



**HAL**  
open science

# Épidémiologie de la rubéole en République centrafricaine, 2015-2016 et caractérisation moléculaire des souches virales, 2008-2016

Sonia Marilou Pagonendji

► **To cite this version:**

Sonia Marilou Pagonendji. Épidémiologie de la rubéole en République centrafricaine, 2015-2016 et caractérisation moléculaire des souches virales, 2008-2016. Santé publique et épidémiologie. Université de Lorraine; Université de Bangui, 2024. Français. NNT : 2024LORR0077 . tel-04808998

**HAL Id: tel-04808998**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04808998v1>**

Submitted on 28 Nov 2024

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

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



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

## Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

### Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

**par Sonia Marilou PAGONENDJI**

**Epidémiologie de la rubéole en République centrafricaine, 2015-2016 et  
caractérisation moléculaire des souches virales, 2008-2016**

**Date de soutenance 07 mai 2024**

#### Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Christelle VAULOUP-FELLOUS	PU-PH, Faculté de Médecine, Saclay, GHU-Paris sud et INSERM-CEA IMVA-HB/IDMIT
	M Philippe COLSON	PU-PH, IHU Méditerranée Infection et MEPHI, Aix-Marseille Université
Examineurs :	Mme Evelyne SCHVOERER	PU-PH, CHRU de Nancy, Faculté de Médecine et UMR 7564, CNRS-Université de Lorraine
	M Silla SEMBALLA	PU, Université de Bangui (RCA)
	Mme Ariane BOUDIER	PU, Faculté de Pharmacie et <b>LRGP</b> , UMR 7274 CNRS-Université de Lorraine <i>Présidente du jury</i>
Directeurs :	Mme Ionela GOUANDJIKAVASILACHE	Laboratoire virus entérique / Rougeole, Institut Pasteur de Bangui, et MCU, Université de Bangui, (RCA)
	M Raphaël DUVAL	PU, Faculté de Pharmacie et L2CM, UMR 7053, CNRS-Université de Lorraine,
	M Alain LE FAOU	Prof. Attaché, Faculté des Sciences de la Santé, Université de Bangui (RCA)

**Institut Pasteur de Bangui (RCA), Department of Infection and Immunity, Luxembourg**

**Institute of Health, Luxembourg et L2CM, UMR 7053, CNRS Université de Lorraine**

DEDICACE

**Je dédie ce travail à mes feus parents :**

**Ma mère Martine PAGONENDJI et mon père Joseph PAGONENDJI**

## REMERCIEMENTS

Dans la vie, toute œuvre humaine ne peut être conçue et réalisée totalement sans l'appui des autres. C'est pour cette raison, qu'il serait anodin pour nous de ne pas admettre le concours de tous ceux qui ont participé à l'élaboration de ce travail et/ou ont joué un rôle déterminant dans nos études.

Ainsi, pour les efforts qui ont été fournis, nous tenons à remercier vivement :

Mes Directeurs de thèses sans lesquelles cette thèse ne serait soutenue. Malgré les différentes difficultés rencontrées, nous vous remercions d'avoir cru en moi, merci pour vos conseils et votre aide dans cette tâche difficile de rédaction et d'orientation de notre manuscrit ainsi que l'intérêt que vous avez accordés à cette thèse. Professeur Raphaël DUVAL, au-delà de votre lourde charge de travail ; vous avez su trouver du temps pour nous guider et nous conseiller, nous vous en sommes infiniment reconnaissante. Professeur Alain LE FAOU, les mots nous manquent, tout simplement encore et encore, merci pour votre accompagnement, votre disponibilité, votre présence, votre écoute et votre rigueur.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien du ministère des Affaires étrangères luxembourgeois qui, à travers le LIH, nous a permis de venir effectuer le séquençage de nos échantillons au Luxembourg. De même, l'Ambassade de France nous a octroyé une bourse de mobilité scientifique pour venir suivre nos formations universitaires.

Mes membres de comité de suivi individuel : Pr Évelyne SCHOEVER Responsable du Département de Microbiologie, CHRU de Nancy, UMR 7564, CNRS-Université de Lorraine et le Vice-recteur de l'Université de Bangui ; Professeur Silla SEMBALLA.

Le corps professoral et personnel de la Faculté de Science de l'université de Bangui et de Faculté de Pharmacie de l'université de Lorraine ; pour avoir su mettre à notre disposition la facilité administrative d'inscription en thèses et une formation de qualité.

Les Directeurs de l'Institut Pasteur de Bangui : Dr Jean Pierre LOMBARD et Dr Guy VERNET pour avoir validé mon inscription à cette formation et ai bénéficié d'un cadre idéal pour mes recherches. Je vous remercie pour vos conseils et votre soutien.

Je tiens également à remercier :

Le Dr Judith HÜBSCHEN Chef de groupe Virologie clinique et appliquée au Luxembourg Institute of Health (LIH) et son équipe ; Mesdames Emilie Charpentier et Aurelie SAUSSY, pour ce magnifique travail effectué. Merci Docteur pour la formation en analyse phylogénétique, pour votre aide dans la construction de l'arbre phylogénétique. Votre savoir et vos talents multiples m'ont profondément inspiré tout au long de mon travail. Merci infiniment à vous, Émilie et Aurélie pour les moments forts passés au laboratoire et pour l'ambiance plus qu'agréable dont vous avez contribué à maintenir au sein du groupe tout au long de ce travail.

La Pr Ariane BOUDIER, CITHEFOR 3452 pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire

La Dr Ionela GOUANDJIKA responsable de laboratoire de recherche Entérovirus / Rougeole à l'Institut Pasteur de Bangui qui m'a accordé l'autorisation de m'inscrire en thèse.

Mes collègues du ministère de la Santé et de la population Centrafricaine, le bureau de l'OMS en RCA pour la collaboration logistique et les donnes qu'ils ont mis à notre disposition. Le personnel de l'Institut Pasteur de Bangui pour leur soutien multiforme.

Mes ami(es) Ly Yun LI ; Yves DEPY, Carole PELLINGRI, Peter SHALLER, Josiane LEAL, Blaise NGUELEBANGA, merci pour votre soutien moral et vos encouragements. Véronique TREAND, Ronan LE FAOU, Luigi MUCCI, Dominique ANDRE, Astenate NAKOUNE ; Je vous remercie pour les bons moments passés ensemble et votre chaleureux accueil à Nancy.

Je tiens à remercier toute ma famille :

Ma sœur Christiane SALE, merci de t'être occupée de mon fils au cours de mes longues absences de mobilité scientifique et plus encore.

Monsieur et Madame ANDRIEU, les mots me manquent...Tout simplement merci Papa et Maman.

Monsieur et Madame BRANGARD, merci pour votre présence au cours de la rédaction de ce manuscrit.

Yvon PAGONENDJI, merci pour ta patience, ton écoute ta disponibilité durant ces longues soirées à discuter. Marie-Paule, Joel et Solange PAGONENDJI, Stephane et Brice TENE, Ella LATO, Julien, Benjamin et Valerie ANDRIEU, pour votre amour fraternel et votre présence tout au long de ce travail

Mes nièces et neveu Benedicte PAGONENDJI, Shayne SALE et Medhi SALE pour vos appels téléphoniques et vos encouragements. Que ce travail vous serve d'exemple de motivations dans toutes vos entreprises

Ma feuie Mère ; Madame Martine PAGONENDJI, et mes feux frères : Evariste PAGONENDJI MANDAHOU et Emery PAGONENDJI ADANE, tous partis trop tôt au premier semestre 2022.

Ne dit-on pas que le meilleur vient toujours à la fin, je voudrais enfin remercier mon fils NZAS-PAGONENDJI Fayçal Osteen, je n'ai pas toujours été là pour toi durant ces années d'études, mais tu m'as montré que je pouvais te faire confiance et partir tranquillement à chaque fois lors de mes séjours scientifiques. Je te remercie pour tous ce sacrifice, trouve à travers ce travail un exemple de conviction et de détermination.

# Table des matières

<b>ETAT DE L'ART</b>	1
<b>I. Introduction</b>	2
<b>II. Généralités</b>	3
II.1. Historique de la rubéole	3
II.1.1. Découverte de la maladie	3
II.1.2. Découverte du syndrome de rubéole congénitale	3
II.2. Les Rubivirus	5
II.3. Le virus de la rubéole	6
II.3.1. Structure du virus	6
II.3.1.1. Le génome viral	7
II.3.1.2. Les protéines virales	8
II.3.1.2.1. Protéines non structurales	8
II.3.1.2.2. Protéines structurales	9
II.3.2. Cycle viral	9
II.3.2.1. Culture cellulaire	9
II.3.2.2. Déroulement du cycle viral	9
II.3.2.3. Rôle des protéines et de l'ARN viral au cours du cycle viral	10
II.3.2.3.1. Protéines non structurales	10
II.3.2.3.2. Protéines structurales	12
II.3.2.3.3. L'ARN génomique	14
II.3.2.4. Effet cytopathogène	14
II.3.2.5. Interactions du RuV et du métabolisme cellulaire	14
II.3.2.5.1. Persistance du RuV dans les cellules	14
II.3.2.5.2. RuV et interférons	14
II.3.2.5.3. RuV et apoptose	15
II.3.3. Structure antigénique	16
II.3.4. Variabilité génotypique	16
II.3.4.1. Génotypes dans la région Afrique de l'OMS	18
II.3.4.2. Génotypes dans les autres régions	19
II.4. La rubéole et le SRC	19
II.4.1. Physiopathologie	19
II.4.1.1. Rubéole post-natale	19
II.4.1.2. Syndrome de rubéole congénitale (SRC)	20
II.4.1.2.1. Infection du fœtus et ses conséquences	20
II.4.1.2.2. Pouvoir tératogène du RuV	21
II.4.1.3. Réponse immunitaire humorale, cellulaire	21
II.4.2. La rubéole	22
II.4.2.1. La rubéole post natale de l'enfant	22
II.4.2.1.1. Incubation	22
II.4.2.1.2. Prodromes	22
II.4.2.1.3. Phase d'état : l'éruption	22
II.4.2.1.4. Evolution	23
II.4.2.2. Formes cliniques	23
II.4.2.3. Complications	23
II.4.2.4. Diagnostic différentiel	24
II.4.3. Le Syndrome de rubéole congénitale (SRC)	24
II.4.3.1. Clinique	24
II.4.3.2. Evolution	25
II.4.3.3. Diagnostic différentiel	25
II.4.4. Diagnostic biologique des infections à RuV	26
II.4.4.1. Diagnostic direct	26
II.4.4.1.1. Les prélèvements	26
II.4.4.1.2. Recherche du virus par culture cellulaire	26
II.4.4.1.3. Mise en évidence du virus par méthodes moléculaires	26
II.4.4.2. Sérologie	28

II.4.4.2.1. Test immuno-enzymatique (ELISA)	28
II.4.4.2.2. Immunochromatographie	30
II.5. Vaccination anti-rubéoleuse	30
II.5.1. Vaccins contre la rubéole	30
II.5.1.1. Vaccin MMR (ROR) [M-M-R II, Merck & Co., Inc.]	30
II.5.1.2. Le vaccin combiné Rougeole-Rubéole (MR Vac)	31
II.5.2. Pratique de la vaccination par le MMR (ROR) en France	31
II.5.3. Epidémiologie vaccinale	32
II.5.3.1. Evolution de la rubéole dans les pays qui pratiquent la vaccination	32
II.5.3.2. Situation quand la vaccination infantile n'est pas systématique	34
II.5.3.3. Séro-épidémiologie de la rubéole dans la région Afrique de l'OMS	34
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL</b>	<b>38</b>
Objectif principal :	39
Objectifs spécifiques :	39
<b>TRAVAIL EXPERIMENTAL</b>	<b>40</b>
<b>III. La rubéole en RCA</b>	<b>41</b>
III.1 La RCA	41
III.1.1. Situation géographique	41
III.1.2. P opulation et climat	41
III.1.3. Le système de santé	41
III.2. Cadre de l'étude	43
III.2.1. L'Institut Pasteur de Bangui (IPB)	43
III.2.2. Le laboratoire des virus entériques et rougeole	43
III.2.3. Epidémiologie de la rubéole et du SRC	44
III.2.4. La vaccination de la rubéole en RCA	44
<b>IV. Matériel et méthodes</b>	<b>45</b>
IV.1. Laboratoires impliqués dans l'étude	45
IV.2. Type d'étude et population d'étude	45
IV.2.1. Taille de l'échantillon et recrutement des participants	45
IV.2.2. Critères d'inclusion et d'exclusion des patients	45
IV.2.2.1. Critères d'inclusion	45
IV.2.2.2. Critères d'exclusion	45
IV.3. Obtention des prélèvements	46
IV.3.1 Traitement des échantillons	46
IV.3.1.1. Collecte de prélèvements sanguins	46
IV.3.1.2. Transport des échantillons	46
IV.3.1.3. Réception des prélèvements au laboratoire	46
IV.3.1.4. Stockage des prélèvements sanguins ou sérums	47
IV.4. Stratégie expérimentale	47
IV.5. Etude sérologique : détection des IgM rougeoleuses et rubéoleuse	49
IV.5.1. Trousses et réactifs utilisés	49
IV.5.2. Réalisation des tests	49
IV.5.2.1. Réactifs et Matériels	49
IV.5.2.2. Mode opératoire	50
IV.5.2.3. Analyse des résultats	51
IV.6. Méthodes moléculaires	52
IV.6.1 Détection de l'ARN viral	52
IV.6.1.1. Purification de l'ARN viral	52
IV.6.1.2. Extraction du génome viral	52
IV.6.2. Transcription inversae et amplification de l'ARN de RuV	54
IV.6.3. Le séquençage	54
IV.6.3.1. PCR pour le séquençage	55
IV.6.3.1.1. 1ère PCR: "RV HK genotyping_first round"	55
IV.6.3.1.2. 2ème PCR; "RV HK genotyping_Nested second round"	56
IV.6.3.2. Détection des amplicons	56
IV.6.3.3. Purification du produit de PCR de séquençage	57
IV.6.3.3.1. Purification sur colonne par centrifugation	57
IV.6.3.3.2. Purification à partir du gel	58

IV.6.3.4. Séquençage	59
IV.6.3.4.1. Principe de la méthode de Sanger	59
IV.6.3.4.2. Mise en œuvre	59
IV.6.3.4.3. Purification des produits de la PCR	61
IV.6.3.4.4. L'électrophorèse capillaire	62
IV.6.3.5. Lecture des résultats du séquençage	63
IV.6.4. Détermination des génotypes	63
IV.7. Analyse des données démographiques	64
IV.7.1. Données patients	64
IV.7.2. Estimation de la taille de la population	64
<b>V. Résultats</b>	65
V.1. Epidémiologie de la rubéole 2015-2016	65
V.2. Distribution des génotypes de RuV (2008-2016)	67
<b>VI. Discussion</b>	71
<b>VII. Conclusion</b>	74
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	75
<b>ANNEXES</b>	88
ANNEXE 1 : Formulaire de notification des cas de rubéole et les instructions pour l'emplir	89
ANNEXE 2A : Modèles de feuille de rendu de résultat rougeole	92
ANNEXE 2B : Modèle de feuille de rendu de résultat rubéole	93
ANNEXE 3 : Feuille de paillasse (RuV diagnostic cdc- taqman)	94
ANNEXE 5 : Feuille de paillasse (rv hk genotyping_nested 2nd)	96
ANNEXE 6 : Electrophorèse des produits de PCR nichées de séquençage	97
ANNEXE 8 : Pagonendji et al. Int J Infect Dis. 2021;111:303-9	99

## Liste des figures

Figure 1 : taxonomie du Rubella virus .....	5
Figure 2 : schéma de l'organisation de la particule de RuV .....	7
Figure 3 : l'ARN viral et les protéines codées .....	8
Figure 4 : cycle de réplication du RuV .....	11
Figure 5 : la rubéole, évolution et complications (d'après Winter AK (2)).....	27
Figure 5 : carte des régions sanitaires de la République Centrafricaine .....	42
Figure 6 : algorithme suivi pour le diagnostic sérologique et moléculaire de la rubéole.....	48
Figure 7 : nombre de cas de rubéole par mois et par année, RCA 2015-2016 .....	65
Figure 8 : nombre de cas de rubéole selon le sexe et l'âge, RCA 2015-2016 .....	66
Figure 9 : incidence des cas de rubéole par 100 000 habitants en RCA selon la région sanitaire, 2015-2016 .....	66
Figure 10 : arbre phylogénétique des RuV de RCA .....	68
Figure 11 : répartition des génotypes selon la région sanitaire.....	69

---

## Liste des Tableaux

Tableau I : historique de la rubéole .....	4
Tableau II : distribution des génotypes selon l'OMS.....	18
Tableau III : utilisation des tests diagnostiques de la rubéole.....	29
Tableau IV : prévalence des IgG chez les femmes enceintes en région Afrique (OMS) .....	36
Tableau V : prévalence des IgM chez les femmes enceintes en région Afrique (OMS) .....	37
Tableau VI : prévalence des IgG anti-rubéole en fonction de l'âge chez les femmes en âge de procréer.....	37

## Liste des sigles et abréviations

AcM	anticorps monoclonaux
ARN	acide ribonucléique
ARN-DI	ARN défectifs interférents
BAX	« Bcl-2-associated X protein »
Ca <sup>++</sup>	Ion calcium
CK	citron kinase
DBS	« Dried Blood Spots »
E1/E2	protéines d'enveloppe 1 et 2
ECP	effet cytopathogène
ELISA	« Enzyme-Linked Immunosorbent Assay »
GAVI	Global Alliance for Vaccines and Immunization
HUVEC	« human umbilical vein endothelial cells »
IFN	interféron
IgG	immunoglobulines G
IgM	immunoglobulines M
IH	inhibition de l'hémagglutination
IN	inhibition de la neutralisation
IPB	Institut Pasteur de Bangui
IRC	infection rubéoleuse congénitale
ISGs	« IFN-stimulated genes »
kDa	kiloDalton
LIH	Luxembourg Institute of Health
LVER/IPB	laboratoire des virus entérovirus/rougeole institut Pasteur de Bangui
M7G	Coiffe de l'ARN messenger en 3'
MEGA	« molecular evolutionary genetics analysis »
MET	microscopie électronique à transmission
MMR	« Measles, Mumps, Rubella »
MTOC	« microtubule-organizing center »
nsP	protéine non structurale
OMS	Organisation mondiale de la Santé
ORF	« open-reading frames » (cadre de lecture ouvert)

PABP	« poly(A)-binding protein »
PAMV	Plan d'Action Mondiale pour les Vaccins
PCR	« Polymerase Chain Reaction » ; Réaction de Polymérisation en Chaîne
Rb	« retinoblastoma tumor suppressor protein »
RCA	République Centrafricaine
RNAi	« Interfering ribonucleic acid » ; ARN interférent
rRT-PCR	« Real time Reverse Transcriptase PCR » ; Transcriptase inverse-PCR en temps réel
RUHV	Ruhugu virus
ROR	Rougeole, Oreillons, Rubéole
RUSV	« Rustrela virus »
RuV	« Rubella Virus »
SA	Semaines d'aménorrhées
SNC	système nerveux central
sP	protéines structurales
SRC	Syndrome de Rubéole Congénitale
TDR	test de détection rapide
VR	virus de la rubéole
VSR	« viral suppressor of RNAi »

# **ETAT DE L'ART**

# I. Introduction

La rubéole est une maladie virale aiguë, strictement humaine, qui touche principalement les jeunes enfants et les adultes jeunes chez lesquels elle est presque toujours bénigne. L'importance de cette infection tient à la survenue chez une femme enceinte au cours des trois premiers mois de grossesse d'une infection fœtale responsable d'atteintes sensorielles et de malformations, c'est le « syndrome de rubéole congénitale » ou SRC.

L'infection post natale, quel que soit l'âge ou le sexe, est classiquement une éruption maculo-papuleuse fébrile mais souvent asymptomatique. Le SRC est un problème de santé publique qui ne peut être combattu que par la vaccination [1;2]. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 103.000 cas de SRC surviennent chaque année en majorité en Asie du sud-est et en Afrique [3].

Si la vaccination systématique de la population fait disparaître la rubéole, celle-ci n'est pratiquée que dans les pays européens, les pays d'Amérique et quelques pays d'Asie. Du fait de la stabilité antigénique la vaccination protège contre toutes les souches de Rubella virus (RuV) [4]. Aussi l'éradication mondiale de la rubéole est possible. La mise en place de la vaccination dans les pays d'endémie rubéoleuse est indispensable et nécessite une prise de conscience au niveau local pour assurer une couverture vaccinale suffisante pour protéger la population féminine en âge de procréer [5].

La République Centrafricaine (RCA) a introduit, en 2000, la vaccination contre la rougeole. Elle doit prochainement mettre en œuvre celle contre la rubéole. Jusqu'à présent cette infection infantile était négligée dans le pays. Avant de débiter cette vaccination l'OMS impose une étude de prévalence et une détermination des génotypes de RuV circulant afin de pouvoir suivre l'efficacité des mesures de lutte qui seront prises contre cette infection. Dans ce but, le travail présenté a consisté tout d'abord à compléter une enquête nationale de prévalence puis à déterminer à partir de prélèvements sanguins recueillis dans tout le pays, les génotypes de RuV circulant depuis 2008.

## **II. Généralités**

### **II.1. Historique de la rubéole**

#### **II.1.1. Découverte de la maladie**

Les premières descriptions cliniques de la rubéole remontent au XVIII<sup>ème</sup> siècle, faites par trois médecins allemands, Hoffmann en 1740, Bergen en 1752 et Orlow en 1758 (Tableau I). Appelée « rōtheln », elle a été initialement considérée comme une variante de la rougeole ou de la scarlatine. En raison de la forte influence allemande, la maladie a été populairement connue sous le nom de « German measles » (rougeole allemande) appellation toujours utilisée dans les pays anglo-saxons [1;6]. En 1814, de Maton la décrit comme une maladie distincte de la rougeole. Veale, en 1866 lui donne le nom de "rubéole" (du latin, « rubeola » signifiant "petit rouge") à la suite de l'observation d'une épidémie en Inde. La rubéole a été reconnue officiellement comme une entité individuelle en 1881 lors du congrès international de médecine à Londres [2;6]. Sur la base d'une recherche sur des singes, Hess en 1914 a démontré que la rubéole était due à un « agent ultrafiltrable ». L'étiologie virale de la rubéole a été établie par Hiro et Tosaka en 1938 avec des lavages nasaux filtrés provenant de cas aigus [2]. Les premiers cas d'isollements du virus de la rubéole ont été rapportés indépendamment en 1962 par Parkman et al. sur des cellules rénales primaires de singe vert africain et par Weller et Neva sur des cellules amniotiques humaines [7].

#### **II.1.2 Découverte du syndrome de rubéole congénitale**

Au cours d'une vaste épidémie de rubéole, en 1941, en Nouvelle-Galles du Sud (Australie), l'ophtalmologiste Gregg a été le premier à décrire une association entre l'infection en début de grossesse et la cataracte congénitale. Pendant l'épidémie, Gregg a examiné 13 bébés atteints de cataracte congénitale bilatérale et identifié 78 cas supplémentaires avec ses confrères. Les cataractes impliquaient toutes les couches sauf les plus externes du cristallin, suggérant que la formation de la cataracte avait commencé au début de la gestation en raison d'un facteur toxique ou infectieux commun. Certains de ces nourrissons souffraient également de cardiopathies congénitales. Des antécédents de rubéoles en début de la grossesse ont été rapportés sur 68 mères [8]. Gregg a ainsi été le premier à décrire qu'une exposition environnementale, et, dans ce cas particulier, à un agent infectieux, au cours du premier trimestre de la grossesse pouvait causer une atteinte fœtale entraînant des fausses couches, des mortinatalités ou des malformations congénitales correspondant à ce qui sera appelé « syndrome de rubéole congénitale » (SRC). Plus tard, Swan et al. (1943) et Gregg (1944) ont décrit d'autres importantes malformations causées par la rubéole [6]. L'idée que les virus puissent être

des agents tératogènes a ainsi été introduite [9;10].

