



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Phimpha PABORIBOUNE

Le 6 décembre 2018

**Surveillance des hépatites virales B-C au Laos ;
De l'analyse de routine à la recherche de
biomarqueurs par métabolomique**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

**PHARMA-DEV-Laboratoire Pharmacochimie et Pharmacologie pour le
Développement**

Thèse dirigée par
Eric DEHARO et Guillaume MARTI

Jury

Eric DEHARO
Guillaume MARTI
Pierre-Marie PREUX
Daniel AJZENBERG
Françoise NEPVEU
Paul DÉNY

Chargé de Recherche IRD
MC, UMR-152 IRD-UPS
Professeur à l'Université de Limoges
MCU PH à l'Université de Limoges
Université Paul Sabatier, Toulouse
Professeur à l'Université Paris 13, Paris

Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur

REMERCIEMENTS

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser jusqu'à au bout de ce travail. Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de ce long chemin qu'a constitué la réalisation de cette thèse. Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse, Eric Deharo pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. Il fut pour moi un directeur de thèse attentif et toujours disponible malgré ses nombreuses charges et m'a permis d'être toujours motivée, d'avoir le cœur léger et l'esprit tranquille depuis le début de ma thèse. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Merci, Eric, pour ton soutien permanent, pour tes multiples encouragements répétés pendant mes périodes de doutes, pour ta relecture finale méticuleuse de chacun des chapitres.

Je remercie également mon co-directeur de thèse Guillaume Marti qui m'a chaleureusement accueilli au laboratoire PHARMA-DEV à Toulouse et m'a appris la nouvelle technique de métabolomique. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur dans ce domaine.

Un grand merci à Thomas Vial pour son aide technique précieuse et son enseignement pour l'interprétation des résultats métabolomiques et à François Chassagne pour ses conseils pertinents et son enthousiasme communicatif de la vie d'étudiant en thèse.

J'adresse toute ma gratitude à Farid Boumédiène pour sa participation à mon comité de suivi de thèse, pour ses suggestions toujours avisées, qui m'ont permis de clarifier ma pensée parfois embrouillée et qui m'a souvent si bien conseillée à l'égard de ma prose.

J'exprime tous mes remerciements aux rapporteurs : Pr Pierre-Marie PREUX et Pr Daniel AJZENBERG pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ma thèse et pour les suggestions très intéressantes qu'ils m'ont prodiguées, et à l'ensemble des membres de mon jury : Pr Françoise NEPVEU, Pr Paul Dény, Dr François-Xavier BABIN.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à tous mes amis et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail, particulièrement toutes ces personnes formidables que j'ai rencontrées au laboratoire PHARMA-DEV, en particulier à M Franck MARIE-SAINTE pour son soutien logistique et son humour.

Je remercie toute l'équipe du Centre d'Infectiologie Lao-Christophe Mérieux et de la Fondation Mérieux pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun m'ont beaucoup apporté et ont été d'une aide précieuse.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à mon cher époux qui, non content d'avoir été le correcteur des fautes d'orthographe et grammaticales de cette thèse, m'a toujours apporté son soutien indéfectible et ses encouragements.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	ii
SOMMAIRE	iii
ABRÉVIATIONS	vi
TABLE DES ILLUSTRATIONS	vii
PRÉAMBULE	viii
INTRODUCTION GENERALE DU PAYS	9
1. Le Laos	1
1.1) Données socio-économiques	1
1.2) L'état sanitaire du Laos	3
2. Le centre d'Infectiologie Lao-Christophe Mérieux (CILM)	6
CHAPITRES	8
CHAPITRE-I : EPIDEMIOLOGIE DE L'HEPATITE B	1
1. Introduction	2
2. Au niveau mondial	3
3. En Asie du Sud-Est	5
4. Au Laos	6
ETUDE-1 : ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE, RETROSPECTIVE DE LA SURVEILLANCE DE L'HEPATITE B AU LAOS	7
1. Contexte et objectifs	8
2. Matériels et Méthodes	8
3. Principaux résultats	8
4. Discussion et conclusion	9
<i>Article 1: « A Seven-Year Retrospective Study on the Surveillance of Hepatitis B in Laos »</i>	9
ETUDE-2 : ETUDE PROSPECTIVE, TRANSVERSALE SUR LA PERFORMANCE DE TROIS TESTS RAPIDES COMMERCIAUX POUR LA DETECTION DE L'AGHBs A VIENTIANE, LAOS	21
1. Contexte et objectifs	22
2. Matériels et Méthodes	22
3. Principaux résultats	22
4. Discussion et conclusion	23
<i>Article 2. « Performance of three commercial rapid diagnostic tests for the detection of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) in Lao PDR »</i>	23
CHAPITRE-II : EPIDEMIOLOGIE DE L'HEPATITE C	28
1. Introduction	29
2. Au niveau mondial	32

3.	En Asie du Sud-Est.....	33
4.	Conclusion.....	34
ÉTUDE-3 : ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE, RETROSPECTIVE DE LA SURVEILLANCE DE L'HEPATITE C AU LAOS.....		
1.	Contexte et objectifs.....	38
2.	Matériels et Méthodes.....	38
3.	Principaux résultats.....	39
4.	Discussion et conclusion.....	39
Article 3. " <i>Hepatitis C in Laos: A Seven-Year Retrospective Study on 1765 Patients</i> ".....		39
CHAPITRE-3 : RECHERCHE DE BIOMARQUEURS DE L'EVOLUTION DES HEPATITES VIRALES PAR METABOLOMIQUE.....		
I.	Partie-1 : Cancer du foie.....	50
1.	Introduction.....	50
2.	Epidémiologie.....	50
3.	Principaux facteurs de risque.....	52
4.	Pathogénèse du cancer du foie.....	52
5.	Dépistage et diagnostic.....	54
6.	Traitements.....	55
II.	Partie-2 : Recherche par l'analyse métabolomique de marqueurs plasmatiques chez les patients porteurs de VHB ou VHC chronique.....	56
1.	Principe de la métabolomique.....	56
1.1)	Traitement de l'échantillon.....	57
1.2)	Traitement des données.....	57
2.	Contexte et objectifs :.....	59
3.	Matériels et Méthodes.....	60
3.1)	Population étudiée.....	60
3.2)	Prélèvements.....	60
3.3)	Echographie abdominale.....	61
3.4)	Techniques utilisées au laboratoire du Laos.....	61
3.5)	Analyse métabolomique au Laboratoire PHARMA-DEV, Toulouse, France.....	62
4.	Résultats.....	63
4.1)	Résultats descriptifs des patients VHB et VHC.....	63
i.	Caractéristiques Sociodémographiques de la cohorte sélectionnée.....	63
ii.	Facteurs influençant l'évolution des hépatites VHB/VHC.....	64
4.2)	Données biologiques.....	66
i.	La charge virale (CV).....	66
ii.	Le bilan hépatique (dosage des aminotransférases, ALAT/ASAT).....	66

<i>iii. Le marqueur tumoral : Alpha-foetoProtein</i>	66
<i>4.3) Résultats préliminaires de métabolomique sur le plasma des patients VHB et VHC</i>	67
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	73
1. Les hépatites virales	74
2. Mise en évidence de profils métabolomiques spécifiques	76
3. Conclusion et perspectives.....	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	80
Annexe-1: Questionnaire	87

ABRÉVIATIONS

RDP Lao :	La République Démocratique Populaire Lao
ASEAN :	Association of Southeast Asian Nations
MDGs :	Millennium Development Goals
PIB :	Produit intérieur brut
RNB :	Revenu national brut
OMS :	Organisation mondiale de la santé
UNDP:	United Nations Development Programme
CILM :	Centre d'Infectiologie Lao-Christophe Mérieux
ISO :	International Organization for Standardization
CHAS :	Center for HIV/AIDS & Sexuel Transmissible
NAMRU :	Naval American Medical Research Unit
MSM :	Men have Sex with Men
FSW :	Female Sex Workers
RTIs/STDs:	Sexually transmitted infection (STI) / Reproductive tract infections
VIH / SIDA :	virus de l'immunodéficience humaine / Syndrome d'Immuno Déficience Acquis
TB:	Tuberculose
DOTS :	Directly observed treatment short course
VHB :	Virus de l'hépatite B
Ag HBs :	Antigène de surface de l'hépatite B
VHC :	Virus de l'hépatite C
ARN :	Acide ribonucléique
HCC :	Carcinomes hépatocellulaires
CAA :	Cholangiocarcinome intrahépatique (CCA)
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay
ARV :	Anti Rétro Viraux
CV :	Charge virale
EASL :	European Association for the Study of the Liver
PEV :	Programme élargi de vaccination
TDR :	Tests de diagnostic rapide
NANB :	Hépatite non-A, non-B
(IV, IM) :	Intraveineuse, intramusculaire
AAD :	Antiviraux à action directe
ASAT/ALAT :	Alanine-Aminotransférase / Aspartate-Aminotransférase
AFP :	Alpha-fœtoprotéines
ICD :	International Classification of Diseases
BCLC :	Barcelona Clinic Liver Cancer
CT :	Computerized tomography
MRI :	Magnetic Resonance Imaging

TABLE DES ILLUSTRATIONS

→ LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : CARTE DU LAOS.....	1
FIGURE 2 : ÉVOLUTION DES CARACTERISTIQUES SOCIO-ECONOMIQUES DE LA POPULATION DE 1995 A 2015 [EXTRAIT DE (2)]	2
FIGURE 3: EVOLUTION DE PIB PAR HABITANT EN COMPARAISON AVEC LE VIETNAM ET LE CAMBODGE [EXTRAIT DE (6)]	3
FIGURE 4 : DIAGNOSTICS DE ROUTINE AU CILM DEPUIS 2009	7
FIGURE 5 : ÉVOLUTION CLINIQUE PAR L'INFECTION DU VHB (ADAPTE DE : EASL CONSENSUS STATEMENT. J. HEPATOL. 2003 ; 39 (S1) :S3-25).....	2
FIGURE 6 : ENDEMICITE MONDIALE, PREVALENCE DE L'AGHBS ESTIMEE ET CATEGORISEE EN 2005 [EXTRAIT DE (18)]	3
FIGURE 7 : CASCADE MONDIALE DE SOINS POUR L'INFECTION DE VHB, 2016 [EXTRAIT DE (24)]	4
FIGURE 8 : ARBRES EVOLUTIFS DE TOUTES LES SEQUENCES NS5B DISPONIBLES DU VHC [EXTRAIT DE (47)]	30
FIGURE 9 : PREVALENCE LIEE DE CHAQUE GENOTYPE DU VHC PAR REGION « GLOBAL BURDEN OF DISEASE » (GBD) [EXTRAIT DE (48)]	31
FIGURE 10 : CASCADE MONDIAL DE SOINS POUR L'INFECTION A VHC, 2016 [EXTRAIT DE (24)]	32
FIGURE 11 : ESTIMATION DE LA PREVALENCE VIROLOGIQUE DU VHC DANS LE MONDE (FIN 2015) [EXTRAIT DE (50)]	32
FIGURE 12 : PAYS OU LE NOMBRE D'INFECTIONS A L'HEPATITE C EST ELEVE [EXTRAIT DE (51)]	33
FIGURE 13 : OBJECTIFS POUR L'ELIMINATION DE L'HEPATITE C [EXTRAIT DE (50)]	35
FIGURE 14 : COMMENT PARVENIR A L'ELIMINATION DU VHC A L'ECHELLE MONDIALE ? [EXTRAIT DE (49)] .	36
FIGURE 15 : MECANISMES DE L'HEPATOCARCINOGENESE [EXTRAIT DE (76)]	53
FIGURE 16 : PROGRESSION HISTOPATHOLOGIQUE ET CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES DU CHC [EXTRAIT DE (76)]	54
FIGURE 17 : FLOW CHART DE L'ETUDE METABOLOMIQUE	61
FIGURE 18 : PROJECTION DES ECHANTILLONS SUR ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPAL A PARTIR DU JEU DE DONNEES LC-MS	67
FIGURE 19 : DENDROGRAMME SUR 95% DU JEU DE DONNEES LC-MS (DISTANCE DE WARD). COLORATION DES BRANCHES PAR ETAT PHYSIOLOGIQUE.....	69
FIGURE 20 : OPLS-DA A PARTIR DES DONNEES LC-MS.....	70
FIGURE 21 : ANALYSES UNIVARIEES	71
FIGURE 22 : ORGANIGRAMME DE L'ETUDE COCLICAN.....	79

→ LISTE DES TABLEAUX :

TABLEAU 1 : EVALUATION DE LA REALISATION DES MDGs LIES A LA SANTE DE 1999 A 2015	4
TABLEAU 2 : LES OBJECTIFS DES MDGs A ATTEINDRE DE 2015 A 2020.....	5
TABLEAU 3 : LES SOURCES D'INFECTION DU VHC	29
TABLEAU 4 : PREVALENCE DU VIRUS DE L'HEPATITE C DANS LES PAYS D'ASIE DU SUD-EST	34
TABLEAU 5 : TAUX DE CANCER DU FOIE DANS LE MONDE	51
TABLEAU 6: LES DONNEES SOCIODEMOGRAPHIQUES DES PATIENTS VHB ET VHC	64
TABLEAU 7 : FACTEURS AGGRAVANTS	65
TABLEAU 8 : DONNEES BIOLOGIQUES DES PATIENTS VHB ET VHC.....	66

PRÉAMBULE

Les travaux exposés dans cette thèse sont le reflet d'années d'efforts consacrées à la mise en place de diagnostics de qualité des hépatites virales au Laos au sein du Centre d'infectiologie Lao Christophe Mérieux (CILM), dont je suis aujourd'hui la directrice scientifique.

En introduction, nous avons tenu à présenter les caractéristiques socio-économiques du Laos et ses défis sanitaires pour atteindre les *Millennium Development Goals*, qui guident les politiques publiques de pays en situation de développement. Nous avons jugé important de souligner ces points tout comme la présentation du CILM pour faire comprendre au lecteur le contexte de réalisation de ce travail.

C'est grâce à une bio-banque riche de plus de 7,000 échantillons biologiques de patients infectés par les virus des hépatites virales B et C, que nous avons pu poser la question de recherche clé de cette thèse :

Comment évoluent les hépatites virales chez les patients reçus depuis une dizaine d'années au CILM ?

Cette question en a fait émerger une deuxième concernant la qualité du diagnostic dans les centres de soins à Vientiane. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux kits de diagnostic rapide de l'hépatite B utilisés dans les structures de soins de Vientiane, comparés au standard utilisé dans notre laboratoire.

Ces travaux, qui ont donné lieu à la publication de 2 articles (un troisième article a été soumis), jouent un rôle capital pour le pays, car ils donnent des axes d'intervention aux autorités de santé publique laotiennes pour combattre ce fléau.

Nous avons choisi une présentation dichotomique des hépatites virales avec une partie dédiée aux hépatites B et une partie dédiée à l'hépatite C en raison de l'émergence d'une troisième question de recherche plus fondamentale. Il s'agit du risque de développement du cancer du foie chez les patients infectés, risque différent suivant que l'on est porteur d'une hépatite B ou d'une C.

En effet, les outils diagnostiques pour déterminer la magnitude de ce risque sont peu ou pas accessibles pour les patients au Laos. C'est la raison pour laquelle la dernière partie de notre travail a porté sur la recherche de marqueurs potentiels de cette transition pathologique par des techniques de métabolomique appliquées aux deux types d'infection. La possibilité d'accéder à une bio-banque de milliers de sérums accumulés au fil des ans est un des atouts de notre laboratoire pour satisfaire cette démarche scientifique. Nos résultats bien que préliminaires différencient bien les deux types d'infection. Ils ouvrent la voie vers de nouveaux horizons diagnostiques et seront poursuivis dans le cadre d'un projet Européen Marie Skłodowska-Curie Actions – Research and Innovation Staff Exchange.

INTRODUCTION GENERALE DU PAYS

1. Le Laos

1.1) Données socio-économiques

La République Démocratique Populaire Lao (RDP Lao) (Fig. 1), pays d'une superficie de 236 800 km², est enclavée au milieu de la péninsule indochinoise, entourée par le Vietnam à l'Est, la Chine au Nord, le Myanmar et la Thaïlande à l'Ouest et le Cambodge au Sud (1). Une grande partie du pays est montagneuse, principalement au Nord et à l'Ouest. Les plaines sont situées le long du fleuve Mékong qui forme la frontière à l'Ouest entre la Thaïlande et le Laos. C'est un pays ethniquement diversifié avec 49 ethnies officiellement reconnues et des centaines de sous-groupes. Il existe quatre principaux groupes ethnolinguistiques (Lao-Tai, Monkhmer, Hmong-Lu Mien et Chinois-Tibétain). Le Lao-Tai est la langue officielle ; cependant, de nombreuses ethnies ne le parlent pas. Administrativement, le pays est divisé en 17 provinces, 148 districts et 8507 villages. Selon les résultats du dernier recensement en 2015, le nombre d'habitants était de 6,492 millions dont 50,1% d'hommes et 49,9% de femmes. 67% de la population vit dans les zones rurales dont 8% sans infrastructure routière (2).

Figure 1 : Carte du Laos



Source : <http://www.canalmonde.fr/r-annuaire-tourisme/monde/guides/cartes.php?p=la>

La figure-2 (2) montre que la population est relativement jeune (32% âgée de 0-14 ans). La tranche d'âge de la population en activité (15 à 64 ans) représente 64% (4% de la population est âgée de 65 ans ou plus). De 1995 à 2015, le taux d'alphabétisation est passé de 60% à 84,7%. Le taux de scolarisation, quant à lui, est resté

quasiment constant depuis 1995 (25% en 1995, 27% en 2015). La proportion des filles et des garçons âgés de 6 à 16 ans fréquentant l'école est respectivement de 79 et 81%.

Figure 2: Évolution des caractéristiques socio-économiques de la population de 1995 à 2015 [extrait de (2)]

	1995	2005	2015		1995	2005	2015
Population and Socio-Economic Characteristics							
Population Size, (1,000s)				Mortality, (per 1,000)			
Total	4,575	5,621	6,492	Crude Death Rate	15.1	9.8	8.2
Females	2,314	2,821	3,237	Infant Mortality Rate	104	70	57
Males	2,261	2,800	3,255	Under 5 Mortality Rate	170	98	86
Sex ratio, males per 100 females	98	99	101	Life Expectancy at Birth, (years)			
Population Density				Female	52	63	65
Persons per sq.Km	19	24	27	Male	50	59	62
Urban/Rural Population, (%)				Literacy Rate, Aged 15+, (%)			
Urban areas	17	27.1	32.9	Literate	60	73	84.7
Rural areas	83	72.8	67.1	Non-literate	40	27	15.3
Rural with roads	-	51.5	59.2	Education, Aged 6+, (%)			
Rural without roads	-	21.3	7.9	Never attend school	38	23	13.1
Age Composition, (%)				Currently at school	25	28	26.9
0-14 years	44	39	32.0	Left school	37	47	57.6
15-64 years	52	57	63.7	Children aged 6-16 attending School, (%)			
65+ years	4	4	4.2	Girls	56	68	78.7
Dependency ratio	-	77	57	Boys	66	75	80.6
Marital Status, (%)							
Never married	59	57	29.4				
Married	36	38	63.5				
Divorced/Separated	2	1	2.5				
Widowed	3	3	4.1				
In Consensual Union	-	-	0.6				

Selon la classification du « *Human Development Index (2017)* » de l'UNDP en Asie du Sud-Est, le Laos reste encore à l'antépénultième position en ce qui concerne la pauvreté (138/188) avant le Cambodge (143/188) et la Birmanie (145/188).

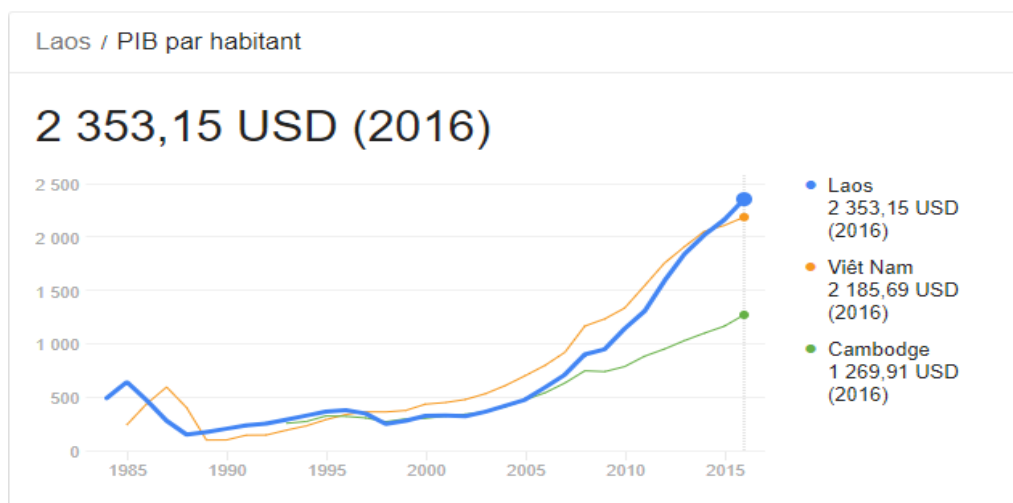
En 2000, le gouvernement a pris des engagements vis à vis de la communauté internationale, en adoptant les objectifs du « *Millennium Development Goals (MDGs)* » et en les incorporant dans les priorités et les objectifs nationaux (3).

Ces objectifs sont :

- MDG-1. Réduire l'extrême pauvreté et la faim
- MDG-2. Assurer l'éducation primaire universelle
- MDG-3. Promouvoir l'égalité des sexes et l'autonomisation des femmes
- MDG-4. Réduire la mortalité infantile
- MDG-5. Améliorer la santé maternelle
- MDG-6. Lutter contre le VIH / SIDA, le paludisme et d'autres maladies
- MDG-7. Assurer la durabilité environnementale
- MDG-8. Développer un partenariat mondial pour le développement

Onze ans après cette adoption, en juillet 2011, la Banque Mondiale a reclassé le Laos de la catégorie « *low income country* » à celle de « *low-middle income country* ». Le RNB par habitant de la RDP lao est de 1,010 USD (4, 5). Le produit intérieur brut (PIB) du Laos a progressé plus rapidement que celui des pays à faible revenu de la même région et de certains de ses voisins. L'économie lao a relativement bien résisté à la crise globale financière, en raison de la stimulation de la demande intérieure (Fig. 3) (6).

Figure 3: Evolution de PIB par habitant en comparaison avec le Vietnam et le Cambodge [extrait de (6)]



1.2) L'état sanitaire du Laos

Le Laos est l'un des pays de l'ASEAN qui a des difficultés à atteindre les objectifs du MDGs relatifs à l'état sanitaire (évaluation faite en 2015, Tableau 1) (3). A cela, il y a plusieurs raisons :

Tout d'abord, la répartition de la population et la géographie du pays rendent l'accès aux soins peu facile. Les zones rurales comportent de nombreuses régions montagneuses avec des routes en mauvais état, parfois inexistantes. La saison des pluies aggrave cette situation. D'autre part, les nombreuses langues vernaculaires rendent difficile la compréhension lors de l'accès aux soins. Enfin, la pauvreté qui touche une grande partie des populations rurales et urbaines, crée un obstacle supplémentaire (7).

Tableau 1 : Evaluation de la réalisation des MDGs liés à la santé de 1999 à 2015

MDG-1 :	Réduire l'extrême pauvreté et la malnutrition		
	Objectif-1 : la proportion de personnes vivant dans la pauvreté	Les données initiales en 1999	Objectifs fixés pour 2015
	<ul style="list-style-type: none"> Proportion de personnes vivant sous le seuil national de pauvreté 	48%	24%
	Objectif-2 : la proportion de personnes qui souffrent de malnutrition		
	<ul style="list-style-type: none"> Prévalence de sous poids chez les enfants < 5 ans Proportion de la population ayant une consommation d'énergie alimentaire inférieure au niveau minimal 	40%	20 %
		31%	16%
MDG-4	Réduire la mortalité infantile		
	Objectif-1 : réduire de deux tiers le taux de mortalité des moins de cinq ans	Les données initiales en 1999	Objectifs fixés pour 2015
	<ul style="list-style-type: none"> Taux de mortalité < 5 ans Taux de mortalité infantile Proportion des enfants d'un an vaccinés contre la rougeole 	170 décès pour 1 000 naissances vivantes 134 décès pour 1 000 naissances vivantes 62 % (1996)	55 décès pour 1 000 naissances vivantes 34 décès pour 1 000 naissances vivantes 90%
MDG-5	Améliorer la santé maternelle		
	Réduire de trois quarts le taux de mortalité maternelle	Les données initiales en 1999	Objectifs fixés pour 2015
	<ul style="list-style-type: none"> Taux de mortalité maternelle Prévalence d'utilisation de moyens contraceptifs Proportion de naissances assistées par le personnel de santé qualifié 	750 décès pour 1,000,000 naissances vivantes 13% 14% (1996)	185 décès pour 1,000,000 naissances vivantes 55% 80%
MDG-6	Lutter contre le VIH / SIDA, le paludisme et d'autres maladies		
	Faire arrêter la progression du VIH et commencer à l'inverser	Les données initiales en 1999	Objectifs fixés pour 2015
	<ul style="list-style-type: none"> Prévalence du VIH chez les travailleuses sexuelles âgées de 15-24 ans Proportion des femmes âgées de 15-24 ans qui n'ont jamais utilisé le préservatif pendant le rapport sexuel Proportion des femmes âgées de 15-24 ans qui connaissent la prévention des RTIs/STDs 	0.4% (2001) 0.9% (1999) 32.3% (2000)	<1% 20% 70%

	Faire arrêter la progression du paludisme, la tuberculose (TB) et des autres maladies	Les données initiales en 1999	Objectifs fixés pour 2015
	<ul style="list-style-type: none"> Taux de morbidité dû au paludisme Proportion de la population dans les zones à risque du paludisme utilise la prévention efficace et la mesure de traitement 	44 cas par an pour 1 000 cas	15 cas par an pour 1 000 cas
	<ul style="list-style-type: none"> Taux de prévalence associé avec la TB Proportion de cas TB détectés sous le DOTS (<i>directly observed treatment short course</i>) Proportion de cas TB guéris sous le DOTS 	24% (2000)	100%
		144 pour 100,000	50 pour 100,000
		24% (1996)	70%
		72% (1996)	85%
MDG-7	Réduire la proportion de personnes n'ayant pas accès à de l'eau potable	Les données initiales en 1999	Objectifs fixés pour 2015
	<ul style="list-style-type: none"> Proportion de la population avec l'accès durable à une source d'eau Proportion de la population urbaine avec un accès à une hygiène améliorée 	28%	80%
		11%	70%

Bien que la mortalité infantile ait baissé depuis 1995, elle reste plus élevée que dans les autres pays d'Asie du Sud-Est. Par ailleurs il existe une différence significative dans la mortalité des enfants de moins de cinq ans, en fonction des provinces, du niveau de richesse et d'éducation au Laos.

Chez les hommes, l'espérance de vie à la naissance est passée de 50 ans en 1995 à 62 ans en 2015, tandis que chez les femmes, elle est passée de 52 à 65 ans. Avec l'évolution actuelle des taux de mortalité des nourrissons et des moins de cinq ans, l'espérance de vie au Laos ne devrait pas atteindre 70 ans avant 2036 (8).

Les évaluations récentes du Ministère de la santé sur les progrès réalisés pour atteindre les indicateurs des MDGs liés à la santé, montrent que les indicateurs des MDG-1 et 5 sont toujours en retard. Cela signifie que des efforts supplémentaires seront nécessaires pour atteindre tous les objectifs des MDGs d'ici à 2020 (tableau 2) (7). Les objectifs attendus pour le secteur de la santé en 2020 sont les suivants :

Tableau 2 : Les objectifs des MDGs à atteindre de 2015 à 2020

Targets	2015	2020
Life expectancy (year)	68	73
Reduce proportion of underweight among under 5 years old (%)	22	15
Reduce proportion of stunted children among under 5 years old (%)	34	28
Reduce Infant mortality (per 1000 live births)	45	30
Reduce under 5 mortality (per 1000 live births)	70	45
Reduce maternal mortality (per 100,000 live births)	260	200
Reduce malaria related mortality ratio (per 100,000 population)	Less than 0.2	
Reduce TB mortality ratio (per 100,000 population)	240	
HIV prevalence among adult population (15-49)	Less than 1%	
Proportion of population that have access to clean water (%)	80	90
Proportion of population that have access to latrine (%)	60	80
National Health Insurance Coverage (%)	50	80
Number of village health worker per village		1

Les maladies infectieuses comme les infections respiratoires, les infections sexuellement transmissibles et les hépatites B/C ne sont pas prises en compte dans les objectifs des MDGs du pays, même si les taux d'incidence de ces maladies sont aussi importants.

Les infections des voies respiratoires sont l'une des raisons les plus fréquentes de la recherche de soins médicaux. Pourtant elles sont mal caractérisées avec seulement quelques données disponibles. Le 1^{er} système de surveillance d'influenza a été mis en place au Laos en 2007 en incluant 526 patients de tous les âges présentant des symptômes grippaux. Les *influenzavirus A/B* sont les virus les plus communément détectés (9).

Les infections sexuellement transmissibles (IST) bactériennes constituent un sérieux problème de santé publique du fait de leur grande fréquence, de leur transmissibilité, de leurs complications (neurosyphilis...), de leurs séquelles (infertilité...) et parce qu'elles sont aussi souvent associées à la transmission du VIH. L'infection à *Chlamydia* est l'IST bactérienne la plus fréquente. Selon une enquête de 2009 sur la prévalence des IST dans différents groupes de population, la prévalence de la chlamydia / gonorrhée est de 9% chez les « *Men have Sex with Men (MSM)* » à 22% chez les « *Female Sex Workers (FSW)* » (10). L'accès aux soins et la disponibilité de services d'IST de bonne qualité sont encore relativement limités au Laos, en particulier dans les zones rurales. Une étude menée au Laos, montre que les connaissances et les compétences relatives à la prise en charge des infections de l'appareil reproducteur (RTIs), y compris les IST, sont insuffisantes (11).

Les hépatites virales B et C représentent un problème de santé publique majeur du fait de la gravité potentielle de ces infections qui peuvent évoluer vers une cirrhose et/ou un carcinome hépatocellulaire, du nombre de personnes infectées et du coût engendré par leur prise en charge. Le Laos est un pays de haute endémicité pour l'hépatite B avec un taux de porteurs de l'Ag HBs estimé à 8,7% et un taux de séroprévalence des anticorps anti-VHC à 1,1% chez les donneurs de sang (12). Au Laos, la vaccination contre l'hépatite B est recommandée pour les personnes à risque élevé d'exposition et pour l'ensemble des nourrissons, avec un rattrapage chez les enfants et les adolescents de 11 à 15 ans révolus.

2. Le centre d'Infectiologie Lao-Christophe Mérieux (CILM)

Ce centre, dont j'assure la direction scientifique, est le centre de référence au Laos pour le diagnostic des infections à HIV, hépatites virales et tuberculose. Nous présenterons ici quelques points importants pour comprendre comment nous avons pu développer notre travail de recherche dans un contexte unique.

C'est la Fondation Mérieux, sur une idée de Christophe Mérieux en 2005, qui a pris en charge la construction du Centre d'Infectiologie Lao-Christophe Mérieux (CILM) à Vientiane pour le Ministère de la Santé de la RDP Lao. Il est opérationnel depuis 2009.



De par sa fonction et sa localisation géographique, il a été complètement intégré au campus de l'Université des Sciences de la Santé, et participe aussi à la formation des étudiants en médecine dans le domaine de la biologie médicale.

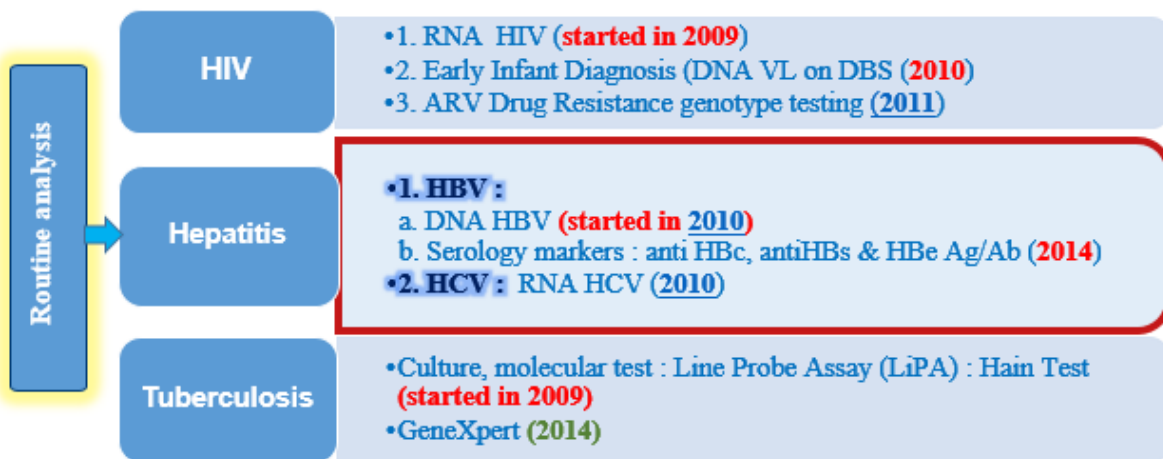
Il comprend un laboratoire (BSL-2+, en cours d'une accréditation ISO 15189 : 2012), une bibliothèque, une salle de conférence et des espaces de travail pour les étudiants.

Les axes de travaux prioritaires retenus sont (Fig. 4) le VIH, les hépatites, la tuberculose et le développement de la recherche appliquée par le biais des analyses de routine. Ce centre contribue donc à élargir les capacités d'analyses médicales du pays en introduisant des nouveaux tests, ce qui réduit l'envoi des examens d'analyses à l'étranger, en Thaïlande en particulier.



Crédit photos CILM

Figure 4 : Diagnostics de routine au CILM depuis 2009



CHAPITRES

CHAPITRE-I : EPIDEMIOLOGIE DE L'HEPATITE B

1. Introduction

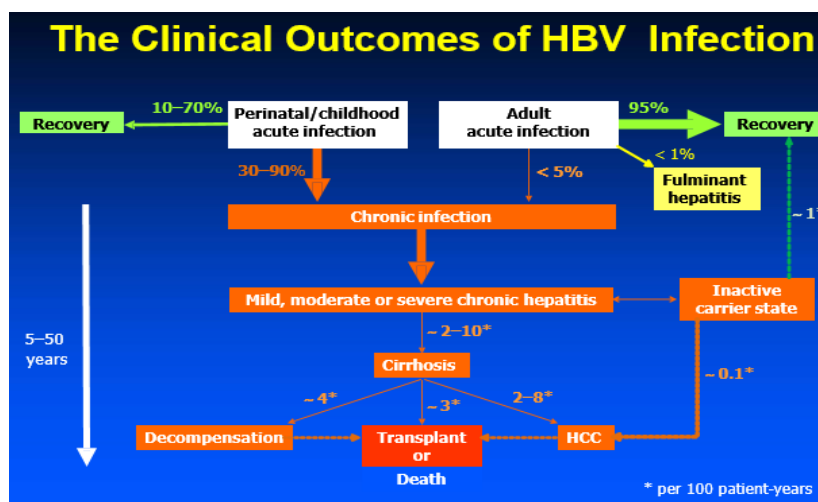
Le virus de l'hépatite B a été découvert en 1965 aux Etats Unis que Blumberg a trouvé un nouvel Antigène dans le sérum d'un patient Aborigène d'Australie, lorsqu'un antigène inconnu a été identifié comme étant associé à l'hépatite de type B. Plus tard, on l'a appelé antigène de surface de l'hépatite B (HbsAg). Cet antigène (antigène australien) a été trouvé chez des patients atteints d'hémophilie, de leucémie et d'hépatite (13). Il y a trois modes principaux de transmission de VHB. Dans les zones de forte endémicité, le VHB est transmis principalement de la mère infectée aux nouveau-nés de façon périnatale (14). Dans les zones à faible endémie, la transmission par voie sexuelle est prédominante. La troisième grande source d'infection est constituée par les injections à risque, les transfusions sanguines et la dialyse.

La probabilité pour qu'une infection par le VHB devienne chronique dépend de l'âge auquel elle est contractée: plus de 90% des nouveau-nés infectés à la naissance vont devenir porteurs chroniques du VHB, ainsi que 80 à 90% des nourrissons contaminés au cours de la première année de vie et 30 à 50% des enfants infectés entre un et quatre ans (15).

À l'âge adulte, l'infection conduit à une hépatite chronique dans moins de 5% des cas (<http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>).

L'hépatite B constitue un problème majeur de santé publique dans le monde en raison de son extension et parce que, aussi bien pour l'infection aiguë que chronique, elle conduit à un risque élevé de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire (CHC) (Fig. 5). Environ 90 à 95% des carcinomes hépatocellulaires apparaissent à la suite d'une infection persistante par le virus de l'hépatite B (VHB) ou par le virus de l'hépatite C (VHC). Le risque de développer un CHC est 25 à 35 fois plus élevé chez les patients ayant une infection chronique par le VHB et 130 fois plus élevé chez les patients ayant une co-infection chronique par le VHB et le VHC (16). Le CHC est le type de cancer du foie le plus courant, représentant environ 75 % de tous les cancers du foie. Son pronostic vital est très mauvais. Il serait responsable de plus d'un million de morts, ce qui le place au 2^{ème} rang dans les responsables de morts par cancers (17). Le risque de développer un CHC pourrait être significativement réduit par la prévention des hépatites B et C par le diagnostic et la prise en charge précoce des patients atteints d'hépatite chronique.

