 Oct 2018.
62. Lao People's Democratic Republic - Lao PDR Map.  
<http://web.worldbank.org/WBSITE/EXTERNAL/COUNTRIES/EASTASIAPACIFICEXT/LAOPRDEXTN/0,,contentMDK:21153659~pagePK:141137~piPK:141127~theSitePK:293684,00.html>. Accessed 2 Oct 2018.
63. Kanchanachitra C, Lindelow M, Johnston T, Hanvoravongchai P, Lorenzo FM, Huong NL, et al. Human resources for health in southeast Asia: shortages, distributional challenges, and international trade in health services. *Lancet Lond Engl*. 2011;377:769–81.
64. van Zonneveld M, van Nunen AB, Niesters HGM, de Man RA, Schalm SW, Janssen HLA. Lamivudine treatment during pregnancy to prevent perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat*. 2003;10:294–7.

65. Han G-R, Cao M-K, Zhao W, Jiang H-X, Wang C-M, Bai S-F, et al. A prospective and open-label study for the efficacy and safety of telbivudine in pregnancy for the prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2011;55:1215–21.
66. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC491989/>. Accessed 8 Jul 2018.
67. Beasley RP, Hwang LY, Lee GC, Lan CC, Roan CH, Huang FY, et al. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. *Lancet Lond Engl.* 1983;2:1099–102.
68. Lee C, Gong Y, Brok J, Boxall EH, Gluud C. Hepatitis B immunisation for newborn infants of hepatitis B surface antigen-positive mothers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;:CD004790.
69. Kang W, Li Q, Shen L, Zhang L, Tian Z, Xu L, et al. Risk factors related to the failure of prevention of hepatitis B virus Mother-to-Child transmission in Yunnan, China. *Vaccine.* 2017;35:605–9.
70. Banks T, Kang J, Watts I, Tyrosvoutis MEG, Min AM, Tun NW, et al. High hepatitis B seroprevalence and risk factors for infection in pregnant women on the Thailand-Myanmar Border. *J Infect Dev Ctries.* 2016;10:384–8.
71. Sheng Q-J, Wang S-J, Wu Y-Y, Dou X-G, Ding Y. Hepatitis B virus serosurvey and awareness of mother-to-child transmission among pregnant women in Shenyang, China: An observational study. *Medicine (Baltimore).* 2018;97:e10931.
72. Chen H-L, Lee C-N, Chang C-H, Ni Y-H, Shyu M-K, Chen S-M, et al. Efficacy of maternal tenofovir disoproxil fumarate in interrupting mother-to-infant transmission of hepatitis B virus. *Hepatol Baltim Md.* 2015;62:375–86.
73. Cheung KW, Seto MTY, Kan ASY, Wong D, Kou KO, So PL, et al. Immunoprophylaxis Failure of Infants Born to Hepatitis B Carrier Mothers Following Routine Vaccination. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2018;16:144–5.
74. Jutavijittum P, Yousukh A, Saysanasongkham B, Samounry B, Samounry K, Toriyama K, et al. HIGH RATE OF HEPATITIS B VIRUS MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION IN LAO PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2016;47:214–8.
75. Han G-R, Jiang H-X, Yue X, Ding Y, Wang C-M, Wang G-J, et al. Efficacy and safety of telbivudine treatment: an open-label, prospective study in pregnant women for the prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat.* 2015;22:754–62.

76. Han G-R, Jiang H-X, Wang C-M, Ding Y, Wang G-J, Yue X, et al. Long-term safety and efficacy of telbivudine in infants born to mothers treated during the second or third trimesters of pregnancy. *J Viral Hepat.* 2017;24:514–21.
77. MLM\_module1.pdf. [http://www.who.int/immunization/documents/MLM\\_module1.pdf](http://www.who.int/immunization/documents/MLM_module1.pdf). Accessed 12 Jul 2018.
78. Ogata N, Cote PJ, Zanetti AR, Miller RH, Shapiro M, Gerin J, et al. Licensed recombinant hepatitis B vaccines protect chimpanzees against infection with the prototype surface gene mutant of hepatitis B virus. *Hepatology* Baltim Md. 1999;30:779–86.
79. Yan B, Lv J, Feng Y, Liu J, Ji F, Xu A, et al. Temporal trend of hepatitis B surface mutations in the post-immunization period: 9 years of surveillance (2005–2013) in eastern China. *Sci Rep.* 2017;7. doi:10.1038/s41598-017-07085-z.

## Résumé

**Contexte** : On estime que 257 millions de personnes dans le monde sont infectées de manière chronique par le virus de l'hépatite B (VHB). La transmission mère-enfant représente la majorité des nouveaux porteurs chroniques du VHB, en particulier en Asie. Le VHB peut être transmis in utero, lors de l'accouchement ou pendant la petite enfance et plus tard. Environ 80 à 90% des nourrissons infectés à la naissance développeront une infection chronique par le VHB avec le risque élevé de développer de graves complications, notamment une fibrose du foie, une cirrhose, un carcinome hépatocellulaire et un décès lié au foie à l'âge adulte. Nous avons envisagé d'évaluer la proportion des enfants immunisés avec succès dans deux grands hôpitaux de Vientiane, en République démocratique populaire lao, où l'immunoglobuline HB (HBIG) n'est pas disponible.