### **Tableau I : Historique de la rubéole**

<p><b>1740</b> Première description clinique de la rubéole</p> <p><b>1881</b> Le Congrès international de médecine reconnaît la rubéole comme une maladie distincte.</p> <p><b>1941</b> Gregg en Australie décrit les cataractes d'enfants nés de mères ayant eu une rubéole en cours de grossesse.</p> <p><b>1962</b> Isolement du virus de la rubéole en culture cellulaire. Premiers tests diagnostiques (neutralisation)</p> <p><b>1963–64</b> Épidémies importantes en Europe et aux États-Unis. 12,5 millions de cas de rubéole, 11 000 décès fœtaux et 20 000 cas de SRC aux États-Unis</p> <p><b>1969-1970</b> Homologation de Vaccins à virus atténués (États-Unis et Royaume-Uni)</p> <p><b>1971</b> Introduction du vaccin MMR (Measles, Mumps, Rubella) aux États-Unis.</p> <p><b>1978, 1979 et 1983</b> Importantes épidémies de rubéole au Royaume-Uni.</p> <p><b>1988</b> Royaume-Uni offre le vaccin MMR aux enfants d'âge préscolaire des deux sexes.</p> <p><b>1989</b> Les États-Unis introduisent la vaccination par MMR à deux doses, la première à 12–15 mois et la seconde à 4–5 ans ou 11–12 ans.</p> <p><b>1989–91</b> Résurgence de la rubéole aux États-Unis (populations non vaccinées).</p> <p><b>1996</b> Au Royaume-Uni, la vaccination des écolières a été interrompue mais une deuxième dose de MMR a été introduite pour les enfants de 4 à 5 ans.</p> <p><b>2000</b> L'OMS organise la première réunion mondiale sur la rubéole depuis 1984.</p> <p><b>2002</b> 123 (57%) des 212 pays et territoires reconnus par l'OMS incluent la vaccination contre la rubéole dans les programmes nationaux de vaccination</p> <p><b>2005</b> Mise en place d'un génotypage des souches de RuV par l'OMS portant sur une séquence de l'ARN viral de 792 bases, utilisé universellement. Obtention des premières données épidémiologiques mondiales.</p> <p><b>2007</b> 1<sup>ère</sup> Mise à jour des données épidémiologiques par l'OMS.</p> <p><b>2009</b> Retrait du vaccin anti-rubéoleux monovalent (Meravax®) aux États-Unis. Le vaccin monovalent antirubéoleux est abandonné et remplacé par le vaccin bivalent MR (measles rubella) prescrit par l'OMS. Il est destiné aux pays qui n'ont pas de programme de vaccination systématique ou pour des campagnes ponctuelles de vaccinations.</p> <p><b>2013</b> 2<sup>ème</sup> Mise à jour des données épidémiologiques par l'OMS.</p> <p><b>2015</b> L'Amérique est déclarée libre de la rubéole par la Pan-American Association.</p> <p><b>2020-2021</b> Ralentissement des programmes de vaccination du fait de la pandémie de Covid-19.</p>
---

Par la suite, la culture du virus a permis d'établir un lien direct entre l'infection rubéoleuse maternelle et les manifestations fœtales. Les tests de diagnostic à partir du sérum ont pu être mis au point en particulier pour établir le statut sérologique de la femme avant une grossesse ou les enquêtes épidémiologiques [11].

La dernière grande épidémie de rubéole survenue aux États-Unis entre 1963 et 1964 estimée à environ 12,5 millions de cas, s'est accompagnée de 2.000 cas d'encéphalite, 11.250 avortements thérapeutiques ou spontanés, 2.100 décès néonataux et 20.000 SRC [1;11]. Cette épidémie a suscité des études du SRC et a stimulé la mise au point d'un vaccin. Entre 1965 et 1967, Stanley Plotkin a isolé la souche de RuV atténué RA27/3 qui est la plus utilisée pour la vaccination actuellement. Le premier vaccin contre la rubéole a été homologué en 1969 [2]. En 1971, un vaccin combiné contre la rougeole, les oreillons et la rubéole le « Measles, Mumps, Rubella » (MMR) a été homologué aux États-Unis. Les pays qui pratiquent la vaccination systématique par le MMR ont vu les rubéoles autochtones disparaître, et font face uniquement à des cas importés car une partie importante de la population mondiale, qui bénéficie seulement de la vaccination antirougeoleuse, n'a toujours pas accès à la vaccination antirubéoleuse. La rubéole reste endémique dans ces pays avec la survenue de milliers de problèmes obstétricaux et de SRC.

## II.2. Les Rubivirus

Le Rubella virus (RuV), a été classé dans la famille des *Matonaviridae* comprenant un seul genre *Rubivirus* (<https://ictv.global/taxonomy>) (Figure 1)

**Règne :** *Riboviria*

**Royaume :** *Orthornavirae*

**Classe :** *Kitrinoviricota*

**Phylum :** *Alsuviricetes*

**Ordre :** *Hepelivirales*

**Famille :** *Matonaviridae*

**Genre :** *Rubivirus*

**Espèces :** *Rubivirus rubellae* (virus de la rubéole, espèce type)

*Rubivirus strelense*

*Rubivirus ruteetense*

**Figure 1 : Taxonomie du « Rubella virus »**

N.B. : L'abréviation du nom commun du virus de la rubéole, « Rubella virus » (RuV), sera utilisée partout dans le texte.

Le RuV, spécifiquement humain, a été longtemps le seul virus de sa famille, mais, récemment, deux autres espèces de *Rubivirus* ont récemment été décrites chez l'animal :

*Rubivirus strelense*

*Rustrelavirus* (RUSV) isolé d'âne (*Equus asinus*), de capybara (*Hydrochoeris hydrochaeris*) et de Wallaby à cou rouge (*Macropus rufogriseus*), tous morts de méningo-encéphalite dans un zoo en Allemagne, ainsi que de mulots à collier (*Apodemus flavicollis*) trouvés dans l'environnement et qui pourraient constituer le réservoir naturel. Le même virus a été mis en évidence chez un coati sud-américain (*Nasua nasua*) au sein du même zoo et chez une loutre européenne (*Lutra lutra*) à proximité de celui-ci, tous les deux morts de méningo-encéphalite [5].

#### *Rubivirus ruteetense*

Le *Ruhugu virus* (RUHV) a été isolé de chauves-souris africaines, "cyclops leaf-nosed bats", asymptomatiques (*Doryrhina cyclops*)

D'autres *Rubivirus* animaux ont été découverts (noms provisoires, données de métagénomique)

« *Pacific electric ray Rubivirus* » (*Tetronarce californica*) [12]

"Tiger Flathead" (*Neoplatycephalus richardsoni*) Matonavirus [13]

« Chinese water snake » (*Myrrophis chinensis*) *Rubivirus* ; très différent du RuV, avec lequel il ne partage qu'environ 34% d'identité d'acides aminés [2;5;14].

Des régions hautement conservées de la protéine d'enveloppe E1 des trois *Rubivirus* (RuV, RUHV, RUSV) suggèrent que ces virus animaux pourraient infecter les humains [2]. Cependant leur découverte ouvre la porte à des études comparatives, jusqu'ici impossibles, et fournir, peut-être, des modèles animaux de rubéole et de SRC [5].

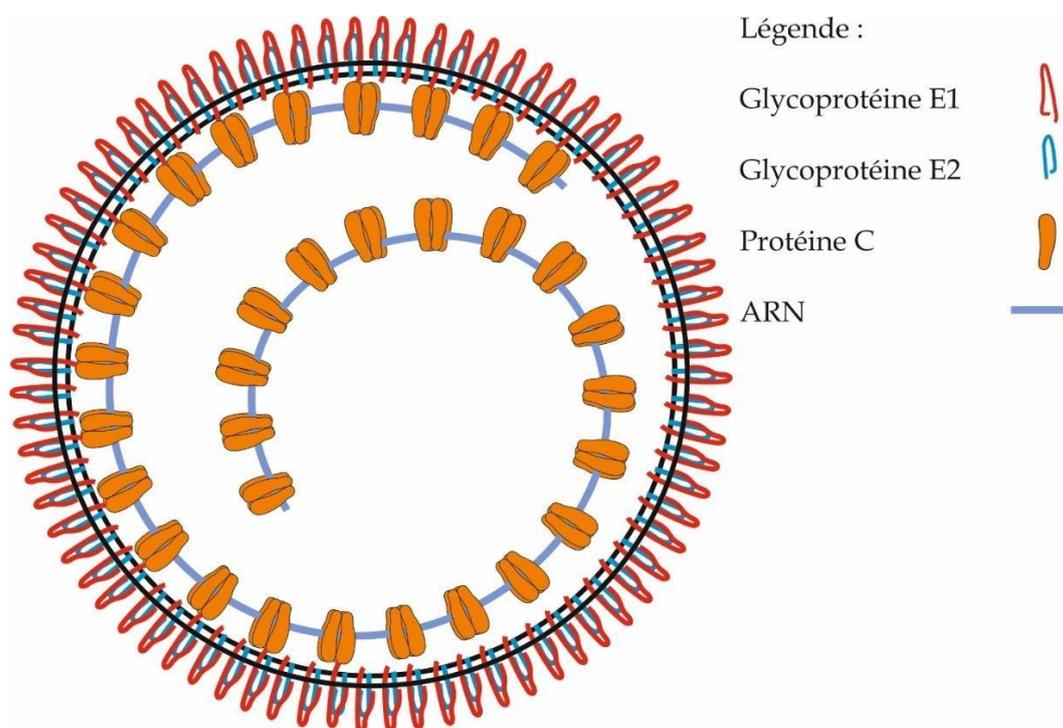
## **II.3. Le virus de la rubéole**

Le virus de la rubéole (*Rubella virus*, RuV) est un virus à ARN de polarité positive de structure génétique simple (son ARN ne code que 5 protéines), enveloppé, appartenant à la famille des *Matonaviridae* qui ne comprend qu'un seul genre (*Rubivirus*). La structure antigénique du RuV reconnue par les anticorps protecteurs est quasiment invariable de sorte que les vaccins protègent contre toutes les souches de RuV. Les Humains sont les seuls hôtes naturels du RuV [2;15] bien qu'*in vitro* des cellules animales de différentes origines soient sensibles comme les cellules primaires de singe grivet ou de rein de lapin, les premières utilisées, [16] ou les cellules Vero, cellules rénales de singe vert établies en lignée continue [17].

### **II.3.1. Structure du virus**

Le virus a une forme irrégulière et un diamètre moyen de 60 nm (50-90 nm). Les deux protéines d'enveloppe, [E1 (58 kDa) et E2 (42-47 kDa)], glycosylées, sont associées en hétérodimères E1/E2 qui forment des projections de 5-6 nm à la surface de la particule virale virus (Figure 2). Ces hétérodimères sont organisés en rangées ou en structure hélicoïdales irrégulières (structure inhabituelle

chez les virus). Les virions immatures ne possèdent pas de "spike" visible (peut-être du fait d'une association étroite entre la nucléocapside et E1/E2), ils ne présentent pas de structure particulière et sont uniformément opaques aux électrons. Donc l'organisation de la particule virale se fait au cours de la maturation en fin de cycle [17).



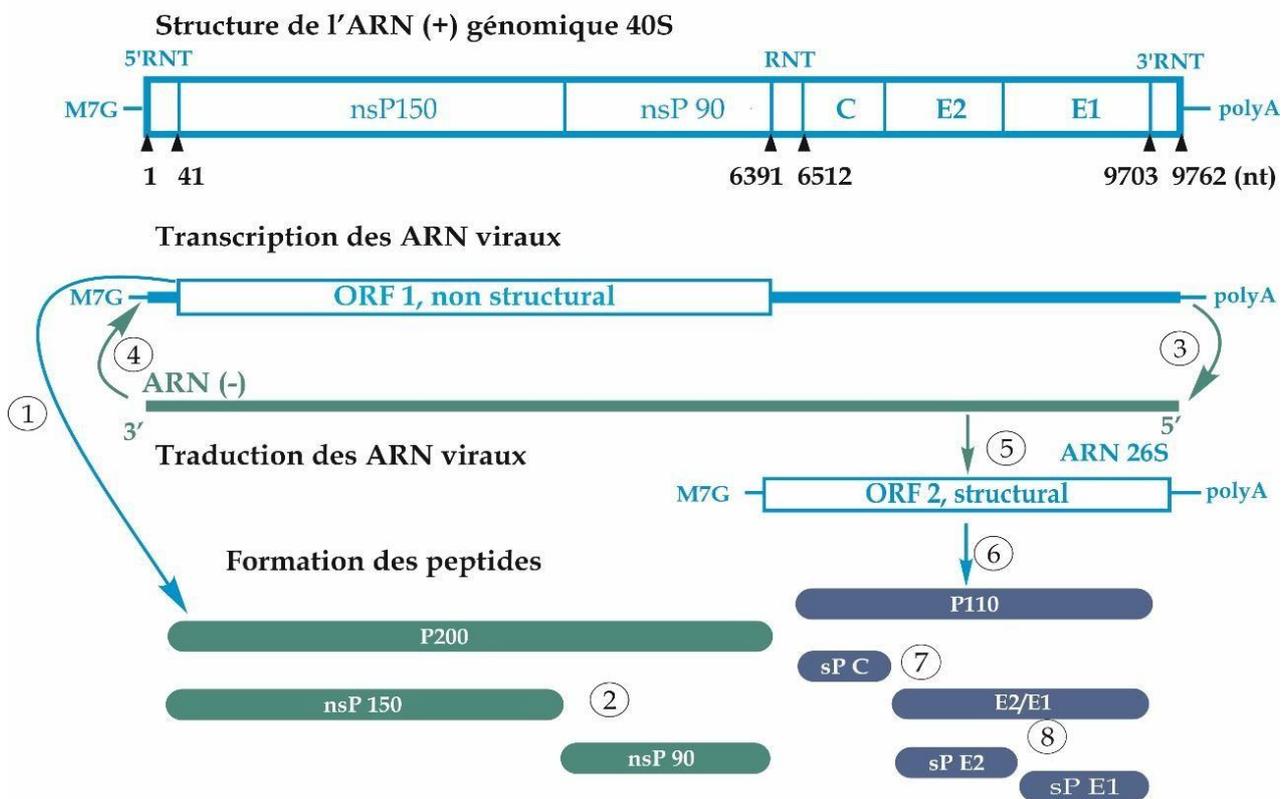
**Figure 2 : Schéma de l'organisation de la particule de RuV**

### II.3.1.1. Le génome viral

Il est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive de 9762 bases, avec deux cadres de lecture ouverts (« open-reading frames » [ORF]) et un G+C% de 69,5%. Cet ARN génomique (40S) a une structure d'ARN messager (coiffe en 5' M7G et queue de poly-adénosine (polyA) en 3' (Figure 3).

ORF 1 : composé de 6345 bases, il est traduit directement sur l'ARN 40S en une polyprotéine de 200 kDa. Celle-ci est ensuite clivée en deux protéines non structurales nsP150 et nsP90 de 150 et 90 kDa respectivement.

ORF 2 : il est transcrit à partir de l'ARN (-). L'ARN messager code une polyprotéine de 110 kDa qui est clivée ultérieurement en 3 protéines structurales (sPC, sPE2 et sPE1).



**Légende :**

- Traduction de l'ORF1 directement à partir de l'ARN génomique
- Auto-clivage de la P 200, produisant les nsP 150 et nsP 90
- Transcription de l'ARN génomique (+) en ARN (-)
- Transcription de l'ARN (-) en ARN (+) génomique
- Transcription de l'ARN (-) et production de l'ARN (+) 26S correspondant à l'ORF 2
- Traduction de l'ARN 26S produisant la P110
- Clivage de la P110 et individualisation de la sP C
- Clivage de la polyprotéine E1/E2 en sP E1 et sP E2

- RNT : région non transcrite
- M7G : 5' "cap" (coiffe)
- ORF : Open reading frame (Cadre ouvert de lecture)
- nucléotide PolyA : 3' polyadénosine
- sP : Protéine structurale
- nsP : protéine non structurale
- nt :

**Figure 3 : L'ARN viral et les protéines codées**

**II.3.1.2. Les protéines virales**

**II.3.1.2.1. Protéines non structurales (nsP)**

- nsP150 : elle possède une activité méthyltransférase (formation de la coiffe des ARNm viraux) une séquence X (activité inconnue) et, en C terminal, une activité protéase en cis qui assure l'auto-

clivage de la P200.

- nsP90 : elle possède les activités hélicase et ARN polymérase ARN dépendante (réplication des ARN (+) et (-) viraux).

#### **II.3.1.2.2. Protéines structurales (sP)**

- Protéine de capsid (sPC), 33-38 kDa : composée de 300 acides aminés [18], elle est phosphorylée, non glycosylée et forme des dimères par pont disulfure. Elle constitue la nucléocapside avec l'ARN génomique
- sPE1, 44-54 kDa : elle est glycosylée, transmembranaire. Un résidu de 22 acides aminés forme une séquence hydrophobe considérée comme la partie transmembranaire de la molécule. Elle est suivie d'une séquence cytoplasmique de 13 acides aminés.
- sPE2, 58 kDa : elle est composée de 481 acides aminés et possède 3 sites de glycosylation et, également, une séquence hydrophobe transmembranaire [19].

### **II.3.2. Cycle viral**

#### **II.3.2.1. Culture cellulaire**

De nombreuses lignées cellulaires, (humaines ou animales) sont permissives pour RuV aussi bien des cellules primaires (cellules de rein de singe vert) que des lignées continues (fibroblastes, cellules endothéliales...). La croissance du RuV est lente dans la plupart des modèles cellulaires et le rendement en titre viral est faible. Par contre, les cellules Vero sont très sensibles avec un rendement élevé car ces cellules ne produisent pas d'interféron [20] bien qu'elles possèdent les récepteurs à ces molécules. La période de latence avec les cellules Vero est de 8 à 10 heures.

#### **II.3.2.2. Déroulement du cycle viral**

Les numéros correspondent à ceux de la Figure 4.

1. Attachement : du fait du grand nombre de cellules sensibles, le récepteur du virus doit être ubiquitaire, mais pour le moment il n'est pas caractérisé [6] ;
2. Entrée par endocytose ;
3. Fusion de la membrane de l'endosome et de l'enveloppe virale ce qui nécessite un pH bas et des ions  $Ca^{++}$  ;
4. Traduction directe de l'ORF1 de l'ARN génomique (+), la polyprotéine de 200 kDa produite est clivée en nsP150 et nsP90 ;
5. L'ARN (+) est transcrit en ARN (-) par la nsP90 et servira de matrice pour la transcription de l'ARN génomique ;
6. Transcription de l'ORF2 à partir de l'ARN (-) en un ARN (+) 24S avec coiffe et queue polyA ;

7. Traduction de l'ARN 24S avec production de la polyprotéine P110 ;
8. La P110 se lie au réticulum endoplasmique ;
9. Transcription de l'ARN (-) en ARN (+) génomique qui s'associe aux dimères de la sPC pour former la nucléocapside ;
 

N.B. : La synthèse de l'ARN se déroule dans des vésicules (complexes de réplication) dérivées des membranes de l'endosome et/ou lysosome, formant des diverticules internes, qui protègent l'ARN viral, en particulier l'ARN intermédiaire double brin, de l'action des ribonucléases cellulaires. Ces structures vésiculaires sont associées au réticulum endoplasmique rugueux où la protéine C est présente ce qui facilite l'encapsidation [21].
10. La polyprotéine 110 kDa pénètre dans le réticulum endoplasmique où la sPC est séparée de la polyprotéine E2-/E1 par une enzyme cellulaire. Cette dernière est ensuite clivée en sPE1 et sPE2 ;
11. Pendant le cycle viral la sPC se lie aux mitochondries et à la nsP150 ;
12. L'ARN (+) génomique est encapsidé par la sPC formant la nucléocapside ;
13. sP E1 et sP E2 forment des hétérodimères qui migrent vers le Golgi et s'accumulent dans ses membranes [22] ;
14. Le virion se forme par bourgeonnement de la nucléocapside à l'intérieur des citernes du Golgi après contact entre la sPC et l'hétérodimère E1/E2 où se déroule sa maturation [23] ;
15. Le virion sort du Golgi par exocytose selon un mécanisme qui n'est pas encore bien compris.

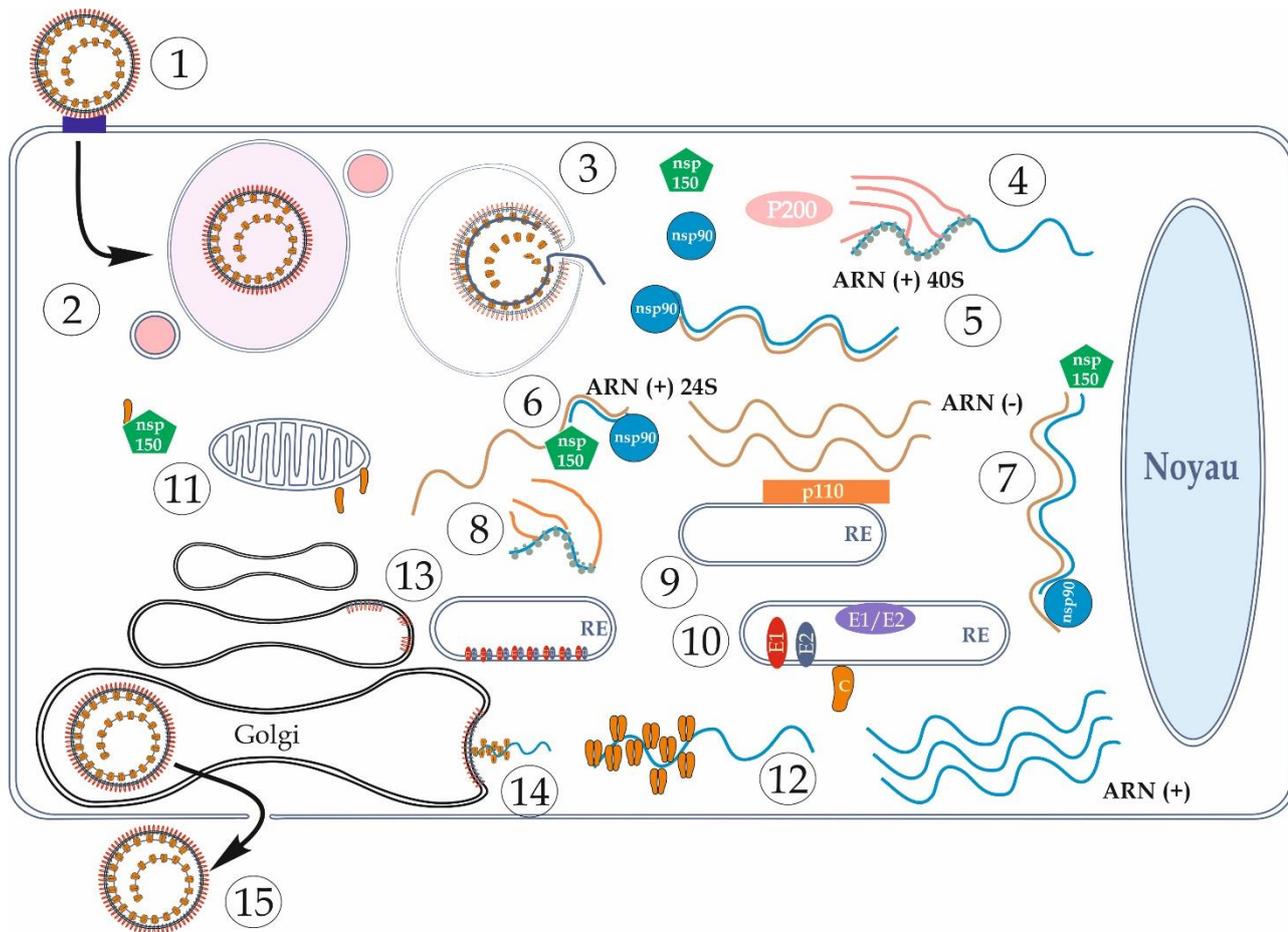
### **II.3.2.3. Rôle des protéines et de l'ARN viral au cours du cycle viral**

#### **II.3.2.3.1. Protéines non structurales**

##### **nsP150**

- L'activité protéase en C terminal agissant en cis assure le clivage de la protéine P200 ;
- Elle assure la synthèse de la coiffe des ARNm viraux (24 S et 40 S) ;

La nsP150 forme des fibrilles dans le cytoplasme de la cellule [24] qui se connectent au « microtubule-organizing center » (MTOC). Cependant ces structures ne sont pas nécessaires pour la réplication virale et leur fonction, s'il en existe une, n'est pas connue. Un rôle dans le transfert du génome viral de cellule en cellule en l'absence de production virale a été avancé [25].