Figure 5 : Évolution clinique par l'infection du VHB (Adapté de : EASL Consensus Statement. *J. Hepatol.* 2003 ; 39 (S1) :S3-25)

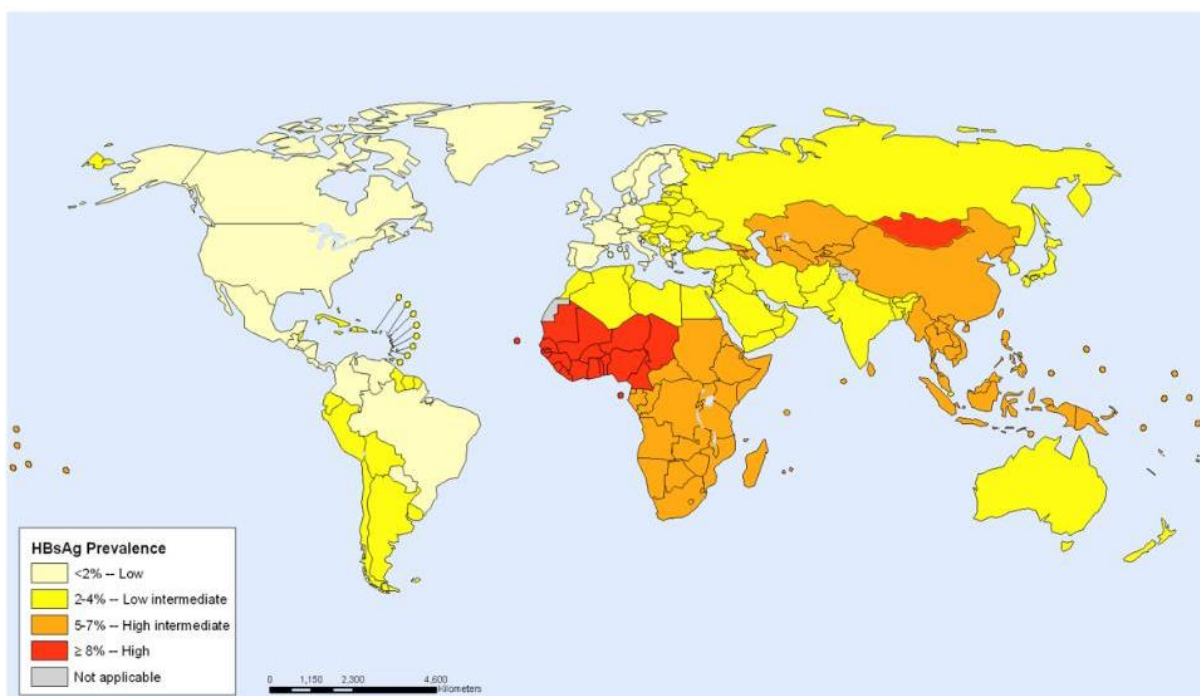


2. Au niveau mondial

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est l'infection virale chronique la plus répandue dans le monde, particulièrement en Asie et en Afrique (Fig. 6) (18). Environ 30% de la population mondiale présentent des évidences sérologiques d'infections récentes ou anciennes par le VHB (19). C'est dans le Pacifique occidental et en Afrique que la prévalence de l'hépatite B est la plus forte, avec plus de 6,1% de la population adulte infectée (20).

En Mongolie, la prévalence est encore plus élevée. Une étude épidémiologique dans la population générale en 2013 a révélé une prévalence de 15 % pour l'hépatite virale B et de 2,6 % pour l'hépatite virale C. L'incidence a augmenté en 2003 (21).

Figure 6 : Endémicité mondiale, prévalence de l'AgHBs estimée et catégorisée en 2005 [extrait de (18)]



Un vaccin contre le VHB est disponible depuis 1982. Ce vaccin est efficace à 95% dans la prévention de l'infection et du développement d'une hépatite chronique et d'un cancer du foie dû à l'hépatite B. Malgré cela, les nouvelles données (avril 2017) de l'OMS faisaient état de 325 millions de personnes vivant dans le monde avec une infection chronique par le virus de l'hépatite B. Le rapport mondial de l'OMS sur l'hépatite en 2017 montre que dans leur grande majorité, ces gens n'ont pas accès aux dépistages et aux traitements. Par conséquent, des millions de personnes sont confrontées au risque d'évolution lente vers une maladie chronique du foie, le cancer et la mort (environ 1,34 million de décès en 2015) (22). C'est un chiffre comparable aux décès dus à la tuberculose et au VIH, mais, alors que la mortalité imputable à la tuberculose et au VIH est en baisse,

celle due à l'hépatite augmente. L'infection par le VHB se classe parmi les dix premières causes infectieuses de décès à l'échelle mondiale.

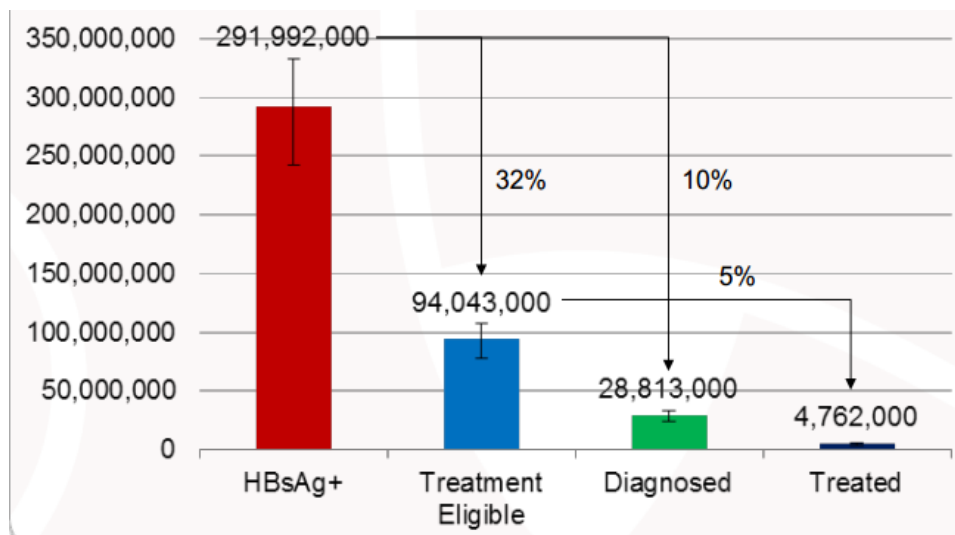
En 2016, l'Assemblée mondiale de la Santé a adopté dans la Déclaration mondiale sur la santé, un texte, qui vise à éliminer le VHB et le VHC d'ici 2030 (23). Les objectifs sont les suivants :

- Couverture mondiale de vaccination pour 90% des nourrissons à trois doses d'ici 2020
- Vaccination de 50 % des nourrissons à la naissance d'ici 2020, et de 90 % d'ici 2030
- Prévalence chez les enfants de 5 ans de 1% seulement d'ici 2020, et de 0 à 1 % d'ici 2030.
- Diagnostic pour 90% des personnes infectées par le VHB
- Accès aux traitements antiviraux pour 80% des personnes infectées.

Environ 94 millions de personnes (32% de la population infectée) étaient éligibles au traitement en 2016, parmi lesquelles seulement 4,8 millions ont reçu un traitement antiviral (Fig. 7) (24).

90 % des patients infectés par le VHB ne sont toujours pas diagnostiqués et 95 % des patients admissibles au traitement ne sont toujours pas traités.

Figure 7 : Cascade mondiale de soins pour l'infection de VHB, 2016 [extrait de (24)]



Sur la prévention, selon les données de l'OMS sur la vaccination, une victoire précoce dans la réponse mondiale a été obtenue grâce aux grandes campagnes de vaccination contre l'hépatite B. Cependant, la couverture de la dose initiale de vaccination à la naissance est toujours faible (25). L'endémicité de l'hépatite B est illustrée par la prévalence de l'Ag HBs dans la population générale d'une zone géographique donnée. Elle montre des variations considérables dans le monde avec une séroprévalence de l'Ag HBs $\geq 8\%$ dans les zones de forte endémie ou dans les pays en voie de développement (Afrique, Chine, Asie du Sud-Est) dans lesquels vivent 45% des individus infectés par le VHB (19). D'après la Figure 7, la Chine et l'Asie du Sud Est en 2005 étaient dans la zone 5 à 7%.

Dans les zones d'endémie intermédiaire, la prévalence varie de 2 à 7% (Asie centrale et du Sud-Ouest, Europe de l'Est et du Sud, Russie et Amérique centrale et du Sud). 43% des individus infectés par le VHB vivent dans ces zones.

Enfin, 12% des individus infectés par le VHB vivent dans les zones de faible endémie, la prévalence y est < 2% (Europe de l'Ouest, Amérique du Nord et Japon). Dans ces régions, la plupart des infections surviennent chez les adolescents et les adultes par voie sexuelle ou parentérale (26).

La mise en œuvre de la vaccination universelle contre le VHB chez les nourrissons a montré une forte diminution de la prévalence dans de nombreuses régions du monde. Cependant, la couverture vaccinale est très variable d'une région à une autre, ce qui fait que la prévalence globale de l'infection par le VHB présente beaucoup de disparités (fig-6). Depuis 1982, dans les pays, où il y a une forte prévalence (8 à 15%), les enfants étaient souvent des porteurs chroniques. La vaccination a permis de ramener le taux d'infection chronique à moins de 1% parmi les enfants vaccinés (20).

À la suite de l'instauration de la vaccination universelle des nouveau-nés, certains pays à forte endémie, comme la Chine, présentent maintenant une prévalence globale de 7 à 8% seulement et devraient être dans la catégorie de prévalence intermédiaire dans un proche avenir.

3. En Asie du Sud-Est

L'Asie du Sud-Est a connu une forte réduction de la prévalence de l'AgHBs entre 1990 et 2005, en particulier dans les groupes de 0-14 ans qui avaient des niveaux de prévalence de 1,2 à 1,4% en 2005. En revanche, la prévalence de l'AgHBs chez les adultes de cette région semble avoir augmenté de 5 % à plus de 6 % chez les adultes d'âge intermédiaire en 2005. L'augmentation de la prévalence avec l'âge était très prononcée en 1990 et plutôt exceptionnelle par rapport aux autres régions. Egalement il y a eu une réduction de la prévalence de l'AgHBs entre 1990 et 2005 dans les pays d'Asie et du Pacifique, y compris le Japon, la République de Corée et Singapour. Les groupes d'âge moyens (25-54 ans) étaient les plus touchés, mais dans l'ensemble, l'endémicité est restée à un niveau intermédiaire d'environ 4% en 2005. Il est intéressant de noter qu'en 1990, les groupes des plus de 75 ans affichaient la plus forte prévalence parmi tous les groupes d'âge (18).

La Thaïlande a une prévalence intermédiaire élevée de l'hépatite B (5 à 7 %). Environ 8 à 20 % de la population sont actuellement porteurs du VHB, dont 70 à 90 % a moins de 40 ans (27, 28).

Au Cambodge, plusieurs enquêtes ont montré que la prévalence de l'hépatite B variait entre 4,6 et 10,8% (29, 30). Mais la prévalence diminue chez les enfants de 5 ans. Une enquête a établi que la prévalence était de 3,5% (2,4-4,8%) en 2006 et se situait entre 0,33 et 3,45% en 2012 en raison de la campagne de vaccination nationale contre l'hépatite B (31, 32).

Au Vietnam, dans la population générale, la prévalence de l'infection chronique par le VHB se situe entre 8 % et 25 % suivant les groupes considérés, et l'infection à VHB entraîne 50 % d'hépatites aiguës (33).

En Birmanie, en 2015 une enquête à l'échelle nationale auprès de 5 547 personnes âgées de 15 à 80 ans a montré que 6% sont infectées par l'hépatite B, 3% par l'hépatite C et 0,04 % par les deux (34).

4. Au Laos

La première étude sur la prévalence de l'hépatite a été menée de 2003 à 2005 sur une population composée de 13 897 nouveaux donneurs de sang de la capitale de Vientiane et alentours. Les résultats ont révélé que 8,7% des participants à l'étude étaient positifs pour l'AgHBs. La prévalence chez les hommes (9,7 %) était plus élevée que chez les femmes (6,2 %) et les taux de AgHBs positifs pour les années 2003, 2004, 2005 et 2006 étaient respectivement de 8,6 %, 8,7 %, 8,9 % et 9,6%. L'AgHBs était moins fréquent dans les groupes plus âgés, avec une prévalence maximale de 11,6 % chez les 20-29 ans. Dans l'ensemble, les hommes (48,7 %) étaient plus souvent infectés que les femmes (38,9 %) (35, 36).

La diversité génétique du VHB permet aujourd'hui de distinguer 10 génotypes (classés de A à J) et environ 38 sous-génotypes. Les génotypes B et C sont largement répandus dans le continent asiatique. Au Laos, une enquête réalisée chez les donneurs de sang dans différentes provinces du pays a montré que 163 souches de VHB (42,2%) appartenaient au génotype B et 204 (55,4%) au génotype C et 23 au génotype I (36).

Pour prévenir l'infection à VHB, le Ministère de la santé du Laos a introduit la vaccination combinée DTC-hépatite B dans le Programme élargi de vaccination (PEV) en 2002, et a mis en place en 2004 la vaccination contre l'hépatite B à la naissance et à l'âge de 6, 10 et 14 semaines. Mais les immunoglobulines spécifiques anti-HBs ne sont pas disponibles au Laos. Toutefois, des études ont montré que dans plusieurs régions du Laos, la 1^e dose à la naissance n'est pas administrée à tous les nouveau-nés. Par exemple, dans 37 établissements de santé interrogés dans cinq provinces, la couverture vaccinale à la naissance contre l'hépatite B (HepB-BD) était de 74 % (intervalle interquartile (IQR) : 39 %-97 %) (37). De plus, seulement 66 % des enfants âgés de 9 à 16 mois présentaient des taux d'anticorps anti-HBs suffisants lors d'une étude menée dans deux cliniques de vaccination situées dans des zones urbaines : l'hôpital provincial de Luang Prabang et l'hôpital central mère-enfant de Vientiane (38).

Le Laos est donc toujours considéré comme faisant partie des pays de haute endémicité pour l'hépatite B. Le manque de procédures efficaces pour prévenir la transmission périnatale et les contaminations transfusionnelles contribue à maintenir un taux d'infection élevé dans la population. Face à la grande diversité génétique des souches de VHB en circulation, les moyens de diagnostic et de traitement restent très déficients.

ETUDE-1 : ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE, RETROSPECTIVE DE LA SURVEILLANCE DE L'HEPATITE B AU LAOS

Paboriboune P. et al. A seven-year retrospective study on the surveillance of hepatitis B in Laos.

International Journal of Hepatology

Volume 2018, Article ID 9462475, <https://doi.org/10.1155/2018/9462475>.

1. Contexte et objectifs

Au Laos, l'incidence du cancer du foie (qui découle principalement d'infections dues au VHB) est l'une des plus élevées au monde (39). Les patients atteints de CHC ont un très mauvais pronostic. Par conséquent, la détection précoce, la surveillance régulière et le traitement approprié des patients infectés par le VHB sont essentiels pour limiter le fardeau du CHC (40).

Il n'existe pas encore de guide national pour la prise en charge des hépatites chroniques B et C, mais nous y travaillons avec un groupe d'agent de santé que je dirige. L'orientation des patients n'est pas encore bien définie entre les spécialités concernées. La prise en charge est compliquée par la méconnaissance du corps médical des schémas thérapeutiques, le coût et la disponibilité variable des traitements et le suivi aléatoire des patients. Quand ils le peuvent, les patients laotiens se déplacent en Thaïlande, en Chine ou au Vietnam pour se faire soigner, ce qui nuit au suivi du traitement.

Dans les guidelines de pratiques cliniques actuelles, le taux sérique d'ADN du VHB est utilisé comme critère pour déterminer le traitement antiviral chez les patients atteints d'hépatite B et C chronique. Grâce à ces techniques, qui ont été mises en place au CILM, la prise en charge thérapeutique d'une hépatite chronique est faite précocement.

Comme ces techniques sont opérationnelles depuis 7 ans, nous avons décidé d'étudier les caractéristiques biologiques des patients qui se sont présentés au CILM sur cette période afin de faire un état des lieux, partiel mais unique par son ampleur et sa durée, au Laos.

2. Matériels et Méthodes

Il s'agit d'une étude d'épidémiologie rétrospective réalisée sur une cohorte de patients diagnostiqués positifs à l'AgHbs dans des hôpitaux ou des cliniques privées, et qui ont été envoyés au CILM pour mesurer la charge virale de janvier 2010 à novembre 2016. Les données (âge, sexe, histoire du traitement, emplacement de la structure de soins, bilan hépatique, résultats de la CV) ont été enregistrées dans une base de données créée avec le logiciel Filemaker Pro Version 11. Au moment de l'étude, nous avons exporté les données sur Excel pour vérifier les erreurs, puis nous avons analysé les données avec le logiciel Minitab, version 17.3.1.

3. Principaux résultats

Pendant ces sept années, le CILM a reçu 5 801 échantillons provenant de 3 857 patients. 91% des sujets venaient de Vientiane, le reste venait des provinces aussi bien du nord que du sud.

Le sex-ratio H/F est de 1,77 avec un âge médian de 37 ans. Les patients de moins de 37 ans présentent une CV plus élevée que les plus de 37 ans. De même, les hommes ont une CV plus élevée que les femmes. La CV initiale varie de <50 UI/mL à 2,5 1013 UI/mL. La médiane de l'aminotransférase est de 45,5 U/L pour l'ALAT

et de 44 U/L pour l'ASAT, l'étendue de <8 à >2 000 U/L. On observe chez les hommes un taux d'aminotransférase plus élevé que celui des femmes. Globalement, 20 % des patients ont reçu un traitement (principalement des immunostimulants et des inhibiteurs de la transcriptase inverse) ; 11 % présentent une CV et un taux d'enzymes hépatiques élevés, mais seulement 2 % d'entre eux sont traités.

4. Discussion et conclusion

Les résultats obtenus avec notre cohorte montrent une augmentation du nombre de patients infectés par le VHB chaque année. Cette augmentation de la détection du nombre de nouvelles infections pourrait être la conséquence d'une amélioration des conditions financières de la population (le PIB par habitant au Laos a augmenté de 50% entre 2009 et 2016), et donc d'un accès aux soins de santé accru.

Les résultats de notre enquête sont toutefois alarmants : 60 % des patients présentent une DNA-VHB très élevée avec des facteurs aggravants : un ALAT/ASAT élevé, et un nombre de traitements très bas. Le risque d'une augmentation du nombre de cas de CHC dans un proche avenir est donc important.

Comme le coût du suivi biologique et les traitements sont à la charge des patients (la majorité d'entre eux ne bénéficiant pas d'assurance-maladie), il faudrait instaurer une politique d'assurance sociale permettant la prise en charge du plus grand nombre et en particulier les plus démunis.

En outre, la gestion biologique et thérapeutique des patients doit devenir systématique, avec une meilleure coordination entre le personnel médical et celui des laboratoires. Enfin il faut mettre l'accent sur la mise en place de campagnes nationales de vaccination à grande échelle, lesquelles se sont révélées très efficaces avec de nombreux exemples en Asie.

Article 1: « A Seven-Year Retrospective Study on the Surveillance of Hepatitis B in Laos »



L'article est présenté ci-dessous *in extenso* dans sa forme originale.

L'article est disponible en libre accès à l'adresse internet suivante :

<https://doi.org/10.1155/2018/9462475>

Research Article

A Seven-Year Retrospective Study on the Surveillance of Hepatitis B in Laos

Phimpha Paboriboune ¹, Thomas Vial,² François Chassagne,²
Philavanh Sitbounlang,¹ Sengaloun Soundala,¹ Stéphane Bertani,²
Davone Sengmanothong,¹ Francois-Xavier Babin,³ Nicolas Steenkeste,³
Paul Dény,^{4,5} Pascal Pineau ⁶ and Eric Deharo²

¹Centre d'Infectiologie Lao-Christophe Mérieux, Vientiane, Laos

²IRD, UPS, UMR 152 PHARMADEV, Université de Toulouse, Toulouse, France

³Fondation Mérieux, Lyon, France

⁴Hôpitaux Universitaires Paris Seine Saint Denis, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁵INSERM U1052, CNRS UMR 5286, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France

⁶Institut Pasteur, Organisation Nucléaire et Oncogénèse, Paris, France

Correspondence should be addressed to Phimpha Paboriboune; phimpha@ccm-laos.org

Received 3 October 2017; Revised 1 February 2018; Accepted 18 February 2018; Published 1 April 2018

Academic Editor: Piero Luigi Almasio

Copyright © 2018 Phimpha Paboriboune 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.

Objective. Lao PDR is one of the most highly endemic countries for hepatitis B in Asia and the second country for liver cancer incidence. Therefore, the follow-up of infected individuals through predictive serological markers is of utmost importance to monitor the progression of the pathology and take the decision on treatment. **Methods.** A retrospective-descriptive cohort study was conducted on 3,857 HBV-infected patients. Information about infection status (viral load, VL), liver function (aminotransferases), and treatments was recorded. **Results.** M/F sex ratio was 1.77 for a median age of 37. Patients under 37 displayed higher VL than older ones and men had higher VL than women. Initial VL ranged from <50 IU/mL to $2.5 \cdot 10^{13}$ IU/mL. Median aminotransferase values were 45.5 U/L for ALAT and 44 U/L for ASAT, ranging from <8 to >2,000 U/L. Men had higher aminotransferase than women. Globally 20% of patients received treatment (mainly immunostimulant and reverse-transcriptase inhibitors); 11% had high levels of VL and liver enzymes, but only 2% of them were treated. **Conclusion.** Public health decisions should be taken urgently to rationalise vaccination and provide fair access to early diagnosis and treatment; otherwise the burden of HBV-associated diseases will be overwhelming for Laos in the near future.

1. Background

Hepatitis B (HBV) is a viral infection encountered all around the world, especially in Southeast Asia where the prevalence of persistent HBV infection is particularly high [1]. Despite efforts made to decrease the level of endemicity in the population through vaccination campaigns [2], HBV infection rates are still elevated in Laos [3]. This situation raises concerns, as chronic HBV infection leads to severe hepatic complications, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). According to the Asia-Pacific HCC Trials Group, over two-thirds of people dying annually of HCC are from Asia [4];

and according to GLOBOCAN, Laos has one of the most elevated rates of liver cancer worldwide, after Mongolia which ranks first [5]. Clinically, HCC patients have a very poor prognosis with an appalling 5-year mortality rate due to HCC [6]. Consequently, early detection, serial monitoring, and appropriate treatment of HBV-infected patients are keys in order to control the burden of HCC.

With the objective of estimating the efficacy of HBV surveillance in Laos, we undertook a survey at Centre d'Infectiologie Lao-Christophe Mérieux (CILM) in the Lao PDR capital Vientiane. Under the auspices of the Ministry of Health, CILM is devoted to the surveillance of infectious



FIGURE 1: Number of patients followed (orange line) and number of samplings received and performed at CILM (blue line) from January 2010 to November 2016.

diseases among the Lao population, notably viral hepatitis, human immunodeficiency virus (HIV), and tuberculosis.

In the present study, we examined the course of HBV infection in 3,857 patients attending CILM between January 2010 and November 2016, who were previously found to be positive for the surface antigen of HBV (HBsAg). Several parameters, such as the gender, age, geographic place of living, treatment allocation, HBV DNA viral load (VL), and liver damage (as measured by aspartate (ASAT) and alanine (ALAT) aminotransferases serum levels) were analyzed.

The results presented herein are intended to help policy makers and stakeholders to apply cost-effective preventive and treatment measures against HBV and its severe health consequences in Lao PDR.

2. Methods

2.1. Data Collection. The present study was conducted retrospectively within a cohort assembled with the data of HBV-infected Lao patients attending CILM between January 2010 and November 2016.

All individuals were previously diagnosed as HBsAg-positive in local health care facilities and advised to go for HBV VL monitoring at CILM. It must be pointed out that HBeAg was not tested among these patients because this kind of test is not available in the health centres in Laos.

Sociodemographic data, health care structure location, date of HBV diagnosis, treatment history, aminotransferase (ASAT/ALAT), and viral load were registered into a database set up with Filemaker Pro Version 11. All data were exported to Microsoft Excel software version 14.4.7 to check any incongruity.

2.2. Statistics. Data were analyzed with Minitab software version 17.3.1. Comparisons between groups (numerical data) or proportions (categorical data) were performed using Student's *t*-test, Chi-squared test, ANOVA, or nonparametric test, as appropriate. A two-sided *p* value lower than 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Cohort. The laboratory received a total of 5,801 blood samples, from 3,857 patients between January 2010 and November 2016 (Figure 1). The age of patients ranged from 1 to 85 years, and median ages were 37 and 36 years for men and women, respectively (Figure 2). The cohort displayed a M/F ratio of 1.77.

About 70% of the individuals included in the survey came from public health care centres and 30% of them from the private health system. A vast majority (91%) of individuals were from Vientiane capital and only 9% of them came from provincial health care centres.

The number of follow-up blood samples varied from one to seventeen per patient, with interval between sampling ranging from one day to several months.

3.2. Laboratory Tests

3.2.1. HBV DNA Quantification. All 3,857 patients had at least one VL measurement, 23.3% ($n = 898$) had two measurements, 11.3% ($n = 436$) had three, 6% ($n = 230$) had four, 3.6% ($n = 139$) had five, and 2.3% ($n = 88$) had six or more assays. The mean duration to second determination of the VL was one year.

VL determination at the first follow-up sampling ranged from less than 50 to 2.5×10^{13} IU/mL. Individuals were stratified in three different classes, according to their VL at first follow-up sampling:

(i) The HBV DNA Undetectable (UD) class had 672 patients (17%) for whom the VL was <50 IU/mL. M/F ratio for this class was 1.22, and 47% of the patients were under age 37. A large majority of them, that is, 83% ($n = 562$), were untreated. Thirteen percent of the individuals of this class ($n = 90$) had a second follow-up sampling, which had a median VL value of 14,270 IU/mL.

(ii) The HBV DNA Detectable and Quantifiable (DQ) class, with a VL ranging between 50 and 10^7 IU/mL, represented the majority of the patients with 58% ($n = 2,229$) (Figures 3 and 4). The median value for this class was 42,234 IU/mL. M/F ratio for this class was 1.77, and 48% of the

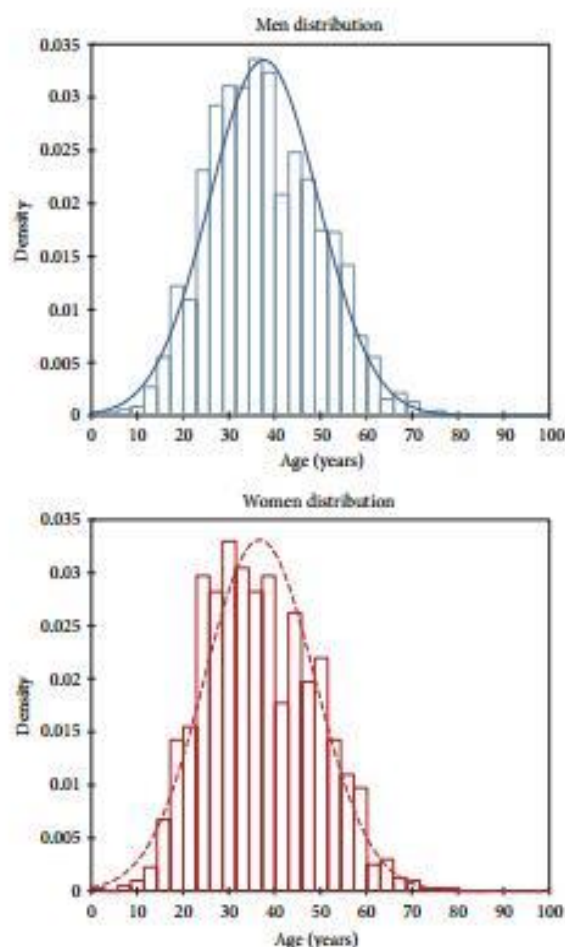


FIGURE 2: Age-based distribution of patients followed at CILM according to their gender (blue: male; red: female).

patients were under the age of 37. As observed for UD class, a very large majority of them, that is, 84% ($n = 1,872$), remained untreated. Twenty-four percent of this class ($n = 551$) had had a second follow-up sample, which had a median VL value of 40,035 IU/mL.

(iii) The HBV DNA Nonprecisely Quantifiable (NQ) class consisted of the patients for whom the VL was above 10^7 . The NQ class represented 25% of the initial cohort of patients ($n = 956$). There were significantly more men than women in this class ($p < 0.0001$, 69% for men versus 39% for female). Sixty-nine percent of the NQ individuals ($n = 659$) were under age 37. Despite the extremely high VL, only 24% ($n = 228$) of them received treatment. Thirty percent ($n = 286$) had a second follow-up sample: 5.2% had an undetectable VL and 94.8% had a VL ranging from 18,000 to 40,000 IU/mL. NQ patients were significantly younger than those from UD and DQ classes ($p < 0.0001$), whereas there was no statistical difference based on age between UD and DQ individuals ($p = 0.079$).

3.2.2. Aminotransferase Levels. For aminotransferase, 40 U/L was considered as the upper limit of laboratory reference

(ULN) [7]. ALAT values ranged from 5 to 3,071 U/L, with a median value of 45.5 U/L. ASAT values ranged from 8 to 2,057 U/L, with a median value of 44 U/L (Figures 4 and 5). Overall, median aminotransferase values were significantly higher in men than in women ($p < 0.0001$, ALAT for men, 812 U/L, versus ALAT for female, 457 U/L).

Patients were age-stratified in 10-year subsets, and aminotransferase levels were compared accordingly. ALAT and ASAT at first follow-up sampling were independent of age ($p > 0.05$). We then stratified aminotransferase values according to VL classes, as both VL and aminotransferases were monitored in 1,269 patients.

(i) In the UD class, 185 patients (out of 193) had a single aminotransferase determination. Both ALAT and ASAT median values were 42 IU/mL, with ranges from 7 to 1,025 U/L for ALAT and 7 to 1,855 U/L for ASAT. Eight patients had a second follow-up aminotransferase determination, with median values of 46 and 49.5 U/L for ALAT and ASAT, respectively. Both ALAT and ASAT aminotransferases had a lowest value around 30 U/L and highest one around 100 U/L.

(ii) In the DQ class, 744 patients benefited from aminotransferase determination. The median values were 42 U/L

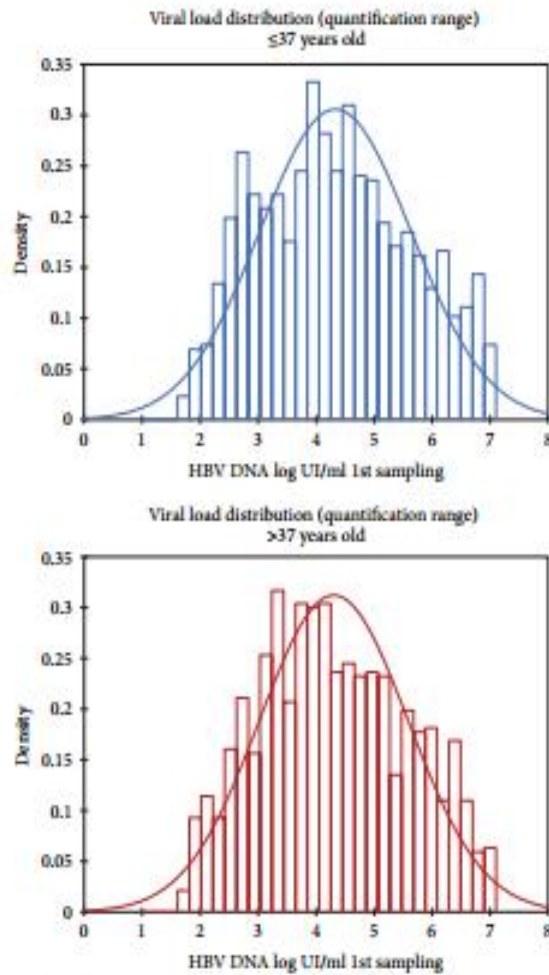


FIGURE 3: Distribution of the viral load at first sampling, according to age, in people from the "Detectable and Quantifiable" category.

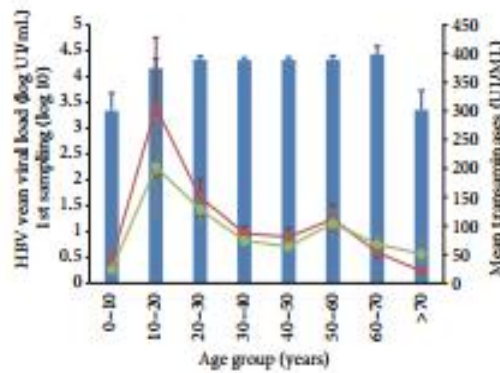


FIGURE 4: Mean viral load (blue bars) and aminotransferases (ALAT in red, ASAT in green) according to groups of age (ten years) at first sampling in the DQ category (only patients with VL and aminotransferases, excluding patients without aminotransferases).

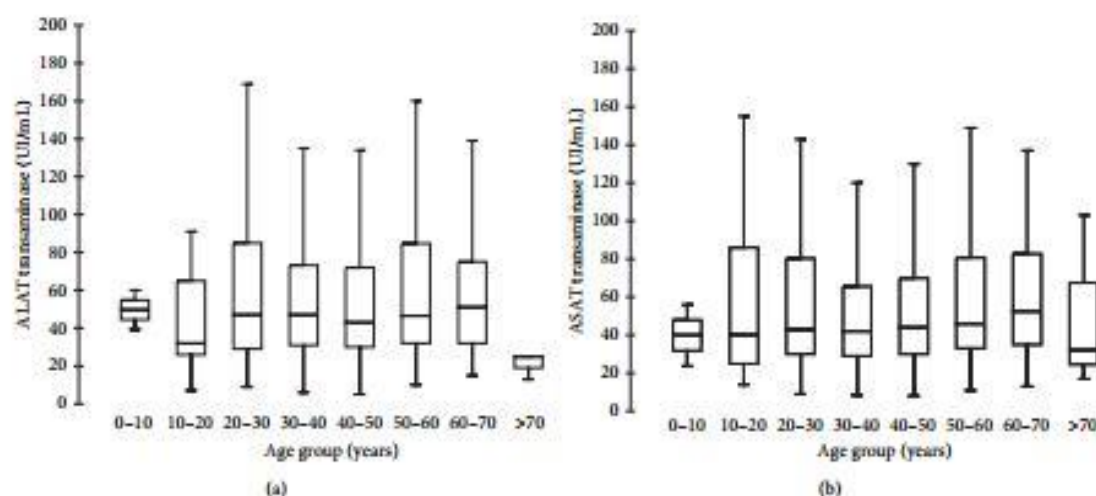


FIGURE 5: ASAT (a) and ALAT (b) concentrations according to 10-year classes of age of patients.

for ALAT and 40 U/L for ASAT, with lowest values around 7 U/L and highest ones over 2,000 U/L for both aminotransferases. 70 patients had a second follow-up aminotransferase determination, with median values of 57.7 and 51.25 U/L for ALAT and ASAT, respectively. Both ALAT and ASAT aminotransferases had a lowest value around 7 U/L and a highest one around 200 U/L.

(iii) In the NQ class, 340 NQ patients benefited from aminotransferase determination. The median values were 54 U/L for ALAT and 53.5 U/L for ASAT, with lowest values around 10 U/L and highest ones over 1,000 IU/mL for both aminotransferases. Forty-four patients had a second follow-up ALAT determination (median value: 42 U/L) and 43 patients had a second follow-up ASAT determination (median value: 38 U/L). The lowest values were around 6 U/L for both ASAT and ALAT and highest ones 296 and 170 U/L, respectively. NQ patients were younger and displayed higher ALAT and ASAT levels than UD and DQ patients ($p < 0.0001$). While considering aminotransferases levels above 40 U/L as abnormal, there were significantly more men with elevated aminotransferase level over 40 U/L than women ($p < 0.0001$). On the contrary, there were more women than men in the patient population with aminotransferases level lower than 40 U/L ($p < 0.0001$). Furthermore, there was no difference in terms of VL between patients displaying aminotransferases levels lower and higher than the 40 U/L threshold level ($p = 0.052$).

3.3. Treatments. Physicians followed and adapted the recommendations of the American Association for the Study of Liver Diseases [8]. In absence of a national health insurance system, treatments prescribed were thus reflective of the availability of drugs in Laos, as well as the capacity of the patients to pay for them.

3.3.1. Evolution of Therapeutic Schemes. The evolution of antiviral drug prescription in Laos between 2010 and 2016 is

detailed in Figure 6. Overall, only 18% (693 out of 3857) of the patient population received therapy. The most prescribed compounds, regardless of therapeutic schemes, were respectively Cycloferon (33.3%), Adefovir (26.9%), and Tenofovir (14.6%) (Figure 7). Monotherapy was prescribed in 75% ($n = 520$) of the cases treated, dual therapy in 18% ($n = 127$), and triple therapy in 7% ($n = 46$). The ranking of medicines used is presented in Figure 8 for monotherapies and in Tables 1 and 2 for combination therapies. The combination of Cycloferon with Adefovir was administered to almost 44% of patients receiving dual therapy, whereas Cycloferon and Lamivudine were used in 33% of the cases, and use of the other combinations ranged from 0.8% to 7.1%. Triple therapies relied essentially on the combination of Cycloferon, Lamivudine, and Adefovir (63%).

3.3.2. Age, Gender, Origin, and Treatments. The median age of treated patients was 39 years ([IQR]: 30.6–47.8 years). Patients above median age were significantly more often treated than those under median ($p < 0.0001$). There was no difference between patients above or below the median age regarding compounds and therapeutic regimen employed. Treatments (globally) were independent of gender ($p = 0.07$), but treated men received more multitherapies than treated women ($p = 0.02$). There was no difference between therapeutic schemes according to the geographic origin of patients.

3.3.3. VL and Treatment. There was a positive correlation between VL and number of administered medications ($p = 0.0001$). Combination therapies tended to be more often used as the VL increased.

84% (583/693) of treated patients had first detectable VL whereas a small subset of patients (16% of treated patients, $n = 110/693$) was treated despite the absence of detectable VL at first quantification.

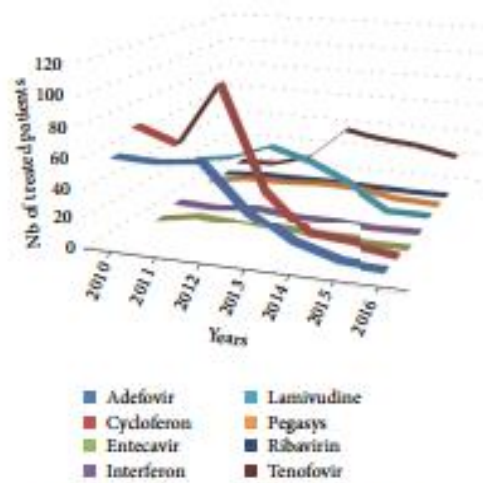


FIGURE 6: Evolution of the number of patients treated and medicines administered to patients received at CILM between January 2010 and November 2016.

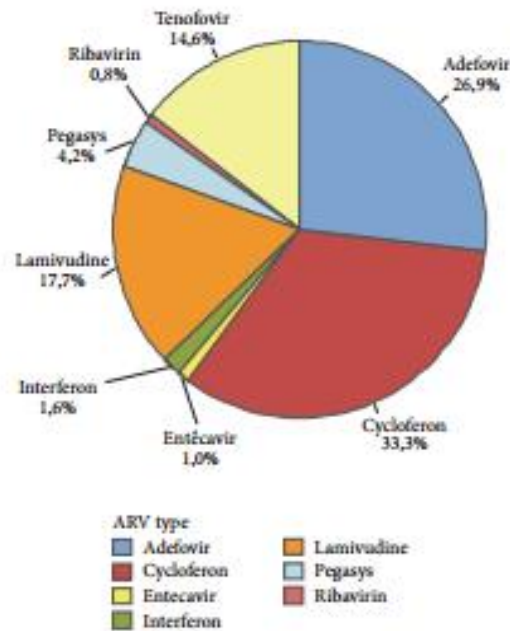


FIGURE 7: Distribution of drugs (%) used in all therapeutic schemes (single, dual, and triple).