**Méthodes** : Nous avons mené une cohorte prospective de femmes enceintes infectées par le VHB et de leurs enfants jusqu'à six mois après la naissance de janvier 2015 à mars 2017. Tous les nourrissons ont reçu le vaccin anti-HB à la naissance et six, 10 et 14 semaines après la naissance. Le statut d'infection par le VHB chez l'enfant a été évalué à l'âge de 6 mois. Le séquençage du gène de surface du VHB a été effectué chez des couples mère-enfant infectés.

**Résultats** : Sur 153 mères ayant été dépistées positives pour l'antigène de surface HB (AgHBs), 60 (39%) avaient l'antigène HBe (AgHBe) positif. Les femmes enceintes ayant AgHBe-positif étaient plus jeunes que les femmes ayant d'AgHBe négatif ((âge médiane 26 versus 28 ans;  $p = 0,02$ ), et avaient une charge virale du VHB significativement plus élevée à l'accouchement (médiane 8,0 versus 4,0  $\log_{10}$  UI / mL,  $p < 0,001$ ). Au total, 141 nouveau-nés, dont une paire de jumeaux, sont nés dans l'étude. Parmi les 112 nouveau-nés pour lesquels le délai entre la naissance et l'heure d'administration du vaccin contre le VHB était disponible, 110 (98%) ont reçu le vaccin dans les 24 heures suivant la naissance. Le délai médian entre la naissance et l'administration du vaccin était de 6 heures (EI 3 à 13), avec 95 (72%) dans les 12 heures suivant la naissance. Un nouveau-né a reçu le vaccin 26 heures après la naissance car le vaccin n'était pas disponible dans la salle d'accouchement et un autre nouveau-né a reçu le vaccin 3 jours après la naissance car, en raison d'une détresse respiratoire sévère à la naissance, le vaccin a été considéré comme contre-indiqué. Parmi les 120 enfants évalués à l'âge de 6 mois, 5 (4%) étaient positifs pour AgHBs et présentaient une charge virale détectable pour

le VHB par réaction en chaîne avec une polymérase. Tous sont nés de mères ayant l'AgHBe positif et une charge virale  $> 8,5 \log_{10}$  UI / mL. Cependant, seulement quatre enfants (3,3%, IC à 95%, 0,5% à 7,0%) avaient une souche virale étroitement apparentée à celle de leur mère. Des mutations du gène de surface du VHB (G145G/R, G145G/A, M133T, M133I) ont été détectées chez 4 des 5 enfants infectés. Le taux d'anticorps anti-HBs était supérieur à 10 UI / L chez 105 nourrissons (88%) à l'âge de 6 mois.

**Conclusions** : La transmission de la mère à l'enfant s'est produite moins souvent que ce que nous avons prévu en absence de l'utilisation de HBIg. L'ajout d'une prophylaxie par HBIg et / ou antivirale maternelle aurait pu prévenir certaines de ces infections. L'observation du taux d'anticorps anti-HBs non satisfait chez 9% des enfants non infectés à 6 mois souligne la nécessité d'améliorer les procédures d'immunisation universelles.

## Summary

**Background:** An estimated 257 million people are chronically infected with the hepatitis B virus (HBV) worldwide. Mother-to-child transmission accounts for the majority of new chronic HBV carriers, especially in Asia. HBV can be transmitted *in utero*, during delivery or during infancy and later. About 80–90% of infants infected at birth will develop a chronic HBV infection, and will have a high risk of developing serious complications including liver fibrosis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma (HCC) and liver-related death during adult age. We aimed at assessing the percentage of infants successfully immunized in two major hospitals in Vientiane, Lao People's Democratic Republic (Lao PDR) where HB immune globulin (HBIG) is not available.

**Methods:** We studied a prospective cohort of chronically HBV infected pregnant women and their infants until 6 months post-partum from January 2015 to March 2017. All infants received the HB vaccine at birth and 6, 10 and 14 weeks thereafter, and their HBV status was assessed at 6 months of age. HBV surface gene sequencing was performed in infected mother-infant pairs.

**Results:** Of 153 mothers with HB surface antigen (HBsAg), 60 (39%) had detectable serum HBe antigen (HBeAg). HBeAg positive pregnant women were younger than those negative (median age 26 versus 28 years;  $p=0.02$ ) and had a significantly higher HBV viral load at delivery (median 8.0 versus 4.0  $\log_{10}$  IU/mL,  $p < 0.001$ ). A total of 141 infants including a pair of twins were included in the study and information at the time of vaccine administration after birth was available for 112 newborns. Of these, 110 (98%) received the HepB-BD within 24 hours after birth. One newborn received the vaccine 26 hours after birth because the vaccine was not available at the delivery room, and another newborn 3 days after birth due to fetal distress, which was erroneously considered to be a vaccine contra-indication. Among the 120 infants assessed at 6 months of age, 5 (4%) were positive for HBsAg and had a detectable HBV viral load by polymerase chain reaction. All were born to mothers with HBeAg and a viral load  $> 8.5 \log_{10}$  IU/mL. However, only four (3.3%, 95% CI 0.5% to 7.0 %) had a virus strain closely related to their mother's strain. HBV surface gene mutations were detected in 4 of the 5 infected infants (G145G/R, G145G/A, M133T, M133I). Anti-HBs antibody level was above 10 IU/L in 105 (88%) infants at 6 months of age.



**Conclusions:** Mother-to-child transmission occurred less frequently than expected without the use of HBIg. Adding HBIg and/or maternal antiviral prophylaxis may have prevented some of these infections. The observation of unsatisfactory levels of anti-HBs antibodies in 9% of the uninfected infants at 6 months highlights the need for improvement of the universal immunization procedures.