### Légende

	Polyprotéine (non structurale)	①	Liaison virus/récepteur
	nsp 150	②	Endocytose
	nsp 90 (ARN polymérase)	③	Fusion enveloppe/membrane et décapsidation
	Polyprotéine (structurale)	④	Traduction de l'ORF1
	Protéine C (capside)	⑤	Synthèse de l'ARN (-)
	Polyprotéine	⑥	Synthèse de l'ARN (+) 24 S
	Glycoprotéine E2	⑦	Traduction de l'ORF2
	Glycoprotéine E1	⑧	Reconnaissance P110/RE
	ARN (+)	⑨	Synthèse de l'ARN (+)
	ARN (-)	⑩	Clivage de P110 (C, E2, E1)
	Lysosome	⑪	Relation C/mitochondrie et C/nsp150
	Réticulum endoplasmique	⑫	Encapsidation de l'ARN(+)
		⑬	Migration de E1 et E2 vers le Golgi
		⑭	Formation du virion par invagination de la membrane du Golgi
		⑮	Virion néoformé sortant par exocytose

**Figure 4 : Cycle de réplication du Ruv**

### nsP 90

- Elle a une activité de protéine chaperonne pour la nsP150 et la séparation des deux protéines non structurales [26].

- C'est l'ARN polymérase ARN dépendante. Elle a également une activité hélicase. Elle assure la synthèse de l'ARN (-), de l'ARN 24 S et de l'ARN génomique. Ces synthèses se déroulent dans les vacuoles, formant le complexe de répllication.
- Elle interagit avec le "retinoblastoma tumor suppressor protein" (Rb) et possède un motif de liaison à Rb. Cette interaction a été montrée *in vitro* et *in vivo*. Elle pourrait induire une stimulation de la synthèse des ARN [27]. Un rôle de cette interaction dans le pouvoir tératogène du virus n'est pas établi.
- Son expression suffit à bloquer les cellules après la phase S. La nsP 90 se co-localise avec la citron kinase (CK), protéine qui intervient dans la polymérisation de l'actine et cette association pourrait perturber le fonctionnement de la CK [28].

### II.3.2.3.2. Protéines structurales

#### sP C, protéine de capsid

Elle possède de nombreuses fonctions :

- Les dimères, formés par des ponts disulfures, s'organisent spontanément en tétramères qui pourraient être nécessaires pour la formation de la nucléocapside. L'association ARN/sP C est possible par une liaison de l'ARN génomique avec une séquence formée d'acides aminés basiques mais pourrait ne pas être due à une séquence spécifique de l'ARN [22].
- La maturation de la P200 est sous le contrôle de la sP C [29].
- Les nucléocapsides se lient à la séquence cytoplasmique de sP E1, étape indispensable de la formation du virion [22]).
- La phosphorylation de la sP C joue un rôle essentiel au cours du cycle viral. La protéine possède 5 sites de phosphorylation (sérines S45, S46, S48, S52 et thréonine T47) mais le plus important est le S46 : une absence de phosphorylation pourrait permettre la libération de l'ARN au début de l'infection. Par contre la phosphorylation de ce site est nécessaire pour assurer l'encapsidation. Ceci implique un mécanisme de régulation de la phosphorylation de la protéine C [30].
- La phosphorylation en S46 entraîne une activité pro-apoptique de sP C du fait de l'induction de l'expression de BAX (« Bcl-2-associated X protein »), protéine à activité pro-apoptotique. Cependant l'activité pro-apoptotique du virus n'est observée que tardivement dans le cycle viral. En fait, la liaison de la région N-terminale de la sP C avec la région C-terminale de la protéine p32 (protéine mitochondriale de fonction inconnue) a une activité anti-apoptotique qui protège le virus dans les premières étapes du cycle. La sP C interagit avec les mitochondries qui sont regroupées près du noyau de la cellule infectée [31;32;33] et sont nécessaires pour permettre sa multiplication [33]. L'interaction du RuV avec les mitochondries, mise en évidence par Microscopie Electronique

à Transmission (MET), se traduit par des zones denses aux électrons associées à ces organelles. Les mitochondries sont associées aux complexes de réplication et pourraient fournir l'énergie indispensable pour ce processus. On ne sait pas si cette association est le fait d'une structure spécifique ou d'une protéine [31].

- La sP C a une activité de suppresseur d'ARNi (« viral suppressor of RNAi » [VSR] activity). Elle séquestre l'ARN double brin empêchant l'activité du "Dicer". Cette activité nécessite la dimérisation de la sP C et la présence de deux résidus, arginine R169 et aspartate D171 [34].
- La sP C interagit avec la NSP150 mais le rôle de cette association n'est pas établi [35].
- La sP C se lie à la "poly(A)-binding protein" (PABP) qui bloque la traduction de l'ARN et facilite l'encapsulation [36].

### **sP E1, glycoprotéine E1**

- Une séquence (non identifiée) de sP E1 se lie au récepteur cellulaire (non identifié). Cette séquence pourrait être le site reconnu par les anticorps neutralisant.
- Une séquence hydrophobe permet la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane de l'endosome.
- La séquence d'acides aminés 195-296 de sP E1 contient des déterminants pour la neutralisation et l'hémagglutination et pourrait représenter un domaine antigénique majeur. Le séquençage des nucléotides de la région correspondante (8696-9154) de 22 souches de RuV a montré que 196 changements de nucléotides concernaient 55 sites par rapport à la souche Therien mais la séquence d'acide aminé déduite n'est modifiée que pour 6 acides aminés situés en dehors des déterminants. Cette région est donc antigéniquement stable [19].
- Le résidu cytoplasmique de 13 acides aminés est indispensable pour la libération du virion. Les mutations Y472A or Y473S inhibent complètement ce processus [37].
- La séquence transmembranaire maintient le lien de la protéine au réticulum endoplasmique tant que l'hétérodimère E1/E2 n'est pas constitué. Une fois celui-ci formé, le transfert vers le Golgi est possible piloté par la séquence transmembranaire de sP E2. sP E1 ne possède pas de signal de rétention dans le Golgi [19].

### **sP E2, la glycoprotéine E2**

- Elle possède des propriétés d'hémagglutination (faible) et de neutralisation et porte des épitopes spécifiques de souche [38]. Bien que la structure de l'hétérodimère E1/E2 ne soit pas connue [39] il est vraisemblable que sP E2 est, au moins en partie, englobée dans sP E1 car peu accessible aux anticorps.
- Le domaine transmembranaire de sP E2 est un signal de rétention dans le Golgi et nécessaire pour

le transport de l'hétérodimère E1/E2 vers cette organelle [40].

#### **II.3.2.3.3. L'ARN génomique**

- L'extrémité 3' de l'ARN (+) génomique s'associe à la séquence N-terminale de la « calreticulin » (protéine qui module l'expression de gènes) et stimule la phosphorylation de celle-ci. La conséquence est une stimulation de la synthèse du brin (-) [41].
- Des ARN défectifs interférents (ARN-DI) sont produits au cours de la réplication du RuV. De taille variable (7000 et 800 bases), ils conservent l'extrémité 3' de l'ARN [42]. Ces ARN, du fait d'une délétion interne, possèdent la fin de la séquence correspondant à la nsP 90, celles de la région non transcrite, du début de C et de la fin de sP E1 avec la queue polyA. Ces ARN mis en évidence sont retrouvés après plusieurs passages en culture cellulaire. Ils sont de type messenger et traduits en une protéine de fusion C/E1. Cette protéine présente au cours de la réplication virale n'est pas incorporée dans la particule virale. Son rôle serait d'assurer la production de l'ARN-DI correspondant [34].

#### **II.3.2.4. Effet cytopathogène**

Au microscope, les cellules en culture ne présentent qu'un effet cytopathogène (ECP) limité, voire une totale absence. Tout au plus on observe un arrondissement des cellules et un détachement de leur support. La microscopie confocale a permis d'observer des formations de fibrilles de NP 150 [21]. La MET montre les formations vésiculaires dérivées de la membrane des endosomes/lysosomes [21], une altération du cytosquelette et une dépolarisation des filaments d'actine avant leur complète désintégration [43] ainsi qu'une accumulation de matériel hyperchromatique. Les microtubules demeurent intacts. La formation de virions a aussi été décrite avec invagination de la nucléocapside dans les vésicules de Golgi [23].

#### **II.3.2.5. Interactions du RuV et du métabolisme cellulaire**

##### **II.3.2.5.1. Persistance du RuV dans les cellules**

Les infections des cellules peuvent évoluer vers une infection persistante du virus, *in vitro*, et après plusieurs passages en culture cellulaire [44] et *in vivo* en particulier chez un patient immunodéprimé [45].

##### **II.3.2.5.2. RuV et interférons**

L'infection d'une cellule permissive par RuV se traduit par une production d'interféron, bien qu'à un degré moindre qu'avec le *Sendai virus* [46]. Le phénomène d'interférence, observé avec les cellules infectées par le RuV, dont l'infection se développe lentement, entraîne une « immunité » à une épreuve par un virus à réplication rapide (ex. : *Poliovirus 1*, *Vaccinia virus*, *Vesicular Stomatitis virus*), alors

que les cellules non infectées par RuV sont rapidement lysées. L'interféron (IFN) produit est mis en évidence dans le milieu de culture par son effet inhibiteur sur la réplication de *Vaccinia virus* ou de *Vesicular Stomatitis virus*, et quantifiée par des préparations d'interféron de référence [20]. L'interféron produit par la cellule hôte pourrait contribuer à l'établissement d'une infection persistante de la cellule hôte après repiquages pendant 3 ans [44]. Les cellules endothéliales fœtales produisent de l'interféron IFN- $\beta$  [47]. Les macrophages activés, infectés par RuV, expriment les IFN- $\alpha 2$ , IFN- $\beta$  and IFN- $\lambda 1$  quel que soit leur statut (pro- ou anti-inflammatoire) [48]. Après inoculation de RuV, la production d'IFN- $\beta$  est stimulée dans les cellules neuronales sous l'action du récepteur des IFN-I. Les gènes effecteurs, activés par l'IFN (IFN-stimulated genes ou ISGs), sont exprimés dans la cellule [49]. Donc la production d'IFN par la cellule infectée se traduit par un effet antiviral modéré qui est contré par le métabolisme induit par le virus.

### II.3.2.5.3. RuV et apoptose

RuV induit une apoptose des cellules Vero, mis en évidence dans les cellules détachées et le processus apoptotique joue un rôle dans la relation entre le virus et les cellules [50]. Cependant, la sensibilité des lignées cellulaires au RuV est très variable. Les cellules primaires de rein de singe vert tolèrent la présence du virus pendant longtemps sans aucun ECP. Par contre le virus se réplique rapidement avec un fort titre viral dans les lignées cellulaires Vero ou BHK21 [51]. Les cellules RK13 (« rabbit kidney » ; rein de lapin) sont permissives avec un faible rendement viral. Ces cellules sont sensibles à l'apoptose induite par RuV. Les mécanismes dépendants ou indépendants de la protéine P53 sont mis en jeu dans la mort cellulaire programmée induite par RuV. Une survie prolongée des cellules infectées par RuV est possible par induction de la « phosphatidylinositol 31-kinase (PI3K)/AKT survival pathway » et par l'activité anti-apoptotique de la sP C [52]. L'apoptose est liée à la réplication virale et l'expression des protéines de structure n'est pas en cause dans l'induction de l'apoptose [53]. La lyse cellulaire s'accompagne d'une induction de l'apoptose qui intervient tardivement dans le cycle, initiée par l'ARN double brin et les nsP associées au complexe de réplication, processus lié aux caspases et à Bcl-2 [52]). Bien que la sP C soit un inducteur d'apoptose quand elle est liée à la séquence d'ancrage à la membrane [54], elle a aussi une forte activité anti- apoptotique pendant les premières étapes du cycle viral du fait de son interaction avec la p32 qui inhibe l'activité pro-apoptotique de la protéine Bax, ce qui protège la mitochondrie et donc prévient l'induction d'une activité apoptotique [31] permettant la poursuite du cycle viral [32]. Les deux voies métaboliques “phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt survival signaling” et “Ras-Raf-MEK-ERK proliferative signaling” permettent la réplication virale car elles contribuent à repousser l'apparition de l'apoptose induite par la réplication du RuV [55]. L'inhibition de l'apoptose dans les cellules infectées pendant les premières étapes du cycle viral est

essentielle pour assurer la réplication du virus [56].

### II.3.3. Structure antigénique

La communauté antigénique des RuV a été reconnue très tôt [57]. Les premières études antigéniques ont fait appel aux anticorps monoclonaux (AcM) et ont mis en évidence l'existence d'épitopes sur la glycoprotéine E1 correspondant à l'inhibition de l'hémagglutination (IH) de la neutralisation (IN). Trois différents sites ont été identifiés avec une proximité des ceux correspondant respectivement à IH et IN [58]. Des AcM inhibant ces deux activités, séparément ou non, ont été obtenus [59]. Des AcM réagissant avec la glycoprotéine sP E2 ont une activité IN. Les AcM dirigés contre la protéine C de capsid n'ont aucune de ces deux activités [38]. Les trois épitopes ainsi identifiés correspondant aux activités IH et IN sont situés dans une région de 40 acides aminés de la sP E1 (245-285) [60]. L'existence d'épitopes additionnels a été rapportée dans la région 214-240 correspondant également à des activités IH et IN d'AcM [61]. La région 213-239 insérée dans un peptide synthétique est reconnue par les anticorps de patients infectés naturellement ou vaccinés mais par contre très peu par ceux des patients atteints de SRC ou non répondeurs à la vaccination [62].

Malgré les parentés antigéniques des souches de RuV, des différences existent entre les souches dont le comportement peut différer in vivo: les titres d'IH, les interactions avec les AcM diffèrent entre les souches sauvages et vaccinales et sont associées à des variations de séquences [63]. Celles-ci sont rares dans la région 195-296 de sP E1 et ne sont pas associées à des réinfections. Les différences, entre 22 souches, des séquences nucléotidiques de la région correspondant à E1 ne dépasse pas 9% et celles des acides aminés est inférieure à 2% montrant que cette région est hautement conservée [4].

### II.3.4. Variabilité génotypique

La séquence complète du génome de RuV (souche Therien) a été publiée en 1990, et a montré l'éloignement des *Rubivirus* et des *Alphavirus* qui étaient à cette date inclus dans les *Togaviridae*. Le génome de RuV est composé de 9759 bases avec un G+C% de 69,5%. Des séquences partielles étaient déjà disponibles en particulier de la région E1 alors que celle de la région non structurale était inconnue [64]. La séquence de l'ARN subgénomique 24S de la souche vaccinale RA27/3 a permis de montrer que les 3 protéines structurales de cette souche et celles de la souche sauvage Therien différaient par 31 acides aminés (dont 12 dans la sP E1) [65]. Les séquences complètes de la souche vaccinale RA27/3 et de la souche Therien confirment le résultat précédent avec cependant un génome de 9762 bases (dimension finalement admise) mais avec le même G+C% de 69,5%. L'analyse de la séquence de bases a confirmé l'existence de 2 ARN subgénomiques correspondant respectivement aux protéines non structurales et structurales. [66]. La séquence nucléotidique, correspondant à E1, de 5 souches

vaccinales (To-336, TCRB19, Matsuba, Takahashi, Matsuura) et de 3 souches sauvages [progéniteurs des souches vaccinales, TO-W (TO-336), TK-W(Takahashi) et MR-W (Matsuura)] a montré que 50 sites mutés correspondant à 9 changements d'acides aminés avec des différences entre les souches sauvages et vaccinales [67]. Une deuxième étude portant sur les nucléotides codant la séquence d'acides aminés 195-296 n'a montré aucune différence d'acides aminés avec ceux de la souche Therien sauf pour 1 souche (E1-N213H) isolée du liquide synovial d'un patient immunodéprimé. Des modifications d'acides aminés ont été notées mais en dehors des déterminants antigéniques [4]. Donc la protéine E1, responsable de la reconnaissance de la cellule par le virus peut varier d'une souche à l'autre mais tout en gardant ses propriétés antigéniques.

Une étude a regroupé 63 séquences nucléotidiques de la région de l'ARN viral de 8280 à 9470 (1191 nt) correspondant à la majeure partie de la séquence codant la sPE1. La variabilité des séquences a permis de les regrouper en 3 clades en fonction de leur origine géographique (USA, Europe, Japon). Les différences proviennent de 291 changements de base (sur 1191 nt) soit 24%. Ces changements de séquence ne correspondent pas à des changements d'acide aminé dans 83% des cas (242). La séquence correspondant aux régions où sont situés les 6 épitopes identifiés (acides aminés 213-285), sites d'hémagglutination et/ou de neutralisation est la même chez 53 souches. Chez les 10 autres, 10 acides aminés de cette séquence diffèrent, mais 3 dans la région des épitopes chevauchant et un seul dans la région des 3 épitopes individualisés (épitope 3) [68]. Une étude complémentaire portant sur 103 souches a défini 2 génotypes. Le type I est nettement prédominant et d'extension géographique plus large que le type II. Ce dernier, représenté par un petit nombre de souche présente une plus grande diversité de séquences [69].

Pour rationaliser l'épidémiologie des souches de RuV, l'OMS a mis en place un système de typage des souches qui est depuis universellement utilisé. Il consiste en un séquençage de 739 nucléotides correspondant à la partie du génome viral comprise entre les nucléotides 8731 et 9469 appartenant à la région E1 et incluant la région correspondant aux épitopes. L'OMS a également fixé la nomenclature des souches. Les résultats de séquençage antérieurs ont été repris et une nomenclature des génotypes instituée avec 2 clades, 1 et 2. Le premier inclut des génotypes présents dans le monde entier tandis que le second est présent en Asie, Afrique et Europe. Certains génotypes ont disparu (1D,2A...). Les résultats de la surveillance épidémiologique des génotypes sont mis à jour régulièrement [70].

**Tableau II : Distribution des génotypes selon l’OMS**

2005		2007		2013	
1a	Rare	1a	Id.	1a	Id.
1B	Europe, Amérique du Sud	1B	-	1B	-
1C	Russie, Japon	1C	-	1C	-
1D	<1996				
1E	Diffusion globale	1E	Id.	1E	Europe, Amérique, Asie, Afrique
1F	<2002				
1g		1G	Afrique, Europe	1G	Afrique, Europe, Amérique du Sud
		1h	Asie, Europe	1H	Id.
1I	< 1994		-		-
		1J	Japon	1J	
2A	< 1980				
2B	Très répandu	2B	Id	2B	Europe, Amérique, Asie, Afrique
2c	Provisoire			2C	

N.B. : les génotypes écrits avec une minuscule correspondent à des appellations provisoires, ceux avec une majuscule sont les génotypes confirmés.

Considérant le grand nombre de souches isolées appartenant aux différents génotypes, il a été proposé de diviser les génotypes en lignées pour améliorer le suivi de l'évolution et de la circulation des souches. Par exemple le génotype G est divisé en 3 lignées principales dont une (L0) correspond à des souches isolées avant 2010 [71]. Récemment l’OMS a mis en avant l’intérêt du séquençage complet du génome des souches de RuV isolées car le génotypage n’est pas suffisant pour différencier les souches apparentées (virus vaccinaux ou variants) lors d’une épidémie [72].

#### **II.3.4.1. Génotypes dans la région Afrique de l’OMS**

Cinq souches recueillies entre 2001 et 2007 appartenaient aux génotypes 1G (Uganda et Côte d’Ivoire) et 2B (Afrique du Sud) [73]. En Uganda entre 2003 et 2012, sur 20 souches étudiées 19 appartenaient au génotype 1G et une au génotype 1E [74]. Depuis 3 souches du génotype 1G et 5 du génotype 2B ont été isolées entre 2012 et 2017 [74]. En RDC entre 2004 et 2013, 8 souches ont été séquencées et appartenaient aux génotypes 1B, 1E, 1G (1 de chaque), et 2B (5 souches) [75]. En Côte d’Ivoire, entre 2010 et 2016, 10 souches ont été séquencées : 9 appartenaient au génotype 1G-L1 et 1 au génotype 2B [76]. En RDC en 2014, une épidémie de rubéole était liée au génotype 2B (lignée 2c) avec une faible variation des souches. Cette étude a montré que le recueil de sang sur papier buvard (DBS : « dried

blood spots ») permettait le génotypage des virus à ARN (rougeole et rubéole) [77]. En République Centrafricaine, les génotypes 1E, 1G, et 2B ont été identifiés entre 2008 et 2016 [78].

### **II.3.4.2. Génotypes dans les autres régions**

Au Japon entre 2010 et 2014, sur 221 souches, 192 appartenaient au génotype 2B, principalement de la lignée 2B-L1 (87%), 26 au génotype 1E (12%), et 3 au génotype 1J (1%) [79]. Au Vietnam, entre 2011-2013, seul le génotype 2B a été trouvé [80]. A Taiwan qui a mis en place la vaccination MMR en 1992, 124 génotypes ont été déterminés parmi lesquels 84 ont été considérés comme importés et provenant de Biélorussie (1 souche de génotype [H1]), d'Allemagne (2 souches [2B]), d'Afrique du Sud (1 souche [2B]), de Chine (17 souches 15 [1E], 2 [2B]), d'Indonésie (2 souches [1E]), des Philippines (3 souches [1J]), de la Malaisie (12 souches, 10 [1E], 3 [2B]), de Thaïlande (2 souches [2B]), du Vietnam (43 souches, 15 [1E], 28 [2B]) [81]. A Beijing, en Chine, où la vaccination a été mise en place en 2000, des épidémies de rubéole ont été observées jusqu'en 2011, concernant, avec le temps, des populations de plus en plus âgées. Le génotype en cause était le 1E, mais correspondant à une lignée présente dans toute la Chine et apparemment spécifique au pays [82]. Neuf souches isolées en Inde entre 1992 et 2017 appartenaient toutes au génotype 2B [83]. Les souches étudiées au Brésil isolées entre 1996 et 2009 étaient du génotype 1a (6 isolées avant 2000 et une récente), 1B (4 isolées en 2000-2001) et 1G et 2B pour les plus récentes (8 souches de chaque) [84]. Les 16 souches étudiées, provenant d'une épidémie survenue en Italie en 2008, étaient toutes du génotype 2B [85]. Les 56 souches de SRC isolées en France entre 1995 et 2009 appartenaient à des génotypes variés : 49 [1E], 1 [1B], 2 [1G], 2 [2B], 1 [1h] et 1 atypique proche de 1B [86]. Lors d'une épidémie survenue en Roumanie en 2011-2012, 19 séquences ont été obtenues toutes du génotype 2B, 12 du lignage 2B-L2 (proches des souches d'Asie du Sud-Est) et 7 du lignage 2B-L1 (proches des souches africaines). Les souches précédentes, isolées dans le pays en 2003, étaient des génotypes 1E et 1G [87]. Les génotypes circulants actuellement (1E, 1G, 2B) sont présents en Afrique. Par contre, en Chine et en Asie ce sont surtout les génotypes 1E et 2B. Des lignées différentes sont décrites pour les génotypes 2B et 1E qui n'ont pas la même distribution géographique.

## **II.4. La rubéole et le SRC**

### **II.4.1. Physiopathologie**

#### **II.4.1.1. Rubéole post-natale**

La porte d'entrée habituelle du RuV est l'épithélium respiratoire du nasopharynx. Le virus est transmis via les particules d'aérosol de sécrétions des voies respiratoires des personnes infectées. Le virus se

fixe et envahit l'épithélium respiratoire où il se multiplie. Il se propage ensuite par voie hématogène (virémie primaire) aux ganglions lymphatiques régionaux et distants et se réplique dans le système réticulo-endothélial. Ceci est suivi d'une virémie secondaire qui survient 6 à 20 jours après l'infection. Au cours de cette phase virémique, le RuV peut être isolé de différents sites, notamment les ganglions lymphatiques, l'urine, le liquide céphalo-rachidien (LCR), le sac conjonctival, le lait maternel, le liquide synovial et les poumons. La virémie culmine juste avant l'apparition de l'exanthème, et se négative en quelques jours [2].