In only 11.7% (81/693) of patients was the last VL undetectable; 65% of them were treated by monotherapy, 24% treated by dual therapy, and 11% treated by triple therapy.

3.3.4. Aminotransferases and Treatments. Among patients receiving antiviral treatments, only 12% ($n = 83/693$) were reported to have a second follow-up determination of ALAT and 10.5% (73/693) for ASAT.

In these patients, mean values for ALAT and ASAT at initial sampling were significantly higher than those observed

at the last follow-up sampling (86.6 versus 46.7 U/L, $p = 0.01$; 78.8 versus 45.3 U/L, $p = 0.01$, resp.).

4. Discussion

4.1. Cohort. Between January 2010 and November 2016, nearly 4,000 patients diagnosed in Lao public or private health care facilities came to CILM for HBV diagnosis confirmation and follow-up. In this cohort, patients came mainly from the Vientiane capital public health care system. This is certainly due to the central position of CILM in the capital,

TABLE 1: Type of drugs, number, and % on total and dual treatments.

Dual therapies	Nb	% of total treatment (n = 693)	% of dual therapy (n = 127)
Cycloferon + Adefovir	55	7.9%	43.3%
Cycloferon + Lamivudine	42	6.1%	33.0%
Adefovir + Lamivudine	9	1.3%	7.1%
Cycloferon + Tenofovir	5	0.7%	4.0%
Tenofovir + Adefovir	4	0.6%	3.2%
Tenofovir + Lamivudine	4	0.6%	3.2%
Pegasys + Tenofovir	3	0.4%	2.4%
Pegasys + Adefovir	2	0.3%	1.6%
Entecavir + Tenofovir	1	0.1%	0.8%
Interferon + Cycloferon	1	0.1%	0.8%
Entecavir + Pegasys	1	0.1%	0.8%
<i>Total</i>	<i>126</i>	<i>18.2%</i>	

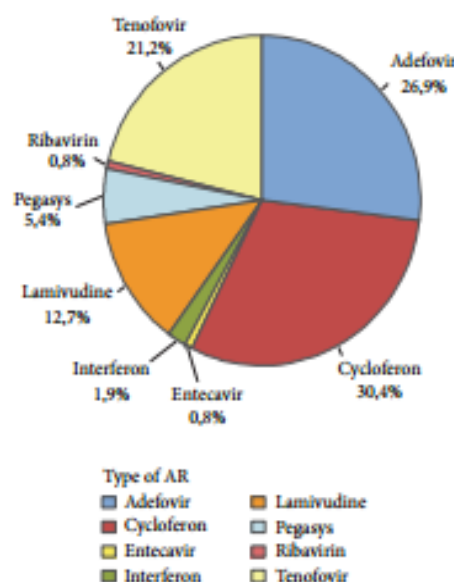


FIGURE 8: Distribution of drugs (%) used in monotherapy.

and also because public sector health care is less expensive than the private sector in Lao PDR. It is very unlikely that this figure reflects the prevalence of the disease, as large-scale HBV screening and treatment programs are almost nonexistent in Lao PDR. Patients come to diagnostic centres on their own discretion. The situation described in the present study is undoubtedly the tip of the iceberg: the true number of infected people in Lao PDR is probably much higher, but there is no previous study to confirm this hypothesis.

The cost of the serological diagnosis and quantification of HBV and some associated biomarkers have to be supported

by people themselves, as most Lao patients do not benefit from health care insurance. This cost is around 67 US\$, which represents a substantial expenditure for most people in the country. Considering that the GDP per capita in Laos was 1,500 US\$ in 2016, the cost of such serological analysis constitutes almost 4% of the annual earnings for most Lao workers. Nevertheless, the number of patients attending CILM increased continually from around 200 patients in 2010 to more than 500 in 2016, with a peak of almost 800 patients in 2015 (Figure 1). This increase may reflect a dramatic increase of the number of new infections, as well as increased economic status, so people are more able to spend money

TABLE 2: Type of drugs, number, and % on total and triple treatments.

Triple therapies	Nb	% of total treatment	% of triple therapy
Cycloferon + Lamivudine + Adefovir	29	4.2%	63.0%
Cycloferon + Lamivudine + Pegasys	3	0.4%	6.5%
Adefovir + Lamivudine + Tenofovir	2	0.3%	4.3%
Adefovir + Tenofovir + Cycloferon	2	0.3%	4.3%
Lamivudine + Cycloferon + Ribavirin	2	0.3%	4.3%
Adefovir + Cycloferon + Entecavir	1	0.1%	2.2%
Adefovir + Cycloferon + Interferon	1	0.1%	2.2%
Adefovir + Cycloferon + Pegasys	1	0.1%	2.2%
Cycloferon + Interferon + Entecavir	1	0.1%	2.2%
Cycloferon + Lamivudine + Entecavir	1	0.1%	2.2%
Cycloferon + Lamivudine + Tenofovir	1	0.1%	2.2%
Interferon + Cycloferon + Lamivudine	1	0.1%	2.2%
Pegasys + Ribavirin + Tenofovir	1	0.1%	2.2%
<i>Total</i>	<i>46</i>	<i>6.6%</i>	

on health care. This hypothesis is supported by the fact that the GDP per capita in Laos increased by 50% from 2009 to 2016, according to Trading Economics [9]. It is also possible that increasing public awareness about the dangers of HBV makes people more willing to be tested and treated.

In the present study, there were twice more men than women attending CILM for HBV diagnosis and follow-up, whatever their geographical origin. This is similar to most studies on HBV prevalence, in which generally a higher prevalence of HBV chronic carriers is found among males than females [10]; in the majority of literature it is generally accepted that HCC affects more men than women [11, 12]. In the Asia-Pacific region, the incidence of HCC for both genders has been shown to increase over the age of 40 [13]. However, in other developing regions like Peru, the occurrence of HCC in a younger patient population has been reported [14–16]. In the present study, the patient population had rather a classical age distribution, but it was striking to observe that patients under age 37 represented almost 50% of the individuals attending CILM (Figure 2). This observation is similar to those made by a consortium of researchers from various African countries (i.e., Ghana, Ivory Coast, Malawi, Nigeria, Sudan, Tanzania, and Uganda), which have recorded that about 40% of the individuals with HBV-related HCC in Africa develop their tumour before the age of 40 [17].

4.2. Viral Load. The presence of circulating viral genomes indicates an active chronic HBV infection, presaging chronic insult to the liver. Consequently, a high HBV VL has been identified among predictive factors of liver carcinogenesis. A survey performed in a prospective cohort of chronic HBV

carriers in Taiwan clearly showed the significance of the association between serum HBV DNA levels and HCC risk [18]. Other biological parameters, such as aminotransferases, have been shown to be predictive as well, when associated with VL [18]. The rigorous follow-up of these serological parameters is then of utmost importance for the stratification of patients at risk.

HBV DNA quantification represents the best marker of viral replication [19]. In our patient population, VL ranged from <50 to $2.5 \cdot 10^{13}$ IU/mL, the group of patients showing VL of 10^7 being the most numerous.

There was no influence of the place of origin for the private/public status of health facility on the VL measured. Younger patients had a VL higher than older ones. Likewise, men displayed a higher VL than women. Almost 60% of the patient population had a VL higher than 10,000 IU/mL, the threshold value for high risk of developing HCC [20]. It is our opinion that this younger patient population should be closely monitored and treated accordingly.

Attention should also be focused on women over age 50, as a multicentre cross-sectional study in China established that the protective effect of female gender against the development of HBV-related cirrhosis gradually disappears after the age of 50 [21]. Furthermore, in the present study, 315 women of childbearing age (i.e., ≤ 37 years) had VL higher than 200,000 IU/mL. They should receive special attention as the use of antiviral therapies during the third trimester of pregnancy leads to a significant reduction in perinatal transmission [8].

4.3. Aminotransferases. In the present patient population, only 30% of patients attending CILM had aminotransferases

records. Ideally, all patients with diagnosis of chronic HBV infection should have had aminotransferase monitoring. Unfortunately, the medical personnel transmitted incomplete laboratory-clinical charts most of the time, or patients themselves admitted their records had been lost.

In a survey conducted on 4,000 people in China, the upper cut-off values for ALAT and ASAT were, respectively, 22.15 IU/L and 25.35 IU/L in healthy men and 22.40 IU/L and 24.25 IU/L for healthy women [22]. In our study, median aminotransferase values at the first follow-up sampling were around 65 U/L for both enzymes. Mean ALAT and ASAT values in the most numerous median age groups (30–40 years) were almost three times higher than the normal level reported in the Chinese study. There was a significant difference between people under 37 and people above 37 for both biomarkers; younger people had higher levels of aminotransferase (30% higher for ALAT, 20% higher for ASAT).

According to Marcellin et al. [23], the risk of developing HCC in patients with compensated cirrhosis with normal ALAT levels is not low, and the long-term treatment is associated with reduced HCC risk, indicating that prompt treatment is necessary, even for those with normal aminotransferase levels.

When both serum HBV DNA and aminotransferase levels are elevated, treatment is recommended for patients with chronic hepatitis; however, for patients with compensated cirrhosis, treatment is recommended when serum HBV DNA levels are elevated, irrespective of serum aminotransferase levels [7]. In our cohort, 10.6% of patients had both a high level of HBV DNA (over 10,000 IU/mL) and aminotransferases, but among them only 2.4% received treatments. This should be seriously taken into account as it has been clearly demonstrated that HBV treatments, which suppress viral replication, can reverse liver fibrosis and cirrhosis and subsequently reduce the incidence of HCC [24, 25].

4.4. Treatments. Merely 18% of the patients reported receiving antiviral treatments and the number of people receiving treatment has been decreasing since 2012. Patients coming from Vientiane or the provinces received the same therapeutic attention. The more elevated the VL, the greater the number of drugs administered.

According to our data, eight different medicines were used by clinicians, irrespective of gender. Three therapeutic schemes were used: monotherapies, dual therapies, and triple therapies. The drug classes included nucleosides analogues including adenosine analogues (Adefovir and Tenofovir), guanosine analogues (Entecavir and Ribavirin), cytidine analogue (Lamivudine), immunostimulant (Cycloferon), and Interferon-like analogues (Interferon, Pegylated Interferon alpha-2a).

Monotherapy was reported for 75% of the treated group, dual therapy in 18%, and triple therapy in 7% of treated people; that is, less than 15%, 4%, and 2% of the whole population received monotherapy, dual therapy, or triple therapy, respectively.

Three drugs were predominantly prescribed: Cycloferon, Adefovir, and Tenofovir. Cycloferon and Adefovir were

clearly decreasing since 2012, in favour of Tenofovir. Lamivudine and Pegasys had had a small increase in use between 2013 and 2014. Tenofovir was the only drug that persisted at a stable and high level from 2013 to 2016. Monotherapy was the primary treatment scheme of choice in Laos over the last 7 years.

Among the monotherapies, nucleosides analogues were preferred as they represented 62.3% of the treatments.

Adefovir and Tenofovir which are both acyclic nucleoside phosphonate analogues, reverse-transcriptase inhibitors (a crucial HBV enzyme [26]), were used for almost 27% and 21% of treated patients, respectively. Adefovir is almost three times less expensive than Tenofovir (see below).

Entecavir and Tenofovir monotherapy has been shown to achieve inhibition of HBV replication in almost all adherent patients [27]. These drugs are known to improve liver fibrosis and reverse cirrhosis in a majority of patients. In Laos, Tenofovir (21%) was preferred over Entecavir, which was anecdotally used (i.e., 0.8% of monotherapies).

Although Ribavirin is part of the World Health Organization's list of essential medicines, the most important medication needed in a basic health system [28], it was rarely used (0.8% of monotherapies).

Finally, Lamivudine was mentioned in only 12.7% of monotherapies, although it is the least expensive. It was probably little used because of its tendency to cause resistance in most patients over a five-year period [29].

Interferon-like drugs and immunostimulants were used in 37.7% of monotherapies. Pegylated Interferon- α (around 5.4%) and Interferon (1.9%) are cytokines that are claimed to have a limited duration of therapy in HBV therapeutic schemes (if pursued for at least 48 weeks), the absence of drug resistance, and an opportunity to obtain a durable posttreatment response [27]. Cycloferon is an early inductor of types 1 and 2 Interferon, administered orally or through the parenteral route. This is an association between acridone acetic acid and meglumine. Imported from Russia into Laos, it is particularly cheap and was used extensively when Russian doctors were present in the public health system. Cycloferon was used in 30.4% of treated people in our survey mostly alone and sometimes in combination. According to these doctors (some are now working in private clinics in Vientiane), Cycloferon is particularly effective but should be administered in combination with other antiviral drugs. Nevertheless, only 25% of treated patients received multitherapies. Interestingly, more than 90% of the combinations associate nucleoside analogues and Interferon-like molecules, especially Cycloferon.

Unfortunately, medical staff did not indicate which criteria were used to select a therapeutic scheme preferentially.

Strikingly, 11% of patients had both a high level of VL ($\geq 10,000$ IU/mL) and high liver enzymes (> 40 U/L) but among them only 2% received treatments. Moreover, among all treated patients, only 12% had undetectable VL after treatment. Nevertheless, results on the impact of therapies on VL and aminotransferases should be cautiously interpreted, as we cannot be confident that the patients strictly respected their treatment protocols.

To reduce the length and the associated cost of the therapy, some authors [30] suggested discontinuing long-term nucleoside therapy, if close follow-up can be ensured in patients without advanced liver disease. Therefore, precise valuation of disease status and appropriate beginning of antiviral therapy should be clearly redesigned for the cost-effective management of patients in Lao PDR.

4.5. Other Parameters. Additional systematic biological parameters should be introduced to improve HBV infection follow-up in Laos. As mentioned above, determination of HBeAg and anti-HBe should be implemented to differentiate patients in the immune clearance phase from those in the reactivation phase that usually heralds severe complications such as HCC. Platelet and aminotransferase levels should also be taken into account to estimate an index to detect subjects with severe fibrosis when >3.25 [31].

AFP reinforced by transabdominal ultrasonography has also been shown to be extremely valuable parameter giving key information on the ongoing tumour process and should be then added in the clinical-biological monitoring of patients [30].

Finally, other variables known to be associated with HCC risk (e.g., socioeconomic status, alcohol intake, smoking, excess weight, infection with *Opisthorchis*, and drug treatment) should be collected in the near future to delineate the degree of HCC risk in Laos more accurately.

5. Conclusion

The picture drawn from the results obtained from this survey is alarming. More than 60% of the patients included had a very high HBV VL; they were mostly young people with aggravating factors such as high aminotransferases. It is also evident from our survey that the level of treatment is critically low. It is obvious that all of the factors are already in place for an increase in HCC cases in the near future.

In Lao PDR, tools and skills are present to rewrite the scenario of this predictable health catastrophe. Only an immediate political decision could slow this fatal trend by firstly improving large-scale national vaccination campaigns, which have been shown to be very effective in Asia [21], secondly, supporting a very precise and vigorous serial biological and medical imaging follow-up of patients, and, finally, putting a system in place for management of at-risk infected patients.

This strategy could be successful only if supplemented by efficient prevention campaigns, better coordination between medical staff and the laboratory, improvement of up-to-date online surveillance networks, and, last but not least, affordability of diagnosis and treatments.

Conflicts of Interest

There are no conflicts of interest.

Authors' Contributions

Phimpha Paboriboune, Thomas Vial, François Chassagne, Philavanh Sitbounlang, and Eric Deharo made substantial

contributions to conception and design, acquisition of data, and analysis and interpretation of data; Sengaloun Soundala, Stéphane Bertani, Davone Sengmanothong, Francois-Xavier Babin, Nicolas Steenkeste, Paul Dény, and Pascal Pineau were involved in drafting the manuscript and revising it critically for important intellectual content.

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere thanks to the Fondation Mérieux for providing financial support and to medical staff and patients. Phimpha Paboriboune was supported by CILM, IRD, Campus France, and Fondation Mérieux. François Chassagne was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (FDM20140731352), Paul Sabatier University of Toulouse, and the Third Cancer Plan of the French National Alliance for Life Sciences and Health (ENV201408). The authors are grateful to Elizabeth Elliott and Brian Gadd for editing assistance.

References

- [1] R. Zampino, A. Boemio, C. Sagnelli et al., "Hepatitis B virus burden in developing countries," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 21, no. 42, pp. 11941–11953, 2015.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), "Hepatitis B vaccine birthdose practices in a country where hepatitis B is endemic - Laos," *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, vol. 62, pp. 587–590, 2013.
- [3] 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.
- [4] N. H. Y. Kong and P. K. H. Chow, "Conducting randomised controlled trials across countries with disparate levels of socioeconomic development: The experience of the Asia-Pacific Hepatocellular Carcinoma Trials Group," *Contemporary Clinical Trials*, vol. 36, no. 2, pp. 682–686, 2013.
- [5] Globocan 2012 - Home. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- [6] J. M. Llovet, A. Villanueva, A. Lachenmayer, and R. S. Finn, "Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 12, no. 7, pp. 408–424, 2015.
- [7] S. K. Sarin, M. Kumar, G. K. Lau et al., "Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update," *Hepatology International*, vol. 10, no. 1, pp. 1–98, 2015.
- [8] N. A. Terrault, N. H. Bzowej, K.-M. Chang, J. P. Hwang, M. M. Jonas, and M. H. Murad, "AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B," *Hepatology*, vol. 63, no. 1, pp. 261–283, 2016.
- [9] Laos GDP per capita — 1984–2016 — Data — Chart — Calendar — Forecast — News. Available from: <http://www.trading-economics.com/laos/gdp-per-capita>.
- [10] B. S. Blumberg, "Sex differences in response to hepatitis b virus," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 22, no. 11, pp. 1261–1266, 1979.
- [11] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al., "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *International Journal of Cancer*, 2014.
- [12] J. W. Park, M. Chen, M. Colombo et al., "Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death:

- the BRIDGE Study," *Liver International*, vol. 35, no. 9, pp. 2155-2166, 2015.
- [13] R. X. Zhu, W.-K. Seto, C.-L. Lai, and M.-F. Yuen, "Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region," *Gut and Liver*, vol. 10, no. 3, pp. 332-339, 2016.
- [14] S. Bertani, P. Pineau, S. Loli et al., "An Atypical Age-Specific Pattern of Hepatocellular Carcinoma in Peru: A Threat for Andean Populations," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, Article ID e67756, 2013.
- [15] A. Marchio, S. Bertani, T. Rojas Rojas et al., "A peculiar mutation spectrum emerging from young peruvian patients with hepatocellular carcinoma," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 12, Article ID e114912, 2014.
- [16] E. Ruiz, T. Rojas Rojas, F. Berrospi et al., "Hepatocellular carcinoma surgery outcomes in the developing world: A 20-year retrospective cohort study at the National Cancer Institute of Peru," *Heliyon*, vol. 2, no. 1, Article ID e00052, 2016.
- [17] J. D. Yang, A. Gyedu, M. Y. Afihene et al., "Hepatocellular carcinoma occurs at an earlier age in Africans, particularly in association with chronic Hepatitis B," *American Journal of Gastroenterology*, vol. 110, no. 11, pp. 1629-1631, 2015.
- [18] X. Chen, F. Wu, Y. Liu et al., "The contribution of serum hepatitis B virus load in the carcinogenesis and prognosis of hepatocellular carcinoma: Evidence from two meta-analyses," *Oncotarget*, vol. 7, no. 31, pp. 49299-49309, 2016.
- [19] J.-M. Pawlotsky, G. Dusheiko, A. Hatzakis et al., "Virologic Monitoring of Hepatitis B Virus Therapy in Clinical Trials and Practice: Recommendations for a Standardized Approach," *Gastroenterology*, vol. 134, no. 2, pp. 405-415, 2008.
- [20] C.-J. Chen, H.-I. Yang, and U. H. Iloeje, "Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B," *Hepatology*, vol. 49, no. 5, pp. S72-S84, 2009.
- [21] H. You, Y. Kong, J. Hou et al., "Female gender lost protective effect against disease progression in elderly patients with chronic hepatitis B," *Scientific Reports*, vol. 6, Article ID 37498, 2016.
- [22] P. Zhang, C.-Y. Wang, Y.-X. Li, Y. Pan, J.-Q. Niu, and S.-M. He, "Determination of the upper cut-off values of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in Chinese," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 21, no. 8, pp. 2419-2424, 2015.
- [23] P. Marcellin, T.-T. Chang, S. G. Lim et al., "Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B," *The New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 9, pp. 808-816, 2003.
- [24] P. Marcellin, E. Gane, M. Buti et al., "Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study," *The Lancet*, vol. 381, no. 9865, pp. 468-475, 2013.
- [25] C.-Y. Wu, J.-T. Lin, H. J. Ho et al., "Association of nucleos(t)ide analogue therapy with reduced risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B - A nationwide cohort study," *Gastroenterology*, vol. 147, no. 1, pp. 143-e5, 2014.
- [26] E. De Clercq and G. Li, "Approved antiviral drugs over the past 50 years," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 29, no. 3, pp. 695-747, 2016.
- [27] WHO — WHO Model Lists of Essential Medicines. Available from: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/>.
- [28] F. Suzuki, Y. Suzuki, A. Tsubota et al., "Mutations of polymerase, precore and core promoter gene in hepatitis B virus during 5-year lamivudine therapy," *Journal of Hepatology*, vol. 37, no. 6, pp. 824-830, 2002.
- [29] G. Papatheodoridis, I. Vlachogiannakos, E. Cholongitas et al., "Discontinuation of oral antivirals in chronic hepatitis B: A systematic review," *Hepatology*, vol. 63, no. 5, pp. 1481-1492, 2016.
- [30] F. Izzo, M. Piccirillo, V. Albino et al., "Prospective screening increases the detection of potentially curable hepatocellular carcinoma: Results in 8900 high-risk patients," *HPB*, vol. 15, no. 12, pp. 985-990, 2013.
- [31] M. Fusco, P. Piselli, S. Virdone et al., "Infection with hepatitis viruses, FIB-4 index and risk of hepatocellular carcinoma in southern Italy: a population-based cohort study," *Infectious Agents and Cancer*, vol. 11, no. 1, pp. 1-8, 2016.

ETUDE-2 : ETUDE PROSPECTIVE, TRANSVERSALE SUR LA PERFORMANCE DE TROIS TESTS RAPIDES COMMERCIAUX POUR LA DETECTION DE L'AGHB_s A VIENTIANE, LAOS

Sihalath D, Paboriboune P et al. Performance of three commercial rapid diagnostic tests for the detection of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) in Lao PDR. Journal of Virological Method. Soumis.

1. Contexte et objectifs

La plupart des dépistages de l'AgHBs sont réalisés avec des tests de diagnostic rapide (TDR), dont le prix unitaire est de 25,000 kips (\approx 3 dollars). Presque tous les TDR donnent des résultats en 10 à 30 minutes et sont donc moins chronophages que le test ELISA. Une autre caractéristique intéressante des TDR est qu'une formation d'expert n'est pas nécessaire pour l'utiliser. Il existe de nombreuses pharmacies au Laos qui importent et distribuent aux hôpitaux et aux cliniques privées un certain nombre de marques différentes de TDR pour la détection de l'infection à VHB. En revanche, très peu d'hôpitaux de Vientiane peuvent fournir le test ELISA de référence, qui est coûteux pour le patient (environ 12-18 USD par test) et nécessite un personnel entraîné. Néanmoins, jusqu'au début de notre étude, aucune donnée n'était disponible sur la performance de ces TDR utilisés au Laos. De plus, les fabricants fournissent peu d'informations sur la spécificité et la sensibilité des kits. L'objectif de notre étude était de comparer la performance des tests de diagnostic rapide pour détecter l'AgHBs dans l'infection à VHB avec la méthode ELISA de référence.

2. Matériels et Méthodes

Une étude prospective et descriptive a été menée dans les 2 hôpitaux publics et les 2 plus grandes cliniques privées de Vientiane, où sont couramment utilisées trois marques commerciales TDR différentes comme Boson Biotech HBsAg RDT, CTK Biotech "Onsite" HBsAg RDT et Coretest One step HBsAg RDT. La taille de l'échantillon a été déterminée selon le mode de calcul de Naing et al. (41), en tenant compte des valeurs de sensibilité et de spécificité de chaque TDR trouvées dans la littérature, d'une IC à 95 %, d'une précision souhaitée de 10 % et d'une prévalence de 9 % de l'infection à VHB au Laos.

Tous les patients hospitalisés ou en consultation externe dont l'AgHBs a été testé par le TDR ont été inclus dans l'étude. Les données socio-démographiques et celles relatives à la vaccination ont été recueillies par les médecins des hôpitaux puis envoyées au CILM avec les échantillons sanguins. Le test ELISA a été effectué au CILM en utilisant le kit Monolisa HbsAg ULTRA®, Bio Rad.

La sensibilité (Sen.), la spécificité (Spec.), la valeur prédictive positive (VPP), la valeur prédictive négative (VPN) et l'exactitude des TDR ont été calculées par le tableau 2x2 et définies conformément aux recommandations de Penn State Science sur le site : <https://onlinecourses.science.psu.edu/stat507/node/17>.

3. Principaux résultats

Au total, 1 729 patients ont été recrutés dans cette étude. Le sex-ratio H/F était de 1 avec un âge médian de 28.7 ans. Environ 5 % des participants avaient été vaccinés contre le VHB et 77 % d'entre eux n'avaient jamais subi un dépistage de l'infection du VHB auparavant. Environ 9 % ont été détectés positifs pour l'AgHBs par les TDR, contre 13,7 % par ELISA. Le TDR Boson HBsAg a été utilisé dans 11 % (190/1729) des cas. Ses caractéristiques sont : Sen. 53,8 %, Spec. 99,4 % (PPV 87,5 %, NPV 96,7 %), Précision de 96,3 %. Le TDR

CTK HBsAg a été retenu dans 35,8 % (619/1729) des cas. Il présente une Sen. de 54,9 %, une Spec. de 98,5 % (PPV 86,2 %, NPV 92,7 %) et une précision de 92,1 %. Le Coretest, quant à lui, a été employé dans 53,1 % (920/1729) des cas (Sen.53,3 %, Spec. 97,8 %, PPV 80,7 %, NPV 92,7 %, Précision de 91,4 %). Les trois tests ne présentent pas de différences significatives pour la Sen., la Spec., la VPP, la VPN et la précision.

4. Discussion et conclusion

D'un point de vue de santé publique, nos résultats ont montré qu'il y a plus d'hommes que de femmes qui sont infectés par le VHB (p -value= 0,001). Nous avons également découvert que peu de personnes sont vaccinées, ce qui s'explique partiellement par le fait que les participants sont nés avant l'introduction du vaccin contre le VHB dans le programme national de vaccination à la naissance et que le vaccin n'est pas gratuit pour les adultes au Laos. Nous avons montré que les trois TDR étudiés présentaient une faible sensibilité mais une spécificité élevée ; par conséquent, ils sont susceptibles de ne pas détecter de nombreux cas d'infection par l'hépatite B et devraient être remplacés ou appuyés par des méthodes plus précises. Nous recommandons que le dépistage ELISA HBsAg soit disponible dans les centres de santé ou au moins que les TDR recommandés par l'OMS soient préférés à ceux distribués aujourd'hui à Vientiane.

Article 2. « Performance of three commercial rapid diagnostic tests for the detection of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) in Lao PDR »

L'article a soumis au « Journal of Virological Methods » : http://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=VIRMET

Performance of three commercial rapid diagnostic tests for the detection of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) in Lao PDR

Dalouny Sihalath¹, Phimpha Paboriboune^{2*}, Sengdao Vannarath¹, Bouachanh Rasachak¹, Stéphane Bertani⁵, Mayfong Mayxay^{3,4}, Philavanh Sithounlang², Eric Deharo⁵

¹Gastroenterology department, Mahosot Hospital, Vientiane, Laos

²Centre d'Infectiologie Lao-Christophe Mérieux, Vientiane, Laos

³Faculty of Postgraduate Studies, University of Health Sciences, Vientiane, Laos

⁴Lao-Oxford-Mahosot Hospital-Wellcome Trust Research Unit (LOMWRU), Microbiology Laboratory, Mahosot Hospital, Vientiane, Laos

⁵Université de Toulouse, IRD, UPS, UMR 152 PHARMADEV, Toulouse, France

*Correspondence should be addressed to Phimpha Paboriboune

E-mail: phimpha@ccm-laos.org

Summary:

Laos has the highest prevalence of hepatitis B viral (HBV) infection in Southeast Asia. Rapid Diagnostic Tests (RDTs) are commonly used in health centres but no study has been conducted to evaluate their performance in Laos. A study was then conducted among 1,729 patients who underwent three different RDTs for surface antigen of hepatitis virus (Boson, CTK and Coretest) in two public central hospitals and two private clinics in Vientiane Capital, to compare sensitivity, specificity, and accuracy of RDTs versus ELISA.

The mean age (95%CI) of the patients was 28.7 years old and the sex ratio was balanced. 13.71% of the patients had positive HBsAg as detected by ELISA, while this was only 8.9% for RDTs. All three types of RDTs had a sensitivity of 54% and specificity of 97%. There was no difference in accuracy, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values between RDTs.

This study revealed higher prevalence of HBsAg among young adults who were present in health care facilities in Vientiane than previously described in Laos. All three RDTs studied had low sensitivity but high specificity; therefore, they are likely to miss many cases of Hepatitis B infection and should be replaced or backed up by more accurate methods.

Keywords: Hepatitis B, ELISA, Laos, rapid diagnostic test

According to WHO, 240 million people are chronically infected with hepatitis B virus (HBV) worldwide (WHO, 2017). In Laos the prevalence of HBV (HBsAg positivity) varies from 2.9% (Xeuatvongsa et al., 2014) to more than 8% (Black et al., 2014). In Vientiane capital, people visiting health centres and suspected to be infected with HBV are commonly tested with rapid immunochromatographic diagnostic tests (RDTs). Three commercial brands are commonly used in Vientiane: Bosen Biotech HBsAg RDT, CTK Biotech "Onsite" HBsAg RDT and Coretest One step HBsAg RDT. None of them have official recommendations; they are bought by health center authorities according to their price. They have many advantages, as they do not require expensive specialized equipment, trained technicians, they can be stored at room temperature (at least under air conditioning atmosphere in tropical environments) and they allow individual use with fast processing. Nevertheless, to the best of our knowledge, no data are available on the performance of these RDTs and the manufacturers provide poor information on specificity and sensitivity of their kits. Moreover, according to our experience at the Centre d'Infectiologie Lao-Christophe Mérieux in Vientiane, about 20% of patients diagnosed HBsAg positive at hospitals and private clinics with rapid test diagnosis are false positives. In this context we decided to determine the performance of rapid tests of different brands in use in hospitals or private clinics of Vientiane Capital, versus ELISA, which is considered as a gold standard.

The study was approved by the Lao Ethical Review Committee of the National Institute of Public Health (Ref. No 046NIOPH/NECHR) and written informed consent was obtained from all included patients. A prospective, cross-sectional study was carried out in Vientiane at the out- and in-patient Departments (OPD and IPD) of 2 public hospitals (Mahosot Hospital, 103 Hospital) and 2 private clinics (Mitthaphab and Lao-Viet) from September 2015 to June 2016.

These health care centres were chosen because of the daily frequency of samples for tested HBV detection (around 20 samples a day). All patients whose attending doctors had requested HBV detection were invited to participate in the study. Patients were Lao people, able to understand Lao language and able to understand and sign a written consent (if not, informed consent was signed by their legal representative). Patients unwilling to participate or already diagnosed by ELISA or non-interpretable rapid test were excluded. Socio-demographic characteristics of patients and their vaccination status were compiled in table-1.

The sample size was determined according to Naing et al. (Naing et al., 2006), taking into account 95%CI, 10% desired precision and 9% prevalence HBV infection in Laos (fig.1).

For each patient, 3 mL of blood was collected and split in 2 samples, one for RDT (for immediate determination) and one for ELISA determination (samples were centrifuged and stored at -80°C until testing). ELISA tests were performed on micro plate 96 wells (Monolisa HbsAg ULTRA®, Bio Rad) according to manufacturer instructions and read at 450 nm on a Multiscan Thermo scientific spectrophotometer. RDTs were also performed according to manufacturer's instructions. Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value (PPV) Negative Predictive Value (NPV) and Accuracy of the RDTs were calculated and defined according to Penn State Science recommendations (2017). Data from participants and laboratory results were recorded in file maker program, and exported to Excel. 2x2 tables were designed to calculate sensitivity, specificity, PPV, NPV (table-2). Data were analysed using STATA version 10.

1,740 samples were collected, 810 came from public health facilities (Mahosot hospital and 103 Hospital) and 930 from private clinics (Mitthaphab and from Lao-Viet). 10 were lost and one was not interpretable, therefore 1,729 samples were included in the study.

For RDT tests, 190 were tested with Bosen Biotech, 619 with CTK Biotech "OnSite" and 920 with Coretest® One, according to Naing (Naing et al., 2006).

75% of the patients were from Vientiane Capital, while 25% from outside of the capital city. Sex ratio was =1, mean age was 28.7 years old and 55% of patients were married. The largest occupational group was the group of government staff (41%). 40% completed secondary school.

About 5% of all participants had been vaccinated and nearly 77% of them had never been tested for HBV before.

Among the 1,729 patients enrolled in this study, 154 (8.9%) were positive for HBsAg by RDTs, while 237 (13.71%) were positive with ELISA (fig. 2).

There was no difference statistical difference ($P < 0.001$) between the three RDTs for Sensitivity, Specificity, PPV, NPV and accuracy.

Poor or no indication on accuracy was given by the manufacturer and to the best of our knowledge, only one article referred to CTK (Chameera et al., 2013).

Our results indicate that the three RDTs commonly used in Vientiane are similar for Sensitivity, Specificity, PPV, NPV and accuracy. They have high specificity, NPV and accuracy for the detection of HBsAg, which is similar with some reports from Sri Lanka and Pakistan (Chameera et al., 2013). Boson RDT has 95.6% sensitivity and 96% specificity (according to the fabricant), 80% sensitivity and 100% specificity for CTK (Chameera et al., 2013) and 60% sensitivity and 100% specificity (Chameera et al., 2013) for Core. In our hands these RDTs were less predictive compared to other RDT recommended by WHO (Shivkumar et al., 2012), but most of all, ELISA detected 1.5 more positive patients than RDTs. This finding corroborates the work of Orkuma et al. (2014) who found that ELISA was much more efficient than HIV antibody Rapid Diagnostic Test (RDT) to detect HIV in blood donors. It corroborates also the work of Okpokam et al. (2015) who showed that the seropositivity of HBV was almost 3 time less for rapid RDT than ELISA methods. Nevertheless, some other RDTs for hepatitis B surface antigen (HBsAg) detection (VIKIA, Determine and Quick Profile) were considered efficient by Bottero et al. (Bottero et al., 2013). The RDTs distributed in Vientiane should be then seriously questioned.

Finally, from a public health perspective, our study showed that there are more men who are positive for HBV than women ($p\text{-value} = 0.001$) and that 40% of patients have a certain level of education. We also showed that few people were vaccinated, this correlates with the fact that participants were born before the introduction of the HBV vaccine into the national vaccination program for children and that adult HBV vaccination is not available for free in Laos. The latter correlates with the fact that participants were born before the introduction of the HBV vaccine into the national vaccination program for children and that adult HBV vaccination is not available for free in Laos. The national health care system should consider HBV as a priority and facilitate access to health care services and vaccinate people for free.

ELISA HBsAg detection should be available in health care centres or at least RDTs recommended by WHO should be preferred over the one distributed nowadays in Vientiane.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests with any organization.

Acknowledgments

We would like to express our sincere thanks to medical staff and laboratory technicians. Special thanks to Elizabeth Elliott for editing assistance.

Fundings

The study was supported by the Foundation Mérieux (especially Dr Nicolas Steenkeste), CILM and the Foundation Anber.

References:

1. Black, A.P., Nouanthong, P., Nanthavong, N., Souvannaso, C., Vilivong, K., Jutavijittum, P., Samounry, B., Lütteke, N., Hübschen, J.M., Goossens, S., Quet, F., Buisson, Y., Muller, C.P., 2014. Hepatitis B virus in the Lao People's Democratic Republic: a cross sectional serosurvey in different cohorts. *BMC Infect. Dis.* 14, 457. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-457>
 2. Bottero, J., Boyd, A., Gozlan, J., Lemoine, M., Carrat, F., Collignon, A., Boo, N., Dhotte, P., Varsat, B., Muller, G., Cha, O., Picard, O., Nau, J., Campa, P., Silbermann, B., Bary, M., Girard, P.-M., Lacombe, K., 2013. Performance of rapid tests for detection of HBsAg and anti-HBsAb in a large cohort, France. *J. Hepatol.* 58, 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.11.016>
 3. Chameera, E.W.S., Noordeen, F., Pandithasundara, H., Abeykoon, A., 2013. Diagnostic efficacy of rapid assays used for the detection of hepatitis B virus surface antigen. *Sri Lankan J. Infect. Dis.* 3. <https://doi.org/10.4038/sljid.v3i2.5172>
 4. Naing, L., Winn, T., Rusli, B.N., 2006. Practical issues in calculating the sample size for prevalence studies. *Arch. Orol. Sci.* 1, 9–14.
 5. Okpokam, D.C., Kooffreh-Ada, M., Okhormhe, Z.A., Ernest, N.A., Nna, V.U., 2015. Sensitivity comparison between rapid one-step test strip and ELISA methods in detection of HBsAg among selected chronic liver disease patients in University of Calabar Teaching hospital, Calabar, Nigeria. *Asian J. Med. Sci.* 6, 56–60. <https://doi.org/10.3126/ajms.v6i5.11851>
 6. Orkuma, J.A., Egesie, J.O., Banwat, E.B., Ejele, A.O., Orkuma, J.H., Bako, I.A., 2014. HIV screening in blood donors: rapid diagnostic test versus enhanced ELISA. *Niger. J. Med. J. Natl. Assoc. Resid. Dr. Niger.* 23, 192–200.
 7. Penn State Science, <https://onlinecourses.science.psu.edu/stat507/node/17>
 8. Shivkumar, S., Peeling, R., Jafari, Y., Joseph, L., Pai, N.P., 2012. Rapid point-of-care first-line screening tests for hepatitis B infection: a meta-analysis of diagnostic accuracy (1980–2010). *Am. J. Gastroenterol.* 107, 1306–1313. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.141>
 9. WHO, Hepatitis B <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> 2017.
 10. Xeuatvongsa, A., Komada, K., Kitamura, T., Vongphrachanh, P., Pathammavong, C., Phounphenghak, K., Sisouk, T., Phonekeo, D., Sengkeopaseuth, B., Som-Oulay, V., Ishii, K., Wakita, T., Sugiyama, M., Hachiya, M., 2014. Chronic Hepatitis B Prevalence among Children and Mothers: Results from a Nationwide, Population-Based Survey in Lao People's Democratic Republic. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088829>
-

CHAPITRE-II : EPIDEMIOLOGIE DE L'HEPATITE C

*Paboriboune P. et al. Hepatitis C in Laos: A 7-Year Retrospective Study on 1765 Patients.
Virologica Sinica <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0039-9>*

1. Introduction

À la fin des années 1960, on croyait qu'il n'existait que des hépatites de types A et B, qui se distinguaient par les circonstances d'exposition et les périodes d'incubation. Au début des années 1970, des études ont été menées chez des gens infectés après une transfusion sanguine et dont on pensait que l'hépatite B était responsable. Mais comme ni le virus de l'hépatite A ni celui de l'hépatite B n'ont été détectés, on a conclu à l'existence d'un autre virus, qui fut qualifié d'hépatite non-A, non-B (NANB). Le suivi initial de ces cas a montré qu'environ 50 % d'entre eux ont développé une hépatite chronique, conclusion fondée sur la persistance des enzymes sériques pendant au moins 6 mois. Environ 15 ans plus tard, après que le virus de l'hépatite C a été identifié comme étant la cause de l'hépatite NANB, on a constaté que l'hépatite chronique se développait plus fréquemment comme une infection virale persistante chez plus de 80 % des adultes infectés, mais seulement chez environ 50 % des enfants ou jeunes femmes infectés (42). Avec le VHB, l'hépatite virale C (VHC) cause les dommages hépatiques les plus graves (43).