Les personnes atteintes de rubéole ne sont pratiquement plus infectieuses à la fin de l'éruption [2] (Figure 5), mais l'ARN viral peut être détecté dans le sang 3 jours après et parfois jusqu'à 10 jours pour les autres types de prélèvements [88].

Des réinfections surviennent, elles sont en général asymptomatiques et mises en évidence par une ascension des IgG [89].

#### **II.4.1.2. Syndrome de rubéole congénitale (SRC)**

##### **II.4.1.2.1. Infection du fœtus et ses conséquences**

L'infection fœtale se produit par voie transplacentaire pendant la phase virémique maternelle [90]. Quel que soit le stade, le RuV infecte le fœtus in utero. La gravité et la nature des atteintes fœtales dépendent de l'âge gestationnel au moment de l'infection. Le risque de lésions est le plus élevé au cours des 12 premières semaines de gestation correspondant à la période d'organogenèse. Plusieurs malformations d'organes peuvent survenir. Quarante-cinq (85%) des infections maternelles primaires surviennent pendant cette période. Le risque de SRC est réduit de moitié pendant les semaines de gestation 13 à 16. Le risque après la semaine 20 est très faible [2]. Les principales atteintes de SRC sont les déficiences auditives, les lésions oculaires et cardiovasculaires, et l'atteinte du système nerveux central (SNC) avec des retards de développement [88].

Lorsque l'infection maternelle se produit après la 18<sup>ème</sup> semaine de gestation, le risque de SRC est faible, cependant, le fœtus reste infecté et le nouveau-né présente une infection rubéoleuse congénitale (IRC). La persistance du virus chez le fœtus est liée à l'absence de système immunitaire au cours du premier trimestre et sa persistance par la suite du fait d'une tolérance immunitaire. L'IRC s'applique à tous les nourrissons infectés, atteints ou non de SRC. En l'absence de signes de SRC, le nourrisson a une simple IRC qui peut persister plusieurs mois. Cependant, une surveillance est nécessaire car des atteintes dues à l'infection fœtale peuvent ne se manifester qu'après plusieurs années.

Les mécanismes par lesquels le RuV cause des lésions fœtales sont mal connus. La persistance de l'infection dans un organisme sans défense immunitaire peut entraîner des lyses cellulaires, des perturbations de l'activité mitotique. L'activité pro-apoptotique du virus pourrait contribuer à ces

atteintes mais elle n'est pas prouvée. Il est vraisemblable qu'une vascularite secondaire soit également responsable d'une nécrose tissulaire en l'absence de réaction inflammatoire [2;90].

#### **II.4.1.2.2. Pouvoir tératogène du RuV**

Le RuV n'est pas tératogène pour les cellules en culture il est seulement responsable d'infections prolongées avec très peu d'effet cytopathogène. L'infection post-natale est en général bénigne et seule l'atteinte fœtale en cas d'infection maternelle au cours du premier trimestre de grossesse entraîne des lésions des organes. L'infection fœtale ne s'accompagne pas de destruction massive de tissus mais d'un déficit de développement des organes (système cardiovasculaire, encéphale, yeux...). Les premières études ont rapporté l'effet tératogène à une inhibition de la multiplication cellulaire, une cytolysse (mais celle-ci n'est pas observée *in vitro*), et enfin un déficit en apport sanguin [91]. Plus tard, une meilleure connaissance de la relation virus/cellule a amené à impliquer dans la tératogénèse le délitement des filaments d'actine [91], inhibant la mitose, la relation entre la réplication virale et les mitochondries, et l'apoptose, contrôlée par le virus et qui intervient en fin de cycle viral (arrondissement des cellules et détachement du support) [6]. Un arrêt de la division cellulaire associée à l'interaction nsP 90/citron kinase, est également un facteur pouvant induire une apoptose [92]. La diminution de la multiplication cellulaire est rendue responsable du petit poids à la naissance. L'existence de vascularite a été invoquée comme pouvant participer aux lésions tissulaires et provoquer des atteintes cérébrales. Le virus infecte et se multiplie dans les cellules endothéliales fœtales (HUVEC : human umbilical vein endothelial cells) [93] ce qui contribue à expliquer l'altération des vaisseaux. La mauvaise vascularisation qui en découle a été rattachée aux atteintes tissulaires cardiaque et cérébrale. Par contre les atteintes oculaires seraient liées à la réplication locale du virus en particulier dans le cristallin [94]. Des calcifications cérébrales sont associées à des manifestations tardives (retards psychomoteur et mental) [95].

#### **II.4.1.3. Réponse immunitaire humorale, cellulaire**

Les IgM anti-rubéole diminuent rapidement et sont généralement indétectables après 2 mois, alors que les anticorps IgG anti-rubéole peuvent persister toute la vie. Une réponse lymphocytaire à médiation cellulaire spécifique à la rubéole commence une semaine après la réponse humorale et persiste toute la vie.

Bien que l'infection naturelle par la rubéole confère généralement une immunité à vie, de rares cas de réinfections sérologique confirmées ont été rapportés. Ces infections surviennent plus fréquemment après vaccination (50%) qu'après une infection naturellement acquise (5%). La plupart des réinfections sont asymptomatiques [10;96] et se traduisent par une multiplication du virus dans les voies respiratoires supérieures et, plus rarement, par une virémie. Le risque d'une réinfection et d'une virémie dépend du

niveau d'anticorps sériques [10;97].

Des cas de SRC consécutifs à une réinfection chez des femmes enceintes présentant une immunité naturelle ou induite par un vaccin ont été observés mais exceptionnellement. Bien que les anticorps antirubéoleux maternels procurent une protection contre la rubéole pendant les premiers mois de la vie, la vaccination des nourrissons avant le déclin des anticorps maternels peut entraîner un échec de la primovaccination ou une réponse immunitaire atténuée [88].

Certaines des complications de la rubéole résultent des réponses immunitaires de l'hôte, notamment l'arthralgie, l'arthrite, le purpura thrombocytopénique et l'encéphalite, bien que leur physiopathologie ne soit pas entièrement comprise [2].

## **II.4.2. La rubéole**

### **II.4.2.1. La rubéole post natale de l'enfant**

Quel que soit l'âge, la rubéole est une infection bénigne et les symptômes varient peu d'une personne à l'autre [98;99]. Elle est asymptomatique chez 25 à 50% des personnes infectées [100].

#### **II.4.2.1.1. Incubation**

La période d'incubation est de 12 à 23 jours avec une moyenne de 18 jours. La première semaine suivant l'exposition est asymptomatique.

#### **II.4.2.1.2. Prodromes**

Au cours de la deuxième semaine suivant l'exposition, les premiers signes de maladie peuvent survenir jusqu'à 5 jours avant l'éruption cutanée. Ceux-ci consistent surtout en une fièvre modérée ( $<39,0^{\circ}\text{C}$ ), qui peut s'accompagner de maux de tête, de malaises, d'une conjonctivite légère (en particulier chez les adultes), de maux de gorge, de toux, d'un léger coryza, de céphalées. Un énanthème [101] du voile du palais (signe de Forschheimer) peut être observé. Une lymphadénopathie peut également être présente et touche classiquement les ganglions lymphatiques auriculaires postérieurs et sous-occipitaux. Elle dure 5 à 10 jours [101].

#### **II.4.2.1.3. Phase d'état : l'éruption**

L'éruption débute généralement sur le visage, en moyenne 17 jours après l'exposition au virus (intervalle de 12 à 23 jours) et se propage de façon centripète au tronc puis aux extrémités en 24 h et dure en moyenne 3 jours. C'est un exanthème maculo-papuleux formé de placards de 3-4 mm de diamètre, parfois atypiques (scarlatiniforme, purpurique). Le diagnostic sur une peau noire peut être difficile.

#### **II.4.2.1.4. Evolution**

La guérison complète est la règle sauf chez le sujet immunodéprimé qui peut présenter des infections chroniques.

#### **II.4.2.2. Formes cliniques**

- Les atteintes de l'adulte ne diffèrent pas de celles des enfants. Un érythème prurigineux peut être observé.
- Infection de l'immunodéprimé : granulomes
- La rubéole périnatale :
- La rubéole congénitale : les enfants suspectés d'avoir une rubéole congénitale doivent être surveillés attentivement pour l'apparition de nouveaux symptômes [102].

#### **II.4.2.3. Complications**

- Arthralgies observées principalement chez les adolescents et les jeunes adultes, elles touchent préférentiellement les femmes (jusqu'à 70%). Les articulations périphériques sont principalement concernées. Ce sont des polyarthralgies ou des polyarthrites transitoires qui régressent en général en deux semaines mais peuvent durer jusqu'à 1 mois. La guérison est complète, sans séquelles.
- Thrombocytopénies : les manifestations hémorragiques sont rares et surviennent dans environ 1 cas sur 3000. Le purpura thrombocytopénique est le plus fréquent. Des hémorragies gastro-intestinales, cérébrales ou intra-rénales sont exceptionnelles. L'hypoplaquettose peut être associée à une vascularite.
- Atteintes neurologiques : très rares (1 cas sur 5000), elles surviennent chez les enfants. Les symptômes débutent 2 à 4 jours après l'éruption et une encéphalite peut être observée. Cependant les signes sont généralement discrets et d'évolution favorable sans séquelles. De rares cas d'encéphalite chronique ont été décrits.
- Hépatite discrète, peu fréquente [10].
- L'iridocyclite hétérochromique de Fuchs (IHF) est une uvéite chronique antérieure, généralement unilatérale, non granulomateuse, d'apparition insidieuse. Elle se caractérise par une dépigmentation de l'iris. Elle entraîne surtout des troubles de la vision mais peut être asymptomatique [103]. L'étiologie de ce syndrome reste incertaine. Son association avec la rubéole repose sur des premières études montrant la présence d'IgG spécifiques anti-rubéoleuses et du génome viral chez les patients [104] mais cette association s'est révélée, par la suite, inconstante et d'autres virus sont associés à ce syndrome caractérisé par une forte

réaction inflammatoire (Cytomegalovirus, Herpès Simplex virus). Cependant si l'IHF représente environ 0,5 à 7% de tous les cas d'uvéïte [103], les anticorps anti-RuV ont été trouvés chez 69% des patients [105].

#### **II.4.2.4. Diagnostic différentiel**

Il est fait avec les autres fièvres éruptives de l'enfant. Le diagnostic clinique différentiel avec la rougeole peut être difficile bien que les signes prodromiques soient le plus souvent très prononcés avec celle-ci. L'éruption lors d'infections à HHV-6 et à Parvovirus B19 peut également simuler une rubéole. Les autres éruptions cutanées sont en général facilement éliminées.

- Infection à cytomégalovirus
- Infections à entérovirus
- Mononucléose infectieuse
- Infection à mycoplasmes
- Syphilis secondaire
- Dermite de contact

#### **II.4.3. Le Syndrome de rubéole congénitale (SRC)**

Les perturbations du déroulement de la grossesse et les atteintes fœtales (correspondant au SRC) du fait de l'infection du fœtus, conséquence d'une rubéole de la femme enceinte [106], sont un problème de santé publique dans les populations non vaccinées.

##### **II.4.3.1. Clinique**

La triade classique du nouveau-né infecté comprend :

- Perte d'audition neurosensorielle dont le diagnostic peut être fait tardivement. C'est la manifestation la plus fréquente et observée chez 58% des patients. Elle peut n'être que le seul déficit et être unilatéral ou bilatéral.
- Lésions oculaires : cataracte, microphthalmie, glaucome, rétinite pigmentaire, lésions de l'iris. Les deux yeux sont concernés mais les atteintes peuvent être unilatérales. Un strabisme ou un nystagmus peuvent être associés. Les lésions peuvent évoluer avec l'âge et des cécités peuvent survenir. La rétinite n'altère pas la vision à moins qu'une néovascularisation tardive ne se produise [107].
- Malformations cardiaques : communication interventriculaire ou inter auriculo-ventriculaire, persistance du canal artériel, sténose de l'artère pulmonaire, myocardite ont été décrits. Cependant, une importante étude de cohorte en Chine associe l'infection par la rubéole en cours de grossesse à 3 principales atteintes cardiaques (communication interventriculaire et inter-

auriculoventriculaire et transposition des gros vaisseaux) mais non pas à la persistance du canal artériel [108].

L'infection maternelle au cours des 10 premières semaines de grossesse est responsable de signes cardiaques tandis que les atteintes ultérieures (13<sup>ème</sup> à 16<sup>ème</sup> semaine) induisent uniquement une perte auditive. Les rubéoles survenant après la 18<sup>ème</sup> ou 20<sup>ème</sup> semaine sont sans autre conséquence qu'une infection chronique.

#### **Autres atteintes :**

- Altération de la croissance intra-utérine, prématurité, mort-né, avortement ;
- Atteintes du système nerveux central : retard mental, anomalies électro-encéphalographiques, troubles du comportement, hypotonie, méningo-encéphalite, microcéphalie ;
- Atteinte hépatique : ictère, hépatite, hépatosplénomégalie ;
- Manifestations cutanées avec le syndrome du « blackberry muffin » (coloration due à une érythropoïèse dermique) et anomalies des dermatoglyphes ;
- Lésions osseuses avec des zones claires métaphysaire des os longs visibles sur la radiographie ;
- Troubles endocriniens : manifestations thyroïdiennes, diabète, qui peuvent apparaître tardivement ;
- Manifestations hématologiques telles que l'anémie, le purpura thrombocytopenique [109]

#### **II.4.3.2. Evolution**

Une surveillance clinique et médicale des nourrissons atteints de SRC est nécessaire car des atteintes dues à l'infection fœtale peuvent ne se manifester qu'après plusieurs années. Ces nourrissons présentent souvent de multiples anomalies congénitales, mais peuvent également présenter une seule anomalie, qui est le plus souvent une déficience auditive Celle-ci- peut se manifester tardivement [2]. Les autres complications post natales tardives sont : un déficit intellectuel, un autisme, une encéphalopathie, un diabète de type I, une thyroïdite, des lésions oculaires [110].

#### **II.4.3.3. Diagnostic différentiel**

Les infections en cours de grossesse sont susceptibles d'atteindre le fœtus comme la syphilis. Les deux principales infections fœtales qui provoquent des atteintes pouvant évoquer un SRC sont [111] :

- Cytomégalovirus : à la naissance surdité, microcéphalie et hépto-splénomégalie ; tardivement déficit auditif et déficits cognitifs et moteurs, épilepsies.
- Zika virus : microcéphalie sévère avec effondrement crânial, amincissement du cortex avec calcifications, atteintes oculaires, hypertonie et surdité. Des troubles graves du développement psychomoteur sont observés.

## **II.4.4. Diagnostic biologique des infections à RuV**

Dans les pays où la vaccination est obligatoire le diagnostic est important en cas de suspicion de rubéole (importation le plus souvent) pour prendre des mesures préventives de santé publique (isolement des cas, test des contacts...). Chez la femme enceinte le diagnostic biologique de la rubéole fait partie du bilan systématique prénatal dans le cadre du TORCH (toxoplasmose, rubéole, cytomegalovirus, herpes virus et autres agents dont le Zika) (Tableau III).

### **II.4.4.1. Diagnostic direct**

#### **II.4.4.1.1. Les prélèvements**

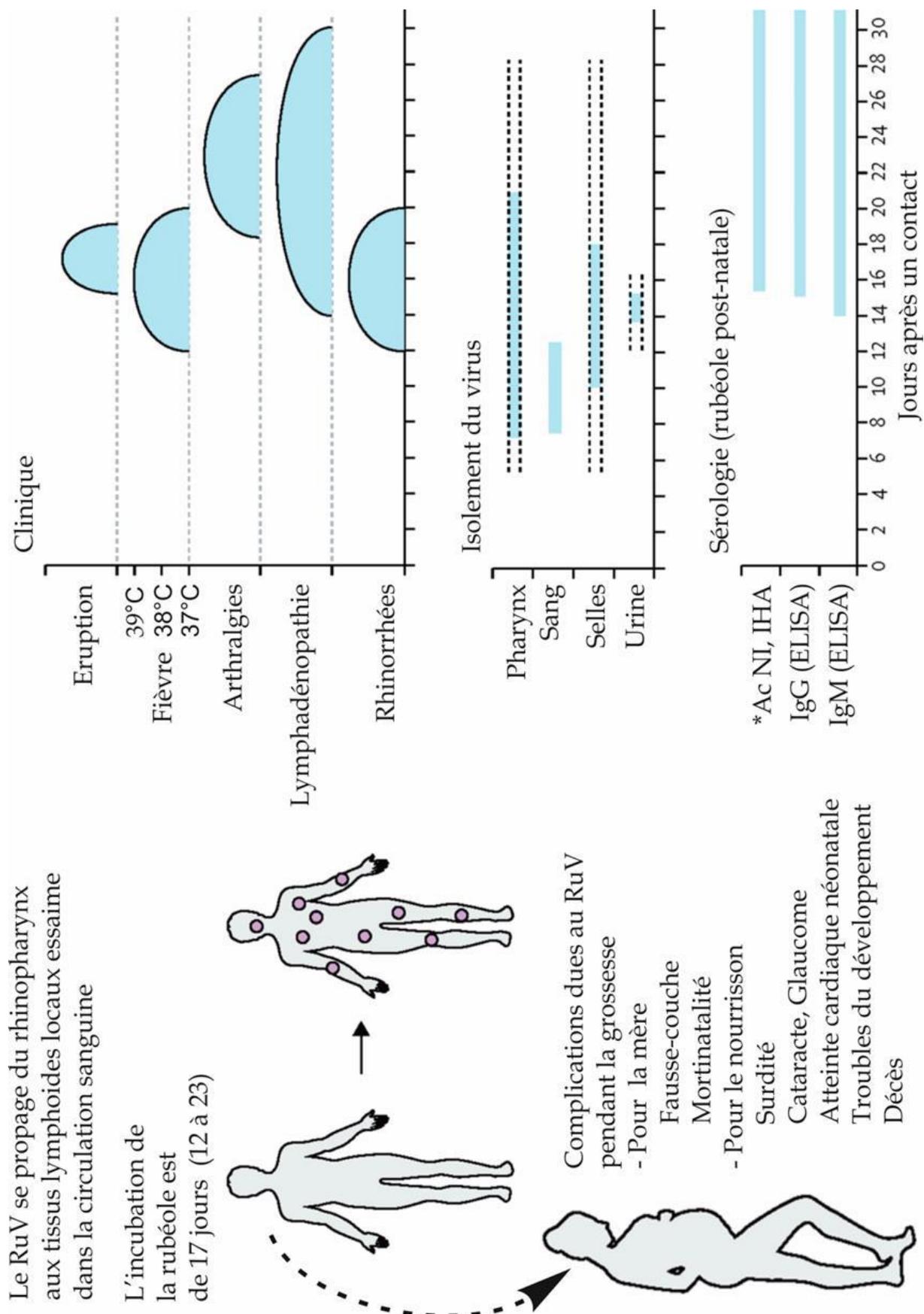
La recherche du virus est faite principalement à partir de prélèvements pharyngés et parfois urinaire et sanguin. Le prélèvement de sang est utilisé pour la recherche de l'ARN viral par RT-PCR ou pour la sérologie.

#### **II.4.4.1.2. Recherche du virus par culture cellulaire**

Au début, elle utilisait des cellules primaires de rein de singe vert africain (primary African green monkey kidney, GMK). Du fait de l'absence d'ECP, le phénomène d'interférence virale était utilisé en inoculant après 8 jours le tapis cellulaire avec un Echovirus 11. Une absence de lyse témoignait de la présence d'un RuV. Une lyse du tapis correspondait à son absence. Cette technique a été abandonnée du fait de la charge de travail qu'elle imposait. Les cellules en lignée continue RK13 (« rabbit kidney » ; rein de lapin) ont également été utilisées mais avec des résultats parfois peu reproductibles et nécessitaient une neutralisation. Enfin les lignées continues VERO principalement ainsi que BHK21 les ont remplacées pour l'isolement du RuV, et le diagnostic était fait par immunofluorescence. Cependant la recherche du virus est lente et la mise en culture des prélèvements est quasiment abandonnée, sauf pour les études *in vitro* ainsi que la préparation et la production de vaccins [112].

#### **II.4.4.1.3. Mise en évidence du virus par méthodes moléculaires**

Le diagnostic de la rubéole est maintenant effectué par des RT-PCR en temps réel (qRT-PCR). Fiables, sensibles et spécifiques elles permettent la recherche de l'ARN viral, principalement à partir du sang, mais de tout type de prélèvement. La détection d'ARN spécifique de la rubéole par RT-PCR peut être utilisée en complément des tests sérologiques pour confirmer les cas suspects [88]. La «endpoint RT-PCR», moins sensible est utilisée pour amplifier la région du génome de la rubéole nécessaire pour déterminer le génotype [113].



**Figure 5 : La rubéole, évolution et complications (d'après Winter AK [2])**

\*Ac NI, IHA : Anticorps neutralisant l'infection et inhibant l'hémagglutination

## **II.4.4.2. Sérologie**

### **II.4.4.2.1. Historique, l'inhibition de l'hémagglutination**

Les premiers tests sérologiques ont utilisé la fixation du complément, mais ses résultats étaient fonction de la qualité de l'antigène utilisé et elle se négativait avec le temps. Elle a été remplacée par l'inhibition de l'hémagglutination qui reposait sur la propriété du virus de se lier aux hématies aviaires. Les anticorps préviennent ce phénomène et il est possible de les titrer. La standardisation de la technique et la production d'antigènes contrôlés en a fait la référence jusqu'au développement des techniques immunoenzymatiques. En parallèle d'autres techniques ont été développées (capture d'antigène, hémolyse radiale, tests au latex...). Actuellement la recherche des anticorps anti-rubéoleux IgG et IgM repose sur des techniques commerciales standardisées, automatisées, principalement « Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) » ainsi que sur des tests rapides.

### **II.4.4.2.2. Test immuno-enzymatique (ELISA)**

Des trousseaux pour la recherche des IgG et IgM rubéoleuses automatisées sur des automates d'immunoanalyse multiparamètres [ex ; Architect Laboratoires ABBOTT, Chicago ill ; VIDAS® RUB IgM (RBM), BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile - France] ou en microplaques [ex : Institut Virion\Serion GmbH, Wurzburg, Allemagne].

#### ***Recherche des IgM***

La détection d'IgM spécifiques de la rubéole dans le sérum est la méthode standard pour le diagnostic au laboratoire (88). Dans les tests de détection, les IgM anti-humaines fixées se lient aux IgM présents dans l'échantillon du patient. Les IgM spécifiques de la rougeole se fixent ensuite à l'antigène de la rougeole, qui est détecté par des anticorps marqués spécifique de l'antigène.

Les IgM spécifiques de la rubéole, témoignent d'une infection récente. Ils peuvent ne pas être détectables dans les 4 jours qui suivent l'éruption et, dans de rares cas, les patients peuvent même ne pas produire d'IgM détectables. Normalement, les IgM persistent pendant au moins 8 semaines et parfois plus longtemps, en particulier après la vaccination, où des IgM peuvent être présentes pendant plus de 6 mois [112].

La recherche d'IgM peut fournir des résultats faussement positifs en raison de réactions croisées avec d'autres infections (Rougeole, infections à Parvovirus B19, cytomégalovirus, Epstein Barr virus) et de l'interférence du facteur rhumatoïde. L'utilisation de techniques de capture d'IgM diminue le risque de faux positifs mais ceux-ci sont toujours possibles.

La confirmation d'une recherche d'IgM positive est très importante chez la femme enceinte qui présente une suspicion de rubéole. À mesure que le nombre de cas de rubéole diminue, la valeur

prédictive d'un résultat IgM positif diminue également, et donc la confirmation d'un résultat positif devient importante [112].

### ***Recherche des IgG***

La recherche d'IgG rubéoleuses isolées se fait surtout dans le cadre d'une détermination du statut vaccinal d'une femme en âge de procréer ou ayant eu une rubéole ancienne. Deux prélèvements à deux semaines d'intervalle qui montrent une augmentation significative du titre d'IgG (x 4) sont en faveur d'une infection récente.