Cependant, l'infection aiguë à VHC est habituellement asymptomatique et n'est que très rarement (voire jamais) associée à une maladie mettant la vie en danger. Environ 15 à 45 % des personnes infectées éliminent spontanément le virus dans les 6 mois suivant l'infection sans aucun traitement. Les 55% à 85% de personnes restantes développeront une infection chronique par le VHC. L'infection persistante par le VHC est associée au développement d'une cirrhose du foie, d'un cancer hépatocellulaire, d'une insuffisance hépatique et du décès. Chez les personnes atteintes, le risque de développer une cirrhose du foie se situe entre 15 et 30 %, en 20 ans (44). Une fois la cirrhose survenue, le carcinome hépatocellulaire se développe chez 1 % à 4 % de ces patients (45).

Aucun vaccin contre l'hépatite C n'est disponible à ce jour ; toutefois, des recherches sont en cours dans ce domaine.

Tableau 3 : Les sources d'infection du VHC

No	Parentérale	Horizontale	Verticale	Nosocomiale / Iatrogène
1	Transfusion	Enfant - Enfant	Mère -Enfant	Accidents d'exposition au sang
2	Activité Professionnelle	Famille		Hémodialyse, Actes invasifs...
3	Usage de drogue (IV, IN)	Personne à Personne		
4	Tatouage, piercing			

Les mères séropositives pour le VHC ont de 5 à 10 % de probabilité de transmettre le virus à leur nouveau-né. 90% de ces enfants infectés à la naissance auront une infection chronique (46).

Étant donné que l'infection aiguë à VHC est habituellement asymptomatique, peu de personnes sont diagnostiquées pendant la phase aiguë. Chez les personnes qui développent une infection chronique, celle-ci n'est pas non plus souvent diagnostiquée parce qu'elle demeure asymptomatique pendant des décennies. Elle

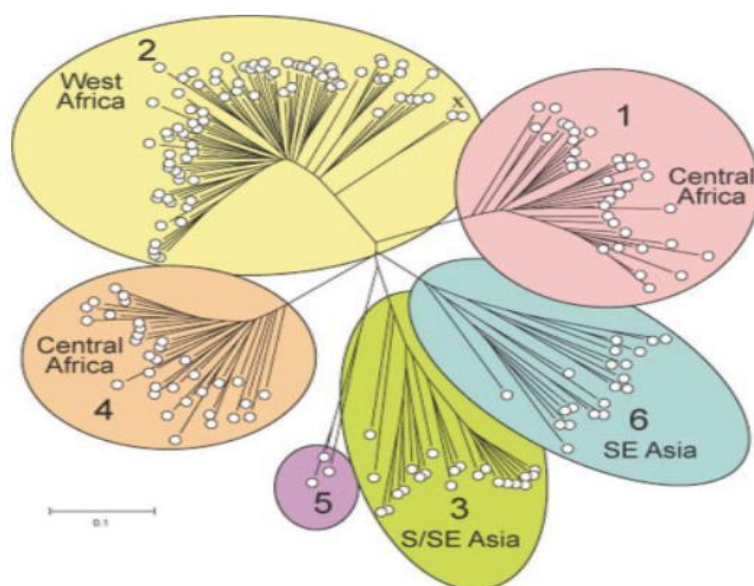
n'est le plus souvent découverte que lorsque les symptômes deviennent secondaires à des lésions hépatiques graves.

L'infection à VHC est diagnostiquée en 2 étapes :

- Le test de dépistage des anticorps anti-VHC au moyen d'un test sérologique permet d'établir s'il y a eu une contamination par le virus,
- Si le test est positif pour les anticorps anti-VHC, un test d'acide nucléique pour la détection (quantification) du génome viral (ARN) du VHC est nécessaire pour confirmer une infection chronique.

Le VHC présente une grande diversité génétique, caractérisée par des variations régionales dans la prévalence du génotype. Cela pose un défi à l'amélioration du développement des vaccins et des traitements pan-génotypiques, et nécessite la prise en compte des tendances mondiales de la prévalence du génotype du VHC. Il existe de multiples souches (ou génotypes) du virus de l'hépatite C dont la distribution varie selon les régions (Fig. 8) (47). Des progrès vers la résolution de ces incertitudes dans la classification du VHC ont été réalisés par la publication d'un document de consensus en 1994, proposant la classification du VHC par des méthodes phylogénétiques en 6 grands génotypes comportant plus de 80 sous-types, nommés par ordre alphabétique de a à z (47).

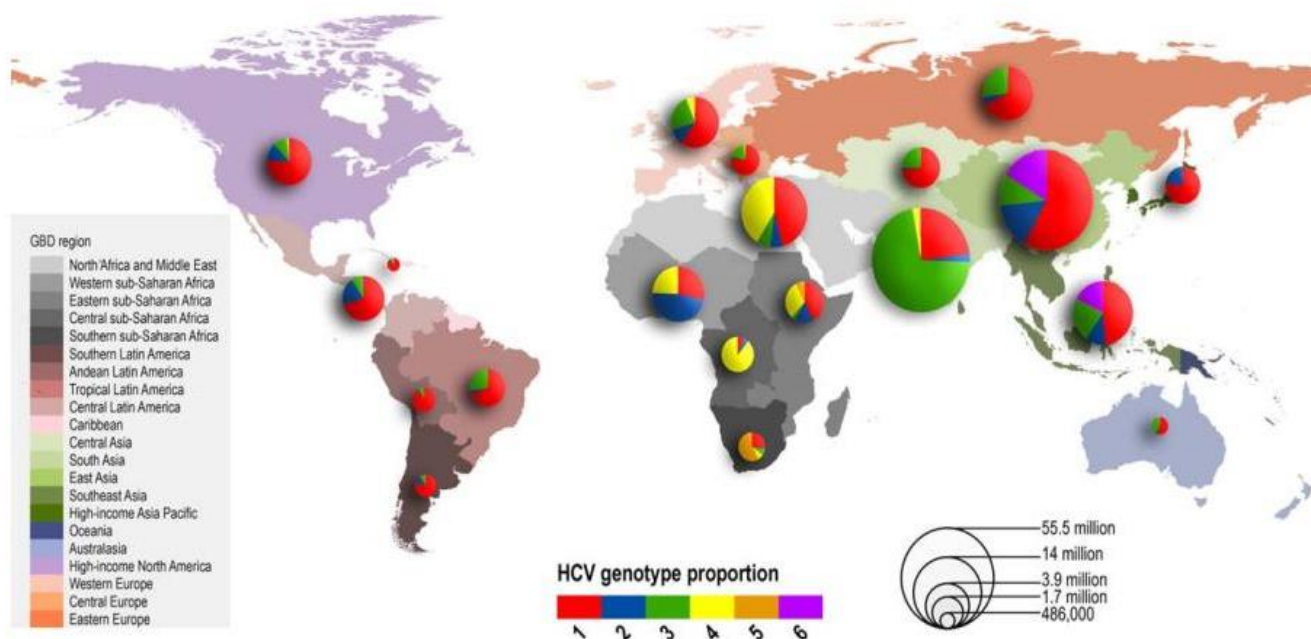
Figure 8 : Arbres évolutifs de toutes les séquences NS5B disponibles du VHC [extrait de (47)]



À l'échelle mondiale, on estime que le génotype 1 est responsable de plus de cas de VHC (46,2 %) que tout autre génotype, avec plus d'un tiers des cas situés en Asie de l'Est. Le génotype 3 est le deuxième génotype le plus courant (30,1 %), dont environ les trois quarts se trouvent dans le sud de l'Asie. Les génotypes 2 (9,1%), 4 (8,3%) et 6 (5,4%) sont responsables de la majorité des cas restants de VHC dans le monde. L'Asie de l'Est compte le plus grand nombre de cas de génotype 2 et de génotype 6 du VHC, tandis que l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient recèlent le plus grand nombre de cas de génotype 4. Le génotype 5 est responsable de moins de

1% de cas de VHC au monde, dont la grande majorité se produisent en Afrique subsaharienne australe et orientale (Fig. 9) (48).

Figure 9 : Prévalence liée de chaque génotype du VHC par région « Global Burden of Disease » (GBD)
[extrait de (48)]

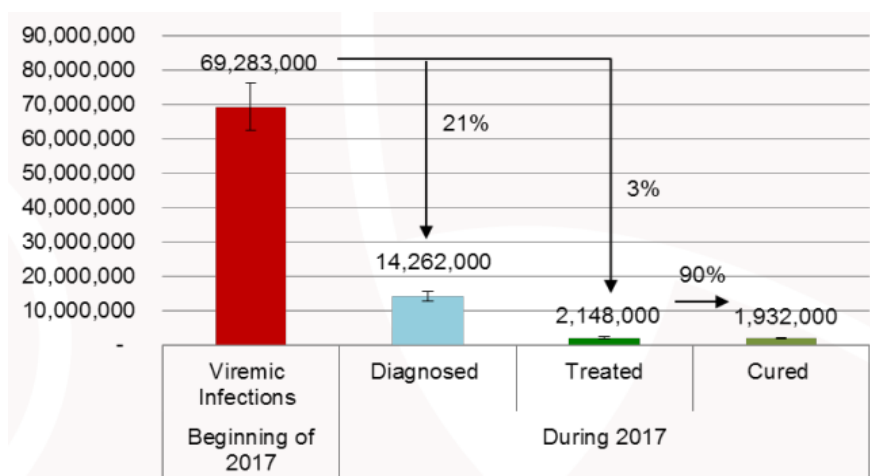


Le premier traitement décrit fut mis en place à la fin des années 1980, lorsque des patients traités pour une hépatite non-A non-B ont reçu de l'interféron. Dans les années qui ont suivi la découverte du VHC en 1989, le traitement des personnes infectées par celui-ci est devenu possible. C'est le traitement combiné d'IFN- α et de ribavirine (RBV) qui a considérablement augmenté les taux de réponse au traitement. Cependant, les traitements à base d'interféron/ribavirine ont été souvent mal tolérés, car associés à des effets indésirables graves, mais ils ont entraîné des taux de guérison variant entre 40 % et 65 % (25).

Une révolution remarquable s'est produite récemment avec la disponibilité des antiviraux à action directe (AAD) ayant différents modes d'action. Cela a conduit à des taux plus élevés de guérison avec un bon profil de tolérance et une réponse virologique soutenue atteignant presque 100 % (49).

L'accès au traitement du VHC s'améliore, mais demeure restreint. Beaucoup des personnes infectées ne sont pas diagnostiquées de l'infection chronique par le VHC. À l'échelle mondiale, environ 80 % des personnes atteintes du VHC chronique ne connaissent pas leur état et 93 % ne sont pas traitées (Fig. 10) (24). Un grand nombre de facteurs contribuent à cela : perception/connaissance du patient, longue phase asymptomatique, priorités organisationnelles et financières (25).

Figure 10 : Cascade mondiale de soins pour l'infection à VHC, 2016 [extrait de (24)]



2. Au niveau mondial

Des procédures de soins ne respectant pas les règles d'hygiène et l'utilisation de drogues injectables ont été les principales causes de nouvelles infections par le VHC, représentant la plupart des 1,75 millions de nouvelles infections en 2015 (taux d'incidence mondiale : 23,7 pour 100 000).

L'OMS estime qu'en 2015, 71 millions de personnes vivaient avec l'infection par le VHC dans le monde, soit 1% de la population mondiale totale. Elle est inégalement répartie dans le monde. Les pays de la Méditerranée orientale affichent la prévalence la plus élevée (2,3%), suivie de l'Europe (1,5%) (25) (Fig. 11-12) (50, 51).

Figure 11 : Estimation de la prévalence virologique du VHC dans le monde (fin 2015) [extrait de (50)]

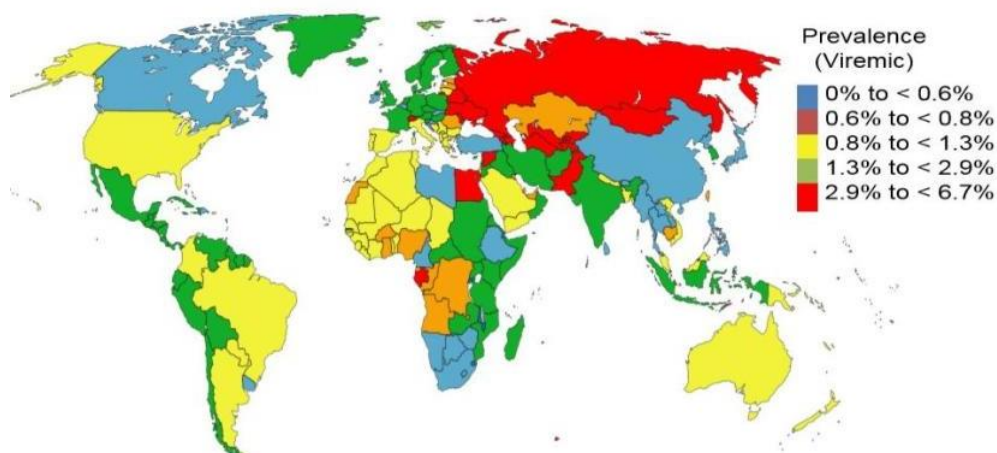
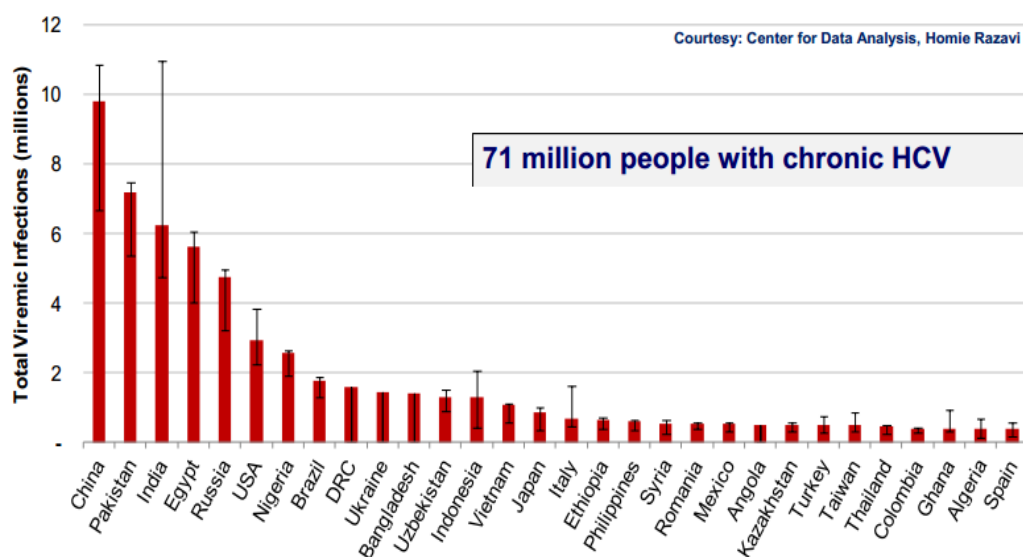


Figure 12 : Pays où le nombre d'infections à l'hépatite C est élevé [extrait de (51)]



En terme de décès par les hépatites, l'OMS estime qu'en 2015, l'hépatite virale était responsable de 1,34 million de décès dans le monde sur 77 millions toutes causes confondues. Parmi ces décès, 30 % étaient le résultat de complications liées à l'infection chronique par le VHC. Sans traitement, l'infection à VHC peut entraîner une cirrhose (720 000 décès) ou un carcinome hépatocellulaire (470 000 décès). La mortalité due aux hépatites virales a augmenté de 22 % depuis 2000. À moins que les personnes infectées par le VHB et le VHC ne soient diagnostiquées et traitées plus précocement, le nombre de décès dus à l'hépatite virale continuera d'augmenter (25).

Bien que l'incidence de l'infection à VHC semble diminuer dans les pays développés, le nombre de décès global consécutifs à une infection à VHC augmentera au cours des 20 prochaines années (52).

3. En Asie du Sud-Est

L'épidémiologie du virus de VHC dans les pays d'Asie du Sud-Est n'est pas suffisamment étudiée. Plusieurs études faites en Asie révèlent une augmentation de la prévalence du VHC avec l'âge, peut-être en raison d'un dépistage plus récent et amélioré sur les produits sanguins et de l'adoption de pratiques d'injection plus hygiéniques (53, 54). La prévalence du VHC dans la population générale varie d'un pays d'Asie du Sud-Est à l'autre, allant d'environ 0,5 % à Singapour et à Hong Kong à environ 6 % au Vietnam ou en Thaïlande (55, 56) et plus de 10% au Myanmar (57), (Tableau 4) (58). La prévalence signalée en Chine est d'environ 2%-3%, ce qui représente environ 30 à 40 millions de personnes. L'incidence croissante du CHC dans de nombreux pays au cours de ces dernières décennies est probablement attribuable au VHC (59) parce que la vaccination universelle contre le virus de l'hépatite B a entraîné une baisse spectaculaire du CHC lié au VHB (60).

Tableau 4 : Prévalence du virus de l'hépatite C dans les pays d'Asie du Sud-Est

Pays	Prévalence (%) du VHC
Cambodge	2,3
Indonésie	2,1
Laos	1,1
Birmanie	0,95
Philippines	0,4
Singapour	0,37
Thaïlande	2,7
Vietnam	6,1

Le génotype 6 est très répandu en Asie du Sud-Est et présente une grande diversité dans les zones endémiques, il représente la variante dominante au Cambodge, au Laos, au Myanmar et au Vietnam. Les souches du génotype 6 du VHC isolées en Asie de l'Est étaient si divergentes qu'elles ont été initialement classées comme des génotypes distincts, désignés 7, 8 et 9 (57).

Le Laos présente une prévalence pour l'hépatite C plus basse que ces voisins, mais se situe dans une zone de haute prévalence de l'hépatite B et C. Un CHC par ces virus pourrait être significativement réduit par une prévention primaire et par un traitement précoce des patients atteints d'hépatite chronique. Le traitement des hépatites virales est un enjeu de santé publique important au Laos, mais aucune politique concertée de prise en charge de ces patients n'est développée. Beaucoup de nouveaux médicaments antiviraux sont disponibles dans le monde mais leur coût reste élevé. La prise en charge des patients atteints d'hépatite virale chronique au Laos n'est pas centralisée. Il n'existe pas de traitement standard ni de recommandation nationale, ni de guide thérapeutique.

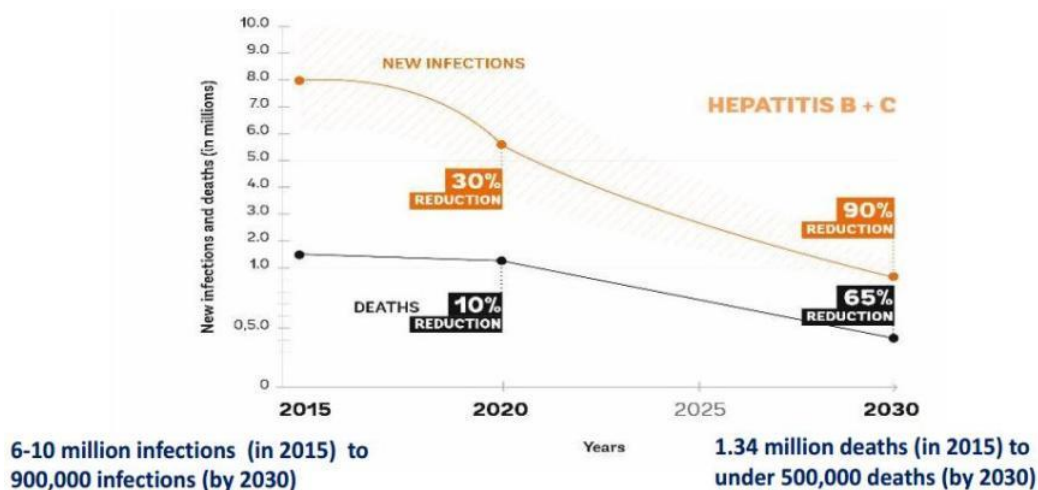
4. Conclusion

Le problème principal du traitement de l'hépatite C est lié au retard du diagnostic et à la prise en charge des patients infectés. L'affection reste en effet peu symptomatique durant plusieurs décennies n'entraînant durant cette période aucune complication. Le VHC, bien que non cytopathique, induit une réponse immunitaire contre les hépatocytes infectés, provoquant des lésions hépatocellulaires et une hépatite chronique évoluant à bas bruit, pouvant aboutir au développement d'une cirrhose (20%), puis d'un CHC (1-4% par an en cas de cirrhose). Il

faut donc traiter l'hépatite chronique C avant la cirrhose pour être sûr qu'elle n'évoluera pas vers le CHC 18-20. Pour le médecin, le manque de connaissances et les obstacles qui surgissent à tous les niveaux, depuis le diagnostic jusqu'à l'envoi chez le spécialiste, peuvent contrecarrer la prise en charge des hépatites C chroniques. Au niveau du patient, le manque de sensibilisation, la crainte des effets indésirables, une mauvaise adhérence, l'existence de co-morbidités, ou encore le coût du traitement, peuvent le rendre inefficace. Au niveau du gouvernement et des organismes payeurs, l'absence de promotion, de surveillance et de financement peuvent aussi interférer. Chacun de ces obstacles doit être pris en compte pour mettre en œuvre à grande échelle les traitements antiviraux adaptés.

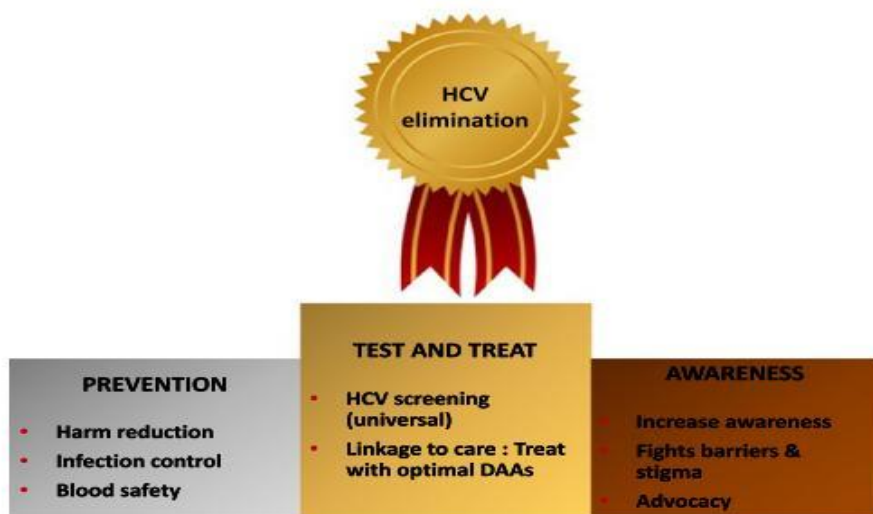
L'OMS a adopté la Déclaration mondiale sur la santé en 2016 pour éliminer le VHC d'ici 2030. Les objectifs sont les suivants : réduire les nouvelles infections de 90% et la mortalité de 65% (Fig. 13) (50).

Figure 13 : Objectifs pour l'élimination de l'hépatite C [extrait de (50)]



Pour atteindre ces objectifs, il y a eu une révolution majeure dans le traitement de l'infection à VHC, avec la disponibilité de plusieurs schémas oraux combinant des DAA de différents modes d'action. Ces traitements entraînent une augmentation de la réponse virologique soutenue qui atteint presque 100 % et réduisent la durée du traitement à une durée de 8 à 12 semaines. Ces traitements présentent un profil d'innocuité favorable et une bonne tolérance. Les recommandations thérapeutiques doivent inclure un mode de vie sain (alimentation « méditerranéenne » et activité physique). Les patients atteints de cirrhose devront faire l'objet d'une surveillance (dépistage du CHC par échographie tous les six mois). Les programmes visant à éliminer le VHC doivent inclure un dépistage accru, l'aiguillage vers les soins et l'amélioration de l'accès aux traitements dans le monde entier (Fig. 14) (49).

Figure 14 : Comment parvenir à l'élimination du VHC à l'échelle mondiale ? [Extrait de (49)]



Nous assistons à une révolution dans la thérapie de l'hépatite C avec des molécules puissantes capables de guérir cette infection.

Il est hors de question que ces traitements qui peuvent sauver des millions de vies NE SOIENT PAS universellement disponibles à un prix abordable.

Pr Françoise Barré–Sinoussi, Prix Nobel de médecine.

ÉTUDE-3 : ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE, RETROSPECTIVE DE LA SURVEILLANCE DE L'HEPATITE C AU LAOS

1. Contexte et objectifs

L'infection chronique par le VHC est un facteur de risque bien connu de cirrhose du foie et de carcinome hépatocellulaire. Il est donc important de détecter et de suivre attentivement les sujets infectés pour proposer une gestion adéquate de la maladie (61).

Le diagnostic et le traitement des hépatites chroniques sont récents avec les antiviraux disponibles au Laos. Les patients atteints d'hépatite chronique ont recours aux médecins qu'ils connaissent pour le traitement antiviral et le suivi mais cette prise en charge est difficile en raison de facteurs liés aux médecins et aux patients. Pour les médecins, c'est le manque d'expérience du traitement antiviral des hépatites chroniques. Pour le patient, c'est le coût élevé et/ou la non-disponibilité des moyens diagnostiques et l'absence de sensibilisation.

Pour ces raisons, après avoir mis en place la mesure de la charge virale (CV) du VIH à l'ouverture officielle du CILM depuis 2009, nous avons aussi mis en place la mesure de la CV pour les hépatites B et C à partir de 2010. A ce jour, le CILM est le seul laboratoire du pays qui fournit ce type de test. Avant cela, les échantillons du patient devaient être envoyés en Thaïlande par un laboratoire privé au Laos et il fallait attendre deux semaines pour avoir le résultat. Pour ces motifs, les médecins avaient du mal à prescrire ce test pour leurs patients.

Les résultats de notre étude visent à aider les autorités sanitaires à appliquer des mesures de prévention et de traitement pour alléger le poids de l'infection par le VHC, allant dans le sens de la nouvelle stratégie de l'Assemblée mondiale de la Santé définie par la Déclaration mondiale sur la santé en 2016 pour éliminer le VHC d'ici 2030.

2. Matériels et Méthodes

Nous avons examiné l'évolution de l'infection à VHC dans une cohorte de 1 765 patients qui sont venus au CILM pour l'analyse de routine de quantification de la CV de VHC entre janvier 2010 et novembre 2016. Ces patients étaient déjà diagnostiqués « anticorps anti-VHC » dans les hôpitaux ou cliniques privées. Les données sociodémographiques, le bilan hépatique et l'historique des traitements ont été collectés par les médecins qui prescrivaient l'ordonnance de test. Toutes les données ont été enregistrées dans une base de données créée avec le logiciel Filemaker Pro Version 11. Au moment de l'étude, nous avons exporté les données sur Excel pour vérifier les erreurs, puis nous avons analysé les données avec le logiciel Minitab, version 17.3.1 et STATA version 14.

Pour la quantification de l'ARN du VHC, nous utilisons le kit commercial : Fast-track Diagnostics avec une détection limite à 50 IU/mL, Luxembourg ; <http://www.fast-trackdiagnostics.com>

Les taux sériques d'aspartate (ASAT) et d'alanine (ALAT) aminotransférases ont été mesurés dans les hôpitaux au moyen d'une *HumaStar 600 machine* (CoreLab, Germany).

3. Principaux résultats

Pendant les sept années de suivi de l'analyse de routine de la CV des patients VHC, le CILM a reçu 3102 échantillons provenant de 1765 patients. La plupart des patients venaient de Vientiane. Le nombre des patients augmente chaque année, spécialement de 2010 jusqu'en 2014, la moyenne d'augmentation annuelle est de 77,3 %.

Le sex-ratio H/F est de 1,2. Les hommes sont significativement plus âgés que les femmes (53,8 vs. 51,6 ; $p = 0,006$). La majorité des patients (72 %) ont été confirmés ARN VHC positifs (CV > 50 UI/mL) et 28 % d'entre eux avaient une CV élevée (> 6 log₁₀). Environ 23 % des patients présentaient un taux d'aminotransférases indiquant une atteinte hépatique (> 40 UI/mL) ; mais moins de 20 % des patients ont reçu un traitement antiviral. Les patients ont rarement bénéficié d'un deuxième examen d'imagerie. Nos résultats ont également montré que le cycloferon, l'interféron pégylé et la ribavirine étaient les médicaments prescrits de préférence par le personnel médical, sans suivre les schémas de recommandations internationales

4. Discussion et conclusion

Entre 2010 et 2016, près de 2000 patients diagnostiqués dans les structures publiques ou privées dans le pays sont venus au CILM pour la détermination de leur CV. Ce chiffre ne reflète pas la prévalence de la maladie, car il n'y a pas de dépistage systématique du VHC dans population générale.

Tous les patients qui se sont présentés au CILM ont reçu un diagnostic d'anti-VHC (+) avec des tests de diagnostic rapide mais d'efficacité douteuse d'après notre expérience [Paboriboune et al. 2018, (62)]. Ce diagnostic a été établi lors de bilans de santé de routine ou de consultations spécialisées en gastro-entérologie.

Plus de 70% des patients ont une CV élevée avec des taux d'ASAT et d'ALAT anormaux. Parmi ces patients moins de 20% patients ont été traités avec des traitements antiviraux qui ne font pas partie des recommandations de l'OMS.

Nous recommandons qu'une politique de dépistage démographique et qu'une meilleure prise en charge des patients soient mises en œuvre d'urgence dans le pays, dans le respect des directives officielles afin d'optimiser la réduction de la charge des maladies liées au VHC. Toutefois, le coût des analyses biologiques et du traitement sont des obstacles importants qui doivent être pris en considération. Des résolutions en matière de santé publique devraient être immédiatement appliquées dans la perspective de respecter l'échéance fixée par l'OMS pour l'élimination du VHC d'ici 2030.

Article 3. "Hepatitis C in Laos: A Seven-Year Retrospective Study on 1765 Patients "

L'article est présenté ci-dessous *in extenso* dans sa forme originale.

L'article est disponible en libre accès à l'adresse internet suivante :

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29948850>



Hepatitis C in Laos: A 7-Year Retrospective Study on 1765 Patients

Phimpha Paboriboune¹ · Thomas Vial² · Philavanh Sitbounlang¹ · Stéphane Bertani² · Christian Trépo³ · Paul Dény^{3,4} · Francois-Xavier Babin⁵ · Nicolas Steenkeste⁵ · Pascal Pineau⁶ · Eric Deharo²

Received: 20 April 2018 / Accepted: 25 May 2018
© Wuhan Institute of Virology, CAS and Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) is a global health concern, notably in Southeast Asia, and in Laos the presentation of the HCV-induced liver disease is poorly known. Our objective was thus to describe a comprehensive HCV infection pattern in order to guide national health policies. A study on a group of 1765 patients formerly diagnosed by rapid test in health centres was conducted at the Centre of Infectiology Lao Christophe Merieux in Vientiane. The demographic information of patients, their infection status (viral load: VL), liver function (aminotransferases) and treatments were analysed. Results showed that gender distribution of infected people was balanced; with median ages of 53.8 for men and 51.6 years for women (13–86 years). The majority of patients (72%) were confirmed positive (VL > 50 IU/mL) and 28% of them had high VL (> 6log₁₀). About 23% of patients had level of aminotransferases indicative of liver damage (> 40 IU/mL); but less than 20% of patients received treatment. Patients rarely received a second sampling or medical imaging. The survey also showed that cycloferon, pegylated interferon and ribavirin were the drugs prescribed preferentially by the medical staff, without following any international recommendations schemes. In conclusion, we recommend that a population screening policy and better management of patients should be urgently implemented in the country, respecting official guidelines. However, the cost of biological analysis and treatment are significant barriers that must be removed. Public health resolutions should be immediately enforced in the perspective of meeting the WHO HCV elimination deadline by 2030.

Keywords Hepatitis C virus (HCV) · HCV incidence · Antiviral agents · Laos

Introduction

Infection with Hepatitis C virus (HCV) is one of the major causes of death and morbidity especially in low and middle income countries (Stanaway *et al.* 2016). According to Lim *et al.* (2017) the prevalence of Hepatitis C in the general population ranges from 0.1% to 4.7% in the Asia–Pacific region. In Laos, among Vientiane Capital blood donors, the prevalence of anti-HCV is 1.1% (Jutavijittum *et al.* 2007). Overall, the epidemiology of Hepatitis C remains poorly defined in Laos, despite its location in the centre of the HCV genotype-6 distribution area (Lee *et al.* 2017). Most notably, it is unknown in Laos whether HCV-infected patients correspond to an age-driven or are merely the result of on-going HCV transmission.

Chronic infection with HCV is a well-recognized risk factor for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Therefore it is important to (1) detect and (2) carefully follow infected subjects to propose adequate disease management. For this purpose, the Centre d'Infectiologie

✉ Eric Deharo
eric.deharo@ird.fr

¹ Centre d'Infectiologie Lao-Christophe Merieux,
3888 Vientiane, Laos

² UMR 152 PHARMADEV, IRD, Université de Toulouse,
UPS, 31062 Toulouse, France

³ INSERM U1052, CNRS, UMR 5286, Cancer Research
Centre of Lyon, 69008 Lyon, France

⁴ Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Hôpitaux
Universitaires Paris Seine Saint Denis, 93000 Bobigny,
France

⁵ Fondation Mérieux, 69002 Lyon, France

⁶ INSERM U993, Institut Pasteur Unité "Organisation
Nucléaire et Oncogénèse", 75015 Paris, France

Lao-Christophe Mérieux (CILM) in Vientiane capital has been receiving patient samples since 2010. In the present study, we examined the course of HCV infection in 1765 patients who attended CILM between January 2010 and November 2016. Several parameters, such as gender, age, treatment allocation, HCV RNA viral load (VL) and liver damage [through aspartate (AST) and alanine aminotransferases (ALT) serum levels] were assessed. The ultimate aim of our work was to better characterize key epidemiologic features of HCV infections in Lao population and to identify unforeseen high-risk groups that should be primarily targeted by proactive screening campaigns.

Our results aim to help health authorities to apply cost-effective prevention and treatment measures to resolve the HCV infection burden as recommended by the World Health Organization in its 2030 agenda for sustainable WHO (2017).

Materials and Methods

Sample Collection

The study was conducted retrospectively by analysing the data of 1765 individuals positive for anti-HCV visiting CILM between January 2010 and November 2016. Anti-HCV antibody detection was performed using rapid point-of-care diagnostic tests according to manufacturer instructions in hospitals and private clinics before patients arrived at CILM. Patients never came to CILM on their own initiative; they were diagnosed in health care centres during routine health check-ups or during specialized consultations related to symptoms they experienced. Patients' blood was collected on EDTA, plasma harvested and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior further analysis. Age, gender, geographic origin, aspartate (AST) and alanine (ALT) aminotransferases serum levels, and treatments were registered.

Viral Load Determination

VL determination was performed through Multiplex Real-Time PCR by TaqMan[®] technology (Biorad, France) with a detection threshold of 50 IU/mL (see <http://www.fast-trackdiagnostics.com/> for details).

Aminotransferases Quantification

ALT and AST concentrations were measured on HumaStar 600 machine (CoreLab, Germany), according to manufacturer's instructions. De Ritis ratio (De Ritis *et al.* 2006) or AST/ALT ratio was also calculated as in chronic liver disease, and especially in case of infection with HCV, as

when the ratio is even slightly above 1.0 (e.g. 1.09) it often correlates with the presence of fibrosis.

Statistics

Data were inputted using Microsoft Excel software (14.4.7) and analysed with Minitab software (17.3.1). Comparisons between groups (numerical data) or proportions (categorical data) were performed using Student's *t*-test, Fisher's exact test, Chi squared test, ANOVA or non-parametric tests (e.g. Mann-Whitney, Kruskal-Wallis), as appropriate. Two-sided *P*-values lower than 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Samples

Our laboratory has received a total of 3102 blood samples, corresponding to 1765 different individuals seropositive for anti-HCV between January 2010 and October 2016 previously diagnosed through rapid tests in health care structures (see Tables 1 and 2 for details). A large majority of patients ($n = 1233$; 70%) had a single viral load measurement, while 220 (12%) had two, 129 (7.3%) had three VL tested and the others more than 3 (one patient had been tested 18 times). At the beginning of the activity of CILM in 2010, only 44 patients were received annually (Fig. 1). Then the number of patients increased to 378 in 2015 and the number of collected samples was about 2 times greater. Since 2013 the number of patients and samples have been almost stable.

Whole Group and Sub-Groups Configuration

The 1765 patients who presented at the CILM for VL measurement were sub-divided into 3 sub-groups: true positive (the largest group with 1278 people), true negative treated and not treated (487) and true negative not treated (407). The sex-ratio of the whole group of patients (and also of true positive and true negative non-treated) was 1.2. The age ranged from 13 to 86 years, with median ages of 53.8 for men and 51.6 years for women ($P = 0.006$). Patients with an on-going infection (true positive) were displaying higher median values for aminotransferases ($P < 0.0001$) than negative patients. A subset of 407 naïve patients (28.4%) were negative for HCV RNA (called "true negative and non-treated" in Table 1). These naïve patients could reflect the natural course of HCV infection in Lao populations with spontaneous cleared infection (if any). However, among this sub-group, 42 benefited from a second VL measurement and 7 (16.7%) of them turned out to

Table 1 Global results on the whole group and sub-groups.