Les études épidémiologiques utilisent également la recherche d'IgG pour évaluer la prévalence de la population protégée soit après rubéole post-natale, soit après vaccination

**Tableau III : Utilisation des tests diagnostiques de la Rubéole**

Test diagnostique	Spécimen	Rubéole post-natale	Rubéole congénitale et SRC
Isolement viral	Gorge, urine, sang	Dans les 7 jours après le début de l'éruption	À la naissance La positivité décline par la suite
RT-PCR	Sérum Prélèvement pharyngé	Id.	A la naissance
	Liquide amniotique		Tout au long de la grossesse
	Placenta		Mortinatalité, avortement
IgM	Sérum	Jusqu'à 2 mois après l'éruption	À la naissance Première année de vie
IgG	Sérum	Diagnostic rétrospectif Statut vaccinal	Après 6 mois
Augmentation des titres d'IgG	Sérum (2 prélèvements à 15j d'intervalle)	Confirmation d'infection récente	
Avidité des IgG	Sérum	Diagnostic d'infection récente Confirmation d'IgM (+)	À la naissance (mère)

### ***Affinité des IgG***

Du fait de la possibilité d'une recherche d'IgM faussement positives, l'étude de l'affinité des IgG est utile pour confirmer une rubéole récente. En l'absence d'IgM, elle permet de confirmer une infection récente ou d'estimer son ancienneté. Les trousseaux commerciaux de mesure de l'avidité de la rubéole sont basés sur une liaison spécifique des IgG à l'antigène en présence ou en l'absence d'un agent chaotropique léger (urée). Les anticorps à faible avidité persistent normalement pendant 2 à 3 mois après une primo-infection et parfois même beaucoup plus longtemps après la première vaccination [112].

### II.4.4.2.3. Immunochromatographie

Des trousse de diagnostic rapide pour la détection simultanée des IgG et des IgM sont disponibles (ex. : Immunoblot rubella, Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, Luebeck, Germany ; Rubella IgG/IgM Rapid Test, CTK, Poway, Ca).

## II.5. Vaccination anti-rubéoleuse

Un vaccin monovalent a été utilisé aux USA (MERUVAX®), sa production a été arrêtée en 2009 et aucun vaccin monovalent n'est actuellement disponible. Aussi les seuls vaccins actuellement disponibles contre la rubéole sont-ils des vaccins combinés : le Measles-Mumps-Rubella (MMR) [Vaccin associé "rougeole-oreillons-rubéole" (ROR)] et le vaccin combiné rougeole rubéole (Measles-Rubella ou « Rubella containing vaccine »). Le premier est administré systématiquement aux enfants de 12 mois et le second est utilisé pour les campagnes de vaccination dans les pays ne vaccinant pas contre la rubéole.

### II.5.1. Vaccins contre la rubéole

#### II.5.1.1. Vaccin MMR (ROR) [M-M-R II, Merck & Co., Inc.]

Il est commercialisé en France sous les noms M-m-rvaxpro® [MSD vaccins] et Priorix® [Glaxosmithkline].

#### Composition du MMR (Priorix®) :

*Measles virus* souche Schwarz, *Mumps virus* souche RIT 4385 (dérive de la souche Jeryl Lynn), *Rubivirus rubellae* souche Wistar RA 27/3 (United States, 1979), ces trois souches de virus sont viables et atténuées.

N.B. : La souche de RuV Wistar RA 27/3 est cultivée sur cellules diploïdes humaines et a remplacées souches HPV-77 et Cendehill car elle fournit un taux de virus plus important, des titres d'anticorps plus élevés, durant plus longtemps et entraîne moins d'effets secondaires.

N.B. : RA 27/3 RA est pour "Rubella Abortus" car elle a été isolée d'un fœtus sur cellules diploïdes humaines WI-38 [114].

#### Conservation :

Le vaccin MMR est commercialisé lyophilisé et doit être stocké entre -50°C et +8°C à l'obscurité. Une fois reconstitué il doit être utilisé immédiatement et ne peut être conservé plus de 8 heures de 2°C à 8°C et à l'obscurité. A température ambiante, il ne se conserve que 30 min. Une fois dépassé ces temps le vaccin doit être détruit.

N.B. : Un vaccin quadrivalent MMRV (measles-mumps-rubella-varicella [ProQuad, Merck & Co., Inc.]) est administré aux USA mais n'est pas disponible en France.

### **II.5.1.2. Le vaccin combiné Rougeole-Rubéole (MR Vac)**

Il est fabriqué selon les recommandations de l'OMS, en Inde, et produit par « the Serum Institute of India ». Il utilise les souches Edmonston-Zagreb de *Measles virus* and Wistar RA 27/3 de *Rubivirus rubellae* cultivées sur cellules diploïdes humaines.

Un deuxième vaccin a été développé par le Japon et le Vietnam et il est produit dans ce dernier pays : le Poliva MR-VAC utilise les souches de *Measles virus* AIK-C et de *Rubivirus rubellae* Takahashi. Cevaccin est également produit en Iran [115].

### **II.5.2. Pratique de la vaccination par le MMR (ROR) en France**

Injection IM d'une dose de vaccin à 12 mois suivie d'une seconde dose entre 16 et 18 mois. Cette deuxième injection est obligatoire pour tous les enfants depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2018.

N.B. : Cette seconde injection n'est pas un rappel, qui serait inutile étant donné la protection apportée par la première dose, mais un moyen d'être sûr que les enfants qui ont échappé à la première vaccination seront bien protégés.

Le personnel de santé né avant 1980 (date d'introduction du MMR) et qui n'a pas été vacciné. La vaccination est recommandée pour le personnel travaillant dans les services prenant en charge les patients à risque de complications sérieuses en cas d'infections par les 3 maladies couvertes par le vaccin (en particulier les patients immunodéprimés) ainsi que les personnes travaillant au contact d'enfants.

Aux femmes non vaccinées (en particulier celles nées avant 1980) et qui projettent une grossesse, il est conseillé d'éviter une grossesse dans le mois suivant la vaccination. Si la sérologie est négative ou indéterminée une contraception doit être prescrite avant la vaccination. Il faut noter cependant que, bien que la grossesse soit une contre-indication, aucun problème obstétrical n'a été rattaché à une vaccination administrée accidentellement.

#### **Contre-indications du MMR**

- Réaction anaphylactique à la néomycine ou allergie sévère à un des composants du vaccin ;
- Grossesses ;
- Immunodépression.

#### **Précautions d'emploi**

Ne pas vacciner :

- Un sujet qui a reçu des produits sanguins dans les 10 mois précédents ;
- En cas d'épisode fébrile, modéré ou sévère ;
- En cas d'antécédents de thrombocytopénie ou de purpura thrombocytopénique.

Le test de Mantoux ne doit pas être pratiqué dans les 4 semaines qui suivent la vaccination par

risque de fausse négativité.

### **Tolérance**

L'administration du vaccin n'entraîne, en général, aucun symptôme important. Peuvent cependant être observés une fièvre (<15%) un érythème fugace (5%), une lymphadénopathie transitoire (5% des enfants, 20% des adultes) et parfois une parotidite (<1%). Un petit nombre de rubéoles, bénignes, après vaccination ont été décrits [116].

### **Protection**

Après une seule dose l'immunité persiste des dizaines d'années et après la disparition des anticorps il n'est pas observé une absence de protection.

En ce qui concerne plus spécifiquement la rubéole, l'immunité conférée est à la fois humorale et cellulaire. Une dose entraîne une réponse sérologique chez 95% des individus et atteint 99% après la deuxième dose. La protection contre les signes cliniques en cas d'infection est au minimum de 97% (94 à 100%) après une simple dose.

### **Remarques épidémiologiques sur la vaccination anti-rubéoleuse**

Les pays qui vaccinent systématiquement les enfants avec le MMR voient la rubéole pratiquement éradiquée et les SRC ne sont plus observés comme aux USA. Cependant une surveillance est maintenue pour dépister d'éventuels cas importés.

Les pays qui n'ont pas mis en place la vaccination contre la rubéole (quel que soit le vaccin) voient la persistance d'épidémies, la survenue de SRC, bien que le diagnostic de ces derniers ne soit pas toujours fait. Dans ces pays la seule politique vaccinale efficace consiste en une vaccination systématique des enfants et une protection des adolescentes et des femmes en âge de procréer (dépistage et vaccination) pour éviter les infections en cours de grossesse, le temps que l'effet de la vaccination systématique des enfants assure une rupture de la chaîne de transmission.

## **V.5.3. Epidémiologie vaccinale**

La rubéole est très diversement répartie dans le Monde du fait de l'inégalité dans la disponibilité de la vaccination. Alors que dans les pays où elle est pratiquée systématiquement, la maladie est éradiquée ou en voie de l'être, dans le reste du Monde les épidémies se poursuivent avec leurs conséquences sur les grossesses et les fœtus.

### **II.5.3.1. Evolution de la rubéole dans les pays qui pratiquent la vaccination**

Des pays comme les USA ont très tôt introduit la vaccination et ont disposé d'un vaccin spécifique contre la rubéole en 1969. Une diminution rapide du nombre de cas a été observée mais une circulation chez les adolescents et les adultes a persisté du fait de l'existence de groupes de personnes non vaccinés. Aussi la vaccination a été étendue à la femme post-pubertaire, adolescents étudiant

et personnel des armées. En conséquence le nombre de cas de rubéole est passé de 20395 en 1977 à 225 en 1988 et en parallèle le nombre de SRC de 29 à 2. Une augmentation du nombre de cas a été observée en 1989- 1991, accompagnée de 20 cas de SRC. La poursuite de la vaccination a ramené le nombre de cas à 14 de 2001 à 2004 car des jeunes adultes et des communautés religieuses n'étaient pas vaccinés. Par la suite seuls 14 cas ont été rapportés de 2001 à 2004 non seulement aux USA mais aussi dans les pays voisins et la rubéole a été déclarée éradiquée aux USA en 2004. Depuis, les cas observés ont été en petit nombre et n'étaient pas autochtones. Ceci a été suivi en 2010 par la déclaration de l'élimination de la rubéole de l'ensemble de la région Amérique par la « Pan American Health Organization » (2015 par l'OMS).

En France la vaccination contre la rubéole et la rougeole a été introduite en 1982 et le MMR en 1986. Le nombre d'infections maternelles a progressivement décru et aucun cas de SRC n'a été rapporté en 2014 et en 2016 un seul cas de rubéole néonatale et un avortement thérapeutique pour infection rubéoleuse a été enregistré (N.B. aucune donnée n'est disponible depuis 2016).

En Espagne, le programme de vaccination a été mis en place en 1978 chez les enfants et des campagnes de vaccination visant les adolescents ont été menées. Entre 1997 et 2016, 23 SRC ont été rapportés, le dernier en 2014 mais les cas de SRC observés après 2005 concernaient uniquement des femmes étrangères. En 2015, le pays a été déclaré libre de rubéole par l'OMS [117].

En Europe : 59 cas de rubéole ont été enregistrés par l'ECDC d'octobre 2020 à septembre 2021 : Finlande 1, Italie 3, Allemagne 8, Pologne 47 [118].

Au Sri Lanka, la vaccination systématique des enfants à 9 mois et à 3 ans à partir de 2001 et des adolescents à partir de 2002 n'a fait baisser que lentement la prévalence de la rubéole et le nombre de SRC malgré des campagnes de rattrapage. Une épidémie est survenue chez des adultes qui n'avaient pas été vaccinés, ceci alors que la couverture vaccinale des enfants était supérieure à 90%. Par la suite un petit nombre de cas a été observé [119] et en 2020 aucun cas de rubéole n'a été enregistré.

En Inde, dans l'état de Tamil Nadu, une campagne universelle de vaccination par le vaccin MR des enfants (9 mois à 15 ans) sur 3 ans (2017-2019) a été programmée. Celle-ci s'est retrouvée en défaut du fait d'un refus de la vaccination des enfants par plusieurs parents avec comme conséquence une couverture insuffisante de 80% [120].

Dans les pays où la rubéole a disparu une surveillance continue est exercée avec une poursuite de la vaccination systématique des enfants le maintien des moyens de dépistage et de diagnostic fonctionnels afin de repérer tous les cas suspects, les confirmer, mettre en œuvre la protection des cas contacts et leur vaccination éventuelle, et mener une enquête pour déterminer l'origine de

l'infection et s'assurer que ce ne sont pas des cas autochtones. Tant que la rubéole n'est pas éradiquée au niveau mondial, ces mesures doivent rester en place. Selon les chiffres de l'OMS en 2020, 173 pays avaient introduit le vaccin contre la rubéole à l'échelle nationale et la couverture mondiale était estimée à 70% [121].

En 2011, dans la région Afrique OMS, seuls 3 états pratiquaient la vaccination systématique des enfants : les Seychelles et l'île Maurice [122] et le Cap vert [123]. Les efforts menés depuis ont fait que de nombreux pays ont introduit la vaccination contre la rubéole au sein des différentes régions OMS soit en 2020 [nombre de pays pratiquant la vaccination antirubéoleuse (nombre de pays de la région OMS)] : Afrique : 31 [47] ; Amériques : 35 [35] ; Asie du Sud-Est : 11 ([11] ; Méditerranée orientale : 16 [21] ; Europe : 53 [53] ; Ouest-Pacifique : 22 [27].

Les couvertures vaccinales dans les régions OMS étaient en 2016 et 2021 respectivement : Afrique 35% et 13%, Amériques 92% et 84%, Asie du Sud-Est 15% et 86%, Méditerranée orientale 44% et 42%, Europe 93% et 94%, Ouest Pacifique 95% et 95%. Il faut noter que l'épidémie de SARS-Coronavirus-2 a ralenti les programmes de vaccination en 2020-2021.

N.B. : Ces données montrent que l'on reste encore loin de l'objectif d'éradication de la rubéole dans le Monde.

### **II.5.3.2. Situation quand la vaccination infantile n'est pas systématique**

Il peut y avoir de grandes disparités dans les situations selon les politiques sanitaires des pays. Certains pays font des campagnes de vaccination, parfois ponctuelles qui ne concernent qu'une partie de la population, d'autres n'ont aucun programme. Cependant dans tous ces pays, la vaccination peut être disponible sur le mode onéreux, donc d'accès limité en fonction des moyens financiers individuels, comme c'est le cas en RCA.

Des 6 régions OMS, les régions Est méditerranéen et Afrique sont les seules qui n'ont pas la totalité de leurs pays impliqués dans l'élimination de la rubéole. Dans la région Afrique 38 pays ont rapporté des cas de rubéole (soit 4883) et 13 des cas de SRC (soit 28). Ces chiffres sous-estiment l'importance de la rubéole du fait que plusieurs pays n'ont pas de diagnostic de laboratoire disponible et/ou n'ont pas de système de surveillance [124].

### **II.5.3.3. Séro-épidémiologie de la rubéole dans la région Afrique de l'OMS**

La surveillance de la rougeole est en place dans de nombreux pays sous l'égide de l'OMS. Les personnes qui se présentent avec une éruption et éventuellement les autres critères de rougeole (fièvre, signes respiratoires...), mais ceux-ci ne sont que peu pris en compte car ils sont antérieurs à l'éruption, sont systématiquement prélevés (sang et frottis pharyngés). Les échantillons sont adressés au laboratoire pour diagnostic sérologique (IgG et IgM) de la rougeole. En cas de

négativité de ce diagnostic, celui de la rubéole peut être mené à partir de ces prélèvements, mais en dehors d'études ciblées cette recherche n'est que rarement faite. Le diagnostic de la rubéole est effectué en milieu hospitalier (femmes enceintes) ou lors de campagnes pour la détermination de la prévalence dans la population.

Les premières études ont utilisé l'hémolyse radiale [125;126] ou l'inhibition de l'hémagglutination (127) mais les techniques ELISA ont facilité le travail et ont permis la multiplication des travaux. Les études sérologiques dans des pays qui ne pratiquent pas la vaccination montrent une prévalence élevée d'IgG chez les femmes enceintes dès 18-20 ans avec parfois des différences entre pays mais après 20 ans la prévalence des IgG est supérieure à 93% et avec peu de différences entre les pays.

Les études chez les enfants montrent la progression des taux d'IgG avec l'âge. En RCA, 397 enfants de 0 à 15 ans ont été répartis en deux groupes. i : 219 enfants : 1-4 ans (38%), 5-9 ans (71%), >10 ans (87%) ; ii : 178 nourrissons < 7 mois (31,8%) [128]. Au Kenya en 2005, 79,9% la prévalence était de 58,5% de 4-6 ans, 84,5% de 7-13 ans et de 93,8% chez ceux de plus de 13 ans.

En Tanzanie, une étude, menée en 2010-2011 chez les enfants avant la mise en place de la vaccination, a montré des prévalences d'IgG faibles de 1,1% chez les nourrissons de 7-12 mois et 2,3% de 13-24 mois et de 25-36 mois [152]. En RDC, en 2013-2014 la prévalence des IgG chez 7.195 enfants de 6 à 59 mois augmentait régulièrement de 12% de 6 à 11 mois, à 37% de 48 à 59 mois [153]. En Tanzanie, chez 379 adolescents (12-18 ans) la prévalence des IgG était de 90,4% [154].

De nombreuses études ont porté sur les femmes enceintes ou en âge de procréer (Tableaux IV, V et VI). Cependant, ces études sont parfois de comparaison difficile, les tranches d'âge ne correspondent pas toujours, les critères de recrutement diffèrent... Cependant quel que soit le pays, les chiffres varient peu. La rubéole est une maladie de l'enfance et les femmes en âge de procréer sont majoritairement immunisées bien qu'à 25 ans, entre 5 et 20% d'entre elles sont susceptibles de s'infecter ce qui fait que le risque de SRC reste important. Des IgM sont trouvées, jusqu'à 10% chez elles, indiquant une infection récente (Tableau V) ce qui explique que la prévalence d'IgG est plus élevée après 25 ans (Tableau VI).

La diversité des critères retenus rend difficile les comparaisons entre les habitats (rural, urbain), le niveau socio-économique et l'éducation reçue d'autant plus que la prévalence des anticorps est élevée et les différences peu significatives.

**Tableau IV : Prévalence des IgG chez les femmes enceintes en région Afrique (OMS)**

<b>Pays/date</b>	<b>Effectif</b>	<b>% Positif</b>	<b>Références</b>
Cameroun (2008)	211	88,6%	[129]
Nigeria (2008)	409	97,6%	[130]
Burkina Faso (2006-2009)	100	77%	[131]
Nigeria (2010-2012)	89	97%	[132]
Nigeria (2010)	293	89,4%	[133]
Burkina Faso (2007-2008)	41	94,7%	[134]
Nigeria (2013)	90	83%	[135]
Tanzanie (2012-2013)	342	92,6%	[136]
Benin (2011)	283	94%	[137]
Nigeria (2012-2013)	272	91,5%	[138]
Ghana (2013)	91	92,3%	[139]
Namibie (2010)	2044	85%	[140]
RDC (2010)	1605	85%	[141]
Ethiopie (2016)	422	86,3%	[142]
RDC (2014)	78	59%	[143]
Ghana (2011-2012)	180	83%	[144]
Ethiopie (2015-2017)	600	89,0%	[145]
Kenya 2008-2017)	2383	89%	[146]
Tanzanie (2014-2016)	685	91,4%	[147]
Nigeria (2012-2013)	246	90,2%	[148]
Cameroun (2015-2017)	522	94,4%	[149]
Afrique du Sud (?)	1104	98,1%	[150]
Angola (2016-2017)	396	84,6%	[151]

**Tableau V : Prévalence des IgM chez les femmes enceintes en région Afrique (OMS)**

Pays/date	Effectif	Positif%	Références
Burkina Faso (2006-2009)	100	2%	[131]
Nigeria (2010-2012)	90	7%	[132]
Benin (2012)	283	0%	[137]
Nigeria (2012-2013)	272	1,8%	[138]
Ghana (2012)	91	6,6%	[139]
Ethiopie (2016)	422	2,1%	[142]
Ghana (2011-2012)	180	4,7%	[144]
Ethiopie (2017)	600	9,5%	[145]
Tanzanie (2016-2017)	629	9,7%	[147]
Angola (2016-2017)	382	1,0%	[151]

**Tableau VI : Prévalence des IgG anti-rubéoleux en fonction de l'âge chez les femmes en âge de procréer**

N	< 25 ans	>= 25 ans	Références
100	85%	76%	[131]
41	95.7%	94%	[134]
342	89.4%	95,9%	[136]
422	88.0%	84,8%	[142]
973	83.9%	92,6%	[155]
600	78.2%	80.2%	[145]

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL**

Les objectifs de notre travail sont :

**Objectif principal :**

- Caractérisation moléculaire des Virus de la Rubéole (RuV) circulant en RCA

**Objectifs spécifiques :**

- Déterminer les caractéristiques épidémiologiques du RuV en RCA,
- Génotypage du RuV circulant en RCA,
- Collecte des données de base permettant d'évaluer et de suivre les progrès accomplis dans les programmes de surveillance, de contrôle et d'élimination de la rubéole en RCA.

Les cas de rubéole détectés de 2004 à nos jours grâce à la surveillance au cas par cas de la rougeole ont montré la circulation du RuV en RCA. Ainsi, de 2012 à 2015 le pays a connu des crises politico-militaires au cours desquelles des flambées épidémiques de rubéole ont été observées dans toutes les Régions Sanitaires (RS).

Les données de surveillance de la rubéole disponibles au laboratoire concernent l'épidémiologie et sont basées sur le diagnostic différentiel avec la rougeole. Il n'y a pas eu de confirmation virologique. Dès lors, il était intéressant et important de faire une étude afin de compléter les données épidémiologiques, par des résultats virologiques, permettant de connaître les génotypes circulant conformément aux recommandations de l'OMS.

# **TRAVAIL EXPERIMENTAL**

## **III. La rubéole en RCA**

### **III.1 La RCA**

#### **III.1.1. Situation géographique**

La République centrafricaine (RCA), est un pays enclavé. Elle couvre une superficie de 622 984 km<sup>2</sup> (environ la France et la Belgique), au cœur du continent africain. Elle fait frontière au Sud avec la République Démocratique du Congo et la République du Congo, à l'Est avec République du Soudan et le Soudan du Sud, au Nord avec la République du Tchad et à l'Ouest avec la République du Cameroun.

#### **III.1.2. Population et climat**

Selon les données du Recensement Général de la Population et de l'Habitation (RGPH 07) la population est estimée, sur la base d'un accroissement naturel annuel de 2,5%, à 4.200.854 habitants en 2007 et 5.990.014 en 2020. Cette population est constituée en majorité de jeunes âgés de moins de 18 ans (49%). La répartition régionale de cette population essentiellement rurale (61%) se traduit par une densité de 11 habitants au km<sup>2</sup> à l'Ouest tandis que l'Est du pays est marqué par une densité faible, inférieure à 1 habitant au km<sup>2</sup>. Au Centre, au Sud et au Sud-Est, cette densité varie de 7/km<sup>2</sup> à 10.041/km<sup>2</sup> dans la capitale, Bangui et la ville adjacente de Bimbo. A l'heure actuelle, ces données ont été modifiées par les mouvements de population vers les zones urbaines apparemment sécurisées à la suite de la crise politico-militaire que connaît le pays, mais les données officielles ne sont pas disponibles.

Le climat de la RCA est équatorial chaud et humide, avec deux saisons : une saison des pluies de mai à octobre et une saison sèche de novembre à avril.

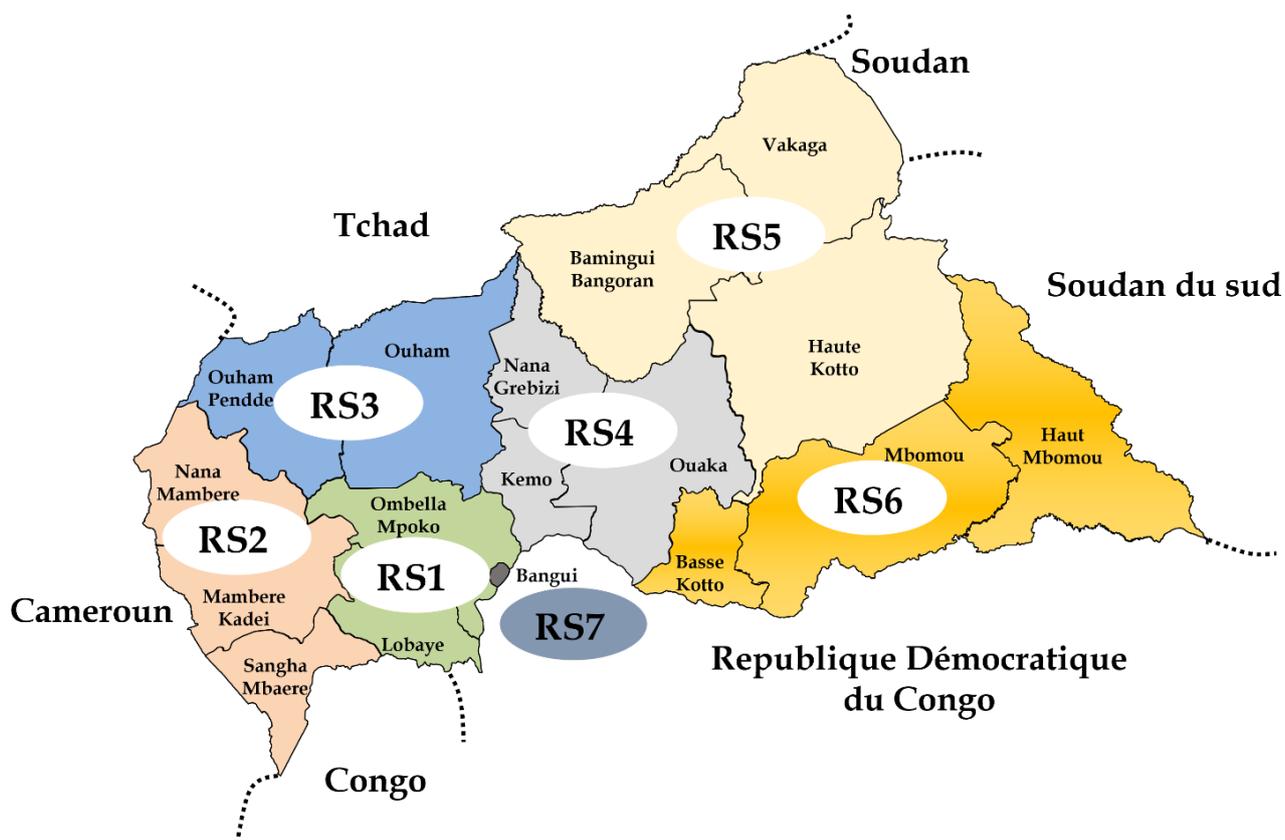
#### **III.1.3. Le système de santé**

La politique nationale de santé est calquée sur la division administrative du pays. Elle est de type pyramidal et comporte trois niveaux comprenant chacun 2 sous-systèmes : gestions et soins.

##### **Le sous-système de gestion comprend 3 niveaux :**

- Le niveau central chargé de définir la politique nationale de santé et fournir l'appui stratégique au niveau inférieur, comprend le cabinet du ministre de la Santé et les directions techniques ;
- Le niveau intermédiaire chargé de fournir l'appui technique aux Préfectures Sanitaires, correspond à la direction de la Région Sanitaire (RS) ; le pays en compte 7, correspondant aux régions administratives (Figure 5) ;
- Le niveau périphérique chargé de fournir l'appui opérationnel aux formations sanitaires pour

la mise en œuvre de la politique nationale de santé, correspond aux préfectures sanitaires qui sont des unités opérationnelles du système de santé. Chaque RS comporte 2 à 3 préfectures sanitaires sauf la RS7 (Bangui). Les préfectures sanitaires correspondent le plus souvent aux districts sanitaires, mais peuvent regrouper 2 ou 3 districts. Le pays compte 16 préfectures sanitaires. La ville de Bangui est découpée en 8 circonscriptions sanitaires.



**Figure 5 : Carte des régions sanitaires de la République centrafricaine**

Ce système de santé décentralisé permet d'assurer une couverture efficace des programmes de santé. Cette organisation assure la mise en place des organes de soins primaires grâce à une autonomie partielle de gestion accordée aux formations sanitaires.

#### **Le sous-système de soins :**

Il est constitué des formations sanitaires où les programmes sont traduits en prestations. Ces formations sanitaires sont organisées sur un mode hiérarchique à 3 niveaux de référence :

- Le premier niveau comprend les postes de santé, les Centres de santé et les Hôpitaux ;
- Le deuxième niveau est constitué par les Hôpitaux Régionaux Universitaires ;
- Le troisième niveau comprend les Établissements Hospitaliers et de Diagnostic de référence nationale situés à Bangui.

## **III.2. Cadre de l'étude**

### **III.2.1. L'Institut Pasteur de Bangui (IPB)**

C'est un établissement reconnu d'utilité publique, objet d'une convention entre l'Institut Pasteur de Paris et le gouvernement de la RCA. Inauguré le 25 février 1961, il fait partie du réseau international des Instituts Pasteur et des Instituts associés. Les trois principales missions de l'IPB sont la recherche biomédicale, la formation et l'appui à la santé publique. L'IPB regroupe, d'une part, un laboratoire d'analyses biomédicales qui vient en appui à la santé publique en réalisant le diagnostic et le suivi des patients et, d'autre part, des laboratoires de recherches qui développent des thématiques autour des priorités de santé publique. Les projets de recherche et les activités des laboratoires de référence concernent principalement les problèmes majeurs de santé publique que sont les maladies émergentes, la rage, la poliomyélite, la rougeole, la tuberculose, le paludisme, le COVID, le monkeypox et les hépatites. Ces derniers font appel à des compétences en biologie, épidémiologie, biomathématique et entomologie et s'inscrivent dans un contexte collaboratif international. L'IPB joue un rôle essentiel de conseil et d'expertise auprès du ministère de la Santé Publique et de l'OMS.

Les différents laboratoires de l'IPB interviennent soit directement comme centre de référence de l'OMS, soit comme centre de référence national pour les principales maladies sous surveillance épidémiologique.

### **III.2.2. Le laboratoire des virus entériques et rougeole**

Le Laboratoire des Virus Entériques et de la Rougeole (LEVR) est un Centre Régional de Référence OMS pour la poliomyélite abritant le Laboratoire National de Référence OMS pour la Rougeole (LNRR). Créé en 1993 avec au départ une activité exclusivement limitée à la surveillance des paralysies flasques aiguës, la surveillance au cas par cas de la rougeole a été initiée en 2004 et intégrée au sein de service avec l'appui de l'OMS. Le laboratoire intervient pour confirmer, par la recherche des IgM, les cas suspects de rougeole déclarés dans le pays. Comme recommandé dans le manuel de diagnostic standard de l'OMS [88], les cas suspects qui répondent à la définition d'un cas clinique de rougeole et dont le test de dépistage de la rougeole est négatif ou douteux sont analysés de manière différentielle pour la présence d'IgM contre la rubéole. Le LNRR est soumis à un processus annuel d'accréditation pour garantir la qualité de l'analyse des échantillons réceptionnés.

Dans le cadre de la Rubéole, les recommandations de l'OMS avant l'introduction du vaccin anti-rubéoleux sont :

- Mettre en place la surveillance de la rubéole et du SRC en s'appuyant sur les programmes de vaccination contre la rougeole existante ;
- Faire de la prévention de la rubéole et du SRC une priorité de santé publique ;

- Poursuivre cette surveillance après l'introduction du vaccin afin de suivre les progrès de l'élimination de la rubéole et du SRC ;
- Déterminer les génotypes de RuV circulants et poursuivre cette détermination, car, sous la pression vaccinale un certain nombre de génotypes disparaissent. Pour ce faire, la collecte d'échantillons de qualité pour le séquençage de l'ARN viral est importante.

### **III.3. Epidémiologie de la rubéole et du SRC**

La RCA fait partie des pays éligibles par le Plan d'Action Mondiale pour les Vaccins (PAMV) de l'OMS pour l'introduction du vaccin à valence rubéoleuse mais ni la rubéole ni le SRC ne sont inscrits sur la liste des maladies sous surveillance active.

La séroprévalence globale des IgG naturelles contre la rougeole et la rubéole chez les enfants de moins de 15 ans, était de 55,4% en 2008. La prévalence chez les enfants de 1 à 4 ans était de 38%, de 5 à 9 ans de 71% et de 10 à 15 ans de 87% [128].

Sur les 1409 sérums prélevés de 2007 à 2014 dans le cadre de la surveillance de la rougeole et négatifs pour cette dernière, et testés pour la rubéole, 30,2% (425/1409) étaient positifs en IgM pour la rubéole, et 7,5% (106/1409) étaient douteux. Sur les 425 cas positifs, 213 (50,1%) étaient des femmes et 212 (40,9%) étaient des hommes (sex-ratio de 1,03). L'âge moyen était de 8 ans (extrêmes : 6–37 ans). La prévalence la plus élevée était chez les enfants de 5 à 9 ans (43,5% ; 185/425) [156].

Les seules données disponibles sur le SRC sont celles d'une thèse en médecine, rapportant que sur 85 cas de malformations congénitales, 13 (15%) étaient cliniquement suspects de SRC. Seules 6 mères (46%) avaient des IgM anti-rubéoleuses [157].

### **III.4. La vaccination de la rubéole en RCA**

Le Programme Elargi de Vaccination (PEV) a été introduit en RCA en 1979 afin de réduire le niveau élevé de mortalité infantile dont les maladies évitables par la vaccination sont une cause non négligeable. Le groupe des maladies cibles du PEV comprend : tuberculose, diphtérie, tétanos néonatal, coqueluche, poliomyélite, rougeole, fièvre jaune et rotavirus. Il n'existe pas de programme national de vaccination contre la rubéole. Le vaccin anti rubéoleux est payant au niveau de l'IPB mais c'est le vaccin trivalent (MMR).

## **IV. Matériel et méthodes**

### **IV.1. Laboratoires impliqués dans l'étude**

Le travail a été réalisé en collaboration sur deux sites :

- La partie sérologique a été effectuée au laboratoire des virus entériques/Rougeole à l'Institut Pasteur de Bangui (LVER/IPB).
- La partie moléculaire (génotypage, séquençage et analyse phylogénique) à l'Unité de recherche sur les maladies infectieuses, au département Infection et Immunité, de l'Institut de Santé du Luxembourg (Luxembourg Institute of Health; LIH).

### **IV.2. Type d'étude et population d'étude**

Il s'agit d'une étude rétrospective. Les échantillons de sang ont été prélevés chez des personnes présentant des symptômes cliniques de rougeole dans les 28 jours suivant l'apparition de l'éruption cutanée de 2008 et 2016.

#### **IV.2.1. Taille de l'échantillon et recrutement des participants**

2918 échantillons de sérums de cas suspects de rougeole provenant des sept régions sanitaires (RS) de la RCA ont été reçus pour diagnostic au LNRR/IPB. Les participants sont les patients ayant consulté auprès des différents centres de santé des 7 RS, et chez lesquels un diagnostic clinique de rougeole a été posé.

#### **IV.2.2. Critères d'inclusion et d'exclusion des patients**

##### **III.2.2.1. Critères d'inclusion**

- Tout patient répondant à la définition clinique des cas suspects de rougeole selon les critères de l'OMS et chez qui des IgM anti-rubéoleuses ont été mises en évidence sur un sérum prélevé 3 jours après l'apparition de l'éruption cutanée ;
- Tout patient ayant accepté de participer à l'étude ;
- Tout patient répondant à la définition clinique de cas suspect de rougeole selon l'OMS : fièvre >38°C, éruption maculo-papulaire, et l'un des signes suivants : toux, coryza, conjonctivite.

##### **IV.2.2.2. Critères d'exclusion**

- Tout patients ayant des IgM rubéoleux positifs, mais n'ayant été prélevé le troisième jour après le début de l'éruption ;
- Les patients pour lesquels le consentement éclairé ou l'accord du tuteur n'a pas été obtenu ;
- Tout patient qui décide de se retirer de l'étude.

### **IV.3. Obtention des prélèvements**

Au cours d'une consultation, lorsqu'un agent de santé ou un médecin reçoit un patient répondant à la définition de cas de rougeole cliniquement confirmé (voir chapitre Critères d'inclusions) un consentement éclairé mais verbal a été obtenu de la part du malade ou des tuteurs légaux si le patient est mineur. Puis un formulaire d'investigation standardisé a été rempli (*cf.* fiche d'enquête ; Annexe 1) et un prélèvement sanguin a été réalisé. Les formulaires d'investigation et les échantillons biologiques clairement identifiés (date-clé d'identification unique du patient attribué à l'inclusion, lieu, de prélèvement, date de début d'éruption, date de vaccination) sont adressés au laboratoire par la route et parfois par avion.

#### **IV.3.1 Traitement des échantillons**

##### **IV.3.1.1. Collecte de prélèvements sanguins**

Les prélèvements sanguins sont réalisés par ponction veineuse à l'aide d'un système de prélèvement sous vide sur tube sec sans anti-coagulant. Bien qu'un volume de 4 à 5 mL soit généralement collecté chez l'adulte et les enfants (1 mL fournira généralement environ 400 µL de sérum), un prélèvement de 0,5 mL à 1 mL est acceptable chez les nourrissons. Le sang doit être conservé de 4 à 8°C (jamais congelé) pendant une durée maximale de 24 heures ou pendant 6 heures entre 20 et 25°C avant que le sérum ne soit séparé du sang coagulé par centrifugation (effectuée sur place ou à l'arrivée). Le sérum doit également être conservé entre 4 et 8°C.

##### **IV.3.1.2. Transport des échantillons**

Les échantillons de sang et sérums prélevés sur tube secs sont acheminés au laboratoire dans un porte-vaccin réfrigéré à 4-8°C, dans les 3 jours suivant le prélèvement.

##### **IV.3.1.3. Réception des prélèvements au laboratoire**

A la réception des prélèvements :

###### **1) Vérifier l'état de l'échantillon à la réception :**

- Les tubes doivent être bien fermés et bien étiquetés ;
- Le prélèvement reçu doit être à 4 à 8°C ;
- La quantité de prélèvement doit être suffisante : 5 mL de sang ou 2 mL de sérum ;
- Il faut que tous ces critères soient remplis pour que le prélèvement soit déclaré adéquat.

###### **2) Vérifier les informations sur la fiche d'enquête :**

- Voir s'il n'y a des informations manquantes (ex : date de début de la maladie, date d'expédition des prélèvements au niveau national, date de vaccination etc....) ;

- La fiche doit être correctement remplie, sinon en informer le programme élargi de vaccination (PEV).

### **3) Finir de compléter le formulaire d’investigation standardisé :**

- Affecter un numéro d'identification appeler “EPID number” par ex.CAF-RS1-BIM-16-001 qui indique : le code pays (CAF) ; la région sanitaire d’origine du prélèvement (RS1) ; le district de résidence : (BIM); les deux derniers chiffres de l’année de réception au laboratoire (16) et le numéro d'ordre de réception du prélèvement au laboratoire (001) ;
- Indiquer le numéro d’identification du laboratoire ”ID LAB” qui comprend l’année de réception de l’échantillon et le numéro d'ordre de réception du prélèvement ;
- Noter également les numéros d’identifications du laboratoire sur les tubes de prélèvement, la date de réception au laboratoire par l’IPB (jour, mois, année) ;
- Photocopier la fiche d’enquête, garder une copie au laboratoire et envoyer l’original au Programme Elargi de Vaccination (PEV) ;
- Enregistrer l’échantillon reçus dans le cahier de laboratoire ;
- IgM rougeole/rubéole : inscrire les résultats des tests effectués ;
- Noter les autres résultats du laboratoire (RT-PCR) (fiche d’enquête pour la rougeole et la rubéole ; Annexe 2a/2b).

#### **IV.3.1.4. Stockage des prélèvements sanguins ou sérums**

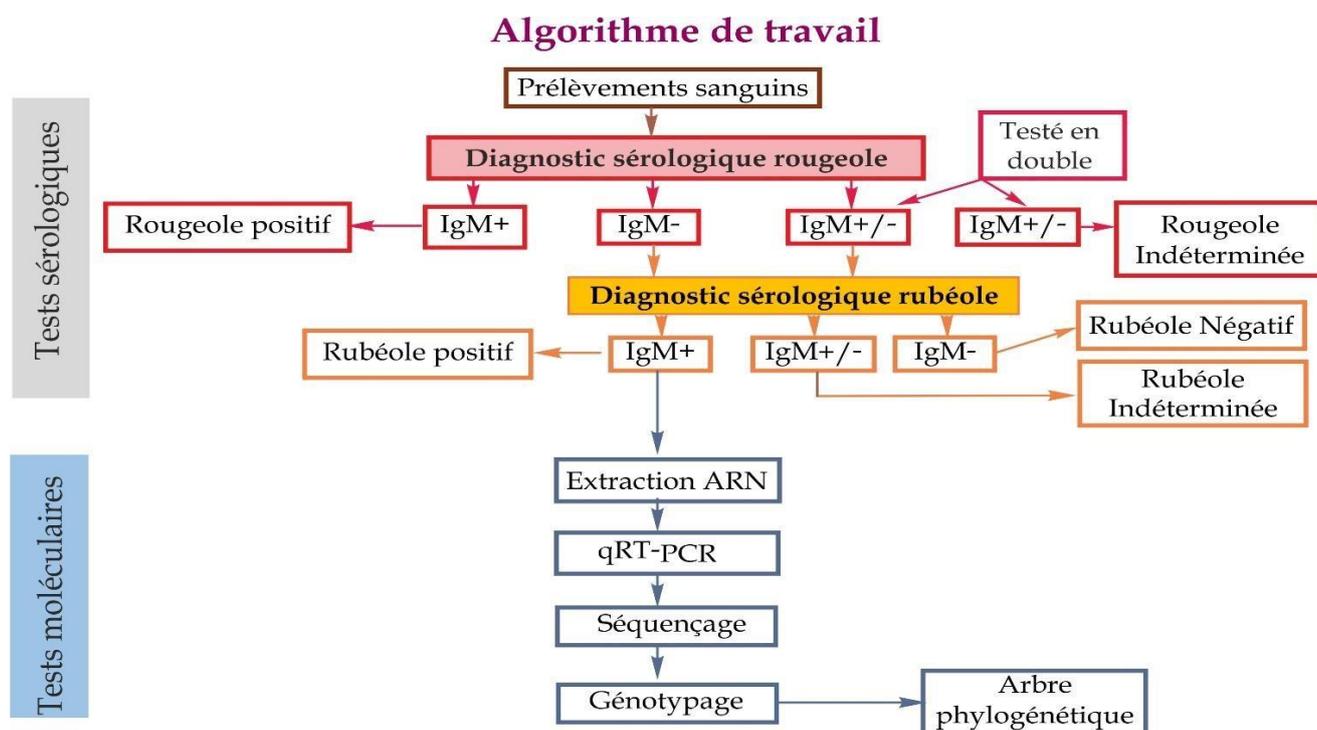
Après leur arrivée au laboratoire, les tubes de sang sont laissés à sédimenter en position verticale, entre 30 et 60 min à température ambiante. Si le prélèvement reçu est un prélèvement sanguin, il est centrifugé à 1000×g pendant 10 min. Puis le sérum doit être soigneusement pipeté sans perturber la couche de globules rouges et transféré dans un cryotube. Une étiquette permanente doit être apposée sur le flacon avec le nom ou l’identifiant du patient, la date de prélèvement et le type d’échantillon. Le sérum est réparti dans deux aliquotes de 1,5 mL dans des cryotubes afin d’éviter les cycles de congélation et décongélation pouvant affecter l’intégrité des IgM. Ces sérums sont stockés dans des boîtes de congélation et conservés à 4°C si l’analyse est effectuée immédiatement, sinon elles sont rangées avec la deuxième boîte de congélation à -20°C pour une conservation de moins de trois mois, et à -80°C pour une conservation de longue durée. Les prélèvements destinés au génotypage sont préservés à -80°C du fait de la fragilité de l’ARN.

N.B. : Trois dates sont très importantes à noter, celles d’apparition de l’éruption cutanée, du prélèvement sanguin et de la vaccination rougeoleuse.

## **IV.4. Stratégie expérimentale**

Les analyses ont été réalisées selon l’algorithme de diagnostic de l’OMS (Figure 6).

Entre 2008 et 2016, 2918 sérums ont été testés par ELISA dans le cadre du programme national de surveillance au cas par cas de la rougeole pour la recherche des IgM (866 positifs, 1966 négatifs, 86 indéterminés). Pour chacun des cas de rougeole cliniquement suspectés, des analyses au laboratoire ont été effectuées pour la recherche des IgM spécifiques de la rougeole afin de confirmer ou infirmer une infection récente.



**Figure 6 : Algorithme suivi pour le diagnostic sérologique et moléculaire de la rubéole**

(selon les recommandations de l’OMS [88;158])

Lorsque les résultats des prélèvements étaient douteux pour la rougeole, le sérum était retesté en double au cours d’une même analyse. En fonction du résultat, l’échantillon était classé comme positif, négatif ou douteux.

Si les résultats des sérums testés étaient indéterminés ou négatifs, une analyse différentielle pour la détection des IgM anti-rubéoleuses était réalisée (soit 2052 sérums). La sérologie rubéoleuse n’est pas faite pour les prélèvements positifs en rougeole.

L’ensemble des résultats était reporté sur les formulaires d’enquête et sur les fiches de rendu des résultats (Annexe 3) puis compilés dans la base de données Epi info 3.5.4, (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Une copie des résultats était envoyée à l’OMS, au Ministère de la Santé

ainsi qu'à la région sanitaire ayant fourni le prélèvement. Les tests analytiques et le rendu des résultats devaient être réalisés dans la semaine après réception des prélèvements au laboratoire.

Les échantillons de sérums ont été stockés à -80°C jusqu'à l'exécution des analyses moléculaires.

Un tri à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2016 a permis de sélectionner les sérums positifs en IgM rubéole qui ont été prélevés dans les trois jours après le début de l'éruption cutanée.

## **IV.5. Etude sérologique : détection des IgM rougeoleuses et rubéoleuse**

### **IV.5.1. Trousses et réactifs utilisés**

La détection sérologique des IgM a été réalisée par ELISA indirecte avec les trousse Enzygnost Anti-Measles-Virus/IgM et Enzygnost Anti-Rubella-Virus/IgM (Siemens, Marburg, Allemagne). La procédure suivie pour la réalisation des analyses était celle recommandée par le fabricant et est la même pour les deux diagnostics.

#### ***Principe des tests***

Les puits d'une microplaque sont recouverts d'antigène des virus de la rougeole ou de la rubéole. Les anticorps du sérum ajouté aux puits se lient à l'antigène présent dans le puits. Après lavage, des anticorps anti IgM humaine conjugués à une peroxydase sont ajoutés. Après lavage, un chromogène est ajouté. Les anticorps de chèvre anti-IgM humaines sont couplés à une peroxydase (POD). Si des IgM sont présentes, une coloration bleue se développe. L'ajout d'une réaction d'arrêt, entraîne l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité, quantifiée par photométrie, est proportionnelle à la quantité d'IgM présentes dans l'échantillon.

Afin d'éviter les résultats faussement positifs pouvant être causés par l'interférence de facteurs rhumatoïdes (RF), un prétraitement des sérums avec le "RF Absorbant" est réalisé. Celui-ci est un anticorps de mouton dirigés contre le fragment Fc des IgG humaines. Ainsi les RF se lient aux IgG présentes dans l'échantillon à tester. Tous les facteurs rhumatoïdes présents dans l'échantillon se lient aux immunocomplexes résultants et sont donc éliminés. Le RF Absorbant précipite jusqu'à 15 mg d'IgG/mL (chiffre valable pour un échantillon non dilué), et supprime donc toute IgG spécifique au virus.

### **IV.5.2. Réalisation des tests**

#### **IV.5.2.1. Réactifs et Matériels**

##### ***Réactifs***

- Microplaques sensibilisées avec de l'antigène viral de la rougeole ou de la rubéole
- Sérum de référence positif : P/P
- Sérum de référence négatif : N/N
- Tampon échantillons POD

- Conjugué anti Humain POD
- Tampon conjugué microbiologique
- RF-Absorbant
- Tampon/substrat TMB
- Solution d'arrêt (acide sulfurique 0,5 N)
- Eau distillée

#### *Matériels*

- Pipettes à embouts interchangeables 20  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L ;
- Tubes à hémolyse /portoires pour tubes ;
- Bain marie à 37°C ;
- Minuteur ;
- Laveur de plaques ;
- Lecteur de plaque ELISA.