At first sampling	Number of patients	Sex ratio	Median age of men	Median age of women	Mean VL log ₁₀	Number of patients with VL > 6	Median AST IU/ml.	AST > 40	Median ALT IU/ml.	Number of patients with AST and ALT > 40	Number of treated patients
Whole cohort	1765	1.2	53.8*	51.6*	4.04 ± 2.7	487 (28%)	55 (n = 620)	405 (23%)	55 (n = 615)	349 (19%)	329 (18%)
True positive	1278	1.2	53.3*	51.5*	5.6 ± 1.4	487 (38%)	60 (n = 468)	327 (70%)	59 (n = 464)	285 (61%)	249 (19%)
True negative (treated and not)	487	1.2	51.6	50.4	-	-	41 (n = 152)	78 (51%)	42 (n = 151)	64 (42%)	80 (16%)
True negative (not treated)	407	1.08	49	48.4	-	-	42 (n = 127)	65 (51%)	41 (n = 126)	52 (41%)	-

*Statistical difference ($P < 0.001$)

have VL > 50 IU/mL suggesting that HCV loads were possibly oscillating around detection threshold in a sizable proportion of patients. Individuals with apparent spontaneous recovery at initial sampling were significantly younger than RNA(+) patients (48.4 ± 12.7 vs. 52.4 ± 11.3 ; $P < 0.0001$). No gender difference was noticed in this sub-group. Remarkably, despite the absence of circulating HCV genomes, 41.0% (n = 52) of HCV RNA(-) subjects tested for aminotransferases displayed levels above the upper limit of normal.

Treated Patients

Treatment prescription reflected the availability of drugs in Laos and economic status of the patients; as a result, international guidelines were seldom followed by the prescribing physicians.

Ten drugs were used in mono to quadruple therapy (Table 3). In total, 329 patients (18.7% of the whole group) received an antiviral treatment including a subset of 80 (24.4%) subjects negative for HCV RNA(-) who were receiving or had already received antiviral treatment at the time of initial VL determination (Tables 1 and 2). We then compared treated individuals (those with confirmed presence of the virus), who had been cured of the virus with those patients who remained chronically infected. Gender distribution was somewhat skewed towards men in patients who displayed a sustained viral response to treatment, albeit without reaching the level of significance ($P = 0.0906$, ns). As for untreated patients, disappearance of HCV RNA in treated patients was the characteristic of younger age (49.8 ± 11.1 vs. 52.6 ± 9.3 , $P = 0.031$).

The De Ritis ratio (AST/ALT ratio) was similar in RNA(+) and RNA(-) groups with 38% of the latter displaying a value above 1.1, indicative of significant liver fibrosis.

When we considered treatments received, we observed that patients who had recovered from viral infection received Pegylated interferon significantly more often than other drugs.

Among infected patients, VLs were significantly higher in treated than in naive patients (6.4 ± 1.7 vs. 5.4 ± 1.3 , $P < 0.0001$). Furthermore, an important subset (64.3%) of treated patients had VL > 6 log₁₀, a threshold considered by some Asian authors as a predictor for liver disease progression (Noh et al. 2016). This rate was significantly lower in treated naive patients (31.8%, $P < 0.0001$). Concerning liver damage, treated patients displayed decreased enzyme values when compared with untreated ones.

Table 2 Compared characteristics of the whole group of patients and HCV RNA ± sub-groups.

	Whole group n = 1765									
	HCV RNA(-) n = 487					HCV RNA(+) = 1278				
	Untreated n = 407	Treated n = 80	Naive (never treated before and after) n = 1029	Treated n = 249	Treated before VL n = 118	Treated after 1 st VL n = 95	Treated before transmissives n = 65	Treated after transmissives n = 39		
Sex ratio M:F	1.21 (267/220)	1.10 (213/194)	1.18 (556/473)	1.31 (141/108)	1.15 (63/55)	1.26 (53/42)	0.97 (32/33)	1.60 (24/15)		
Age										
Mean ± SD	48.7 ± 12.5	48.4 ± 12.7	49.8 ± 11.1	52.6 ± 9.3	53.0 ± 9.4	51.8 ± 9.1	51.7 ± 8.5	52.5 ± 8.4		
Median (range)	50.6 (13-85)	50.4 (13-85)	51.3 (18-73)	53.4 (19-78)	53.5 (22-78)	52.6 (19-70)	53.3 (30-69)	52.3 (33-65)		
HCV RNA load (log ₁₀ IU/mL)	<5.0	<5.0	<5.0	>5.0	>5.0	>5.0	>5.0	>5.0		
Mean ± SD	na	na	na	6.4 ± 1.7	6.3 ± 1.8	6.5 ± 1.6	6.3 ± 1.8	6.3 ± 1.2		
Median (range)	na	na	na	6.5 (2.0-15.3)	6.4 (2.1-14.9)	6.6 (2.0-15.3)	6.4 (3.3-15.3)	6.6 (2.0-8.0)		
VL > 6log ₁₀ (in %)	na	na	na	64.3	60.2	68.4	60	71.8		
Delay between ARV and VL [1] or transmissives [2] (days)	na	na	na	na	[1]	[1]	[2]	[2]		
Mean ± SD	na	na	na	na	271 ± 401	108 ± 185	402 ± 470	262 ± 383		
Median (range)	na	na	na	na	106 (1-2601)	42 (0-1182)	208 (0-1983)	92 (1-1765)		
AST (IU/mL)	(n = 152)	(n = 127)	(n = 25)	(n = 108)	(n = 44)	(n = 23)	(n = 65)	(n = 39)		
Mean ± SD	73 ± 127	72 ± 133	78 ± 91	89 ± 107	91 ± 112	93 ± 58	76 ± 96	111 ± 125		
Median (range)	41 (2-1413)	41 (2-1413)	43 (12-430)	58 (11-770)	54 (11-710)	84 (22-253)	41 (11-710)	79 (22-770)		
ALT (IU/mL)	(n = 151)	(n = 126)	(n = 25)	(n = 104)	(n = 42)	(n = 23)	(n = 65)	(n = 39)		
Mean ± SD	74 ± 118	75 ± 125	69 ± 73	76 ± 58	75 ± 57	95 ± 73	68 ± 53	89 ± 64		
Median (range)	42 (5-933)	42 (5-933)	40 (10-311)	50 (13-293)	56 (13-254)	50 (29-293)	47 (13-254)	60 (25-293)		
De Ritis ratio	(n = 151)	(n = 126)	(n = 25)	(n = 104)	(n = 42)	(n = 23)	(n = 65)	(n = 39)		
Mean ± SD	1.2 ± 1.2	1.2 ± 1.3	1.3 ± 0.9	1.2 ± 0.8	1.2 ± 0.7	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.6	1.3 ± 1.1		
Median (range)	1.0 (0.1-12.8)	1.0 (0.1-12.8)	1.1 (0.4-5.3)	1.0 (0.4-7.1)	1.0 (0.4-4.4)	1.1 (0.5-2.5)	1.0 (0.4-4.4)	1.1 (0.4-7.1)		
Treated patients (in %)	16.4	na	100	100	100	100	100	100		
Cycloferon (%)	2.7	na	16.3	47	58.5	40.0	55.4	38.5		
Ribavirin (%)	6.2	na	37.5	47	40.0	54.7	60.0	51.3		
Pegylated interferon (%)	8.4	na	51.3	28	17.8	37.9	24.6	30.8		
Monotherapy	na	na	56 (70%)	145 (58%)	83 (70%)	41 (43%)	34 (52%)	22 (56%)		

Table 2 (continued)

Whole group n = 1765		HCV RNA(+) n = 1278												
HCV RNA(-) n = 487		Naive (never treated before and after) n = 1029		Treated n = 249		Treated before VL n = 118		Treated after 1 st VL n = 95		Treated before transaminase n = 65		Treated after transaminase n = 39		
All n = 487	Untreated n = 407	Treated n = 80	na	na	95 (38%)	6 (3%)	3 (1%)	3 (1%)	50 (53%)	2 (2%)	2 (2%)	28 (43%)	2 (3%)	1 (3%)
Dual therapy	na	21 (26%)	na	na	21 (38%)	3 (1%)	0	0	2 (4%)	2 (2%)	2 (2%)	1 (3%)	1 (3%)	1 (3%)
Triple therapy	na	3 (4%)	na	na	3 (5%)	3 (1%)	0	0	2 (2%)	2 (2%)	2 (2%)	1 (3%)	1 (3%)	1 (3%)
Quadruple therapy	na	0	na	na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Impact of Treatment as Seen on VL and Transaminases

Among the 249 HCV RNA(+) treated patients (detailed in Table 2), 108 have AST and 104 have ALT measurements; 65 patients were treated before aminotransferases determination and 39 were treated subsequently. AST and ALT medians were significantly lower (respectively $P = 0.005$ and $P = 0.026$) when the treatment was received before transaminases evaluation. Among the 39 patients treated after the first transaminase sampling, 17 had a second determination after treatment. Only the AST median was significantly lower after treatment ($P = 0.014$). However, time intervals between samplings were extremely variable and this group rather small. A group of 197 infected treated patients had 2 serial VL determinations (data not shown). We observed in them a significant decrease of the mean and median VL ($P < 0.0001$), but there was no difference between therapeutic schemes regarding the magnitude of VL decrease.

58% of this group received monotherapy with acridone-acetic acid (Cycloferon) predominantly employed. Therefore we compared Cycloferon impact on VL in patients who received it in mono or dual therapies (Table 4). We noticed that the viral response to Cycloferon was stronger when monotherapy was used ($P = 0.0001$).

We also analysed the impact of dual therapy on true positive patients with 2 samplings. A subset of 88 patients received dual therapy: 31 ribavirin + Cycloferon (group 1), 30 ribavirin + Pegasys (group 2) and 27 "others" (group 3). We found that VL were more strongly impacted in group 2, while groups 1 and 3 were similar (same decrease of the VL) $P < 0.0001$.

The global impact of monotherapy versus dual therapy on VL was also assessed. We observed that there was no difference between these therapeutic schemes regarding viral response.

Evolution of Medications Administered to Patients

As shown in Fig. 2, 10 different medicines were used between January 2010 and November 2016. The drug classes included adenosine analogues (adefovir and tenofovir), guanosine analogue (ribavirin), cytidine analogue (lamivudine), immunostimulant (cycloferon), and Interferon-like (Interferon, Pegasys), NS5A replication complex inhibitors (ledipasvir, daclatasvir) and nucleoside NS5B polymerase inhibitors (sofosbuvir). Ribavirin, cycloferon and pegasys were the most prescribed drugs; they peaked in 2012, 2014 and 2015 respectively. The least used drug was sofosbuvir.

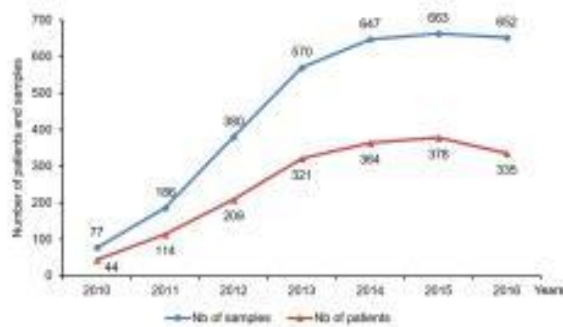


Fig. 1 Number of patients received (blue line) and samples processed at CILM (orange line) from January 2010 to November 2016.

Discussion

In recent years, worldwide, almost half of the patients with HCC have been diagnosed positive for HCV (Chassagne *et al.* 2016; El-Serag and Mason 1999). This has been confirmed in a study we conducted at the Calmette hospital in Cambodia on around 500 patients, where HCV was associated with half the cases of HCC, with higher prevalence in women (Chassagne *et al.* 2016). In Laos, comprehensive epidemiological data are lacking but those

obtained by Jutavijittum *et al.* (2007), aggregated to ours, are a source of concern. Between 2010 and 2016, nearly 2000 patients diagnosed in Lao public or private health care structures came to CILM for the determination of their VL. Of course, this figure does not reflect the prevalence of the disease, as there is no systematic screening for HCV in the Lao population. Patients usually come to be diagnosed at CILM following the advice of a physician. The cost of HCV viral load measurement is around 45 USD in Vientiane, which is a substantial amount of money for most people in the country (minimum salary is 111 USD per month). It is probable that such expense may deter many Lao people to visit diagnostic laboratories. Overall, the fact that HCV infection is commonly associated with low income status both in developed and developing countries implies that the problem in Lao PDR is much more serious than the situation we can describe with the evidence at our disposal (Mahajan *et al.* 2017; Alter *et al.* 1994).

Nevertheless, the number of patients attending CILM to control their HCV RNA VL increased constantly from 2010 to 2016. This increase could reflect increased economic status of the patients, the effectiveness of public health prevention campaigns for hepatitis, the high repute of the CILM (meaning that less patients cross the border to

Table 3 Percentages of drugs used in mono, multi therapy and all together.

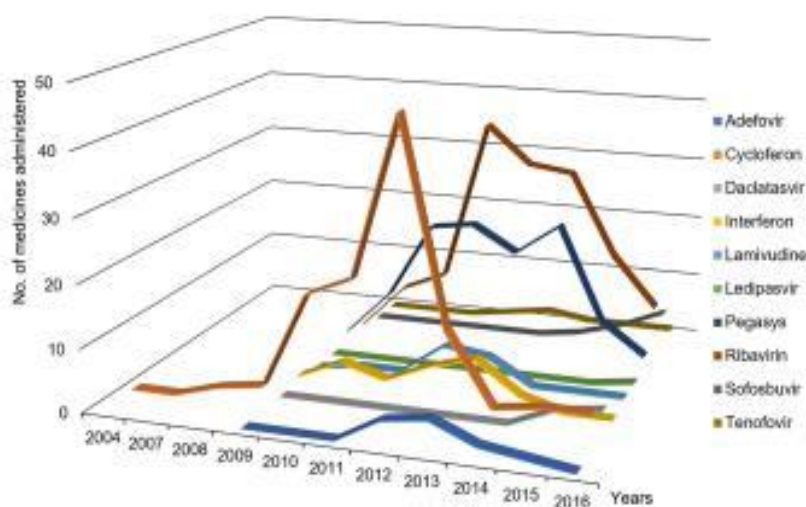
Drugs	All therapeutic schemes		Mono therapy		Dual therapy		Triple therapy		Quadruple	
	Nb used	%	Nb used	%	Nb used	%	Nb used	%	Nb used	%
Adefovir	13	2.8	11	3.3	2	1.6	-	-	-	-
Cycloferon	131	27.8	103	31.3	26	20.3	2	16.7	-	-
Daclatasvir	8	1.7	-	-	7	5.5	1	8.3	-	-
Interferon	23	4.9	16	4.9	5	3.9	-	-	2	66.7
Lamivudine	17	3.6	12	3.6	5	3.9	-	-	-	-
Ledipasvir	1	0.2	-	-	1	0.8	-	-	-	-
Pegasys	113	23.9	96	29.2	13	10.2	4	33.3	-	-
Ribavirin	149	31.6	77	23.4	66	51.6	5	41.7	1	33.3
Sofosbuvir	10	2.1	9	2.7	1	0.8	-	-	-	-
Tenofovir	7	1.5	5	1.5	2	1.6	-	-	-	-

Table 4 Comparison of the medians of VL at first sampling (1) and second sampling (2) in true positive treated patients with (+) or without (-) cycloferon in monotherapy versus dual therapy.

Drugs	Monotherapy (n = 101)		Dual therapy (n = 88)	
	Median 1 log ₁₀	Median 2 log ₁₀	Median 1 log ₁₀	Median 2 log ₁₀
Cycloferon+	6.57 (n = 41)	5.45 (n = 41)	6.69 (n = 39)	5.27 (n = 39)
Cycloferon-	6.11 (n = 60)	5.02 (n = 60)	6.52 (n = 49)	Negative (n = 49)

True positive treated patients, n = 197 true positive and receiving treatment before or after first VL; dual therapy, in total 459 patients were true positive with 2 samplings; cycloferon, the most used drug in the study.

Fig. 2 Evolution of medications administered to patients received at CILM between January 2010 and November 2016 (all therapies cumulated when the date of treatment is known).



be diagnosed in Thailand), or last but not least because the hepatitis epidemic is spreading in the country.

All patients presenting at CILM were diagnosed anti-HCV(+) using rapid point-of-care tests with questionable efficacy according to our experience (Paboriboune *et al.* 2018). This diagnosis was established during routine health check-ups or specialized gastroenterology consultations. Patients never come to CILM on their own initiative.

Among them 18.6% had undetectable virus. In the small subset of initially HCV RNA(-) patients tested twice, a substantial proportion (16.7%) turned out to be actually infected with HCV. Thus, a sizeable subset of anti-HCV(+)/RNA(-) was, in fact, positive. This observation questions the sensitivity of the initial analysis that was performed in the presence of undetectable VL according to our standards but could also reflect the fluctuation of the viral load. Moreover, despite the absence of circulating HCV genomes, a large section among the untreated anti-HCV(+)/RNA(-) subjects displayed increased levels of AST and ALT > 40 with a De Ritis ratio value above 1.1 considered as a predictor of liver fibrosis. This suggests that additional liver injury such as chronic high alcohol intake, occult B infection or infection by liver flukes commonly found in Laos were actually on-going in these patients (Sripa *et al.* 2012).

The significance of the VL is source of debate as oscillation in HCV RNA levels has been reported as a “stamp” of the viral dynamics in the early stages of HCV infection, and was described by some investigators as a “yo-yo” pattern (Aberle *et al.* 2006; Smith *et al.* 2010). We also observed this phenomenon in patients who had multi samplings. Noh *et al.* (2016) showed that the cumulative risk of HCC development was higher in patients with high titer of HCV RNA than patients with low

titer. These authors also stated that VL is “high” when > 6log₁₀. In our hands 27% of patients have VL > 6 log₁₀ and among them 105 patients have VL > 6 log₁₀ associated with liver injury evidenced by AST and ALT > 40 IU/mL (6% of the whole group of patients). A subset of 38 patients among the 105, received treatments (36% of this sub-group i.e. only 3% of the RNA(+) group). According to Botros and Sikari (2013) the De Ritis ratio reflects the time course of acute viral hepatitis and is generally a vital clue to the patient’s prognosis. We found that 218 patients who had one sampling had high fibrosis risk (AST/ALT = 1.09–2.0), but only 46 received treatments. We also observed that 39 patients had acute viral hepatitis flares (AST/ALT > 2.0) but only 10 received treatments (with means AST around 200 and ALT > 50 IU/mL). Only 74 on 615 patients had a second sampling and AST/ALT measured; 50% of them scored > 1.09, and less than 1/3 were treated.

Some authors have demonstrated that HCV genotype 1b was more often related to the development of HCC than non-1b genotypes (Ishiguro *et al.* 2011). Unfortunately, we did not have the opportunity to perform genotyping on the sample-set described herein. Nevertheless, it could be considered that genotype determination could soon become obsolete since drugs such as Sofosbuvir (and many other direct-acting antivirals) are effective on all known genotypes (Linas *et al.* 2015). The cost of these therapies is, however, shamefully prohibitive for the vast majority of infected people in the world. Fortunately, affordable alternatives exist (although less effective than Sofosbuvir, used in only 2.1% of patients in this study).

Ten different medicines and four therapeutic schemes (mono, dual, triple, and quadruple therapy) were used. Curiously, we observed that anti-hepatitis B antivirals were

prescribed to a small subset of HCV patients ($n = 37$). This may be due to the fact that hepatitis B is much more frequent in Laos than HCV and that medical staff prescribe drugs in a probabilistic manner when they consider the treatment necessary.

Ribavirin, Cycloferon and Pegasys were the most prescribed drugs of all therapies. Nonetheless only 30 patients received the WHO-validated therapeutic scheme (Ribavirin + Pegasys) with 2 samplings to ascertain the efficacy of the therapy (WHO 2014). As expected, we showed in these cases that the combination was effective on the VL.

Ribavirin is part of the World Health Organization's list of essential medicines (WHO 2016). It has been extensively used in dual therapy (51.6%) but for unknown reason we found that its use was declining since 2012. Cycloferon is considered as an early inductor of types 1 and 2 Interferons. This particularly cheap medicine (10 US\$/month) is imported from Russia into Laos and was the most used drug in monotherapy scheme. It was used extensively when Russian clinicians were present in the public health system. Pegasys (Pegylated interferon alfa-2a) has been used in a stable and continuous manner since 2011, and was almost as used as Cycloferon in monotherapy schemes. The other drugs were used in less than 5% of all therapeutic schemes (direct acting antivirals, Sofosbuvir and Ledipasvir were used in only 11 patients).

A meta-analysis of controlled trials has shown that antiviral therapy reduced the rate of HCC development in patients with liver cirrhosis (Craxi and Cammà 2005). Moreover, it has been shown that in patients with chronic hepatitis C (with normal aminotransferases level) interferon therapy improves liver histology (Voronkova *et al.* 2002). It is then of utmost importance to make "curative" drugs affordable to infected patients and to encourage physicians to follow international guidelines as soon as possible in Laos.

Nevertheless, we showed that among true positive patients who were treated and sampled twice, those receiving monotherapy had a greater VL decrease than those treated with dual therapy. This is in contradiction with the therapeutic schemes recommended by the World Health Organization who advocate for a combination of Interferon and Ribavirin, effective against all the genotypes of HCV (WHO 2014).

Our results also suggest that the use of Cycloferon should be examined in combination. In other studies it was shown to increase other antiviral drugs' efficacy, providing earlier normalization of clinical and biochemical parameters; it reduces the incidence and degree of adverse reactions and increases the quality of life in treated patients (Romantsov *et al.* 2008, 2010; Sologub *et al.* 2010; Malyi *et al.* 2013). Last but not least it is economically

sustainable in a country like Laos. Therefore, clinical trials should be conducted in Laos to re-define the most effective and affordable drugs to be recommended by health authorities, including Cycloferon.

The biological follow-up of patients should be also updated. As a matter of fact, meta-analysis regression demonstrated that advanced stages of fibrosis were significantly correlated with platelet count, AST/ALT ratio and AFP levels but there was no correlation with viral load. Fanning *et al.* (1999) observed correlation between VL and the degree of inflammation while they did not detect any correlation between VL and the degree of fibrosis nor between serum viral load and ALT, although there was a correlation between ALT and the degree of inflammation. Su *et al.* (2009) showed that 42% of patients achieving sustained virological response following peg-interferon alpha and ribavirin therapy showed delayed biochemical normalization (persistently abnormal transaminase levels). Delayed biochemical response was associated with the baseline hepatic fibrosis stage and liver cirrhosis. All these data suggest that we should consider other alternatives to VL for the follow-up of HCV infected patients. According to Durante-Mangoni *et al.* (2013), hepatitis C virus core antigen (HCVcoreAg) levels are significantly correlated with HCV-RNA, ALT levels and liver necroinflammatory activity. Although these findings must be confirmed by additional studies, the determination of HCVcoreAg could be useful for the monitoring of chronic hepatitis C patients in the future.

In conclusion, it is urgent to challenge on-going diagnostic and therapeutic strategies in Lao PDR, with better follow-up of patients, in order to optimize the reduction in the burden of HCV-related diseases. Field studies should be conducted to determine the routes of infection in the Lao population, which population groups are the most vulnerable and why preventive campaigns have failed in some areas of the country.

Acknowledgements We would like to express our sincere thanks to medical staff and patients. Phimpha Paboriboune was supported by CILM, Institut de Recherche pour le Développement, Campus France and the Fondation Mérieux. We are grateful to Elizabeth Elliott for editing assistance.

Author Contributions P. Paboriboune, TV, PS, ED made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data. SB, CT, PD, FXB, NS, P. Pineau were involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Animal and Human Rights Statement The study was approved by the Ethic Committee of the National Authority. All participants provided written informed consent. Written consents were obtained from all children's parents involved in the study.

References

- Aberle JH, Formann E, Steindl-Munda P, Weseslindtner L, Garguta C, Persstinger G, Grilnberger E, Laferl H, Dienes HP, Popow-Kraupp T, Ferenci P, Holzmann H (2006) Prospective study of viral clearance and CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection. *J Clin Virol* 36:24–31
- Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS (1994) The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 341:556–562
- Botros M, Sikaris KA (2013) The De Ritis ratio: the test of time. *Clin Biochem Rev* 34:117–130
- Chassagne F, Rojas Rojas T, Bertani S, Bourdy G, Eav S, Ruiz E, Pineau P, Deharo E (2016) A 13-year retrospective study on primary liver cancer in Cambodia: a strikingly high hepatitis C occurrence among hepatocellular carcinoma cases. *Oncology* 91:106–116
- Craxi A, Cammà C (2005) Prevention of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 9:329–346
- De Ritis F, Coltoresi M, Giusti G (2006) An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis: the transaminase serum activities. *Clin Chim Acta* 369:148–152
- Durante-Mangoni E, Vallefucio L, Sorrentino R, Iossa D, Perna E, Molaro R, Braschi U, Zampino R, Sodano G, Adinolfi LE, Utili R, Portella G (2013) Clinico-pathological significance of hepatitis C virus core antigen levels in chronic infection. *J Med Virol* 85:1913–1918
- El-Serag HB, Mason AC (1999) Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 340:745–750
- Fanning L, Kenny E, Sheehan M, Cannon B, Whelton M, O'Connell J, Collins JK, Shanahan F (1999) Viral load and clinicopathological features of chronic hepatitis C (1b) in a homogeneous patient population. *Hepatology* 29:904–907
- Ishiguro S, Inoue M, Tanaka Y, Mizokami M, Iwasaki M, Tsugane S (2011) JPHC Study Group. Impact of viral load of hepatitis C on the incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based cohort study (JPHC Study). *Cancer Lett* 300:173–179
- Jutavijitum P, Yousukh A, Samouny B, Samouny K, Oanavong A, Thanavavong T, Keokhamphue J, Toriyama K (2007) Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections among Lao blood donors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38:674–679
- Lee MH, Hsiao TL, Subramaniam SR, Le AK, Vu VD, Trinh HN, Zhang J, Jin M, Wong VWS, Wong GL-H, Nguyen MH (2017) HCV genotype 6 increased the risk for hepatocellular carcinoma among Asian patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 112:1111–1119
- Lim SG, Aghemo A, Chen P-J, Dan YY, Gane E, Gani R, Gish RG, Guan R, Jia JD, Lim K et al (2017) Management of hepatitis C virus infection in the Asia-Pacific region: an update. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2:52–62
- Linás BP, Barter DM, Morgan JR, Pho MT, Leff JA, Schackman BR, Horsburgh CR, Assoumou SA, Salomon JA, Weinstein MC, Freedberg KA, Kim AY (2015) The cost-effectiveness of sofosbuvir-based regimens for treatment of hepatitis C virus genotype 2 or 3 infection. *Ann Intern Med* 162:619–629
- Mahajan R, Midha V, Goyal O, Mehta V, Narang V, Kaur K, Singh A, Singh D, Bhanot R, Sood A (2017) Clinical profile of hepatitis C virus infection in a developing country-India. *J Gastroenterol Hepatol* 33:926–933
- Malyi VP, Pen'kov DV, Chiriukina OI (2013) Cycloferon therapy of acute and chronic virus hepatitis C. *Antibiot Khimioter Antibiot Chemoter Sic* 58:34–40 (in Russian)
- Noh R, Lee DH, Kwon BW, Kim YH, Kim SB, Song IH (2016) Clinical impact of viral load on the development of hepatocellular carcinoma and liver-related mortality in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterol Res Pract* 2016:7476231
- Paboriboune P, Vial T, Chassagne F, Sitbounlang P, Soundala S, Bertani S, Sengmanothong D, Babin F-X, Steenkeste N, Dény P, Pineau P, Deharo E (2018) A seven-year retrospective study on the surveillance of hepatitis B in Laos. *Int J Hepatol*. <https://doi.org/10.1155/2018/9462475>
- Romantsov MG, Kovalenko SN, Sologub TV, Anikina OV (2008) Immunomodulators in the 'gold standard' of the chronic viral hepatitis C therapy. *Antibiot Khimioter* 53:18–22 (in Russian)
- Romantsov MG, Kremen' NV, Sologub TV (2010) Use of immunomodulators in the therapy of chronic hepatitis C: improving standard approach. *Eksp Klin Farmakol* 73:14–17 (in Russian)
- Smith J, Aberle JH, Fleming VM, Ferenci P, Thomson EC, Karayiannis P, McLean AR, Holzmann H, Klennerman P (2010) Dynamic coinfection with multiple viral subtypes in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 202:1770–1779
- Sologub TV, Romantsev MG, Shul'diakov AA, Lin'kova IN, Radchenko VG, Kovalenko AL (2010) Efficiency of using cycloferon as part of combined therapy for chronic hepatitis C (a review of multicenter clinical trials). *Ter Arkh* 82:78–81 (in Russian)
- Sripa B, Brindley PJ, Mulvenna J, Laha T, Smout MJ, Mairiang E, Bethony JM, Loukas A (2012) The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*—multiple pathways to cancer. *Trends Parasitol* 28:395–407
- Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M, Fitzmaurice C, Vos T, Abubakar I, Abu-Raddad LJ, Assadi R, Bhalla N, Cowie B et al (2016) The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the global burden of disease study 2013. *Lancet* 388:1081–1088
- Su WP, Peng CY, Lai HC, Liao KF, Huang WH, Chuang PH, Chen CB, Jeng LB (2009) Persistent transaminase elevations in chronic hepatitis C patients with virological response during peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatogastroenterology* 56:798–801
- Voronkova NV, Blokhina NP, Kelli EI, Mikhailov MI, Malyshev NA (2002) Prospects for interferon therapy in chronic hepatitis C with normal transaminase levels. *Ter Arkh* 74:12–15 (in Russian)
- WHO (2014) Hepatitis C. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164_apr2014/en/. Accessed 20 April 2018
- WHO (2016) Model lists of essential medicines. <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>. Accessed 20 April 2018
- WHO (2017) Towards access 2030. http://www.who.int/medicines/publications/towards_access2030/en/. Accessed 20 April 2018

CHAPITRE-3 : RECHERCHE DE BIOMARQUEURS DE L'EVOLUTION DES HEPATITES VIRALES PAR METABOLOMIQUE

I. Partie-1 : Cancer du foie

1. Introduction

Le cancer primaire du foie comprend le carcinome hépatocellulaire (CHC), le cholangiocarcinome intrahépatique (CCA) et d'autres tumeurs rares, notamment le carcinome fibrolamellaire et l'hépatoblastome. La classification internationale des maladies (ICD, International Classification of Diseases) publiée par l'OMS distingue les différents types de tumeurs malignes du foie sur des critères histologiques (63):

- Le carcinome hépatocellulaire (CHC) (C22.0) touchant les hépatocytes
- Le cholangiocarcinome (CCA) (C22.1) touchant les cellules des canaux biliaires intrahépatiques
- L'hépatoblastome (C22.2) touchant des cellules embryonnaires du foie
- L'angiosarcome du foie (C22.3) touchant des cellules des vaisseaux hépatiques
- Les autres sarcomes du foie (C22.4)
- Les autres carcinomes du foie précisés (C22.7)
- Les tumeurs du foie, sans précision (C22.9)
- Les tumeurs malignes secondaires (métastases) ont été classées dans une catégorie à part (C78.7).

Dans la grande majorité des cas de cancers primitifs du foie, la forme histologique prédominante est le carcinome hépatocellulaire (CHC) (env. 85% des cas), suivi par le cholangiocarcinome (CCA) (env. 15% des cas). Les autres cas de tumeurs malignes hépatiques sont considérés comme rares, notamment le carcinome fibrolamellaire et l'hépatoblastome (64). Les caractéristiques moléculaires et cliniques du CHC et du CCA sont distinctes, mais ces affections présentent des facteurs de risque et des voies d'oncogenèse qui se chevauchent. Une meilleure compréhension des types cellulaires à l'origine du cancer du foie pourrait aider à explorer les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse et les options thérapeutiques (65).

2. Epidémiologie

Le cancer du foie est le 5^e type de cancer le plus fréquent chez les hommes et le 9^e chez les femmes. En 2018, les estimations portaient à 840 000 le nombre de nouveaux cas à l'échelon mondial. Les 25 premiers pays ayant les taux les plus élevés de cancer du foie en 2018 sont indiqués dans le tableau 5 ci-dessous [<https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/liver-cancer-statistics>].

Tableau 5 : Taux de cancer du foie dans le monde

La Mongolie présente le taux le plus élevé de cancer du foie en 2018, suivie de l'Égypte

Rang	Pays	Taux normalisé selon l'âge pour 100 000 habitants
1	Mongolie	93.7
2	Egypte	32.2
3	Gambie	23.9
4	Vietnam	23.2
5	Laos	22.4
6=	Cambodge	21.8
6=	Guinée	21.8
8	Thaïlande	21.0
9	Chine	18.3
10	Corée du Sud	17.3
11	Corée du Nord	16.5
12	Ghana	15.4
13	Liberia	15.2
14	Guatemala	14.9
15	Guam	14.8
16=	Moldavie	13.8
16=	Burkina Faso	13.8
18	Vanuatu	13.1
19	Sénégal	12.6
20	Singapore	12.3
21=	Papouasie Nouvelle Guinée	11.9
21=	Guinée-Bissau	11.9
23	Philippines	11.5
24	Mauritanie	11.3
25	Cap Vert	10.7

Les hommes représentent la population la plus touchée par le cancer du foie, puisqu'ils en sont 2 à 4 fois plus atteints que les femmes (66).

Le cancer du foie est principalement rencontré dans les pays du Sud, et plus particulièrement dans trois régions :

- Asie de l'Est (Chine, Corée du Nord, Corée du Sud, Japon, Taïwan)
- Asie du Sud-Est (Birmanie, Brunei, Cambodge, Indonésie, Laos, Malaisie, Philippines, Singapour, Thaïlande, Timor Oriental, et Vietnam)
- Afrique subsaharienne (regroupe 48 pays répartis sur le continent africain au sud du Sahara)

Près de 50% des nouveaux cas déclarés de cancer du foie dans le monde se trouvent en Chine, alors que l'Asie du Sud-Est arrive en seconde position avec 29.4% (22.2% pour les hommes et 7.2% pour les femmes) (67). La partie continentale de l'Asie du Sud-Est (Birmanie, Cambodge, Laos, Thaïlande, et Vietnam) est particulièrement exposée aux problèmes du cancer du foie (68) et présente les taux d'incidence et de mortalité les plus élevés des pays d'Asie du Sud-Est (69). En 2008, le cancer du foie représentait le 2^{ème} type de cancer le plus fréquent et la 2^{ème} cause de décès par cancer dans cette région.

Selon le Globocan¹, le cancer du foie au Cambodge représente la première cause de décès par cancer tous sexes confondus, et constitue le cancer le plus fréquent et le plus mortel chez les hommes. Au Laos, le cancer du foie serait le cancer le plus fréquent et le plus mortel toutes catégories de sexe et d'âge confondus.

Le fardeau du cancer du foie augmente à l'échelle mondiale, et il pourrait y avoir 1 million de cas d'ici 2030 (67).

3. Principaux facteurs de risque

A l'échelle mondiale, l'infection chronique par les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C représente le facteur de risque prédominant du carcinome hépatocellulaire, alors que l'infection par les parasites de la famille des Opisthorchiidae (*Opisthorchis viverrini* et *Clonorchis sinensis*) constitue le facteur de risque majoritaire du cholangiocarcinome. Cette dernière pathologie représente un risque particulièrement important au Laos car la consommation de poisson cru est une tradition solidement ancrée dans le pays (70). Au total, près de 80% des cancers du foie dans le monde sont causés par l'un de ces quatre agents infectieux (68, 71, 72).

D'autres facteurs de risque sont aussi responsables de l'apparition du cancer du foie, tel que l'alcoolisme chronique, les aflatoxines, les composés N-nitrosés, l'obésité, le diabète, les pesticides, le thorotrast (produit de contraste utilisé en radiodiagnostic), le tabac, les métaux lourds, les contraceptifs oraux, et certaines maladies hépatiques: cirrhose, stéatohépatite non alcoolique, hépatite auto-immune, cholangite sclérosante primitive, lithiase hépatique, maladie de Wilson (73, 74).

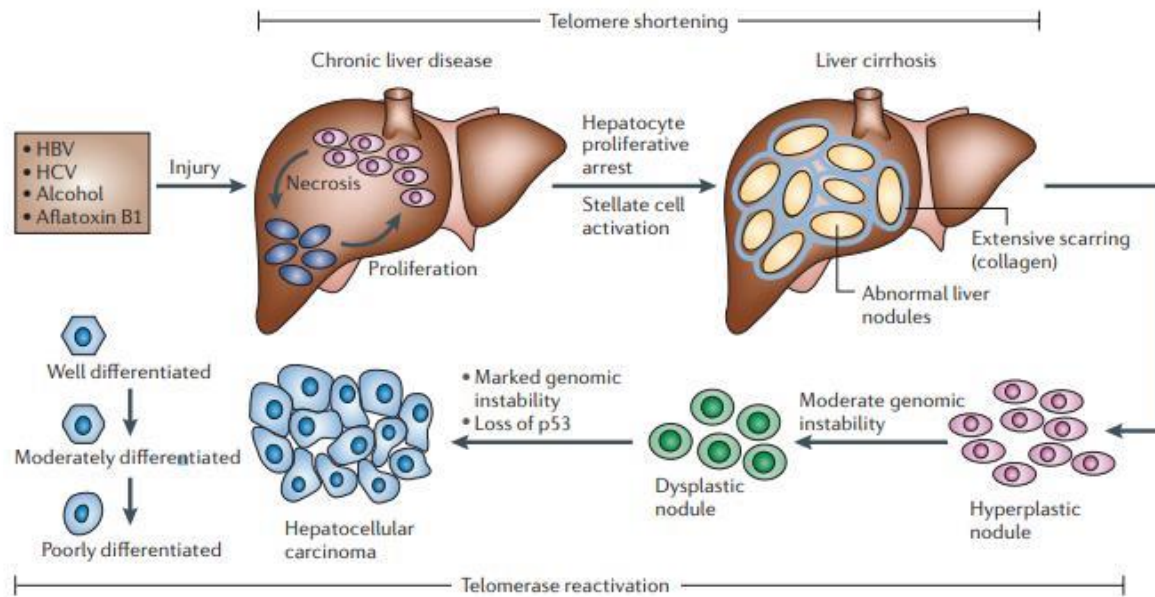
Les points communs sont indiqués en utilisant la même couleur. En plus de ces mécanismes, le virus de l'hépatite B (VHB) et l'aflatoxine B1 partagent la caractéristique d'affecter le génome - le VHB peut s'intégrer dans le génome hôte et l'aflatoxine B1 est un mutagène.