#### *Préparation des réactifs*

Porter tous les réactifs à température ambiante (Sans sortir les plaques de leur emballage) ;

- Solution de lavage : dilution au 1/20<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée ;
- Tampon échantillon : dilution au 1/20<sup>ème</sup> du tampon échantillon POD et solution colorée bleue :  
ex : pour une barrette (solution bleu 175  $\mu$ L + tampon échantillon 3,5 mL) ;
- Conjugué : dilution au 1/21<sup>ème</sup> du conjugué anti IgM humain avec le tampon conjugué microbiologique ;
- Chromogène : dilution au 1/11<sup>ème</sup> de la solution d'emploi du chromogène avec le substrat ;
- Solution RF-Absorbant : reconstituer le contenu d'un flacon avec 5 mL d'eau distillée ;
- Dilution des échantillons : pré diluer au 1/21<sup>ème</sup> les échantillons et les témoins positifs et négatifs avec le tampon échantillons POD colorés (20  $\mu$ L sérum ou témoin + 400  $\mu$ L de tamponPOD).

#### *Absorption des facteurs rhumatoïde*

- Dans un tube à hémolyse, mélanger 200  $\mu$ L de chacun des échantillons tests pré dilués avec 200  $\mu$ L de RF-Absorbant reconstitué.
- Incuber le mélange 15 min à température ambiante ou toute la nuit à +2°C /+8°C.

#### **IV.5.2.2. Mode opératoire**

- Déterminer le nombre de cupules nécessaires : nombre d'échantillons à tester + le nombre de dépôts des témoins positifs et négatifs ;
- Le témoin négatif doit être distribué comme le premier échantillon de la série ;
- Le témoin positif doit être distribué comme le deuxième et le dernier échantillon de la

série/plaque (P/P1, P/P2) ;

- Distribuer 150 µL de référence P/N, P/P pré-diluer et des échantillons traités selon le plan dans les cupules Ag et Ag contrôle ;
- Couvrir la plaque d'une feuille adhésive et incuber 60 mn à 37°C ;
- Laver 4 fois ;
- Ajouter 100 µL du conjugué à la dilution d'emploi dans chaque cupule (ex : pour 5 échantillons soit une barrette : 2,5 mL de tampon conjugué + 50 µL conjugué) ;
- Ajouter 100 µL de la solution de substrat (2 mL Buffer TMB + 200 µL chromogène TMB) ;
- Couvrir la plaque et incuber 30 mn à la température ambiante et à l'obscurité ;
- Ajouter 100 µL de la solution d'arrêt dans chaque cupule ;
- Lire la densité optique à 450 nm/650 nm ;
- Plan de distribution des échantillons sur la plaque.

#### **IV.5.2.3. Analyse des résultats**

Pour chaque échantillon ou référence, déterminer la différence d'absorbance (Abs) :

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs (Ag positifs)} - \text{Abs (Ag négatifs)}$$

##### ***Validation du test***

#### **1. Validation quantitative, seuil de validation :**

- Référence P/P (témoin positif) : la différence de densité optique  $\Delta\text{Abs}$  doit être comprise dans l'intervalle de confiance (limite supérieur et inférieur de la valeur du kit) ;
- Limite inférieure  $\leq \Delta\text{Abs} \leq$  limite supérieure ;
- Chacune des valeurs obtenues pour le témoin (référence P/P) en début et en fin de série varie de  $\pm 20\%$  par rapport à la valeur moyenne des deux mesures ;
- Référence P/N (témoin négatif) : la différence de densité optique  $\Delta\text{Abs}$  doit être inférieure à 0,1 ( $\leq 0,999$ ).

#### **2. Validation qualitative :**

- Chaque dosage du témoin positif (référence P/P) doit atteindre une valeur minimale de 0,2 pour  $\Delta\text{Abs}$  :  $\Delta\text{Abs}$  référence P/P  $\geq 0,2$

##### ***Interprétation des résultats***

- Résultat négatif : si la  $\Delta\text{Abs}$  du sérum testé est  $< 0,10$  (valeur seuil)
- Résultat positif : si la  $\Delta\text{Abs}$  du sérum testé est  $> 0,20$  (limite supérieure)
- Résultat douteux ou indéterminé : si la  $\Delta\text{Abs}$  du sérum testé est comprise entre 0,10 et 0,20 après deux dosages.

## **IV.6. Méthodes moléculaires**

### **IV.6.1 Détection de l'ARN viral**

La présence d'ARN génomique de RuV a été testée en utilisant une RT-PCR en temps réel (qRT-PCR). La PCR a été réalisée avec la trousse Qiagen One-step RT-PCR (Qiagen, Hilden, Allemagne) qui amplifie un fragment de 185 nts du gène E1 (nts 8807 à 8991) [74;159].

#### **IV.6.1.1. Purification de l'ARN viral**

Le kit QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen) simplifie la purification de l'ARN à partir de fluides corporels acellulaires avec des procédures rapides utilisant des colonnes de centrifugation conformément aux instructions du fabricant. L'ARN se lie spécifiquement à la membrane de silice QIAamp tandis que les impuretés passent au travers. Les inhibiteurs de PCR, tels que les cations divalents et les protéines, sont complètement éliminés en deux étapes de lavage très rapides, laissant un ARN pur à éluer dans de l'eau ou dans un tampon fourni avec le kit.

#### **IV.6.1.2. Extraction du génome viral**

##### *Réactifs et matériels*

- Gants ;
- Blouse de laboratoire ;
- RNaseZap (Sigma, # R2020 - 250ML) ;
- Microtubes à centrifuger exempte de nucléase (autoclave) 1,5 mL (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Allemagne) ;
- Mini Kit ARN Viral (Qiagen, #52904) ;
- Ethanol à 100% (> 99,8 % indiqué par le fabricant ; VWR International, Radnor, PA) ;
- Ethanol à 70% molecular biology grade (VWR) ;
- PBS, RNase-free ;
- Congélateur à - 20°C ;
- Seau à glace ;
- Film adhésif de protection (VWR) ;
- Hotte de sécurité biologique Catégorie II avec lumière UV ;
- Microcentrifugeuse ;
- Micropipettes et pipette conseils avec filtres aérosols-résistant ;
- Vortex ;
- Block chauffant à 37°C.

##### *Contrôles*

Il est fortement recommandé d'inclure un échantillon négatif (les cellules non infectées ou un PBS 1x) comme contrôle d'extraction pour détecter une contamination survenue au cours de la procédure d'extraction.

### ***Préparation des réactifs pour une première utilisation***

- Ajouter 310 µL de tampon AVE dans le tube contenant le transporteur d'ARN lyophilisé. Répartir en aliquots conservés à -20°C. Pas plus de 3 cycles congélation-décongélation.
- Ajouter 130 mL d'éthanol à 100% à AW1 tampon (comme indiqué sur le flacon)
- Ajouter 160 mL d'éthanol 100% à AW2 tampon (comme indiqué sur le flacon)

### ***Protocole***

- Vérifier si le tampon AVL n'a pas précipité ; si c'est le cas, incubé à 37°C jusqu'à ce que le précipité se dissolve. Mélanger soigneusement à l'aide d'un vortex ;
- Le mélange tampon AVL et « RNA carrier » à un ratio de 100/1, est préparé. Par exemple pour 10 échantillons : 5,6 mL AVL +56 µL « RNA carrier ». Ne pas oublier d'inclure un contrôle d'extraction. Il est recommandé de préparer plus de mélange que nécessaire afin de pallier les erreurs de pipetage ;
- Répartir 1 mL du mélange dans des tubes de 1,5 mL ;
- Ajouter 140 µL du sérum et des contrôles négatifs et positifs au tampon AVL contenu dans le tube. Mélanger en agitant au vortex 15 sec, plusieurs fois, puis incubé à température ambiante (15-25°C) 10 min ;
- Centrifuger brièvement le tube dans une micro-centrifugeuse ;
- Ajouter 560 µL d'éthanol à 100% à chaque tube puis agiter au vortex 15 s ; centrifuger brièvement ;
- Pour chaque échantillon, étiqueter une mini-colonne et la placer dans un tube de prélèvement de 2 mL (tous deux fournis dans la trousse). Transférer 630 µL du mélange dans la colonne et centrifuger 1 min. à 6000 x g ;
- Vider le tube de prélèvement et transférer le reste du mélange dans la colonne et centrifuger à 6000 xg 1min ;
- Retirer la colonne du tube de prélèvement et la placer dans un tube de prélèvement propre. Ajouter 500 µL de tampon AW1. Centrifuger 1 min à 6000 x g ;
- Retirer la colonne du tube de prélèvement et la placer dans un tube de prélèvement propre. Ajouter 500 µL de tampon AW2. Centrifuger 3 min à vitesse maximale (12000 x g) ;
- Oter la colonne du tube de prélèvement et la placer dans un tube de 1,5 mL exempt de nucléase ;
- Ajouter 60 µL de tampon AVE, incubé 1min. à température ambiante et centrifuger 1 min à

6000 x g ;

- Retirer et jeter la colonne. Placer le tube de 1,5 mL contenant l'ARN sur la glace pour une utilisation immédiate ou déposer à - 20°C ou - 80°C au congélateur pour une utilisation future.

#### **IV.6.2. Transcription inverse et amplification de l'ARN de RuV**

La présence d'ARN de RuV est détectée par une étape de transcription inverse (« Reverse Transcription ») suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (« Polymérase Chain Reaction ») en temps réel (RT-qPCR) avec la trousse RT-PCR QIAGEN OneStep® et une sonde RV-RubProbe : FAM-AGG TCC AGG TCC CGC CCG AC-BHQ1. L'amorce sens (RV11 [nts 8812-8831 : 5'-CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC-3']) et l'amorce antisens (RV12 [nts 8978-8997 : CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA-3']) utilisées amplifient un fragment de 185 nts dans la région codant E1 (nts 8812 à 8997). La RT-PCR précédemment décrite [159] a été modifiée par l'ajout d'une deuxième amorce antisens (RV12-2 [CCA CGA GCC GCG AAC AGT CG CG]) [74]. L'amorce antisens RV12 permet la détection des RuV de clade 1 tandis que l'amorce antisens RV12-2 améliore la détection des RuV de clade 2 par une modification de trois des nucléotides de la séquence de l'amorce pour qu'ils correspondent à la séquence consensus du clade 2.

La sonde de détection des ARN de RuV amplifiés :

RV-Rub-Probe: FAM-AGGTCCAGGTCCCGCCCGAC-BHQ1

Elle est marquée à l'extrémité 5' avec la molécule rapporteuse, la 6-carboxyl-fluoresceine (FAM), et à l'extrémité 3' avec un « quencher ».

Le mélange réactionnel : à 12,77 µL d'eau distillée sont ajoutés, dans l'ordre, 5 µL du tampon RT 5X (Qiagen RT-PCR KIT) ; 1 µL de chaque amorce à une concentration 20 µM ; 0,375 µL de sonde RubProbe à une concentration 20 µM ; 1µL du mélange dNTP 10 mM ; 0,1 µL inhibiteur de RNase OUT, Invitrogen); 1 µL d'enzyme Qiagen Onestep RT-PCR ; 2,5 µL d'ARN. Le volume final est de 25 µL.

La qRT-PCR a été réalisée avec le thermocycleur CFX96 C1000 (Biorad, Hercules, CA) (cf. détails du protocole opératoire dans le fichier Excel ; Annexe 4)

##### ***Paramètres des cycles de la qRT-PCR :***

- Une étape de transcription inverse, 30 min, 50°C ;
- Une activation, 15 min, 95°C ;
- 40 cycles : dénaturation (30 s, 95°C), hybridation et élongation (30 s, 57°C) ;
- Une étape finale d'élongation (30 s, 72 °C).

Trois contrôles négatifs et trois positifs PC (Cf. extraction ARN) ont été inclus. Si un contrôle est

contaminé, tous les résultats sont rejetés.

### **IV.6.3. Le séquençage**

Le séquençage a été effectué en utilisant la trousse Big Dye Terminator version 3.1 (Life Technologies, Carlsbad, Ca) selon les instructions du fabricant et le modèle de séquenceur capillaire ABI 3130xl (Applied Biosystems, Foster city, CA).

#### **IV.6.3.1. PCR pour le séquençage**

La détermination des génotypes de la rubéole est faite par le séquençage d'une séquence (E-739) de 739 nts (8731-9469) situés dans la région codant la glycoprotéine d'enveloppe E1. Pour ce faire, le séquençage est effectué sur 2 segments (fragments 1 et 2) qui se recoupent amplifiés en utilisant une PCR nichée à partir d'une séquence comprenant ces deux fragments.

Une PCR nichée amplifiant la région des 739 nt définie par l'OMS pour le génotypage du RuV a été utilisée pour tous les extraits positifs en ARN.

##### **IV.6.3.1.1. 1ère PCR: "RV HK genotyping\_first round"**

Les sérums positifs avec la RT-PCR de diagnostic ont été utilisés. La première RT-PCR de génotypage a utilisé la trousse Access RT-PCR System (Promega France Charbonnières les Bains, France), avec du SYBR green pour vérification du résultat. Un couple d'amorce encadre une séquence de 945 nt incluant la séquence de 739 nt requise pour l'attribution du génotype. Les amorces utilisées sont : l'amorce sens (8633F [nts 8633-8652 : 5'-AGC GAC GCG GCC TGC TGG GG -3']) et amorce antisens (9577R [nts 9557-9577 : 5'-CGC CCA GGT CTG CCG GGT CTC-3']).

Le mélange réactionnel : à 11 µL d'eau, sont ajoutés dans l'ordre : 5 µL du tampon RT-PCR 5X concentré ; 0,5 µL du mélange de dNTP 10mM ; 1,25 µL de DMSO ; 1,25 µL de solution de chaque amorce à une concentration 10µM ; 1 µL MgSO<sub>4</sub> ; 0,25 µL de SybrGreen ; 0,5 AMV Reverse Transcriptase à une concentration de 5U/µL ; 0,5 µL de Tfi DNA polymérase à une concentration 5U/µL ; et 2,5 µL d'ARN viral. Le volume final est de 25 µL.

##### ***Déroulement du cycle***

- RT : 45 min, 45°C ;
- 2 min, 95°C ;
- 40 cycles comportant chacun : 30 s, 95°C ; 1 min, 58°C ; 2 min, 68°C ; 7 min, 68°C ;
- Terminer par 7 min, 68°C.

La vérification de l'obtention du fragment attendu est faite par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% contenant 10 µL de colorant SYBR™ Safe (Invitrogen, Waltham, MA) dans 100 µL de tampon Tris Acetate EDTA (TAE). Dans chaque puits un mélange de 5 µL du produit de PCR et 2 µL d'une solution tampon de charge sont déposés (Annexe 5). Les témoins positifs et négatifs ainsi que des marqueurs de

poids moléculaire d'ADN (1 Kb Plus DNA ladder ; Invitrogen) sont ajoutés. La migration s'effectue dans du TAE 1X à 130 V, 45min. Après migration les fragments d'ADN sont visualisés sur une table à UV.

#### **IV.6.3.1.2. 2ème PCR; "RV HK genotyping\_Nested second round"**

Les couples d'amorces utilisés amplifient deux fragments qui se chevauchent. Une séquence en 5' (fragment 1) de 457 nts est amplifiée par le couple d'amorces :

739F1/9112R : 739F1 [nts 8656-8676 : 5'-CCC CAC CGA CAC CGT GAT GAG-3'] et  
9112R [nts 9092-9112 : 5'-GCG CGC CTG AGA GCCTAT GAC -3'].

Une séquence (fragment 2) en 3' de 605 nts est amplifié par le second couple d'amorce 8945F/9549R :

8945 [nts 8945-8962 : 5'-TGG GCC TCC CCG GTT TG-3']  
9549R [nts 9529-9549 : 5'-GCA GTG GTG TGT GTG CCA TAC-3'] (Annexe 6).

N.B. : les fragments 1 et 2 sont amplifiés séparément en utilisant les mêmes conditions expérimentales.

Milieu réactionnel : à 15,85 µL d'eau sont ajoutés 2,5 µL de tampon 10X ; 1 µL de MgCl<sub>2</sub> à 50mM ; 0,5 µL de dNTP à 10 mM ; 1 µL de chaque couple d'amorce à une concentration 10 µM ; 1,25 µL de DMSO ; 1 µL de MgSO<sub>4</sub> ; 0,25 µL de SYBR Green ; 0,15 µL de Platinum *taq* (Platinum™ Taq DNA Polymerase, DNA-Free (Thermo Fisher scientific) 5U/µL) ; et 1,5 µL des produits de la première PCR. Le volume final est de 25 µL.

##### ***Cycles d'amplification (fragments 1 et 2)***

- Incubation à 94°C, 5 min ;
- 40 cycles, avec la séquence : 94°C, 30 s ; 60°C 30 s ; 72°C, 30 s ;
- Incubation finale à 72°C, 5 min.

#### **IV.6.3.2. Détection des amplicons**

La vérification de l'obtention du fragment attendu est faite en gel d'agarose à 1,5% contenant 10 µL de colorant SYBR™ Safe (Invitrogen) dans 100 µL de tampon Tris-acétate EDTA (TAE). Les témoins positifs et négatifs ainsi que des marqueurs de poids moléculaire d'ADN (1 Kb Plus DNA ladder).

Dans chaque puits un mélange de 10 µL du produit de PCR et 2 µL d'une solution tampon de charge sont déposés. La migration s'effectue dans du TAE 1X, à 130 V, 45min. Après migration les ADNc sont visualisés sur une table à UV. L'observation des bandes de 457 pb et de 605 pb correspondaux deux ADNc attendus (*cf.* Photographies des gels ; Annexe 7).

#### **IV.6.3.3. Purification du produit de PCR de séquençage**

L'échantillon ne doit contenir ni amorces ni nucléotides non incorporés ni produits amplifiés non spécifiques qui interféreraient avec la PCR de séquençage.

##### **IV.6.3.3.1. Purification sur colonne par centrifugation**

Si le produit de la PCR obtenu à la longueur attendue avec une seule bande sur le gel d'agarose, il est purifié à l'aide de la trousse Genomed® Jet Quick Spin (Genomed GmbH, Löhne, Allemagne)

##### ***Matériel***

- Jet quick PCR Purification Spin Kit 250 ;
- Éthanol moléculaire - Grade de biologie (VWR) ;
- Centrifugeuse (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) ;
- Tubes centrifuges de 1,5 mL (Eppendorf) ;
- Pipettes et embouts (Rainin ; Mettler-Toledo SAS, Viroflay, France) ;
- Bloc chauffant 70°C (ThermoFisher Scientific ; Illkirch Graffenstaden, France).

##### ***Principe du test***

Les petits fragments tels que les amorces et les nucléotides non incorporés passent à travers le filtre tandis que les plus gros fragments de PCR (80 pb-20 kpb) se lient à la colonne et sont ensuite élués.

##### ***Mode opératoire***

- Reconstituer le tampon de purification (Binding solution H1) contenant de l'isopropanol et la solution de lavage (Buffer H2) contenant de l'éthanol (96-100%) selon les instructions du fabricant ;
- Ajouter 175 µL de tampon de purification H1 au produit d'amplification. Bien agiter au vortex.
- Pipeter le produit et le déposer sur la colonne d'éluion JetQuick®, centrifuger (10000 x g ; 1 min) ;
- Laver les colonnes avec 450 µL du tampon de lavage H2, centrifuger (12000 x g ; 1 min). Jeter l'éluat, replacer la colonne dans le même tube récepteur, centrifuger à vide (13000 x g ; 3 min) ;
- Ajouter 30 µL de tampon TE (ou de Tris-HCl 10 mM) à pH 8,0 à la colonne transférée dans un nouveau tube de 1,5 mL. Centrifuger (12000 x g, 1 min) pour récupérer l'ADN purifié. Celui-ci est conservé à 4°C pour une utilisation immédiate ou à -20°C pour un stockage à long terme.

#### **IV.6.3.3.2. Purification à partir du gel**

Si plus d'une bande est observée sur le gel, la purification est réalisée, après migration, à partir des bandes découpées du gel d'électrophorèse d'agarose contenant le fragment d'intérêt avec la trousse d'extraction (QiaQuick Gel®, Qiagen).

##### ***Matériel***

- Isopropanol Moléculaire - Grade de biologie (Sigma Aldrich®, Saint-Louis, MO) ;
- Balance ;
- Microcentrifugeuse (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) ;
- Tubes pour centrifuger de 1,5 ml (Eppendorf) ;
- Pipettes et embouts (Rainin) ;
- Bloc chauffant 50°C (Thermofisher, Waltham, MA).

##### ***Méthode***

Suivre les instructions du fabricant. Une partie de l'ADN est perdue lors de cette purification.

##### ***Principe du test.***

Les kits QIAquick contiennent un assemblage de membrane de silice pour la liaison de l'ADN dans un tampon à haute teneur en sel et l'élution avec un tampon à faible teneur en sel ou de l'eau. La procédure de purification élimine les amorces, les nucléotides, les enzymes, l'huile minérale, les sels, l'agarose, le bromure d'éthidium et d'autres impuretés des échantillons d'ADN.

Ce kit comprends des tubes de colonnes constituées de gels de silice disposés dans des microtubes et des tubes collecteurs pour recueillir les produits de PCR >100 bp après les étapes de lavages. L'ADN (de 100 bp à 10 kb) est purifié à l'aide d'une procédure simple et rapide de liaison-lavage-élution et sous un volume d'élution de 30 à 50 µL. Sont également inclus des tampons PBI et PE de lavage pour éliminer des petits fragments d'ADN et l'ADN non spécifique. Le tampon EB permet d'éluer l'ADN purifié.

##### ***Mode opératoire***

Préparation des échantillons

- Sortir les produits de PCR
- Centrifuger les barrettes ou les tubes pour faire redescendre la condensation et les gouttes éventuelles sur les parois.
- Repérer les échantillons sortis positifs sur gel

Préparation des colonnes et des réactifs

- Préparer les colonnes sur un portoir : Une colonne dans un tube collecteur par échantillon à purifier
- Reconstitution du tampon PE selon les recommandations du fournisseur : Ajouter 24 ml d'éthanol (aux 6 ml dans le flacon) les autres tampons sont prêts à l'emploi

## Transfert des échantillons sur colonnes et élution

- Ajouter 5 volumes de tampon PB à 1 volume d'échantillon ADN
- Récupérer tout le volume de chaque échantillon et le déposer sur la colonne, en déposant bien au milieu, délicatement.
- A la fin, vérifier que tous les échantillons à purifier ont été transférés et n'ont pas de volume restant.
- Centrifuger 60s 14500 rpm, vider et remettre le tube collecteur.
- Ajouter 750 µl de tampon PE, centrifuger 60s à 14500 rpm
- Vider et remettre le tube collecteur
- Centrifuger 60s à 14500 rpm
- Mettre la colonne sur un tube Eppendorf 1,5 µl noté du N° d'échantillon
- Ajouter 30 µl du tampon EB sur la colonne, laisser reposer la colonne 1mn
- Centrifuger 60s à 14500 rpm
- Faire une électrophorèse en gel d'agarose pour un contrôle de purification.
- Conserver les produits au congélateur -20°C en attendant le séquençage.

### IV.6.3.4. Quantification de l'ADN purifié

L'obtention des résultats optimaux du séquençage, nécessite une quantification de l'ADN. Les produits issus de l'extraction par gel ne sont pas quantifiés car une grande quantité d'ADN est perdue lors de cette purification et la quantité maximale d'ADN est ajoutée dans la réaction de séquençage.

La concentration peut être estimée en vérifiant l'intensité de la bande sur le gel. Si la bande est forte, la concentration est élevée et une faible quantité d'ADN sera nécessaire dans la réaction, et vice versa. Cette méthode n'est pas très précise et nécessite une certaine expérience pour estimer la quantité de matériel nécessaire. Cependant elle permet d'économiser du temps et de l'argent par rapport à l'utilisation d'une quantification.

En fonction de l'intensité de la bande obtenue sur le gel d'électrophorèse, diluer le produit PCR avec de l'eau distillé stérile.