4. Pathogénèse du cancer du foie

L'hépatocarcinogénèse est un processus multifactoriel et séquentiel qui fait intervenir différents mécanismes selon le type de facteur de risque impliqué (VHB, VHC, aflatoxine, alcool). Ainsi, le virus de l'hépatite B induit le développement du carcinome hépatocellulaire par l'intermédiaire de voies directes et indirectes, puisqu'il est capable d'intégrer le génome de la cellule hôte et donc d'agir sur la croissance et la signalisation des cellules. Par contre, le virus de l'hépatite C n'intègre pas le génome de la cellule hôte et agit donc principalement d'une manière indirecte, en induisant une inflammation chronique, ainsi qu'une prolifération et une mort cellulaire (75).

¹ Informations extraites du site internet : <http://globocan.iarc.fr>

Figure 16 : Progression histopathologique et caractéristiques moléculaires du CHC [extrait de (76)]



5. Dépistage et diagnostic

Il est malaisé de diagnostiquer un cancer du foie à un stade précoce parce que les signes et les symptômes n'apparaissent souvent qu'à un stade avancé de la maladie. Les petites tumeurs du foie sont difficiles à détecter lors d'un examen physique parce que la plus grande partie du foie est couverte par la cage thoracique droite. Au moment où une tumeur peut être sentie, elle peut déjà être assez grosse. L'identification des populations à risque de développer la maladie et son dépistage sont donc d'une grande importance dans la prise en charge de la pathologie (77). Mais le test pourrait être recommandé pour certaines catégories de personnes, telles que les personnes à risque élevé de cancer du foie dû à une cirrhose (quelle qu'en soit la cause) ou à une hépatite B chronique (même sans cirrhose), les patients atteints d'infection chronique à l'hépatite C, de cirrhose alcoolique, d'hémochromatose génétique, de cirrhose biliaire primitive, de déficit en alpha1 antitrypsine, de stéatose hépatique non alcoolique, ou d'hépatite auto-immune. Les tests de dépistage les plus utilisés sont les analyses sanguines et des examens échographiques tous les 6 à 12 mois à l'aide d'alpha-fœtoprotéines (AFP). Certaines études ont montré une corrélation entre le dépistage et l'augmentation de la survie au cancer du foie (American Cancer Society, Last Revised: April 28, 2016)².

Le diagnostic est principalement basé sur les techniques d'imagerie. L'échographie est souvent le premier test utilisé pour examiner le foie, puis viennent la tomodensitométrie [ou CT scan] l'imagerie par résonance magnétique [IRM] et la biopsie hépatique (78).

² Informations extraites du site internet : <https://www.cancer.org/cancer/liver-cancer>

Malheureusement, dans les pays en voie de développement et en particulier au Laos, le dépistage est quasi-inexistant et le diagnostic se fait très souvent à des stades déjà avancés de la maladie (79).

6. Traitements

Le traitement du cancer du foie dépend du stade d'évolution. Le traitement peut inclure la chirurgie et les médicaments. L'âge et l'espérance de vie attendue suite au traitement doivent également être pris en compte dans la décision thérapeutique. La classification BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) sert de référence internationale pour aider les praticiens à décider du type de traitement à adopter en fonction de la présentation clinique du cancer du foie. Cependant, cette classification est remise en cause dans son application « sur le terrain » par plusieurs chirurgiens en Europe, notamment en Italie, et en Asie, en Chine et en Corée. Une étude récente menée au Pérou suggère que cet arbre décisionnel pourrait ne pas être adapté à toutes les populations de patients atteintes de cancer du foie, notamment celles des pays en voie de développement, et devrait être contextualisée en fonction des observations cliniques faites parmi les populations (80).

Le système du BCLC se compose de cinq étapes :

- Stade 0 - la tumeur a un diamètre inférieur à 2 cm, la personne se porte très bien et a une fonction hépatique normale
- Stade A - une seule tumeur s'est développée, mais son diamètre est inférieur à 5 cm, ou il y a trois petites tumeurs de moins de 3 cm de diamètre ou moins, et la personne a une fonction hépatique normale
- Stade B - il y a de multiples tumeurs dans le foie, mais la personne va bien et sa fonction hépatique n'est pas affectée
- Stade C - l'une ou l'autre des circonstances susmentionnées, mais la personne ne va pas aussi bien et sa fonction hépatique n'est pas aussi bonne, ou lorsque le cancer a commencé à se propager dans le vaisseau sanguin principal du foie, les ganglions lymphatiques voisins ou d'autres parties de l'organisme
- Stade D - où le foie a perdu la plupart de ses capacités fonctionnelles et où la personne commence à présenter des symptômes de maladie hépatique terminale, comme une accumulation de liquide à l'intérieur de son abdomen.

Si le cancer est au stade A au moment du diagnostic, une guérison complète est possible. Les trois principaux moyens d'y parvenir sont les suivants :

- Une résection chirurgicale de la partie affectée
- Une greffe du foie
- Une ablation par micro-ondes ou radiofréquence
- Une chemoembolisation

Si le cancer est au stade B ou C, il n'est généralement pas possible de le guérir. Cependant, la chimiothérapie peut ralentir la progression du cancer, soulager les symptômes et prolonger la vie pendant des mois ou, dans certains cas, des années.

Si le cancer est au stade D au moment du diagnostic, il est généralement trop tard pour ralentir la propagation du cancer. Le traitement vise plutôt à soulager les symptômes de douleur et d'inconfort.

II. Partie-2 : Recherche par l'analyse métabolomique de marqueurs plasmatiques chez les patients porteurs de VHB ou VHC chronique

1. Principe de la métabolomique

La métabolomique (81) est une technique de plus en plus utilisée et touche de nombreux domaines : la santé, la nutrition et également l'analyse d'extraits végétaux. Elle fait partie des méthodes chimiométriques qui mettent en relation des mesures faites sur un système, par exemple un échantillon, avec son état, défini par des grandeurs qualitatives ou quantitatives, par des méthodes mathématiques et/ou statistiques. C'est une technique qui permet l'étude des métabolites, molécules de faibles masses moléculaires, synthétisées à partir de protéines et qui participent au bon fonctionnement de la cellule ou d'un organisme, notamment au niveau de la croissance et de la défense. Le terme métabolomique définit l'analyse complète et quantitative de tous les métabolites d'un système. Si l'on s'intéresse à une partie des métabolites, par exemple une classe chimique particulière, on parlera de profilage des métabolites et enfin on utilisera le terme empreinte métabolique lors de l'analyse d'un grand nombre d'échantillons dans un but de classification (82). Deux approches sont distinguées en métabolomique :

i. Approche ciblée

Les méthodes ciblées se focalisent sur un nombre limité de métabolites. Ainsi, l'objectif est d'établir une relation entre l'état et les mesures qualitative et quantitative de certains métabolites d'intérêts ou de familles particulières de métabolites. C'est donc une approche a priori dont la principale limite réside dans le fait de devoir connaître au préalable les composés cibles. C'est pourquoi une approche non ciblée peut également être envisagée.

ii. Approche non ciblée

Les méthodes non ciblées se basent sur l'ensemble des signaux détectables par une méthode physico-chimique. Elles assurent une détection d'un grand nombre de composés, sans recherche de caractérisation ou de quantification. Dans un second temps, les signaux d'intérêts sont identifiés à l'aide de méthodes d'analyses adaptées.

L'analyse complète des métabolites d'un système, comme un fluide biologique par exemple, est une entreprise très ambitieuse compte tenu du nombre de composés contenu dans les extraits biologiques. Néanmoins, la combinaison de méthodes d'extraction, d'analyse et de traitement des données permet

d'obtenir un bon aperçu du métabolome d'un organisme. L'analyse métabolomique présente également l'intérêt de pouvoir identifier et quantifier des métabolites qui peuvent être mis en relation avec des activités biologiques ou un état physiologique.

1.1) Traitement de l'échantillon

La préparation de l'échantillon doit rester simple de manière à limiter les biais entre les échantillons et elle doit également permettre de conserver au maximum l'hétérogénéité de l'échantillon de manière à obtenir une bonne représentativité du métabolome étudié. Lors de la collecte, il est primordial de veiller à éviter la formation d'artefacts due à des réactions enzymatiques ou d'oxydation par exemple. C'est pourquoi les échantillons prélevés devraient être plongés dans un bain d'azote liquide puis conservés à très basse température (- 80 °C). De même, lors du séchage, il est possible de relancer ces réactions non désirées (83), c'est pourquoi la lyophilisation est préférée puisqu'elle s'opère à partir du matériel gelé. Cette étape permet in fine une meilleure conservation de la matière en raison de l'élimination de l'eau, et donc de la limitation des réactions enzymatiques.

La majorité des techniques analytiques utilisées dans une étude métabolomique est de type chromatographique (gazeuse ou liquide) et spectroscopique (RMN, MS, ...). La spectrométrie de masse est essentiellement couplée avec une colonne de chromatographique gazeuse (GC-MS) dans le cas de l'analyse de composés (semi-)volatils, ou liquide (LC-MS) dans le cas de l'analyse de composés peu ou non volatils. La technologie la plus utilisée en analyse métabolomique reste la LC-MS car elle permet de séparer et de détecter une large gamme de composés. La spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) est de plus en plus utilisée dans les analyses métabolomiques en raison de sa sensibilité élevée et de l'obtention d'une masse exacte, indispensable au processus d'identification. La source d'ionisation prépondérante reste l'ionisation par électronébulisation (ESI) puisqu'elle assure l'ionisation à la fois des composés polaires et peu polaires. Le principal inconvénient de cette technique réside dans la production importante d'adduits. Les principaux analyseurs associés sont la FT-ICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), l'Orbitrap et le ToF (Time of Flight).

1.2) Traitement des données

Différents logiciels sont ensuite utilisés de manière à effectuer une détection automatique des informations spectrales et chromatographiques des échantillons analysés en UHPLC-MS et GC-MS, à l'aide de divers algorithmes afin de sélectionner les informations pertinentes. Ces derniers peuvent être libres ou commerciaux et les plus utilisés sont MZmine (84), XCMS (85) et la combinaison MS-DIAL (86) et MS-FINDER (87). Des conversions des fichiers bruts sont souvent nécessaires avant introduction dans les logiciels, par exemple la conversion en .CDF avec le convertisseur DataBridge pour MZmine ou en .abf avec le convertisseur ABFconverter pour MS-DIAL. Le but final est d'obtenir par la suite une liste de pics caractérisés par leurs masses exactes et leurs temps de rétention chromatographique ainsi que leur intensité respective pour chaque échantillon analysé. Ce jeu de données servira aux

analyses statistiques et à l'identification des composés à l'aide de bases de données. Deux approches de traitement statistique peuvent être mises en œuvre :

i. Une analyse non supervisée

Les méthodes non supervisées s'appuient uniquement sur les données spectrales et permettent de comprendre leur structuration. Elle assure une observation de la variabilité générale pour une étude globale des données brutes. La méthode d'analyse statistique non supervisée la plus connue est l'analyse en composantes principales (ACP). C'est la première étape de la démarche d'analyses multivariées avec aucun a priori de l'appartenance d'un échantillon à un groupe donné. Elle permet d'extraire et de synthétiser les informations essentielles des données en nouvelles variables appelées composantes principales, qui correspondent à une combinaison linéaire des variables originelles. L'ACP va alors permettre d'identifier les directions, c'est-à-dire les axes principaux pour maximiser la variance des données. Ainsi, elle conduit à la réduction des dimensions, généralement en 2 ou 3 composantes, permettant de visualiser graphiquement l'information en perdant le moins possible. Ces composantes sont orthogonales les unes par rapport aux autres et permettent la formation d'un nouveau système de coordonnées pour la projection des échantillons. Le plan ainsi formé est appelé carte factorielle des individus (score plot en anglais). Chaque composante explique un certain pourcentage du jeu de données total. La présence de groupes représentés par la proximité des échantillons révèle leur similarité de comportement par rapport aux variables étudiées.

Des techniques de classification peuvent également être utilisées pour mettre en évidence des groupes supposant l'existence de ressemblance entre les individus. Elles sont complémentaires de l'ACP. La principale technique est la classification ascendante hiérarchique (CAH). C'est un processus itératif qui permet la formation de groupes matérialisés par la suite sous forme de dendrogramme. Au départ, il y a autant de groupes que de variables, puis des fusions entre les groupes les plus similaires sont ensuite effectuées jusqu'à obtenir des groupes clairement distincts. En amont, un prétraitement des variables est généralement effectué, dont une normalisation afin de réduire la variance entre les variables et ne pas favoriser l'expression de certaines variables par rapport à d'autres. En effet, d'un point de vue biologique, les métabolites abondants ne sont pas nécessairement plus intéressants que les métabolites peu concentrés. Ces prétraitements permettent ainsi de réduire l'influence du bruit de fond et de se focaliser sur les informations biologiques pertinentes (88).

ii. Une analyse supervisée

Les méthodes supervisées utilisent les données spectrales et une ou des informations quantitatives ou qualitatives basées sur l'état du système. Elles assurent une mise en relation des variables après retraitement et normalisation dans une optique de recherche de modèles prédictifs. Parmi les méthodes d'analyse supervisée se trouve la régression des moindres carrés partiels (Partial Least Squares [PLS] en anglais) basée sur les régressions linéaires. Une régression orthogonale (OPLS) peut également être utilisée. Dans ces modèles, une variable Y, nommée variable à expliquer, est exprimée en fonction d'une autre variable X, nommée variable explicative. La variable Y peut aussi bien être qualitative conduisant

à l'application d'une PLS-DA (analyse discriminante) ou quantitative. Deux paramètres R^2Y et Q^2 sont indicateurs de la validité du modèle. Le premier coefficient est à rapprocher de l'appartenance à différentes classes, tandis que le second reflète l'erreur de prédiction. Plus ces derniers sont proches de 1 et plus le modèle est robuste. Un test de permutation est aussi usuellement utilisé pour évaluer la robustesse du modèle. Ces modèles permettent de mettre en évidence les variables responsables de la discrimination des échantillons et couplés à des analyses biologiques, ils permettent d'identifier les variables potentiellement marqueurs d'un état physiologique donnée.

2. Contexte et objectifs :

Au Laos, l'accès aux diagnostics et aux médicaments nécessaires pour traiter ces infections s'améliorent, mais le manque d'information de la population et de formation du personnel de santé sont des obstacles majeurs à la prise en charge des hépatites.

Par ailleurs, il n'existe actuellement aucun marqueur biologique permettant à la fois la détection et la mesure de l'évolution de ces pathologies prédictives de l'apparition de complications.

Notre objectif est donc de découvrir dans des échantillons de plasma humain, des biomolécules exprimées lors d'infections virales, et caractéristiques de l'évolution de ces infections en cancer.

Dans la « *BioBank* » du Centre d'Infectiologie Lao-Christophe Mérieux (CILM), nous avons accès à des échantillons de plasma bien identifiés de porteurs d'hépatites B et C. Des prélèvements de 3800 patients porteurs chroniques du VHB et de 1800 patients porteurs chroniques du VHC sont stockés depuis 2010. L'analyse spectrale combinée à de puissantes méthodes de calculs statistiques (métabolomique) appliquées à l'évaluation de ces plasmas infectés devrait donc permettre d'aider à définir les profils de métabolites spécifiques du pathogène (diagnostic) et de l'évolution clinique du patient (pronostic).

Nous espérons identifier des molécules ayant le potentiel de devenir des outils de diagnostic différentiel mais aussi capables de donner des informations sur l'évolution de la pathologie (outils dynamiques et pronostiques), permettant la mise en place de stratégies thérapeutiques et préventives adaptées.

→ Objectif général :

Identifier des biomarqueurs plasmatiques pronostiques d'une infection chronique au VHB ou VHC.

→ Objectifs spécifiques :

- Etablir une description épidémiologique et clinique d'une cohorte de patients infectés par le VHB et VHC au CILM depuis janvier 2010 jusqu'à 2017.
- Mettre au point la technique d'extraction des métabolites pour l'analyse « *Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS)* »
- Identifier des biomarqueurs plasmatiques d'une infection aux virus hépatiques VHB/VHC

- Déterminer la dynamique évolutive prédictive d'une détérioration clinique à l'aide de données échographiques couplées aux marqueurs plasmatiques

3. Matériels et Méthodes

Le protocole a été validé par le comité d'éthique du NIOPH (National Institute of Public Health) qui lui a donné l'autorisation n° 023/2016/NECHR, daté 19/10/2016.

Une autorisation d'importation de matériel biologique contaminé N°IE-2016-891 a été obtenue par le Ministère français chargé de la recherche, Direction générale de la recherche et de l'innovation, Cellule de bioéthique.

3.1) Population étudiée

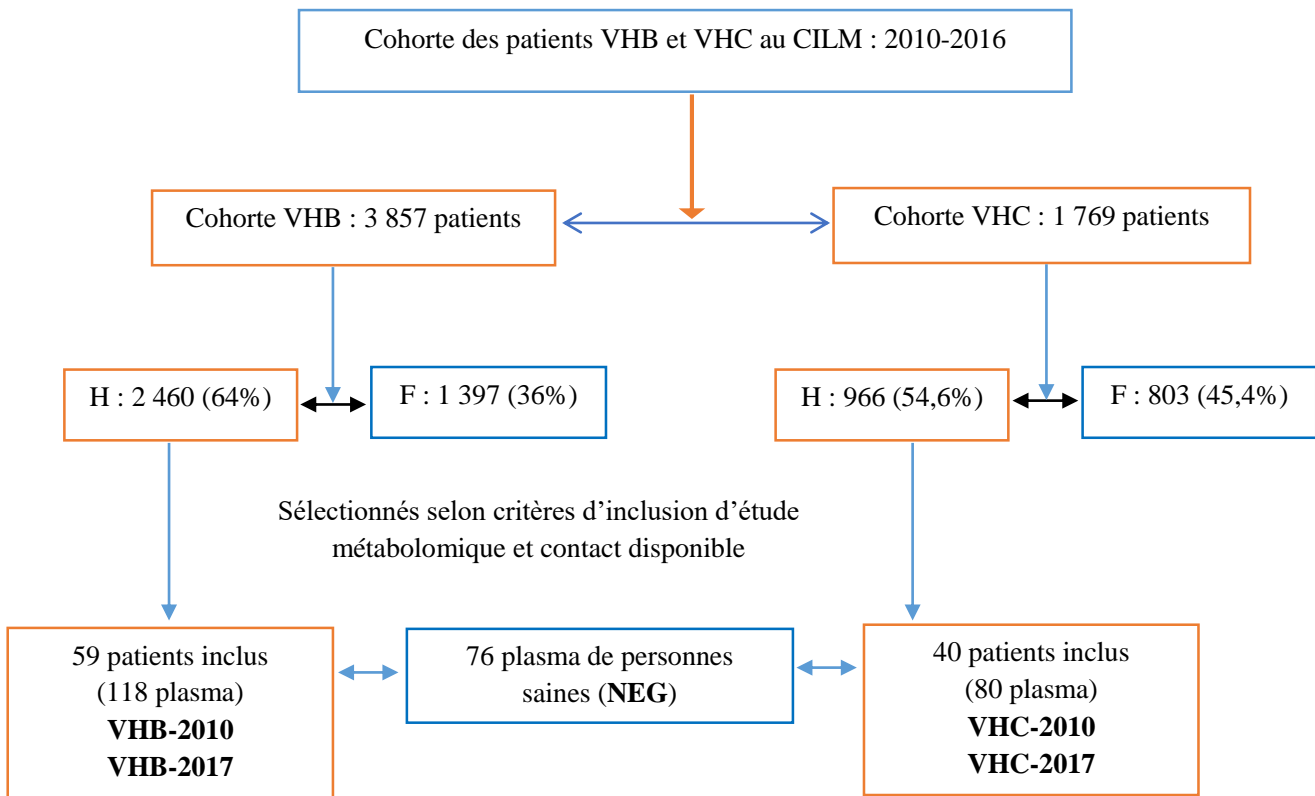
De janvier 2010 à novembre 2016, le CILM a reçu 3 857 patients infectés par le VHB et 1 769 patients infectés par le VHC. Parmi ces patients, nous avons sélectionné un groupe présentant les critères suivants :

- Sexe : Masculin
- Age : entre 30 et 60 ans
- Porteurs d'hépatite B/C (avec un suivi régulier de la charge virale, CV)
- Prélevés au moins 5 ans auparavant (et toujours présents dans la biobank)
- Consentement éclairé compris et signé.
- Les données collectées sont :
 - Socio-économiques
 - Histoire du traitement établi par les médecins
 - Laboratoire : la CV, bilan hépatique, AFP (résultat quantitatif)
 - Consommation de tabac
 - Consommation d'alcool
 - BMI (kg/m²)
 - Maladies chroniques (HTA, DM)
 - Histoire familiale de cancer du foie

3.2) Prélèvements

- Pour étudier l'évolution de la maladie, pour un patient, nous avons sélectionné deux échantillons : 1^e en 2010 et 2^e en 2016 ou 2017.
- Le groupe contrôle : ce sont les gens qui sont Ag HBs et anticorps anti VHC négatifs et qui ont le même sexe, même tranche d'âge.

Figure 17 : Flow chart de l'étude métabolomique



3.3) Echographie abdominale

L'échographie abdominale a été réalisée par un médecin radiologue de l'hôpital Mahosot sur une machine Toshiba - Nemio XG, model SSA-580A. Le patient était placé en position couchée sur le dos, avec le ventre découvert jusqu'en bas du bassin. Un gel dit conducteur était appliqué sur la peau du ventre pour faciliter le passage des ultrasons et le glissement de la sonde émettrice reliée à l'appareil qui capte les images. Le radiologue a exploré le foie (son aspect général, son caractère homogène ou non, sa taille et ses contours, la présence éventuelle de kystes ou tumeurs) et la présence d'une ascite dans la cavité abdominale.

3.4) Techniques utilisées au laboratoire du Laos

a) La charge virale (au CILM)

- Prélèvement sanguin sur EDTA. Centrifugation à 1400g pendant 10 minutes. Extraction des acides nucléiques avec le kit Qiagen (QIAamp Viral DNA ou RNA Mini Kit, *Ref: Cat. No. 51306*).
- Pour la quantification de la CV par PCR en temps réel, on utilise un kit commercial de Fast-track Diagnostics, Luxembourg. <http://www.fast-trackdiagnostics.com> (détection limite de 50 IU/mL).

b) Dosage des aminotransferases (ALT/AST)

- Le bilan hépatique a été fait dans les hôpitaux sur automate HumaStar 600 SR. Calibration pour ALT = 25-40 U/L et pour AST = 27-43 U/L.

c) Test Alpha-foetoProtein (AFP)

- A été fait avec le test rapide SD BIOLINE pour la détection qualitative d'AFP dans le plasma. Avec la valeur seuil : 20 ng/mL, Sensibilité : 100 % et Spécificité : 100 %.

3.5) Analyse métabolomique au Laboratoire PHARMA-DEV, Toulouse, France

→ Partie expérimentale

i. Collecte et extraction des échantillons

- Lyophilisation du plasma au CILM, Vientiane, Laos. 100 µL de plasma sont centrifugés à 17 000g pendant 2h à 4°C avec un SpeedVac. Le plasma lyophilisé est stocké à -20°C jusqu'à l'envoi en France.
- Mise au point de la technique d'extraction des métabolites de plasma lyophilisé pour analyse métabolomique LC-MS au Laboratoire PHARMA-DEV, Toulouse, France. Nous avons adopté cet essai : ajouter 200µL de H₂O/MeOH (2:8) à 4°C. Vortexer 1 min, mettre à l'ultrason froid pendant 10 mn, puis vortexer 15''. Laisser dans la glace pendant 30 mn. Centrifuger pendant 10 mn à 14 000 rpm à 4°C. Récupérer le surnageant (environ 80µL) et mettre dans les ampoules e à insert en verre sylanisé. Un échantillon QC (*quality control*) a été réalisé en prélevant 10 µL de l'ensemble des échantillons.

→ Les extraits peuvent être directement analysés par LC-MS, ou stockés à -20°C ou -80 °C.

ii. Méthodes analytiques UHPLC-CAD-HRMS/MS

Les analyses UHPLC-HRMS/MS ont été réalisées sur un instrument UHPLC-LTQ Orbitrap XL (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, Royaume-Uni) disponible au laboratoire Pharma-Dev. Celui-ci est piloté à l'aide de trois logiciels : Xcalibur version 2.1 (Thermo Fisher Scientific Inc.), Chromelon pour la partie UHPLC et Thermo Tune plus version 2.5.5 pour la partie MS. Les échantillons ont été séparés à l'aide d'une colonne Zic-Hilic 50 × 2.1 mm, 5 µm équipée d'une colonne de garde en Zic-Hilic 20 × 2.1 mm (SeQuant, Merck, Darmstadt, Germany). Un gradient a été réalisé à l'aide d'un tampon acétate d'ammonium 20 mM additionné de 0.05 % d'acide acétique (solvant A) et d'acétonitrile (Solvant B). De 0 à 1 minute, 10% A puis de 1 à 10 minutes 60% A maintenu jusqu'à 11 minutes pour retourner aux conditions initiales en 30 secondes. La température de la colonne a été réglée à 40 °C et le volume d'injection a été fixé à 2 µl. Un blanc et un QC ont été injectés tous les 10 échantillons. La détection de masse a été réalisée en utilisant une source d'électronébulisation (ESI) dans le mode d'ionisation positif (PI). La température du capillaire a été fixée à 300 °C et la tension de l'électrospray à 4,2 kV en positif et 3 kV en négatif. La plage de balayage de masse était de 100 à 2000

Da. Chaque balayage a été suivi par une fragmentation des quatre ions les plus intenses par dissociation induite par collision (CID). L'ensemble des échantillons a été préparé à 2 mg/mL dans un mélange MeOH/Eau 8/2 v/v et conservé à 10 °C dans le passeur d'échantillons. L'aiguille est systématiquement rincée avec une solution aqueuse méthanolique 90% entre deux injections.

iii. Traitement des analyses LCMS

Les fichiers .raw correspondant à chaque injection et analyse d'échantillons ont été transformés en fichier .abf à l'aide du logiciel Reyfics Analysis Base File converter puis importé dans MSdial v 3.08. Les paramètres de traitement et d'extraction des pics chromatographique par défaut ont été appliqués en utilisant une hauteur minimum 3E5. L'alignement des chromatogrammes a été effectué sur la base des QC. La détection d'un pic chromatographique est retenue sur la base de sa présence dans l'ensemble des échantillons d'un groupe (QC, NEG, HCV...). La matrice obtenue comprenant 557 pics (paire m/z × RT) pour 301 injections a été normalisée par la méthode LOWESS. L'identification des pics a été réalisé à l'aide du logiciel MSfinder sur la base de la masse exacte haute résolution et l'empreinte MS/MS associé à chaque pic. Les bases de données interrogées ont été HMDB (Human Metabolome Database), LipidMaps, CheBI et PubChem.

Les analyses statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel SIMCA-P v14.1 (Umetrics, Sartorius, Netherlands). Les données ont été mise à l'échelle par la méthode Unit Variance afin d'avoir une variance homogène pour l'ensemble des pics. Le modèle discriminant (analyse OPLS-DA, orthogonal projection to latent structure) a été évalué par des test de permutations.

4. Résultats

4.1) Résultats descriptifs des patients VHB et VHC

i. Caractéristiques Sociodémographiques de la cohorte sélectionnée

Le tableau 6 montre que plus de la moitié (58%) des patients viennent de la capitale de Vientiane. Les patients VHC sont significativement plus âgés que les patients VHB (50 vs. 40 ans, $p=0.000$). La plupart des patients (95%) sont des bouddhistes et environ la moitié ont le niveau baccalauréat ou plus. 45,8% des patients VHB sont fonctionnaires, contre 35% seulement des patients VHC. 40,7% des patients VHB ont un revenu mensuel supérieur à 600 USD, contre 15% des patients VHC, dont 2,5% des patients VHC ont un revenu compris entre 400 et 600 USD par mois. Globalement, les patients VHB gagnent significativement mieux leur vie que les patients VHC ($p=0.01$).

Tableau 6: Les données sociodémographiques des patients VHB et VHC

Variables	VHB (n=59)		VHC (n=40)	
	Nombre	%	Nombre	%
Origine				
• Capitale de Vientiane	39	66,1	23	57,5
• Provinces (nord et sud)	20	33,9	17	42,5
Age (ans)				
• < 40	28	47,5	5	14,3
• ≥ 40	31	52,5	35	85,7
Moyenne (95% CI)	39,9 (38,2-41,5)		50 (47,4-52,6)	
Ethnie				
• Laolum	55	93,2	40	100
• Hmong	3	5,1	0	0
• Autres	1	1,7	0	0
Religion				
• Bouddhisme	56	95,0	38	95,0
• Animiste	3	5,0	2	5,0
Education				
• ≥ Baccalauréat	31	52,5	21	52,5
• Secondaire	17	29,0	14	35,0
• Polytechnique	10	17,0	4	10,0
• Primaire	1	1,5	1	2,5
Profession				
• Privé	32	54,2	26	65,0
• Fonctionnaire	27	45,8	14	35,0
Statut familial				
• Mariés	58	98,3	40	100
Revenu personnelle mensuelle (USD)				
• > 600	24	40,7	6	15,0
• 400-600	11	18,6	17	42,5
• 100-300	23	39,0	15	37,5
• < 100	1	1,7	2	5,0

ii. Facteurs influençant l'évolution des hépatites VHB/VHC

Le tableau 7 montre qu'un grand nombre de patients sont en surpoids (le BMI moyen est de 26) et 12 à 17% sont obèses. Environ 35% des patients VHB et 60% des patients VHC sont atteints d'une maladie chronique comme le diabète ou l'hypertension. 76% ont des antécédents familiaux de cancer (foie, poumon, lymphome etc...). 25% des patients ont arrêté de fumer après la découverte des hépatites, alors que 20% des patients VHB et 32% des VHC ont continué de fumer. Au niveau de la consommation d'alcool, on observe une différence significative. Plus de la moitié des patients VHB (59%) continuent de boire de l'alcool alors qu'ils savent qu'ils sont infectés par le VHB. Pour les patients VHC, seulement 35% continuent de consommer de l'alcool ($p=0.01$) après avoir appris leur maladie. 62% des patients B et 43% des patients consomment de l'alcool 1 à 2 fois par semaine. Les patients B consomment un seul

type d'alcool, bière, whisky ou vin, beaucoup plus que les patients C (68,6% vs. 21,4%, $p=0.003$). 88% des patients VHB et 78% des VHC consomment de l'alcool depuis plus de 10 ans.

Après le diagnostic des hépatites, les patients VHB ont significativement mis plus longtemps pour tester leur CV que les patients VHC (27 mois vs. 6,2 mois, $p=0.01$).

Tableau 7 : Facteurs aggravants

Variables	VHB (n=59)		VHC (n=40)	
	Nombre	%	Nombre	%
BMI groupes				
• < 25 (normal)	21	35,6	17	42,5
• ≥ 25-29.99 (surpoids)	31	52,5	16	40
• ≥ 30 (obese)	7	11,9	7	17,5
[Moyen (95% CI)]	[25,9 (25,1-26,8)]		[26,2 (25,1-27,4)]	
Maladies chroniques				
• Pas de maladie chronique	38	64,4	16	40,0
• Diabète/HTA	14	23,7	16	40,0
• Autres maladies chroniques	7	11,9	8	20,0
Antécédent du cancer dans la famille				
• Oui	45	76,3	31	77,5
• Non	14	23,7	9	22,5
Consommation de tabac				
• Jamais fumé	33	56,0	17	42,5
• Fumé et arrêté (après le diagnostic)	14	23,7	10	25,0
• Continue de fumer après le diagnostic	12	20,3	13	32,5
Consommation d'alcool				
• Oui	35	59,3	14	35,0
• Bu et arrêté après découverte de l'hépatite	24	40,7	26	65,0
→ Fréquence de consommation (n=35) et (n=14)				
○ 2-4 fois par mois	13	38,2	8	57,1
○ 1-2 fois par semaine	22	61,8	6	42,9
→ Type d'alcool				
○ Un seul type (bière/whisky/vin)	24	68,6	3	21,4
○ Mixte (bière + whisky + vin)	11	31,4	11	78,6
→ Durée de consommation (ans)				
○ 5-10	4	11,4	3	21,4
○ > 10	31	88,6	11	78,6
Délai entre la découverte de l'hépatite jusqu'à la 1^e CV (mois)				
• < 12	19	32,2	23	57,5
• Entre 12-36	14	23,7	10	25,0
• > 36	26	44,1	7	17,5
Médian [IQR]	27,1 [1,5-50,0]		6,2 [0,2-25,1]	

4.2) Données biologiques

i. La charge virale (CV)

Nous avons divisé les CV en 3 groupes. Il y a 2 valeurs de la CV pour chaque patient, la 1^{ère} ayant été testée en 2010 et la 2^{ème} en 2017. Pour les patients VHB et VHC, il y a une diminution significative entre les 2 prélèvements. Les patients VHB/VHC ont une CV en 2017 moins élevée qu'en 2010 (moyen \log_{10} 6,5 vs. 3,3 copies/mL, $p=0.001$) et (5,3 vs. 3,9 copies/mL, $p=0.01$).

ii. Le bilan hépatique (dosage des aminotransférases, ALAT/ASAT)

Ce dosage a été fait à 2 reprises, en 2010 et en 2017, comme la CV. En 2010, plus de la moitié des patients VHB et VHC avaient un taux d'ALAT supérieur à 40 U/L et aucune différence significative n'a été détectée en 2017. Le taux reste toujours élevé de même que celui d'ASAT.

iii. Le marqueur tumoral : Alpha-foeto Protein

Les résultats pour la mesure de l'AFP en 2010 et 2017 sont presque identiques. Deux patients VHB étaient positifs en 2010 et sont devenus négatifs en 2017. Un VHC était positif en 2010 et l'est resté en 2017.

Tableau 8 : Données biologiques des patients VHB et VHC

Variables	VHB (n=59)		VHC (n=40)	
	Nombre	%	Nombre	%
Charge virale (copies/mL) en 2010				
• CV < 50	1	1,7	10	25,0
• CV $\geq 50 - 10^5$	12	20,3	11	27,5
• CV > 10^5	46	78,0	19	47,5
• Moyen \log_{10} (95% CI)	6,5 (5,9 – 7,1)		5,3 (4,5 – 6,0)	
Charge virale (copies/mL) en 2017				
• CV < 50	17	28,8	11	27,5
• CV $\geq 50 - 10^5$	26	44,1	22	55,0
• CV > 10^5	16	27,1	7	7,5
• Moyen \log_{10} (95% CI)	3,8 (3,2 – 4,3)		3,9 (3,3 – 4,6)	
ALAT (U/L) en 2010				
• ≤ 40	9	34,6	5	41,6
• > 40	17	65,4	7	58,3
• Médian [IQR]	51,5 [37-114]		45,5 [35,5-122,5]	
ALAT (U/L) en 2017				
• ≤ 40	26	44,1	12	30,0
• > 40	33	55,9	28	70,0
• Médian [IQR]	46 [35 – 79]		53,5 [36 - 103,5]	
ASAT (U/L) en 2010				
• ≤ 37	11	42,3	1	30,0
• > 37	15	57,7	11	70,0
• Médian [IQR]	49,5 [34 – 74]		72 [48-136,5]	
ASAT (U/L) en 2017				
• ≤ 37	33	55,9	14	35,0

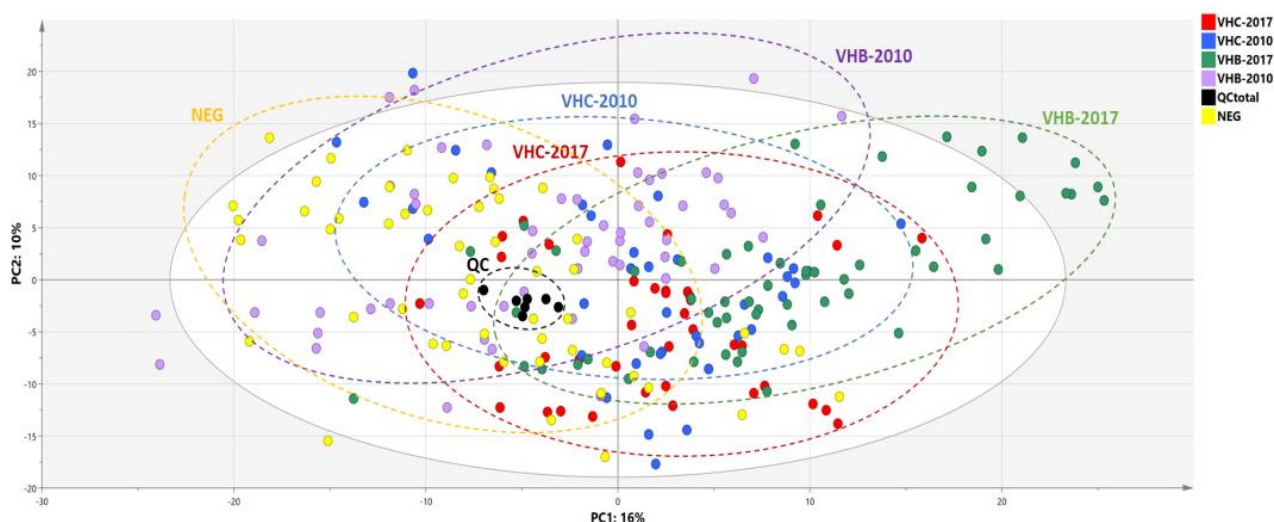
• > 37	26	44,1	26	65,0
• Médian [IQR]	37 [31 – 54]		44 [31-79,5]	
AFP (ng/mL) en 2010				
• < 20 (négative)	57	96,6	39	97,5
• > 20 (positive)	2	3,4	1	2,5
AFP (ng/mL) en 2017				
• < 20 (négative)	59	100	39	97,5
• > 20 (positive)	0	0	1	2,5

4.3) Résultats préliminaires de métabolomique sur le plasma des patients VHB et VHC

Le traitement des analyses LC-MS a permis d'obtenir une matrice de 330 échantillons (incluant Blanc et QC injectés tous les 20 échantillons) pour 557 pics chromatographiques détectés (pair $m/z \times RT$). Afin d'obtenir une vue générale de la proximité des échantillons de manière non biaisée, une analyse en composante principale a été réalisée (**Fig. 18-A**). Cette analyse va résumer le jeu de données sous forme de variable latente (composante principale) et projeter les échantillons sur ce nouvel espace de variance. Ainsi sur l'axe PC1+PC2, 26 % de la variance total du tableau est représenté. Ces deux axes orthogonaux ont été sélectionnés afin d'éclater au maximum la projection des échantillons les uns par rapport aux autres.

Figure 18 : Projection des échantillons sur Analyse en Composante Principal à partir du jeu de données LC-MS

A) Echantillons colorés en fonction de l'état physiologique.



Les QC (Quality control samples) sont projetés à côté du centre de l'ACP (**Fig. 18A**), ce qui est attendu étant donné qu'ils représentent un échantillon moyen (pool de l'ensemble des échantillons). On peut observer que les échantillons d'une même classe ont tendance à se regrouper sur l'espace de projection ACP. L'axe PC1 oppose les groupes de patient VHB-2017 et VHC-2017 aux patients sains (NEG). Cependant l'ensemble des groupes est relativement superposé et aucune tendance claire ne peut être dégagée à ce stade.

Les groupes peuvent être analysés de manière plus fine en prenant en compte l'ensemble du jeu de données (95% de la variance total) à l'aide d'un dendrogramme (**Fig. 19**). Les trois branches principales séparant clairement les patients sains (NEG) des patients VHB-2017. Cette tendance avait déjà été observée sur l'ACP et est donc confirmée ici.

Figure 19 : Dendrogramme sur 95% du jeu de données LC-MS (distance de Ward). Coloration des branches par état physiologique

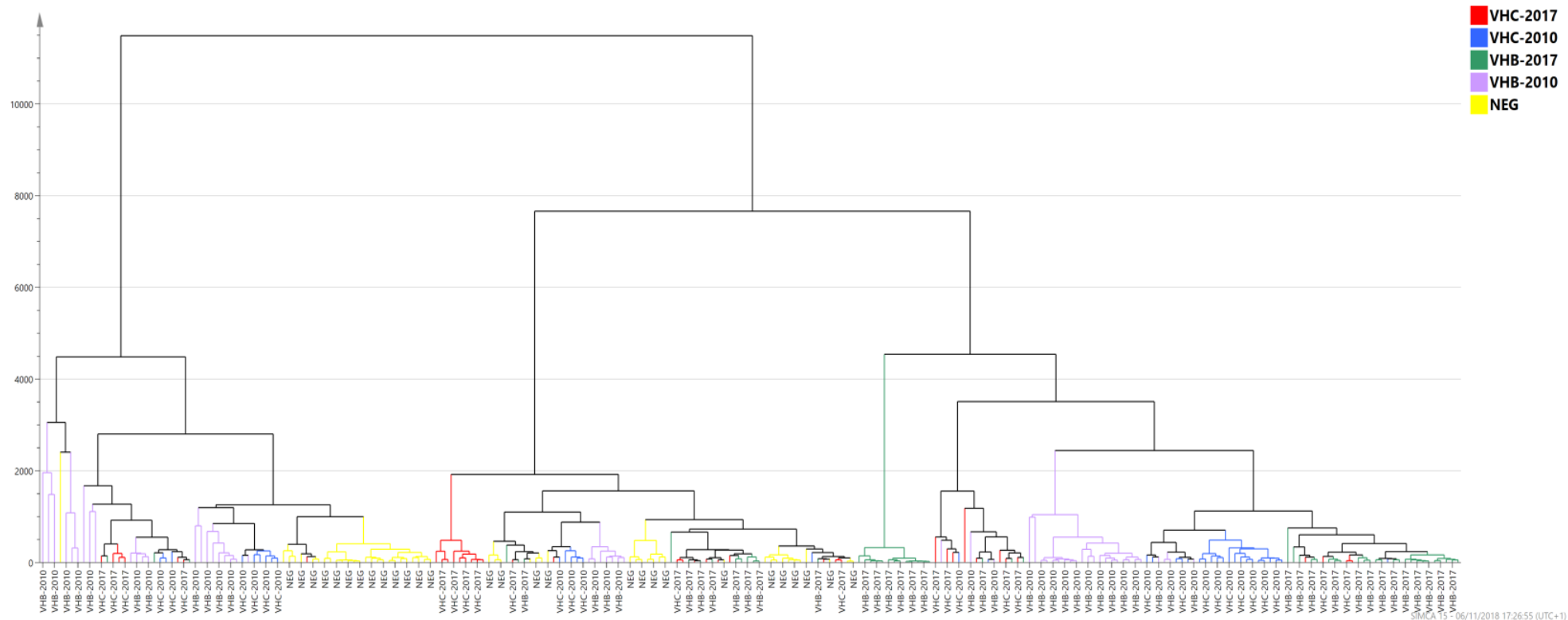
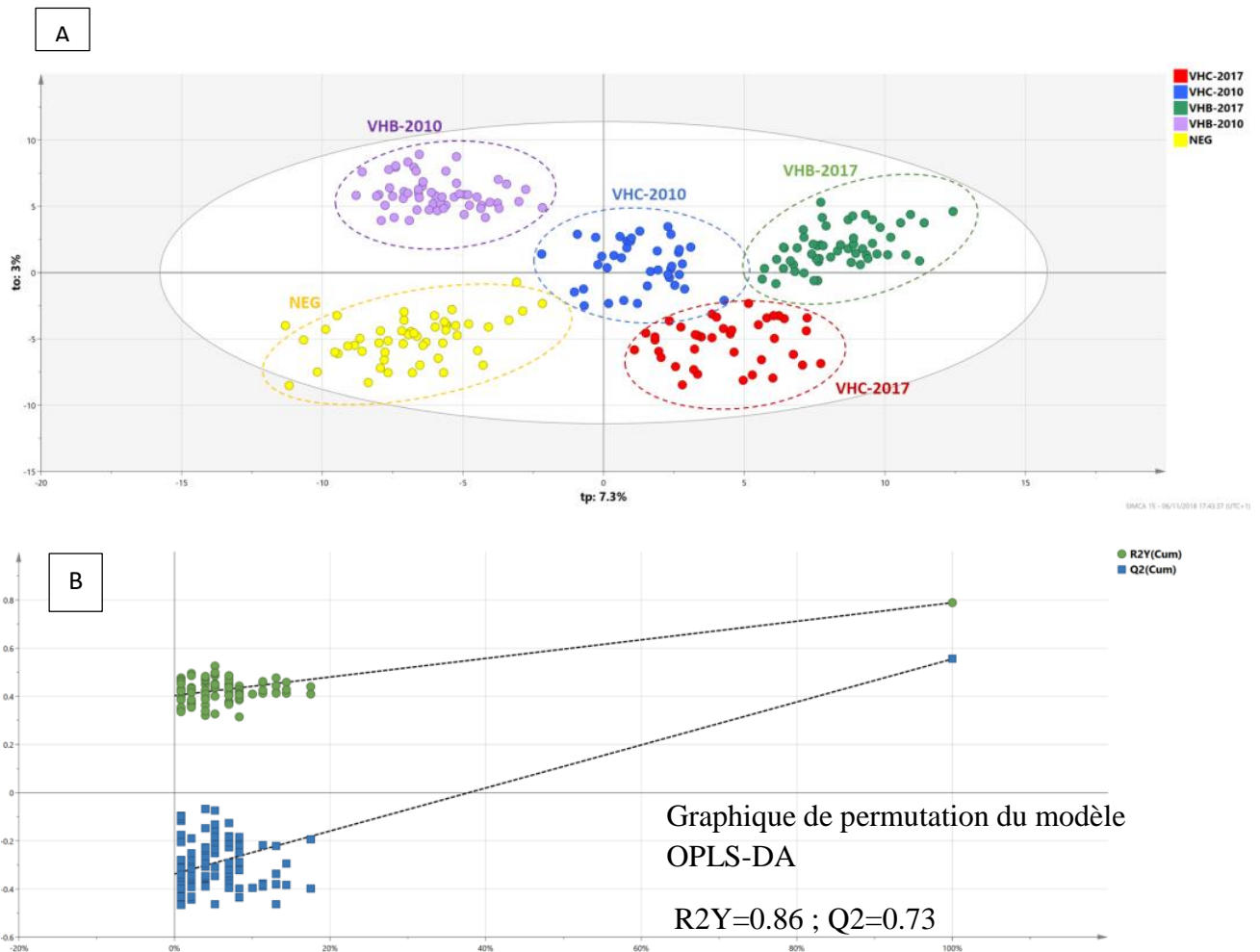


Figure 20 : OPLS-DA à partir des données LC-MS



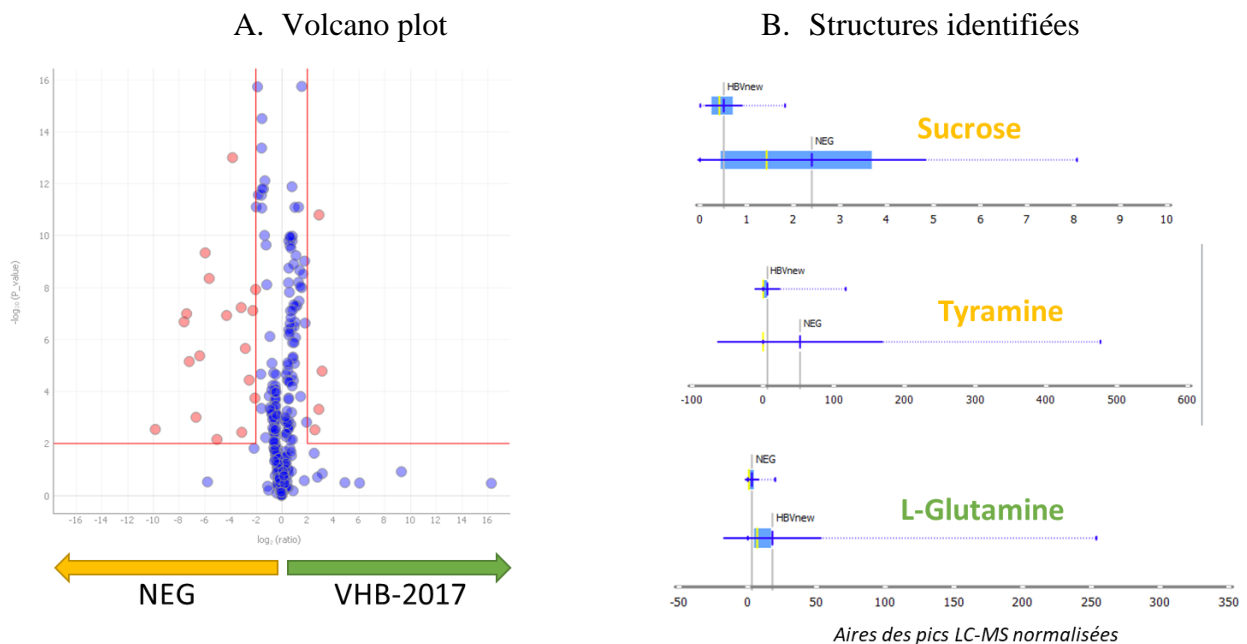
Afin d'évaluer la puissance discriminante des analyses LC-MS et de trouver des biomarqueurs valides pour chaque catégorie des plasmas, un modèle statistique discriminant a été réalisé en utilisant l'OPLS-DA (Orthogonal Projection to Latent Structure-Discriminant Analysis, **Fig. 20A**). Cette technique permet de maximiser la variance sur le premier axe afin de séparer les classes, les autres axes orthogonaux servant à recueillir les variables n'ayant pas de lien avec les classes prédéterminées. Le modèle OPLS-DA montre une très bonne séparation des classes avec très peu de chevauchement. L'axe 1 permet de séparer les mesures récentes (2017) des mesures anciennes (2010) et des mesures de patients sains (NEG). L'axe 2 sépare VHC/VHB-2017 ainsi que VHB-2010 des NEG. La validité du modèle a été testée par la méthode des permutations aléatoires qui montre une bonne robustesse et affiche des valeurs satisfaisantes ($R^2Y = 0.86$; $Q^2 = 0.73$, **Fig. 20B**). Ces résultats démontrent que :

- Le modèle a une bonne capacité à prédire la classe pathologique d'un patient dont le diagnostic n'est pas établi,

- Qu'il existe des biomarqueurs connus ou inconnus qui caractérisent chacun des états pathologiques de cette étude.

Pour continuer l'étude plus précise de ces biomarqueurs, nous avons choisi de nous focaliser sur les deux groupes de patients les mieux discriminés par le modèle OPLS-DA, à savoir les mesures de plasma des patients VHB-2017 contre les patients sains.

Figure 21 : Analyses univariées



Afin d'identifier les métabolites potentiellement discriminants pouvant donc servir de marqueurs diagnostiques de l'infection, des « volcano plots » ont été réalisés entre VHB-2017 et les échantillons négatifs. Le volcano-plot (**Fig. 21A**) montre une baisse significative et reproductible pour une quinzaine de composés. À l'inverse, 4 composés sont retrouvés à un niveau plus élevé chez les patients VHB-2017. L'identification de ces composés est basée sur le spectre de masse haute résolution et leurs spectres de fragmentation MS/MS respectifs. L'interrogation de la base de données HMDB (Human metabolome database) a permis d'obtenir une annotation possible pour ces pics. Une baisse significative du niveau de sucrose et de tyramine a été observée chez les patients infectés. À l'inverse, la concentration en L-glutamine est augmentée chez les patients VHB. Ce dernier résultat recoupe celui d'une étude menée en 2015 par l'équipe de Yan qui s'est basée sur une étude des sérums de patients par GC-TOFMS (89).

Le potentiel de ces approches holistiques pour un diagnostic précoce et simplifié des patients à partir de fluides biologiques accessibles commence à émerger (90). Cependant plusieurs étapes sont nécessaires pour valider correctement un biomarqueur, notamment son identification, ses niveaux de

détection, sa pharmacocinétique. Les travaux rassemblés ici constituent donc une étape préliminaire qui démontre la faisabilité de notre approche et une preuve de concept méthodologique.

Les analyses échographiques des patients sont en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit. Les premiers modèles statistiques essayant de relier les données des échographies (Stéatose et/ou cirrhose hépatique) au jeu de données LCMS n'ont pas montré de tendances significatives. Cependant, le nombre de patient échographié à ce jour étant encore très restreint, la puissance statistique des modèles reste insuffisante.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. Les hépatites virales

Pour la première fois une étude portant sur 7, 000 patients atteints d'hépatites virales et suivis pendant plus de 7 ans a été menée au Laos. Globalement, nos résultats montrent que chez les patients VHB, les hommes sont plus infectés que les femmes ce qui est conforme aux conclusions de différentes études en Asie (91-94). En revanche, chez les patients VHC de notre cohorte, le sex-ratio est équilibré. Il est cependant intéressant de noter que Chassagne et al. (95) dans une étude menée au Cambodge ont montré que le sex-ratio était équilibré chez des femmes porteuses de VHC et ayant développé un CHC. D'autres études ont montré que le CHC touche plus les hommes que les femmes (96, 97). Nous avons constaté aussi que les patients VHC sont plus âgés que les patients VHB (âge médian de 53 ans vs. 37 ans). Cela peut s'expliquer par le mode transmission. L'infection à VHB est davantage associée à la transmission familiale, de mère à enfant et survient plus tôt que l'infection à VHC. Selon certains auteurs (98), la plupart des infections à VHC ont été contractées plus tard à l'âge adulte au cours d'une transfusion sanguine, ou bien après avoir reçu des injections fréquentes. La grande majorité des patients de notre cohorte sont d'ethnie Lao, qui est l'ethnie majoritaire parmi les 69 que compte le Laos (53 % de la population appartiennent au groupe ethnique Lao) (2). Cependant nous ne pouvons pas affirmer à ce jour que nos résultats s'appliquent à l'ensemble de la population. En effet, plus de 90% de patients de la cohorte viennent de Vientiane, où l'ethnie lao habite principalement.

La CV est un marqueur virologique quantitatif reflétant le niveau de répliation de l'hépatite virale. Sur l'ensemble de la cohorte, plus du tiers des patients ont des charges virales extrêmement élevées. Près de 60 % présentent une CV supérieure à 10 000 UI/mL, c'est la valeur seuil pour avoir un risque élevé de développer un CHC (99). Les patients plus jeunes (<40 ans) ont une CV plus élevée que les patients plus âgés. De même, les hommes ont une CV plus élevée que les femmes. Des études antérieures ont montré qu'il existe une disparité de genre dans le développement du CHC lié au VHB. Par exemple, les femmes porteuses du VHB ont généralement des charges virales plus faibles que les hommes. Le risque de CHC associé au VHB est plus faible chez les femmes que chez les hommes. Enfin, le rapport du taux d'œstradiol au taux de testostérone est plus bas chez les femmes porteuses du VHB et qui présentent un CHC lié au VHB que chez celles qui ne présentent aucun CHC (100-102). 65% des patients VHB de notre cohorte ont des taux de transaminases élevés et ils sont significativement associés au sexe masculin, à l'âge (plus de 40 ans) et à une CV élevée, qui sont des facteurs de risque pour le CHC comme cela a été montré dans plusieurs études (45, 103-105).

Dans notre étude, selon la déclaration des médecins seulement 18% des patients reçoivent un traitement antiviral. Parmi eux, 11 % des patients VHB présentaient à la fois une CV élevée (plus de 10 000 UI/mL) et des taux de transaminases élevés, mais seulement 2 % d'entre eux ont été traités. Il convient d'en tenir sérieusement compte car il a été clairement démontré que les traitements contre le VHB, qui suppriment la répliation virale, peuvent inverser la fibrose et la cirrhose hépatiques et réduire ainsi l'incidence du CHC (93, 106).

Parmi les patients VHC de notre cohorte, 32% ont une CV élevée, de plus de 6 log₁₀ UI/mL, ce qui est un seuil considéré par certaines études publiées en Asie comme annonciateur de l'aggravation de la maladie hépatique. En effet, le risque de développement du CHC est plus élevé chez les patients présentant une CV élevée que chez les patients présentant une CV faible (107). Dans notre étude, 25% de patients ont des taux de transaminases élevés (> 40 UI/mL) et ils sont associés avec une CV élevée. Des études évaluant la relation entre la CV et la gravité des anomalies biochimiques et histologiques ont donné des résultats contradictoires. Certaines n'ont trouvé aucune corrélation entre les CV du VHC et les valeurs d'ALAT sérique (108), et d'autres en ont trouvé (109, 110). La virémie à VHC, quel qu'en soit le niveau, est un facteur de risque important de CHC ; inversement, un traitement qui élimine le virus diminue le risque de CHC. Une étude réalisée à Taïwan a fait état d'une corrélation entre le taux d'ARN du VHC et le risque de CHC (111, 112). Dans notre étude, moins de 20% de nos patients ont reçu un traitement antiviral adapté (même si 24% d'entre eux ont une CV indétectable). 11% ont reçu le même médicament que les patients VHB. Cela peut être dû au fait que l'hépatite B est beaucoup plus fréquente au Laos que l'hépatite C et que le personnel médical prescrit d'une manière aléatoire quand ils estiment le traitement nécessaire.

D'un point de vue diagnostic, au Laos, les personnes qui se rendent dans les centres de santé et qui sont soupçonnées d'être infectées par l'hépatite sont généralement soumises à des tests de diagnostic immunochromatographique rapide (TDRs). Les résultats de notre étude pour évaluer la performance de trois tests rapides couramment utilisés dans les hôpitaux de la capitale pour la détection de l'Ag HBs de l'hépatite B ont montré que les 3 TDRs présentaient une faible sensibilité (54%) mais une spécificité élevée (97%). Par conséquent, ils sont susceptibles de ne pas détecter de nombreux cas d'infection par l'hépatite B et devraient être remplacés ou appuyés par des méthodes plus précises. A minima, les TDR recommandés par l'OMS devraient être préférés à ceux qui sont actuellement distribués au Laos (113). Nous avons également constaté que peu de personnes (5%) ont été vaccinées, ce qui correspond au fait que les participants sont nés avant l'introduction du vaccin anti-VHB dans le programme national de vaccination des enfants et que la vaccination anti-VHB pour adultes n'est pas gratuite au Laos.

Il est clair que nos résultats sont inquiétants pour l'avenir des patients que nous avons suivis.

Ce travail nous a permis d'émettre des recommandations destinées aux autorités de santé publique à savoir : les prélèvements devraient être plus réguliers, d'autres marqueurs devraient être intégrés ainsi que l'imagerie médicale pour un meilleur suivi des patients et des prises de décisions thérapeutiques plus adaptées. A l'heure actuelle, avec le département curatif du Ministère de la Santé, nous avons créé le comité national pour la prise en charge des hépatites et VIH/SIDA, approuvé par le Ministre de la Santé le 28/08/2018. L'objectif principal de ce comité est de rédiger un guide thérapeutique national pour la prise en charge des patients infectés par les hépatites, basé sur les recommandations de l'OMS et dans la région. D'après les plans d'actions élaborés par le comité national, ce document sera finalisé en 2019.

Nous avons également insisté sur la nécessité de revoir les grands programmes de vaccination car les campagnes de vaccination au Laos rencontrent de réelles difficultés. L'OMS nous a sollicité pour participer à une grande enquête pour comprendre pourquoi ses campagnes de vaccinations étaient défaillantes au Laos. Dans un travail sous presse, nous avons montré que :

- Les insuffisances en matière de politiques de planification et la faiblesse des systèmes de santé ont un impact négatif sur l'offre de vaccination.
- De nombreux centres de santé ne disposent pas d'installations adéquates pour gérer la chaîne du froid de manière appropriée (certains vaccins sont congelés).
- Les campagnes de vaccination mettent à rude épreuve les ressources sanitaires locales.
- Le manque de ressources humaines dans les centres de santé et le recours à des volontaires non rémunérés ont rendu le personnel incapable de mettre en œuvre les programmes de vaccination et n'ont pas fait l'objet d'un suivi adéquat. La perception par la population d'un personnel mal formé a créé une résistance à la vaccination dans certaines régions.
- La difficulté d'accès aux établissements de santé en raison de la distance, de la mauvaise qualité des routes, du manque de moyens de transport, ont un impact négatif sur la couverture vaccinale en zones rurales, en particulier parmi les minorités ethniques ; il y est difficile pour le personnel de santé de mettre en œuvre des programmes de sensibilisation.
- La langue utilisée est importante parmi les groupes ethniques minoritaires, à la fois pour une meilleure compréhension et pour renforcer la confiance. Certains documents et affiches écrits en lao contiennent des informations erronées.

Limitations des études : les deux études portant sur VHB et VHC ont été réalisées dans notre laboratoire localisé au centre de Vientiane, par conséquent les patients étudiés ne peuvent être représentatifs de la population nationale. Par ailleurs certaines informations recueillies sont fournies par les médecins des hôpitaux ne sont pas toujours complètes, en particulier l'itinéraire de traitement antiviral des patients (adhérence, compliance et arrêt de traitement). Le questionnaire ne couvrait pas tous les facteurs de risque de cancer du foie, comme par exemple le contact avec les aflatoxines, la consommation de poissons crus.

En ce qui concerne le diagnostic, l'étude sur l'évaluation de la performance des TDRs a été réalisée uniquement dans la capitale, et n'a pas porté sur tous les TDRs utilisés dans les hôpitaux du pays.

2. Mise en évidence de profils métabolomiques spécifiques

Selon les recommandations de l'American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), le diagnostic du CHC est fait grâce à des études typiques d'imagerie (CT scan ou MRI) et/ou d'histopathologie (biopsie du foie) qui est le « Gold Standard » pour montrer la gravité de l'atteinte

hépatique (114, 115). Mais comme ni la biopsie du foie, ni le fibroscan ne sont disponibles au Laos, nous dépistons le CHC chez ces patients au moyen d'une échographie, puis un CT scan (computerized tomography) est réalisé si besoin. Nous avons observé que très peu de patients bénéficiaient d'un examen d'imagerie même dans des cas graves. Par conséquent la recherche de nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques de l'évolution des hépatites en cancer du foie est d'autant plus pertinente que nous espérons mettre en lumière de nouveaux outils bon marché.

Dans la cohorte sélectionnée pour l'étude de métabolomique, nous avons montré que tous les facteurs de risque pour développer une cirrhose du foie et un CHC sont présents :

- Environ 27% de patients VHB ont une CV élevée ($>10^5$ UI/mL), contre 7% pour les patients VHC et les deux groupes montrent des transaminases élevées également. Différentes études en Thaïlande et en Chine (107, 115-117), ont aussi montré que l'élévation de la CV est liée avec une augmentation du bilan hépatique (ALAT/ASAT) (105).
- Les autres facteurs liés avec l'augmentation du bilan hépatique sont l'âge, la consommation d'alcool, le tabac, et le surpoids (118). Plus de 50% des patients VHB ont plus de 40 ans, contre 86% pour les patients VHC. 52,5% sont en surpoids, et 59% de patients consomment l'alcool depuis plus de dix ans.

Presque tous les patients inclus dans l'étude ont un résultat d'AFP négatif (la valeur seuil du test rapide est de 20 ng/mL). Néanmoins la valeur d'AFP est toujours élevée chez les patients CHC, mais quand on fixe la valeur seuil à 20 ng/mL, la sensibilité du test reste à 39% et la spécificité reste à 76% seulement (119). Une échographie abdominale ayant une meilleure sensibilité que l'AFP pour détecter le cancer primitif, l'examen par AFP n'est donc pas utile pour le test de dépistage et pour la surveillance de cancer du foie (120).

L'étude échographique de notre cohorte est en cours et les résultats obtenus sont trop partiels pour pouvoir en faire l'analyse ici.

Les études métabolomiques utilisent des méthodes complètes de profilage métabolique pour l'analyse des métabolites de petites molécules dans les fluides biologiques, ce qui permet d'obtenir une vision systémique des processus biologiques (121).

Dans cette étude, nous avons analysé 118 plasmas de 59 patients masculins infectés par le VHB, 80 plasmas de 40 patients masculins infectés par le VHC et 76 plasmas d'hommes non infectés. Pour les patients VHB et VHC, ces plasmas ont été prélevés en 2 fois, une en 2010, l'autre en 2017. Cela a été fait à l'aide d'une plateforme analytique combinée comportant chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse pour évaluer les changements dans le métabolome associés à l'infection chronique à VHB et à VHC.

Nous avons détecté 557 pics chromatographiques. Nos données préliminaires ont montré la capacité de la métabolomique pour différencier les états pathologiques de chaque groupe des patients. Après les

avoir comparé avec des études du même type, notre cohorte a inclus un nombre d'échantillons à analyser bien plus grand que ce qui avait déjà été publié dans la littérature (89, 122-125).

L'objectif que nous nous fixons maintenant est d'approfondir l'analyse pour pouvoir identifier les métabolites associés avec la cirrhose du foie et le CHC et d'augmenter le nombre de plasma à étudier pour tenter d'identifier des marqueurs diagnostiques et pronostiques de l'évolution de la pathologie. Nous espérons l'atteindre dans le cadre d'un projet européen dont nous faisons partie, le projet COCLICAN qui comprend une approche métabolomique et une approche par imagerie médicale.

3. Conclusion et perspectives

Alors que le Laos dispose d'un institut unique (le CILM) pour le diagnostic des hépatites virales depuis plusieurs années désormais, les données que nous y avons accumulées n'avaient jamais été analysées jusqu'à présent. Cette thèse a montré l'importance de cette analyse puisque les résultats obtenus sont éloquentes quant à la gravité de la situation de ces pathologies dans notre pays, et ce d'autant plus qu'ils ne concernent qu'une part réduite de la population laotienne (celle qui s'est rendue dans notre laboratoire et les laboratoires affiliés).

En effet, pour un nombre considérable de patients le contexte biologique révélé par nos travaux annonce un pronostic particulièrement inquiétant.

Nos conclusions communiquées à la communauté scientifique au sens large et surtout aux autorités de santé publique lao en particulier, ont motivé les décideurs à former le premier comité national pour la prise en charge des hépatites et VIH/SIDA, approuvé par Ministre de la Santé récemment.

Par ailleurs, nous avons également mis en lumière les défaillances diagnostics dans les centres de soins mais aussi, avec le soutien de l'OMS, nous avons analysé pourquoi les campagnes de vaccinations n'atteignaient pas leurs objectifs. L'ensemble de nos résultats a donc une portée capitale en santé publique et devrait ouvrir la voie vers une meilleure prévention et prise en charge des hépatites virales au Laos.

Le troisième volet de recherche plus fondamental de notre thèse est toujours en cours. Il sera approfondi dans le cadre d'un projet européen dont il a été l'origine ; *Collaborative Consortium for the early detection of Liver CANcer (Marie Sklodowska-Curie Actions (MSCA) – Research and Innovation Staff Exchange - RISE.N°823935)*

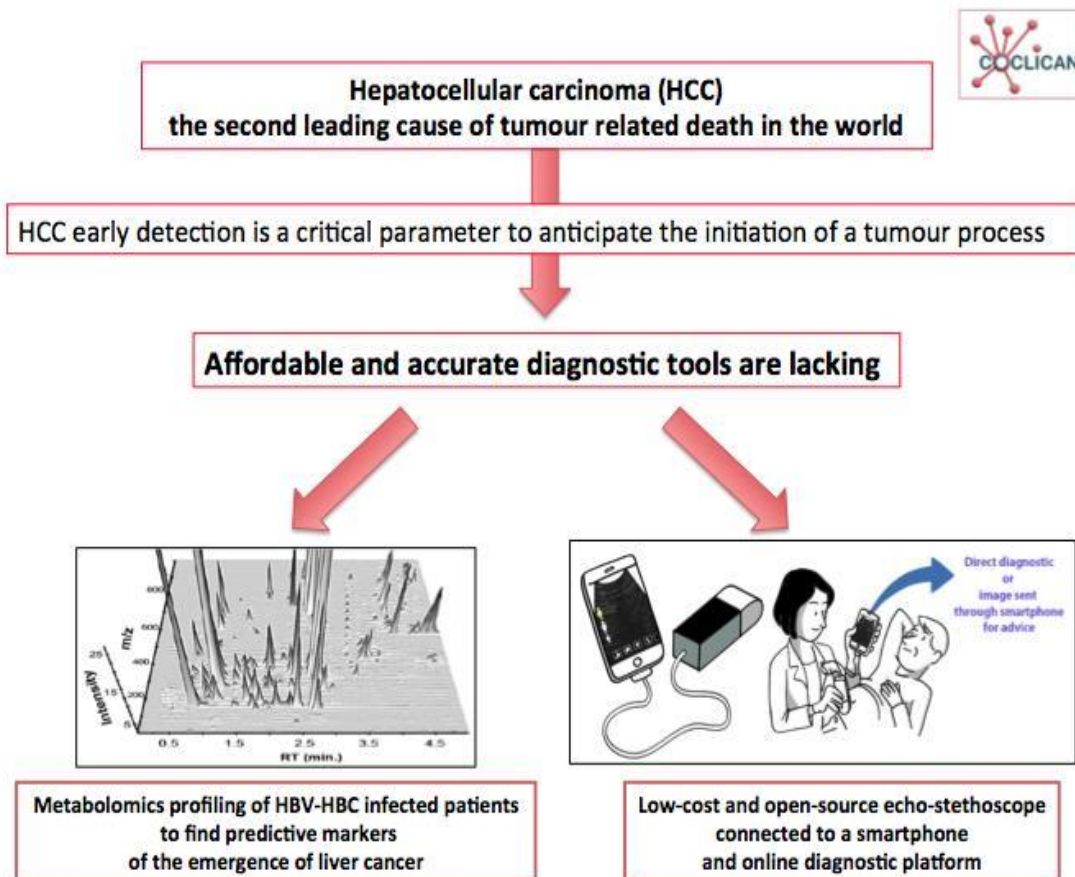
Ce projet rassemble des chercheurs de 3 continents (Europe, Amérique du Sud, Asie) et de 5 pays (Belgique, France, Laos, Lituanie, Pérou) qui ont pour objectif d'améliorer la détection de l'émergence du cancer du foie chez des patients porteurs d'hépatites virales.

Cette équipe internationale analysera et comparera les profils métabolomiques d'une cohorte de patients (plus importante que celle étudiée pendant notre thèse) infectés par le VHB-VHC afin de délimiter un groupe de molécules prédictives de l'émergence du cancer du foie. Ils évalueront également les

performances d'un écho stéthoscope à code source ouvert et à faible coût connecté à un smartphone, spécialement adapté aux pays à faible revenu (Fig-22).

COCLICAN a été conçu pour renforcer les collaborations de recherche, améliorer le potentiel d'innovation aux niveaux européen et mondial et répondre aux besoins de santé des populations délaissées.

Figure 22 : Organigramme de l'étude COCLICAN



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Nanthavong K. Data on socio economic in Laos. Intelligent Energy Europ. 2011 (https://ec.europa.eu/.../reepro_socio_economic_study_laos.pdf).
2. Bureau Lao Statistic. Results of Populaton and Housing Census in Lao PDR 2015 (<https://www.lsb.gov.la/pdf/PHC-ENG-FNAL-WEB.pdf>).
3. PDR GoL, UNDP. Millennium Development Goals Orogress Report Report. 2004 (www.la.undp.org/.../lao_pdr/en/.../mdg/mdg-compact-for-lao-pdr).
4. World Bank. The World Bank Atlas method. 2018(<https://datahelpdesk.worldbank.org>).
5. World Bank. Lao PDR Now a Lower-Middle Income Economy. PRESS RELEASE. 2011 (www.worldbank.org/.../lao-pdr-now-lower-middle-income-econo).
6. World Bank. Laos/PIB par habitant. 2016 (<https://fr.actualitix.com/pays/lao/laos-pib-par-habitant.php>).
7. JICA, MOH, WHO. LAO HEALTH SECTOR REFORM 2014- 2025. 2016 (www.nationalplanningcycles.org/.../lao_peoples_democratic_republic/lao_hsr_strategy).
8. CFE-DM. Lao PDR Disaster Management Reference Handbook. 2017 (<https://reliefweb.int/.../lao-peoples-democratic-republic/lao-pdr-dis>).
9. Vongphrachanh P, Simmerman JM, Phonekeo D, Pansayavong V, Sisouk T, Ongkhamme S, et al. An early report from newly established laboratory-based influenza surveillance in Lao PDR. *Influenza Other Respir Viruses*. 2010;4(2):47-52.
10. AIDS Ncf. UNGRASS Country_progress_report Nat Committee for AIDS_2010. 2010.
11. Sihavong A LC, Syhakhang L, Vernby A, Panyanouvong A, Marions L, Wahlström R. Health providers' competence in the management of reproductive tract infections in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *Int J STD AIDS*. 2007;18(11):774-81.
12. Hübschen JM JP, Thammavong T, Samounry B, Yousukh A, Toriyama K, Sausy A, Muller CP. High genetic diversity including potential new subtypes of hepatitis C virus genotype 6 in Lao People's Democratic Republic. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):E30–E4.
13. Alter HJ, Blumberg BS. Further studies on a "new" human isoprecipitin system (Australia antigen). *Blood*. 1966;27(3):297-309.
14. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004;11(2):97-107.
15. WHO. World Health Organization. Hepatitis B fact sheet WHO/204. WHO Fact sheets. 2017 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en>).
16. Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Portera G, Gelatti U, et al. Case-control study on hepatitis C virus (HCV) as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. *Brescia HCC Study*. *Int J Cancer*. 1999;81(5):695-9.
17. GLOBOCAN. Liver Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/liver-newasp>. 2012.
18. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine*. 2012;30(12):2212-9.
19. Te HS JD. Epidemiology of Hepatitis B and C Viruses: A Global Overview. *Clinics in Liver Disease*. 2010;14(1):1-21.
20. WHO. Hepatitis B. World Health Organization. <http://www.who.int/fr/news-room/factsheets/detail/hepatitis-b>. 2017 (Accessed 15 July 2018).
21. Tsatsralt Od B. Epidemiology of Viral Hepatitis and Liver Diseases in Mongolia. *Euroasian J Hepatogastroenterol*. 2015;5(1):37-9.
22. WHO. New hepatitis data highlight need for urgent global response <http://www.who.int/news-room/detail/21-04-2017-new-hepatitis-data-highlight-need-for-urgent-global-response>. 2017 (Accessed 15 July 2018).
23. WHO. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. WHO/HIV/201606. 2016;56 (<http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>).
24. Razavi H, Polaris O. Global Cascade of Care for HBV and HCV. 2018 (@CDAFound).
25. WHO. GLOBAL HEPATITIS REPORT, 2017. 2017(<http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>).

26. Trepo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2014;384(9959):2053-63.
27. Frida Bladh EO. Knowledge about hepatitis B and attitudes towards hepatitis B vaccination among university students in Thailand. 2015.
28. Heidari Z, Moudi B, Mahmoudzadeh Sagheb H, Moudi M. Association of TNF-alpha Gene Polymorphisms with Production of Protein and Susceptibility to Chronic Hepatitis B Infection in the South East Iranian Population. *Hepat Mon*. 2016;16(11):e41984.
29. Yamada H1 FM, Svay S, Lim O, Hok S, Goto N, Ohisa M, Akita T, Matsuo J, Do SH, Katayama K, Miyakawa Y, Tanaka J. Seroprevalence, genotypic distribution and potential risk factors of hepatitis B and C virus infections among adults in Siem Reap, Cambodia. *Hepatol Res*. 2015;45(4):480-7.
30. Sa-Nguanmoo P TP, Thawornsuk N, Vichaiwattana P, Prianantathavorn K, Theamboonlers A, Tanaka Y, Poovorawan Y. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus among migrant workers from Cambodia, Laos, and Myanmar to Thailand. *J Med Virol*. 2010;82(8):1341-9
31. Soeung SC RM, Huong V, Sarath S, Kimly C, Kohei T. Results from nationwide hepatitis B serosurvey in Cambodia using simple and rapid laboratory test: implications for National Immunization Program. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81(2):252-7.
32. Mao B PM, Hennessey K, Duncan RJ, Wannemuehler K, Soeung SC. Prevalence of chronic hepatitis B virus infection after implementation of a hepatitis B vaccination program among children in three provinces in Cambodia. *Vaccine*. 2013;31(40):4459-64.
33. Nguyen VT, McLaws ML, Dore GJ. Highly endemic hepatitis B infection in rural Vietnam. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(12):2093-100.
34. Myanmar BE. 6.5% of Myanmar population infected with Hepatitis B. *The Nation* 2016 (<http://www.nationmultimedia.com/breakingnews/6-5-of-Myanmar-population-infected-with-Hepatitis>).
35. Prapan Jutavijittum AY, Bounthome Samountry, Khamtim Samountry,, Angkham Ounavong TT, Jerapha Keokhamphue and Kan Toriyama. Seroprevalence of hepatitis B and c virus infection among Lao blood donors. *SOUTHEAST ASIAN J TROP MED PUBLIC EALTH*. 2007;38 No. 4.
36. Jutavijittum P AI, Yousukh A, Samountry B, Samountry K, Thammavong T, Keokhamphue J, Toriyama K, Muller CP. Occult hepatitis B infections among blood donors in Lao PDR. *Vox Sang*. 2014;106(1):31-7.
37. Anonh Xeuatvongsa CP, Kongxay Phounphenhack, Rita Reyburn, Thompson, Minal K. Patel, Eyasu H. Teshale, Francisco Averhoff Hepatitis B Vaccine Birthdose Practices in a Country Where Hepatitis B is Endemic — Laos, December 2011–February 2012 *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2013;62(29):587-590(PMC4604971).
38. Black AP NP, 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;23;14:457.
39. Cancer IAfro. International Agency for research on Cancer. Lao People's Democratic Republic. 2018 (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).
40. Llovet JM, Villanueva A, Lachenmayer A, Finn RS. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(8):436.
41. L. Naing TW, B.N. Rusli. Practical Issues in Calculating the Sample Size for Prevalence Studies. *Archives of Orofacial Sciences*. 2006.
42. Seeff LB. The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009). *Liver Int*. 2009;29 Suppl 1:89-99.
43. Fact-sheets W. Hepatitis C. 2018 (<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>).
44. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2001;345(1):41-52.
45. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S35-50.
46. Black AP, Vilivong K, Nouanthong P, Souvannaso C, Hubschen JM, Muller CP. Serosurveillance of vaccine preventable diseases and hepatitis C in healthcare workers from Lao PDR. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123647.

47. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42(4):962-73.
48. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015;61(1):77-87.
49. Asselah T, Marcellin P, Schinazi RF. Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure? *Liver Int*. 2018;38 Suppl 1:7-13.
50. WHO, Easterbrook P. Global Perspectives on HCV Elimination. ICAR. 2018 (www.icar2018.it/public/repository/slide/1_1_7_0_1_slide.pdf).
51. Observatory P. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(3):161-76.
52. Razavi H, Elkhoury AC, Elbasha E, Estes C, Pasini K, Poynard T, et al. Chronic hepatitis C virus (HCV) disease burden and cost in the United States. *Hepatology*. 2013;57(6):2164-70.
53. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(9):558-67.
54. Sievert W, Altraif I, Razavi HA, Abdo A, Ahmed EA, Alomair A, et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver Int*. 2011;31 Suppl 2:61-80.
55. Nguyen LH, Nguyen MH. Systematic review: Asian patients with chronic hepatitis C infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(10):921-36.
56. Wasitthanasem R, Vongpunsawad S, Siripon N, Sua C, Chulothok P, Chaiear K, et al. Genotypic distribution of hepatitis C virus in Thailand and Southeast Asia. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126764.
57. Pybus OG, Barnes E, Taggart R, Lemey P, Markov PV, Rasachak B, et al. Genetic history of hepatitis C virus in East Asia. *J Virol*. 2009;83(2):1071-82.
58. Doan TQ. Hepatitis C in Developing Countries in Southeast Asia. 2018:97-104.
59. Publications GI. International Agency of Research Against Cancer. World cancer report. 2014.
60. Puri P, Srivastava S. Lower chronic hepatitis B in South Asia despite all odds: bucking the trend of other infectious diseases. *Trop Gastroenterol*. 2012;33(2):89-94.
61. Aberle JH, Formann E, Steindl-Munda P, Weseslindtner L, Gurguta C, Perstinger G, et al. Prospective study of viral clearance and CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection. *J Clin Virol*. 2006;36(1):24-31.
62. Paboriboune P, Vial T, Chassagne F, Sitbounlang P, Soundala S, Bertani S, et al. A Seven-Year Retrospective Study on the Surveillance of Hepatitis B in Laos. *Int J Hepatol*. 2018;2018:9462475.
63. ICD ICod, WHO. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2014/en>. 2014 (<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2014/en>).
64. Amon JJ, Nedsuwan S, Chantra S, Bell BP, Dowell SF, Olsen SJ, et al. Trends in liver cancer, Sa Kaeo Province Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005;6(3):382-6.
65. Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*. 2017;152(4):745-61.
66. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S5-S16.
67. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
68. Moore MA, Attasara P, Khuhaprema T, Le TN, Nguyen TH, Raingsey PP, et al. Cancer epidemiology in mainland South-East Asia - past, present and future. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11 Suppl 2:67-80.
69. Kimman M, Norman R, Jan S, Kingston D, Woodward M. The burden of cancer in member countries of the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(2):411-20.
70. Vonghachack Y, Odermatt P, Taisayyavong K, Phounsavath S, Akkhavong K, Sayasone S. Transmission of *Opisthorchis viverrini*, *Schistosoma mekongi* and soil-transmitted helminthes on the Mekong Islands, Southern Lao PDR. *Infect Dis Poverty*. 2017;6(1):131.

71. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012;13(6):607-15.
72. Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2004;5(2):118-25.
73. Hamed MA, Ali SA. Non-viral factors contributing to hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2013;5(6):311-22.
74. Shin HR, Oh JK, Masuyer E, Curado MP, Bouvard V, Fang YY, et al. Epidemiology of cholangiocarcinoma: an update focusing on risk factors. *Cancer Sci.* 2010;101(3):579-85.
75. But DY, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008;14(11):1652-6.
76. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(9):674-87.
77. Yu MW, Hsu FC, Sheen IS, Chu CM, Lin DY, Chen CJ, et al. Prospective study of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis in asymptomatic chronic hepatitis B virus carriers. *Am J Epidemiol.* 1997;145(11):1039-47.
78. Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver D. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology.* 2011;53(3):1020-2.
79. Eav S, Schraub S, Dufour P, Taisant D, Ra C, Bunda P. Oncology in Cambodia. *Oncology.* 2012;82(5):269-74.
80. Rojas Rojas T, Bourdy G, Ruiz E, Cerapio JP, Pineau P, Gardon J, et al. Herbal Medicine Practices of Patients With Liver Cancer in Peru: A Comprehensive Study Toward Integrative Cancer Management. *Integr Cancer Ther.* 2018;17(1):52-64.
81. Wolfender JL, Marti G, Thomas A, Bertrand S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *J Chromatogr A.* 2015;1382:136-64.
82. I.Ellis WBD. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2005;24(4):285-94.
83. Niamh Harbourne, Eunice Marete, Jean Christophe Jacquier, Dolores O'Riordan. Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). *LWT - Food Science and Technology.* 2009;42(9):1468-73.
84. Katajamaa M, Miettinen J, Oresic M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics.* 2006;22(5):634-6.
85. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem.* 2006;78(3):779-87.
86. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods.* 2015;12(6):523-6.
87. Tsugawa H, Kind T, Nakabayashi R, Yukihiro D, Tanaka W, Cajka T, et al. Hydrogen Rearrangement Rules: Computational MS/MS Fragmentation and Structure Elucidation Using MS-FINDER Software. *Anal Chem.* 2016;88(16):7946-58.
88. Van den Berg RA, Hoefsloot HC, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics.* 2006;7:142.
89. Gao R, Cheng J, Fan C, Shi X, Cao Y, Sun B, et al. Serum Metabolomics to Identify the Liver Disease-Specific Biomarkers for the Progression of Hepatitis to Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep.* 2015;5:18175.
90. Lopez-Lopez A, Lopez-Gonzalez A, Barker-Tejeda TC, Barbas C. A review of validated biomarkers obtained through metabolomics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2018;18(6):557-75.
91. Blumberg BS. Sex differences in response to hepatitis B virus. I. History. *Arthritis Rheum.* 1979;22(11):1261-6.
92. Ie SI, Turyadi, Sidarta E, Sadhewa A, Purnomo GA, Soedarmono YS, et al. High Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Young Adults in Ternate, Eastern Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93(6):1349-55.

93. Merican I, Guan R, Amarapuka D, Alexander MJ, Chutaputti A, Chien RN, et al. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15(12):1356-61.
94. Guclu E, Ogotlu A, Karabay O. A Study on the Age-Related Changes in Hepatitis B and C Virus Serology. *Eurasian J Med.* 2016;48(1):37-41.
95. Chassagne F, Rojas Rojas T, Bertani S, Bourdy G, Eav S, Ruiz E, et al. A 13-Year Retrospective Study on Primary Liver Cancer in Cambodia: A Strikingly High Hepatitis C Occurrence among Hepatocellular Carcinoma Cases. *Oncology.* 2016;91(2):106-16.
96. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86.
97. Park JW, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen PJ, et al. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver Int.* 2015;35(9):2155-66.
98. CHONG-SHAN WANG T-TC, WEI-JEN YAO, AND PESUS CHOU. COMPARISON OF HEPATITIS B VIRUS AND HEPATITIS C VIRUS. *Am J Trop Med Hyg.*
99. Chen CJ, Yang HI, Iloeje UH, Group R-HS. Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2009;49(5 Suppl):S72-84.
100. Farinati F, De Maria N, Marafin C, Fagioli S, Della Libera G, Naccarato R. Hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis: is sex hormone imbalance a pathogenetic factor? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1995;7(2):145-50.
101. Huang YT, Jen CL, Yang HI, Lee MH, Su J, Lu SN, et al. Lifetime risk and sex difference of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis B and C. *J Clin Oncol.* 2011;29(27):3643-50.
102. Liu WC, Liu QY. Molecular mechanisms of gender disparity in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20(20):6252-61.
103. Karageorgos SA, Stratakou S, Koulentaki M, Voumvouraki A, Mantaka A, Samonakis D, et al. Long-term change in incidence and risk factors of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in Crete, Greece: a 25-year study. *Ann Gastroenterol.* 2017;30(3):357-63.
104. Rapti I, Hadziyannis S. Risk for hepatocellular carcinoma in the course of chronic hepatitis B virus infection and the protective effect of therapy with nucleos(t)ide analogues. *World J Hepatol.* 2015;7(8):1064-73.
105. Tufon KA, Meriki HD, Anong DN, Mbunkah HA, Nkuo-Akenji T. Genetic diversity, viraemic and aminotransferases levels in chronic infected hepatitis B patients from Cameroon. *BMC Res Notes.* 2016;9:117.
106. Wu CY, Lin JT, Ho HJ, Su CW, Lee TY, Wang SY, et al. Association of nucleos(t)ide analogue therapy with reduced risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B: a nationwide cohort study. *Gastroenterology.* 2014;147(1):143-51 e5.
107. Noh R, Lee DH, Kwon BW, Kim YH, Kim SB, Song IH. Clinical Impact of Viral Load on the Development of Hepatocellular Carcinoma and Liver-Related Mortality in Patients with Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterol Res Pract.* 2016;2016:7476231.
108. McCormick SE, Goodman ZD, Maydonovitch CL, Sjogren MH. Evaluation of liver histology, ALT elevation, and HCV RNA titer in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 1996;91(8):1516-22.
109. Aka N, As M, Ah A, Gam A. Correlation between Liver Function Tests and Polymerase Chain Reaction in Chronic Hepatitis C Patients. *Journal of Hepatology and Gastrointestinal disorders.* 2015;01(01).
110. Kurosaki M, Enomoto N, Sato C, Sakamoto N, Hoshino Y, Haritani H, et al. Correlation of plasma hepatitis C virus RNA levels with serum alanine aminotransferase in non-A, non-B chronic liver disease. *J Med Virol.* 1993;39(3):246-50.
111. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2012;142(6):1264-73 e1.
112. Lee MH, Yang HI, Lu SN, Jen CL, Yeh SH, Liu CJ, et al. Hepatitis C virus seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: long-term predictors from a community-based cohort study. *J Clin Oncol.* 2010;28(30):4587-93.

113. Shivkumar S, Peeling R, Jafari Y, Joseph L, Pai NP. Rapid point-of-care first-line screening tests for hepatitis B infection: a meta-analysis of diagnostic accuracy (1980-2010). *Am J Gastroenterol.* 2012;107(9):1306-13.
114. Iida-Ueno A, Enomoto M, Tamori A, Kawada N. Hepatitis B virus infection and alcohol consumption. *World J Gastroenterol.* 2017;23(15):2651-9.
115. Tangkijvanich P, Chanmee T, Komtong S, Mahachai V, Wisedopas N, Pothacharoen P, et al. Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease and other liver cancers. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25(1):129-37.
116. Lin CL, Kao JH. New perspectives of biomarkers for the management of chronic hepatitis B. *Clin Mol Hepatol.* 2016;22(4):423-31.
117. Liu J, Yang HI, Lee MH, Jen CL, Batrla-Utermann R, Lu SN, et al. Serum Levels of Hepatitis B Surface Antigen and DNA Can Predict Inactive Carriers With Low Risk of Disease Progression. *Hepatology.* 2016;64(2):381-9.
118. Breitling LP, Arndt V, Drath C, Brenner H. Liver enzymes: interaction analysis of smoking with alcohol consumption or BMI, comparing AST and ALT to gamma-GT. *PLoS One.* 2011;6(11):e27951.
119. Tajiri H, Takano T, Tanaka H, Ushijima K, Inui A, Miyoshi Y, et al. Hepatocellular carcinoma in children and young patients with chronic HBV infection and the usefulness of alpha-fetoprotein assessment. *Cancer Med.* 2016;5(11):3102-10.
120. Ungtrakul T, Mahidol C, Chun-On P, Laohapand C, Siripongsakun S, Worakitsitatorn A, et al. Hepatocellular carcinoma screening and surveillance in 2293 chronic hepatitis B patients in an endemic area. *World J Gastroenterol.* 2016;22(34):7806-12.
121. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature.* 2008;455(7216):1054-6.
122. Huang H, Sun Z, Pan H, Chen M, Tong Y, Zhang J, et al. Serum metabolomic signatures discriminate early liver inflammation and fibrosis stages in patients with chronic hepatitis B. *Scientific Reports.* 2016;6(1).
123. Lu Y, Huang C, Gao L, Xu Y-J, Chia SE, Chen S, et al. Identification of serum biomarkers associated with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis using mass-spectrometry-based metabolomics. *Metabolomics.* 2015;11(6):1526-38.
124. Akram Safaei AAO, Seyed Reza Mohebbi, Mostafa Rezaei-Tavirani, Mohammad Mahboubi,, Maryam Peyvandi FO, Mona Zamanian-Azodi. Metabolomic analysis of human cirrhosis, hepatocellular carcinoma, non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis diseases. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench.* 2016;2016;9(3):158-173.
125. Di Poto C, He S, Varghese RS, Zhao Y, Ferrarini A, Su S, et al. Identification of race-associated metabolite biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis and hepatitis C virus infection. *PLoS One.* 2018;13(3):e0192748.

Annexe-1: Questionnaire

METAVIR Epidemiological questionnaire

1. Date on which the questionnaire is completed: ___/___/_____ (D/M/Y)
2. Interview starts time: ___/h
3. Place where the questionnaire is completed (Institute or other):
4. Person who filled in the questionnaire:

I. PERSONAL DATA

Weight.....kg; high..... cm

1	Name & Last name: or patient code	Or ___/_____
2	Age : ___ years	Date of birth (D/M/Y): ___/___/_____
3	Gender (for HIV patients)	<input type="checkbox"/> 1 Male <input type="checkbox"/> 2 Female
4	Place of birth	Village:District:..... Province:.....
5	Current address:	<input type="checkbox"/> 1 Urban <input type="checkbox"/> 2 Rural Village:District:..... Province:.....
6	Ethnic group	<input type="checkbox"/> 1 Lao <input type="checkbox"/> 2 Hmong <input type="checkbox"/> 3 Mon-Khmer <input type="checkbox"/> 4 Ta-Oy <input type="checkbox"/> 5 Ngae <input type="checkbox"/> 6 other.....
7	Religion	<input type="checkbox"/> 1 Buddhist <input type="checkbox"/> 2 Christian <input type="checkbox"/> 3 Phee <input type="checkbox"/> 4 Other:
8	Level of education	<input type="checkbox"/> 1 Illiterate <input type="checkbox"/> 2 Primary <input type="checkbox"/> 3 Secondary <input type="checkbox"/> 4 Higher education <input type="checkbox"/> 5 technique <input type="checkbox"/> 6 Other:
9	Marital status present-day	<input type="checkbox"/> 1 Single <input type="checkbox"/> 2 Married <input type="checkbox"/> 3 Separated/divorced <input type="checkbox"/> 4 Widowed
10	Do you have children?	<input type="checkbox"/> 1 Yes <input type="checkbox"/> 2 No If yes, How many boys? ___/ and How many girls? ___/
11	What is your monthly income?	<input type="checkbox"/> 1 < 100 \$ <input type="checkbox"/> 2 between 100-300 \$ <input type="checkbox"/> 3 between 300-600 \$ <input type="checkbox"/> 4 > 600 \$
12	What is the monthly income of your family?	<input type="checkbox"/> 1 < 100 \$ <input type="checkbox"/> 2 between 100-300 \$ <input type="checkbox"/> 3 between 300-600 \$ <input type="checkbox"/> 4 > 600 \$

II. LIVING ENVIRONMENT

1	Your work activities: Type of work activity	Current job:..... Time (in years): ___/
		Previous job:..... Time (in years): ___/

2	Work activities (current or performed) of your:	FATHER: MOTHER..... WIFE or Husband.....
3	current housing structure:	<input type="checkbox"/> 1 Concrete <input type="checkbox"/> 2 Wood <input type="checkbox"/> 3 Wood+concrete <input type="checkbox"/> 4 Bamboo
4	How long do you at this address?	<input type="checkbox"/> 1 ≤ 1 year <input type="checkbox"/> 2 between 1-2 years <input type="checkbox"/> 3 between 2-4 years <input type="checkbox"/> 4 between 4-6 years <input type="checkbox"/> 5 between 6-10 years <input type="checkbox"/> 6 > 10 years
5	Who lives with you? (You can select more than one)	<input type="checkbox"/> 1 Parents <input type="checkbox"/> 2 brothers <input type="checkbox"/> 3 Spouse or partner <input type="checkbox"/> 4 Children <input type="checkbox"/> 5 Sharing with other unknown people <input type="checkbox"/> 6 Alone <input type="checkbox"/> 7 Other.....

6. If you have lived in different directions in the last 15 years, specify where and how much time:

Village	District	Province	Time (in years)

7. There are the types of companies or main activities where you live (for example, mines, ports, agriculture, textiles, etc): 200 m around your house.

1 Yes 2 No

If yes, please specify

Year	Types of activities

8	What is the place of origin of your parents?	Village: District: Province.....
11	Do you have animals?	<input type="checkbox"/> 1 Yes <input type="checkbox"/> 2 No
12	If yes, what kind of animals?	<input type="checkbox"/> 1 Pets (dogs, cats, birds...) <input type="checkbox"/> 2 Livestock (cattle, pigs, sheep, and rabbits) <input type="checkbox"/> 3 Poultry (chickens, ducks...) <input type="checkbox"/> 4 Other.....

III. LIFE STYLE

1	What source of drinking water do you use in your family /household?	<ul style="list-style-type: none"> • Tap water <input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No • Boiled water <input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No • Plastic water bottles <input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No • Drilled water (water pump) <input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No • Rainwater <input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No Others.....
2	What source of using water in your family / household?	Tap water <input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No Boiled water <input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No Plastic water bottles <input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No Drilled water (water pump) <input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No Rainwater <input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No Others.....
3	Are you suffering from a disease or health problem?	<input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No
4	If yes, what is/are the disease/s or health problems	1 st 2 nd 3 rd
5	Did you receive the treatment for this disease or health problem?	<input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No
6	If yes, could you show it to me?	<input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No <input type="checkbox"/> ₃ don't take the drugs

Name of medicine	Prescribed by doctor?	For what disease/ problem?	Expired date of drug?(dd/mm/yy)	Frequency?	Currently taking?

7	Do you smoke currently?	<input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No, I never smoked (go to question 14) <input type="checkbox"/> ₃ have smoked, but quit (go to question 11)
8	If yes, what kind of smoking?	<input type="checkbox"/> ₁ Cigars <input type="checkbox"/> ₂ Cigarettes <input type="checkbox"/> ₃ Other.....
9	How much do you smoke?	<input type="checkbox"/> ₁ between 1-5 pieces per day <input type="checkbox"/> ₂ between 5-10 pieces per day <input type="checkbox"/> ₃ between 10-25 pieces per day <input type="checkbox"/> ₄ > 25 pieces per day
10	How long are you smoking?	<input type="checkbox"/> ₁ < 2 years <input type="checkbox"/> ₂ between 2-5 years <input type="checkbox"/> ₃ between 2-5 years <input type="checkbox"/> ₄ > 10 years (to go quest 14)
11	<i>If you have smoked before for how long?</i>	<input type="checkbox"/> ₁ < 2 years <input type="checkbox"/> ₂ between 2-5 years <input type="checkbox"/> ₃ between 2-5 years <input type="checkbox"/> ₄ > 10 years
12	What kind of smoking?	<input type="checkbox"/> ₁ Cigars <input type="checkbox"/> ₂ Cigarettes <input type="checkbox"/> ₃ Other.....
13	How much did you smoke?	<input type="checkbox"/> ₁ between 1-5 pieces per day <input type="checkbox"/> ₂ between 5-10 pieces per day <input type="checkbox"/> ₃ between 10-25 pieces per day <input type="checkbox"/> ₄ > 25 pieces per day
14	Do you drink currently?	<input type="checkbox"/> ₁ No <input type="checkbox"/> ₂ Yes <input type="checkbox"/> ₃ have drunk, but stopped (go to question 20)

15	If yes, how often do you consume alcoholic beverages?	<input type="checkbox"/> ₁ Daily <input type="checkbox"/> ₂ 2 - 3 times a week <input type="checkbox"/> ₃ Once a month or less <input type="checkbox"/> ₄ 2 - 4 times a month
16	What type of alcohol do you drink?	<input type="checkbox"/> ₁ Beer/Spy <input type="checkbox"/> ₂ Spirits (Whisky, Vodka) <input type="checkbox"/> ₃ white Lao whisky <input type="checkbox"/> ₄ Jar alcohol <input type="checkbox"/> ₅ Wine <input type="checkbox"/> ₆ Others:.....
16	If beer, how many bottles do you drink?	<input type="checkbox"/> ₁ > 1 bottle (750 cc) <input type="checkbox"/> ₂ 1-3 bottles <input type="checkbox"/> ₃ 3-4 bottles <input type="checkbox"/> ₄ 4-6 bottles <input type="checkbox"/> ₅ 7 - 9 bottles <input type="checkbox"/> ₆ > 10 bottles
17	If whisky, how many standard drinks do you usually drink on such a day? (glass of 250 cc)	<input type="checkbox"/> ₁ 1-2 glasses <input type="checkbox"/> ₂ 2-3 glasses <input type="checkbox"/> ₃ 3 - 4 glasses <input type="checkbox"/> ₄ 4-6 glasses <input type="checkbox"/> ₅ 7 - 9 glasses <input type="checkbox"/> ₆ > 10 glasses
18	How long are you drinking?	<input type="checkbox"/> ₁ < 2 years <input type="checkbox"/> ₂ between 2-5 years <input type="checkbox"/> ₃ between 2-5 years <input type="checkbox"/> ₄ > 10 years
20	If you have drunk before how long did you quit?	<input type="checkbox"/>₁ < 2 years <input type="checkbox"/>₂ between 2-5 years <input type="checkbox"/>₃ between 2-5 years <input type="checkbox"/>₄ > 10 years
21	how often did you consume alcoholic beverages?	<input type="checkbox"/> ₁ Daily <input type="checkbox"/> ₂ 2 - 3 times a week <input type="checkbox"/> ₃ Once a month or less <input type="checkbox"/> ₄ 2 - 4 times a month
22	What type of alcohol did you drink?	<input type="checkbox"/> ₁ Beer/Spy <input type="checkbox"/> ₂ Spirits (Whisky, Vodka) <input type="checkbox"/> ₃ white Lao whisky <input type="checkbox"/> ₄ Jar alcohol <input type="checkbox"/> ₅ Wine <input type="checkbox"/> ₆ Others:.....
23	For how long?	<input type="checkbox"/> ₁ < 2 years <input type="checkbox"/> ₂ between 2-5 years <input type="checkbox"/> ₃ between 2-5 years <input type="checkbox"/> ₄ > 10 years
24	If beer, how many bottles do you drink?	<input type="checkbox"/> ₁ > 1 bottle (750 cc) <input type="checkbox"/> ₂ 1-3 bottles <input type="checkbox"/> ₃ 3-4 bottles <input type="checkbox"/> ₄ 4-6 bottles <input type="checkbox"/> ₅ 7 - 9 bottles <input type="checkbox"/> ₆ > 10 bottles
25	If whisky, how many standard drinks did you drink on such a day? (glass of 250 cc)	<input type="checkbox"/> ₁ 1-2 glasses <input type="checkbox"/> ₂ 2-3 glasses <input type="checkbox"/> ₃ 3 - 4 glasses <input type="checkbox"/> ₄ 4-6 glasses <input type="checkbox"/> ₅ 7 - 9 glasses <input type="checkbox"/> ₆ > 10 glasses

VI. Environment factors

1	Do you use or your family pesticides at home?	<input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No
2	If yes, how often do you use?	<input type="checkbox"/> ₁ Weekly <input type="checkbox"/> ₂ Monthly <input type="checkbox"/> ₃ Annually <input type="checkbox"/> ₄ Others:.....
3	Do you use or your family fertilizer at home? Or herbicides	<input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No
4	If yes, how often do you use? What frequently?	<input type="checkbox"/> ₁ Weekly <input type="checkbox"/> ₂ Monthly <input type="checkbox"/> ₃ Annually <input type="checkbox"/> ₄ Others:.....

4. Please give name them:

Names of pesticides	Names of fertilizers	Names of herbicides

5	Do you use traditional medicine (plants or others) to treat diseases in general?	<input type="checkbox"/> ₁ Yes <input type="checkbox"/> ₂ No
6	If yes, please specify the name (s) of plant (s) and (s) disease (s) and symptoms associated with using:	
Names of plants		Diseases and symptoms

7	What is the way you consume medicinal?	<input type="checkbox"/> ₁ Infusion <input type="checkbox"/> ₂ Chewing <input type="checkbox"/> ₃ application on the skin, bath <input type="checkbox"/> ₄ Other.....
8	Who has indicated you the use of these plants?	<input type="checkbox"/> ₁ Parents <input type="checkbox"/> ₂ Grand parents <input type="checkbox"/> ₃ Brothers/Sisters <input type="checkbox"/> ₄ Cousins <input type="checkbox"/> ₅ Children <input type="checkbox"/> ₆ Traditional tellers <input type="checkbox"/> ₇ Other.....
9	For how long has these plants be taken?	___ ___/ days or ___ ___/ months or ___ ___/ years

10. Does your family has history with cancer (can mark more than one):

₁ Yes ₂ No

If yes, please specify:

11. Specify type of cancer and the date (year):

Person	Type of cancer	Year of diagnosis	Status
			<input type="checkbox"/> ₁ death <input type="checkbox"/> ₂ Alive
			<input type="checkbox"/> ₁ death <input type="checkbox"/> ₂ Alive
			<input type="checkbox"/> ₁ death <input type="checkbox"/> ₂ Alive

Annexe-2 : la lettre de consentement et lettre d'information de projet

ໃບແນະນຳຂໍ້ມູນການສຶກສາ

ຫົວຂໍ້ ແລະ ຈຸດປະສົງຂອງການເຮັດການສຶກສາ

ຫົວຂໍ້ຂອງການສຶກສາຄົ້ນຄວ້າແມ່ນ: “ສຶກສາການສືບທຽບ ວິທີກວດຫາ markers ໃນການປິ່ງມະຕິ, ການເຄື່ອນໄຫວ ແລະ ການຄາດຄະເນພະຍາດ ອັກເສບຕັບ ບີ/ຊີ ແລະ ເຮັດສໄອວີ ໃນ plasma ຂອງຄົນເຈັບລາວ (METAVIR)” ເຊິ່ງເປັນການສຶກສາມາຈາກຮ່ວມມື ລະຫວ່າງ ສູນວິໄຈພະຍາດຊຶມເຊື້ອ ລາວ-ຄຣິສຕິຟ ເມລິເອີ (ສວຄມ) ແລະ ສະຖາບັນຄົ້ນຄວ້າເພື່ອການພັດທະນາ. ຈຸດປະສົງຂອງການສຶກສາແມ່ນ ເພື່ອກວດຫາທາດ biomarkers ສະເພາະຂອງການຊຶມເຊື້ອຍ້ອນໄວຣັສ ແລະ ເພື່ອຕິດຕາມທາດທີ່ມີສະເພາະ (biodisponibility) ໃນແຕ່ລະພະຍາດ, ເຊິ່ງມັນຈະຊ່ວຍໃຫ້ເຮົາໄດ້ພັດທະນາວິທີການກວດ, ການປິ່ງປົວ ແລະ ເຂົ້າໃຈການຊຶມເຊື້ອຂອງພະຍາດໃຫ້ດີຂຶ້ນ, ເພື່ອຊ່ວຍໃນການສ້າງແຜນຍຸດທະສາດຂອງການປິ່ງປົວທີ່ເໝາະສົມໃຫ້ແກ່ຄົນເຈັບທີ່ຕິດເຊື້ອຊຳເຮື້ອ. ໃນການສຶກສານີ້, ພວກເຮົາຈະໄດ້ກວດຈຳແນກການປ່ຽນແປງຂອງທາດ metabolic ໃນໄລຍະຂອງການຊຶມເຊື້ອຂອງໄວຣັສ (ສົມທຽບແບບເປັນຕົວຢ່າງ ຫຼື ເປັນກຸ່ມ),

ສໍາລັບ ຕົວຢ່າງເລືອດທີ່ຈະກວດແມ່ນຈະເກັບເອົາຕົວຢ່າງທີ່ທ່ານໄດ້ມາກວດນັບເຊື້ອໄວຣັສ ຢູ່ ສວລມ ໃນປີ 2010, ຫຼື 2011 ຫຼື 2012 ແລະ ຕົວຢ່າງໃນປີ 2016 ຫຼື 2017.

ຂັ້ນຕອນການເກັບຂໍ້ມູນແມ່ນ ທີມງານການຄົ້ນຄ້ວາຈະໂທຫາຄົນເຈັບແຕ່ລະທ່ານທີ່ໄດ້ຄັດເລືອກເຂົ້າໃນການສຶກສາ ໂດຍອີງໃສ່ເງື່ອນໄຂທີ່ກຳນົດໄວ້, ເພື່ອອະທິບາຍຈຸດປະສົງ ແລະ ຂັ້ນຕອນຕ່າງໆ, ຖ້າຄົນເຈັບເຫັນດີ ແລະ ມີຄວາມສະໝັກໃຈ ທີ່ຈະເຂົ້າຮ່ວມໃນການສຶກສາ ແມ່ນຈະໄດ້ເຊັນມາທີ່ ສວຄມ ເພື່ອເຊັນໃບຍິນຍອມ ແລະ ເຮັດການສໍາພາດ. ທ່ານໝໍຈະໃຊ້ ເວລາ ປະມານ 20-25 ນາທີຕໍ່ຄົນ. ໃນຟອມສອບຖາມຈະບໍ່ມີການລະບຸຊື່ໃດໆຂອງຄົນເຈັບ, ພວກເຮົາຈະໃສ່ເປັນລະຫັດ ແລະ ສໍາລັບຂໍ້ມູນທຸກຢ່າງຂອງທ່ານຈະບໍ່ເປີດເຜີຍຕໍ່ສາທາລະນະ, ພວກເຮົາຈະປິດບັງເປັນຄວາມລັບ ແລະ ຈະບໍ່ມີຜູ້ໃດຮັບຮູ້ ນອກຈາກແພດໝໍຜູ້ໃຫ້ສໍາພາດ ແລະ ນັກຄົ້ນຄ້ວາຜູ້ທີ່ກ່ຽວຂ້ອງ. ສໍາລັບການສໍາພາດແມ່ນຈະຖາມເຖິງ ຂໍ້ມູນທາງດ້ານການ ແພດ, ປະຫວັດຄອບຄົວ, ເງື່ອນໄຂທາງດ້ານເສດຖະກິດ, ສິ່ງແວດລ້ອມ ແລະ ວິທີການດໍາລົງຊີວິດຂອງທ່ານ.

ດັ່ງນັ້ນ ການເຂົ້າຮ່ວມໃນການສຶກສາຈຶ່ງບໍ່ມີຄວາມສ່ຽງຫຍັງໝົດ ແລະ ທ່ານສາມາດຖອນຕົວອອກຈາກການສຶກສາ ໄດ້ທຸກເວລາຖ້າຕ້ອງການ ໂດຍທີ່ບໍ່ຕ້ອງເຖິງການມາກວດຕິດຕາມ ແລະ ຈະບໍ່ໄດ້ຮັບການລົງໂທດໃດໆເລີຍ.

ການສຶກສານີ້ ແມ່ນໄດ້ຮັບການພິຈາລະນາຮັບຮອງຈາກຄະນະກຳມະການ ດ້ານຈາລິຍາທຳການຄົ້ນຄວ້າ ຂອງ ສປປ ລາວ ເພື່ອທີ່ສິດຂອງທ່ານຈະໄດ້ຖືກປົກປ້ອງ.

ຫາກທ່ານມີຄໍາຖາມ ກ່ຽວກັບການສຶກສາໃນຄັ້ງນີ້, ກະລຸນາຕິດຕໍ່ທີ່ເບີ:

ຜູ້ດໍາເນີນການສຶກສາ ດຣ. ພິມພາ ພາບໍລິບູນ: 020-5551 0755

ໃບສະມັກໃຈເຂົ້າຮ່ວມການສຶກສາ

ວັນທີ: __ / __ / __ __ __ __

ພະເຈົ້າ ຍິນດີທີ່ຈະເຂົ້າຮ່ວມໃນການສຶກສາ METAVIR Study ທີ່ໄດ້ນຳສະເໜີໂດຍ ດຣ _____,

ເຊິ່ງເປັນຜູ້ຊີ້ແຈງທຸກລາຍລະອຽດຂອງການສຶກສາ ແລະ ໃຫ້ທຸກໆຂໍ້ມູນທີ່ຂ້າພະເຈົ້າສອບຖາມ.

ຂ້າພະເຈົ້າໃນນາມຜູ້ເຂົ້າຮ່ວມໃນການສຶກສາຄັ້ງນີ້ຂໍຢັ້ງຢືນວ່າ:

1. ຂ້າພະເຈົ້າໄດ້ອ່ານໃບຂໍ້ມູນການສຶກສາເປັນທີ່ຮຽບຮ້ອຍແລ້ວ, ທັງໄດ້ຮັບໃບສໍາເນົາ ແລະ ເຂົ້າໃຈເຖິງຈຸດປະສົງ ແລະ ຂັ້ນຕອນ ຂອງການສຶກສາເປັນຢ່າງດີ.
2. ການເຂົ້າຮ່ວມໃນການສຶກສາຄັ້ງນີ້ຂອງຂ້າພະເຈົ້າແມ່ນເກີດຈາກຄວາມສະໝັກໃຈບໍ່ມີການບັງຄັບໃດໆ

3. ຂ້າພະເຈົ້າເຫັນດີໃຫ້ນຳໃຊ້ຕົວຢ່າງທີ່ເປັນເລືອດຂອງຂ້າພະເຈົ້າ ທີ່ເກັບໄວ້ຢູ່ສູນ ສວລມ (ທັງຕົວຢ່າງເກົ່າ ແລະ ໃນປະຈຸບັນ) ເຂົ້າໃນການກວດວິໄຈສຳລັບການສຶກສານີ້. ຂ້າພະເຈົ້າຍິນຍອມໃຫ້ສົ່ງປລາມາຂອງຂ້າພະເຈົ້າໄປເຮັດການວິໄຈກວດຫາທາດ metabolomics markers ທີ່ ເມືອງຕູລູສ UMR-152 IRD-UPS, France.
4. ຂ້າພະເຈົ້າສາມາດປະຕິເສດທີ່ຈະບໍ່ເຂົ້າຮ່ວມໃນການສຶກສາ ຫຼື ຕອບຄຳຖາມຕ່າງໆ ທີ່ເຮັດໃຫ້ຂ້າພະເຈົ້າ ຫຼື ຄອບຄົວຮູ້ສຶກບໍ່ສະບາຍໃຈ ແລະ ສາມາດຖອນໂຕອອກຈາກການສຶກສານີ້ໄດ້ທຸກເວລາໂດຍທີ່ບໍ່ຈຳເປັນຕ້ອງມີເຫດຜົນ ໂດຍທີ່ຈະບໍ່ຖືກລົງໂທດແຕ່ຢ່າງໃດ ແລະ ການຖອນໂຕນີ້ຈະບໍ່ມີຜົນໃດໆຕໍ່ການເຂົ້າໄປໃຊ້ບໍລິໃນການກວດຕິດຕາມພະຍາດຂອງຂ້າພະເຈົ້າ.
5. ຂໍ້ມູນສ່ວນຕົວທຸກຢ່າງຂອງຂ້າພະເຈົ້າຈະໄດ້ຖືກຮັກສາເກັບເປັນຄວາມລັບຢ່າງເຄັ່ງຄັດໃນຖານຂໍ້ມູນ, ໃນຄອມພິວເຕີ ແລະ ໃນການວິເຄາະຂໍ້ມູນ ເຊິ່ງຊື່ຂອງຂ້າພະເຈົ້າຈະຖືກທົດແທນດ້ວຍລະຫັດການສຶກສາ. ຂໍ້ມູນທີ່ໄດ້ຮັບຈາກການສຶກສາໃນຄັ້ງນີ້ ຈະຖືກເກັບໄວ້ຢ່າງປອດໄພ ແລະ ຈະມີພຽງແຕ່ທີມງານນັກຄົ້ນຄ້ວທີ່ມີສ່ວນຮັບຜິດຊອບໃນການສຶກສາຄັ້ງນີ້ ທີ່ສາມາດເຂົ້າເຖິງຂໍ້ມູນໄດ້. ນັກຄົ້ນຄວ້າຄົນອື່ນສາມາດນຳໃຊ້ຂໍ້ມູນນີ້ໄດ້ຖ້າພວກເຂົາເຫັນດີທີ່ຈະເກັບຮັກສາຂໍ້ມູນເປັນຄວາມລັບໄວ້ຢ່າງດີ.
6. ຖ້າຕ້ອງການຂໍ້ມູນເພີ່ມເຕີມ ຫຼື ມີຄຳຖາມທີ່ບໍ່ເຂົ້າໃຈ, ຂ້າພະເຈົ້າສາມາດຕິດຕໍ່ຫົວໜ້າທີມງານ ດຣ ພິມພາ ປາບໍລິບູນ (ໂທ: 020 55 510 755)

ຊື່ຜູ້ເຂົ້າຮ່ວມການສຶກສາ: ລາຍເຊັນ:.....

ຊື່ແພດຜູ້ສຳພາດ: ລາຍເຊັນ:.....

ວັນທີ: __ __ / __ __ /2017