## IV.6.4. Le séquençage

### IV.6.4.1. Principe de la méthode de Sanger

La séquence nucléotidique des produits PCR est déterminée à l'aide de la méthode de séquençage dite « dye terminator » sur le séquenceur ABI 3130xl d'Applied Biosystems (Life Technologies). Cette méthode utilise une PCR faite avec des amorces spécifiques, une ADN polymérase ADN dépendante, un tampon contenant les désoxyribonucléotides (dNTP) et des di-désoxyribonucléotides marqués avec 4 fluorochromes différents (ddNTP fluorescent) un par nucléotide. Lorsqu'un ddNTP fluorescent est

incorporé, l'élongation du brin d'ADN correspondant est arrêtée en raison de l'absence du groupe hydroxyle en 3' et donc des produits de différentes tailles sont générés.

#### **IV.6.4.2. Mise en oeuvre**

##### ***Matériel***

- Trousse de séquençage de cycle Big Dye terminator v3.1 contenant 5X Buffer, BigDye v3.1, vecteur PGEM, amorce M13 (Life Technologies) ;
- Eau ultrapure (Life Technologies) ;
- Microplaque et bouchons PCR de 96 puits (Life Technologies) ;
- Thermocycleur Conventional PCR Master cycler: Master x5a (Eppendorf) ;
- Pipettes multicanal 10  $\mu$ L et embouts (Rainin) ;
- 5  $\mu$ M amorces sens et antisens (Eurogentec, Seraing, Belgique) ;
- Produit de PCR ;
- Supports de microplaque (Greiner Bio-One) ;
- Glace.

##### ***Méthode : Préparation des microplaques***

- Décongeler le mélange prêt à l'emploi (Big Dye v3.1, sensible à la lumière) à 4°C. Agiter au Vortex avant utilisation ;
- Pour chaque échantillon, préparer le « master mix » : 1  $\mu$ L de Big Dye, 1,5  $\mu$ L d'eau ultrapure et 1,5  $\mu$ L de tampon 5 X TE ;
- Un contrôle positif est ajouté généralement dans le puit A1 qui contient un mix réactionnel : de 3  $\mu$ L d'eau ultrapure, 2  $\mu$ L d'amorce M13 (fourni dans le kit) et 1  $\mu$ L de vecteur PGEM (fourni dans la trousse) ; ce contrôle permet de savoir s'il y a eu un problème lors du séquençage du produit PCR ;
- Garder un puits vide pour un contrôle du séquençage qui sera ajouté plus tard ;
- Préparer le plan de plaque en incluant un puits pour l'amorce sens et un puits pour l'amorce anti- sens ;
- Distribuer dans chaque puits : 4  $\mu$ L de master mix réactionnel, 2  $\mu$ L d'amorce à 5  $\mu$ M, 2  $\mu$ L de produit PCR (max 5  $\mu$ L), 3  $\mu$ L d'eau ultrapure (rajouter jusqu'à 10  $\mu$ L selon la quantité d'ADN) ;
- Agiter brièvement la plaque ;
- Couvrir la microplaque avec un ruban adhésif ;
- Agiter au Vortex et centrifuger à nouveau pendant au moins 10 s ;
- Conserver la microplaque à 4°C ;

### *Mode opératoire de la PCR pour le séquençage*

#### **Identique pour les fragments 1 et 2 :**

- 3 min à 95°C ;
- 29 cycles, comportant chacun 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 2 min à 60°C ;
- Terminer par 10 min, 10°C ;
- Conserver les échantillons à 4°C.

#### **IV.6.4.3. Purification des produits des PCR**

Elle permet d'éliminer le fluorochrome non incorporé issu du master mix Big Dye, qui pourrait interférer avec la lecture des fragments de faible poids moléculaire.

##### *Matériel*

- Centrifugeuse pour microplaques ;
- Pipettes et embouts (Rainin) ;
- Microplaques (Greiner Bio-One) ;
- Papier essuie-tout (VWR) ;
- ddH<sub>2</sub>O (Eau bidistillée) ;
- Ethanol à 100% Molecular Biology Grade (VWR).

##### *Mode opératoire*

- Préparer l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,5 M pH 8,0 (93 g d'EDTA (Sigma) dans 500 mL ddH<sub>2</sub>O ; ajuster le pH à 8,0), autoclaver. Conserver à température ambiante pendant 12 mois ;
- EDTA 42 mM : 42 mL de 0.5M EDTA, ajouter ddH<sub>2</sub>O jusqu'à 500 mL ;
- Éthanol 70% : 7 mL d'éthanol à 100% dans un tube de 15 mL, 3 mL de l'eau bidistillée (ddH<sub>2</sub>O), placer à -20°C ;
- Centrifuger la microplaque avant de commencer ;
- Retirer les bouchons de la plaque PCR. Les garder dans l'ordre parce qu'ils vont être réutilisés ;
- Distribuer 15 µL par puits de 42 mM EDTA. Mélanger avec les embouts en les changeant à chaque fois ;
- Ajouter 60 µL d'éthanol 100% à chaque mélange réactionnel. Couvrir la plaque avec les bouchons dans le même ordre et bien agiter au vortex ;
- S'assurer que chaque puits a une quantité suffisante de mélange réactionnel ;
- Incuber 15 min à température ambiante dans l'obscurité ;
- Centrifuger 30 min à 3000 tr/min à 4°C ;
- Immédiatement après, retirez les bouchons ;

- Retourner la plaque sur du papier essuie-tout ;
- Centrifuger à 1000 tr/min, 1 min ;
- Ajouter 70 µL 70% d'éthanol à chaque puits ;
- Couvrir la plaque et centrifuger 2 fois à 3000 tr/min à 4°C, 1 min ;
- Laisser sécher la plaque sur du papier essuie-tout pendant au moins 15 min (pour éliminer toute trace d'éthanol) ;
- Couvrir la plaque et la conserver à 4°C lorsque le chargement sur le séquenceur est dans les heures qui suivent, sinon conserver à -20°C.

#### **IV.6.4.4. L'électrophorèse capillaire**

##### ***Matériel***

- Hi-Di (formamide hautement désionisé ; Applied Biosystems), stocké à -20°C ;
- 301/31xx Genetic Analyzer Sequencing Standards, BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), remis en suspension dans 340 µL de Hi-Di (Life Technologies) ;
- Pipette multicanaux 10 µL et embouts (Rainin) ;
- Support de microplaques (Greiner Bio-One) ;
- Plate Septa (Life Technologies) ;
- Glace ;
- Papier essuie-tout (VWR) ;
- Polymère (POP-7 for 3130/3130xl Genetic analyzers (Applied Biosystems) ;
- 310 and 31xx Running Buffer 10X (Life Technologies) : à diluer 10 fois dans ddH<sub>2</sub>O ;
- Séquenceur ABI 3130xl Genetic analyzer (Applied Biosystem) ;
- Porte-plaque (noir) et couvercle (blanc).

##### ***Mode opératoire***

- Retirez le papier essuie-tout ;
- Ajouter 10 µL Hi-Di dans chaque échantillon (le puits est censé être sec avant l'addition) ;
- Ajouter 10 µL d'ABI Standard dans le puits vide gauche ;
- Le séquenceur lit 16 puits en même temps, soit 2 colonnes. Remplir les puits inutilisés avec Hi-Di ;
- Couvrir les puits ;
- Démarrer le programme suivant sur la machine 5 min à 95°C, 5 min à 10°C ;
- Immédiatement après déposer la plaque sur la glace ;
- Retirer le couvercle et placer un septum sur la plaque. C'est un dispositif en caoutchouc à

travers lequel les capillaires vont passer ;

- Centrifuger la plaque juste avant de la charger sur le séquenceur ;
- S'assurer qu'il y a suffisamment de polymère (POP7), de tampon 1X et d'eau dans les réservoirs du séquenceur ;
- Vérifier que le séquenceur est allumé. Appuyer sur le bouton « Tray » pour appeler le plateau ;
- Lorsque le plateau n'est plus en mouvement, ouvrir les vitres ;
- Retirer soigneusement les 2 compartiments tampons et les 2 compartiments d'eau ;
- Vider-les et les remplir avec de nouveaux réactifs ;
- Charger la microplaque et démarrer le séquenceur.

#### **IV.6.4.5. Lecture des résultats du séquençage**

Lorsque la lecture est terminée, les fichiers sont copiés de l'ordinateur du séquenceur à l'emplacement suivant : L:\Transfer\SEQUENCING\RESULTS. Les fichiers avec l'extension «. ab1 » peuvent être analysés par BioEdit ou tout autre logiciel d'analyse de séquence.

Vérifier la qualité du séquençage en ouvrant la séquence d'ADN standard avec l'analyse de séquence et vérifier la qualité des contrôles pour s'assurer que rien n'est venu altérer le processus.

#### ***Analyse des séquences***

Les données des séquences de chaque échantillon sont importées et alignées à l'aide du logiciel Seqscape V2.5 (Applied Biosystem) et les séquences consensus couvrant la fenêtre de 739 nts ont été alignées avec les séquences de référence de l'OMS grâce au logiciel BioEdit version 7.2.5 (Inform Technology, Inc., Los Angeles, CA). L'analyse phylogénétique est effectuée avec le logiciel MEGA7 en utilisant les méthodes de Neighbor-joining et Kimura à 2 paramètres. L'interférence phylogénétique est testée avec la méthode de Bootstrap.

#### **IV.6.5. Détermination des génotypes**

Les données des séquences ont été analysées avec le logiciel SeqScape v2.5 (Applied Biosystems) et les séquences obtenues, couvrant la séquence de 739 nt recommandée par l'OMS pour le génotypage du RuV, sont comparées aux 32 séquences virales de référence de l'OMS à l'aide du logiciel BioEdit version 7.2.5. Les résultats sont ensuite comparés à des séquences sélectionnées dans GenBank, appartenant aux différents génotypes de RuV.

Les analyses phylogénétiques et les distances génétiques ont été calculées en utilisant le logiciel MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Megasoftware, Pennsylvania State University ; <https://www.megasoftware.net/faq>). L'arbre phylogénétique a été construit avec la méthode de voisinage et les distances calculées à l'aide du modèle à deux paramètres de Kimura. La robustesse des nœuds a été testée pour 1000 Bootstrap.

N.B : toutes les séquences de RuV obtenues ont été soumises à GenBank sous les numéros d'accès MW079853-89.

## **IV.7. Analyse des données démographiques**

### **IV.7.1. Données patientes**

Les données des patients ont été traitées avec le logiciel EPI info version 3.5.4 et Microsoft Office Excel 2016. Le seuil utilisé pour évaluer les tests statistiques (test du  $\chi^2$ ) était  $\alpha=0,05$ . Les cartes ont été générées avec le logiciel « Health Mapper » version 4.2 (OMS).

Les estimations de la taille de la population ont été obtenues au niveau du ministère de la Santé et de la population et sont fondées sur le recensement national de 2003. Les prévisions selon les groupes d'âge, la région et le sexe sont disponibles pour les années 2004 à 2028. L'incidence cumulative a été calculée pour 100.000 habitants par région sanitaire.

#### *Les données analysées*

- Le nombre de cas suspects et confirmés par âge, date de début (mois et année, par semaine dans le cas d'une épidémie) et zone géographique ;
- L'incidence par million de personnes par période de 12 mois et par zone géographique ;
- L'incidence en fonction de l'âge, du sexe et du district ;
- Proportion de cas confirmés par groupe d'âge (les groupes d'âge proposés sont 0 à 11 mois, de 1 à 4 ans, de 5 à 9 ans, de 10 à 14 ans, et supérieur à 15).
- Répartition géographique des 3 géotypes de RuV identifiés par année 2008-2016

Les résultats sont présentés sous forme de graphiques ou de cartes.

### **IV.7.2. Estimation de la taille de la population**

Les estimations de la taille de la population ont été obtenues au niveau du ministère de la Santé et de la Population et sont fondées sur le recensement national de 2003. Les prévisions selon les groupes d'âge, la région et le sexe sont disponibles pour les années 2004 à 2028. L'incidence cumulative a été calculée pour 100 000 habitants par région sanitaire.

## V. Résultats

### V.1. Epidémiologie de la rubéole 2015-2016

Des 831 cas présumés de rougeole testés pour des anticorps IgM spécifiques à la rubéole entre 2015 et 2016, 411 (49,5%) ont été positifs (371 en 2015 et 40 en 2016), ce qui correspond à une incidence annuelle, respective de 7,49 et 0,79 pour 100 000 habitants. La plupart des cas ( $n = 391$  ; 95,1%) se sont produits entre janvier et avril et l'incidence maximale a été observée en février (Figure 7). Une rubéole récente a été confirmée chez 190 mâles (46,2%) et 221 femelles (53,8% ;  $p = 0,422$ ). L'âge des patients variait de 11 mois à 59 ans avec une médiane de 5 ans. L'information sur l'âge manquait pour un cas de rubéole. La plupart des 410 patients positifs étaient âgés de 5 à 9 ans (206 ; 50,2%), suivis de ceux de 1-4 ans (108 ; 26,3%) et de 10-14 ans (72 ; 17,6%), seulement 18 (4,4%) étaient âgés d'au moins 15 ans, et 6 (37 ; 1,5%) avaient moins de 12 mois. Cette répartition des positifs en fonction de l'âge est significative ( $p < 0,0001$ ). L'incidence des positifs varie également beaucoup avec l'âge : 0-11 mois (6/37 ; 16%) ; 1-4 ans (108/251 ; 43%) ; 5-9 ans (206/351 ; 58,7%) ; 10-14 (72/124 ; 58,1%) ; >15 ans (18/56 ; 32%). Ces différences sont significatives ( $p < 0,01$ ). Il est important de noter que dans la tranche d'âge > 15 ans, 15 femmes sur 36 testées (42%) étaient IgM positive (Figure 8).

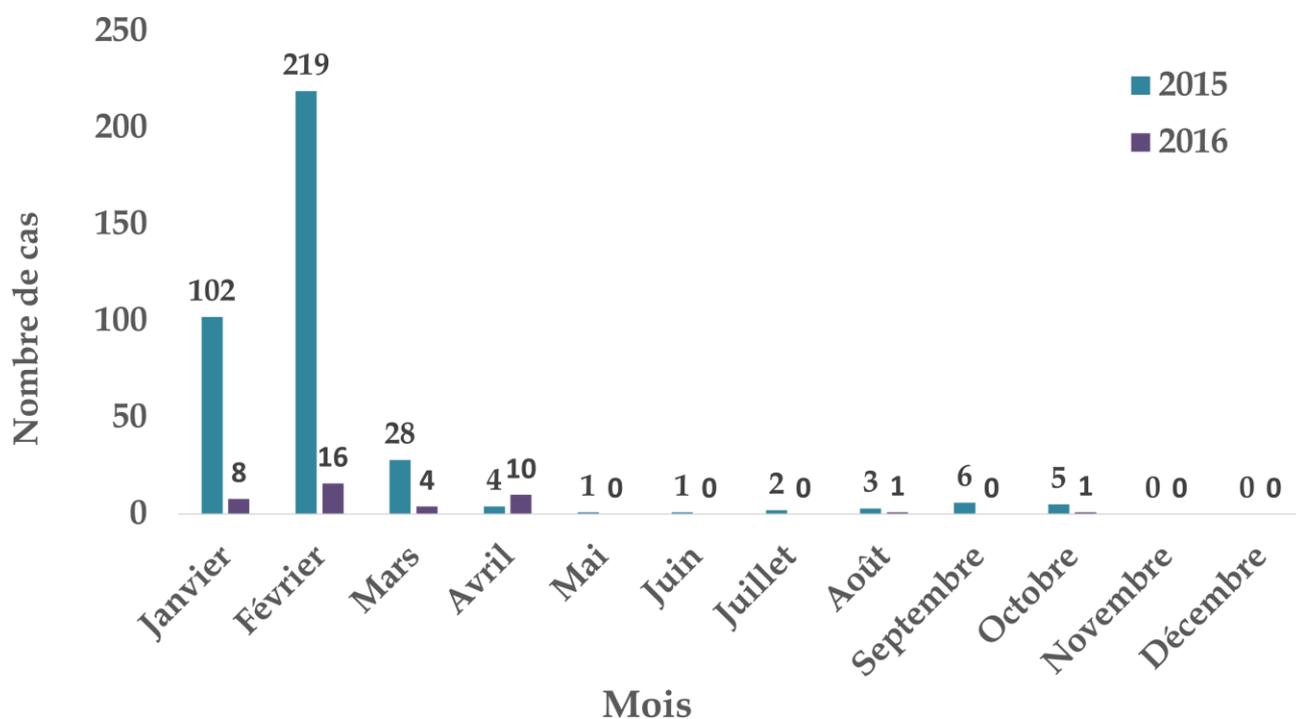


Figure 7 : Nombre de cas de rubéole par mois et par année, RCA 2015-2016.

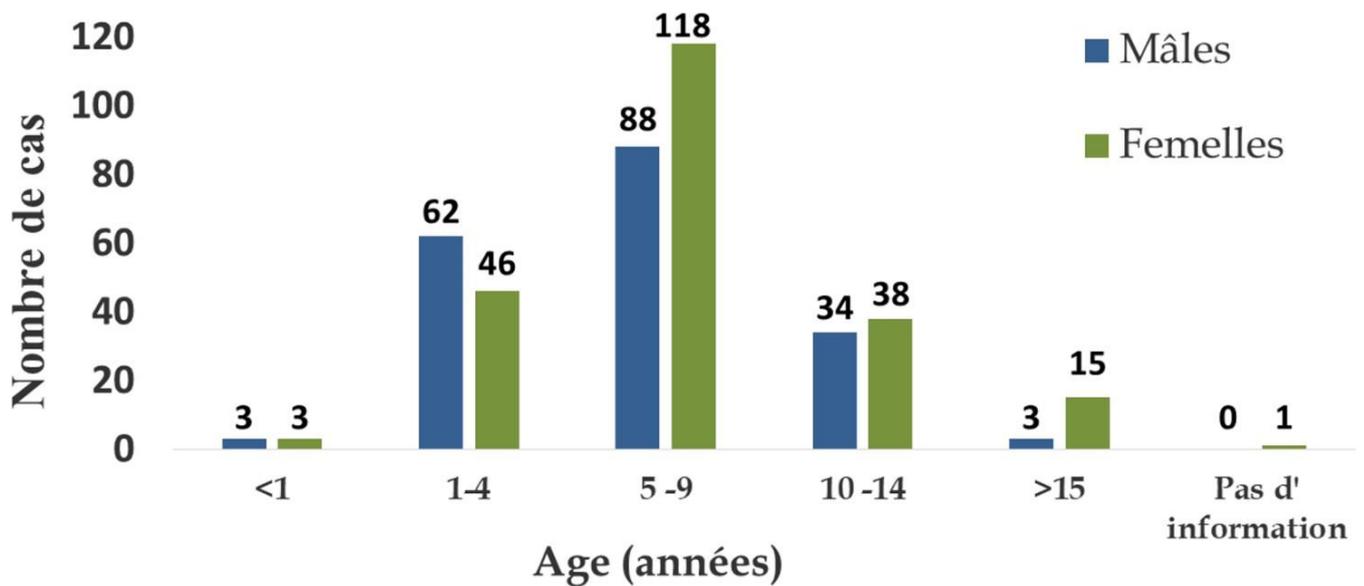


Figure 8 : Nombre de cas de rubéole selon le sexe et l'âge, RCA 2015-2016

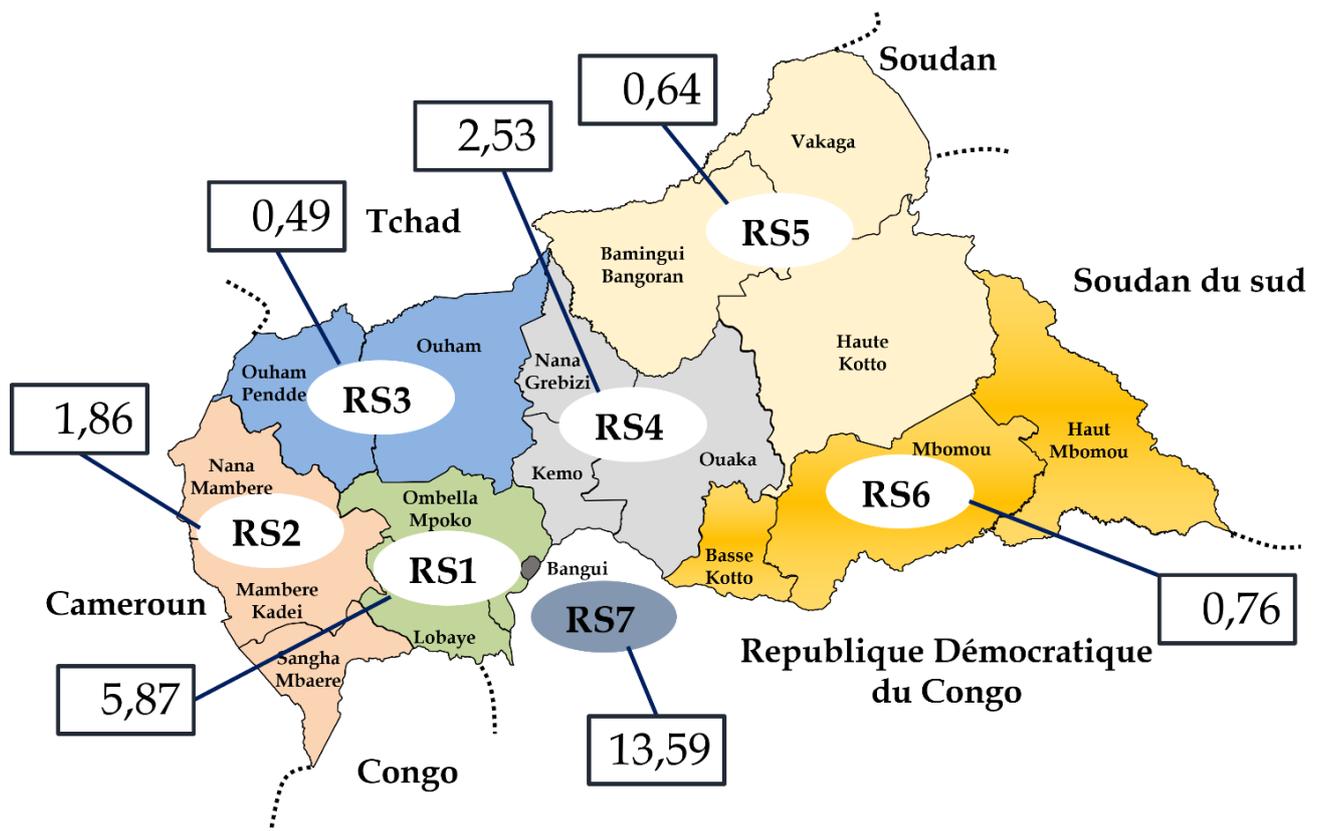


Figure 9 : Incidence des cas de rubéole par 100 000 habitants en RCA selon la région sanitaire, 2015-2016.

L'étude de la répartition géographique des cas de rubéole a montré que plus de la moitié des cas (233/411 ; 56,7%) provenaient de la RS 7, correspondant à une incidence de 13,59 pour 100 000 habitants (Figure 9). La deuxième région la plus touchée a été la RS1 avec 87 cas (21,2%), suivie de la

RS4 (n = 36 ; 8,8%), la RS2 (n = 33 ; 8,0%), la RS3 (n = 10 ; 2,4%), la RS6 (n = 9 ; 2,2%) et la RS5 (n = 3 ; 0,7%). Les différences de survenue de cas de rubéole entre les différentes RS sont significatives (p < 0,0001).

## **V.2. Distribution des génotypes de RuV (2008-2016)**

L'alignement de 37 séquences couvrant les 739 nts du gène E1 du RuV tel que défini par l'OMS a fourni l'arbre phylogénétiques de la figure 10. Les valeurs de Bootstrap d'au moins 70% (après 1000 répétitions) sont affichées. Le résultat des séquences d'ARN des RuV de la RCA incluses dans l'étude sont marqués d'un point noir. Les correspondances BLAST les plus proches de ces séquences sont signalées par des triangles ouverts.

Les génotypes ont été déterminés pour 37 des 350 échantillons positifs pour les IgM anti-rubéole. Une seule séquence (RV/Bangui.CAF/8.13/3) couvrait seulement les premiers 374 nts de la fenêtre de 739 nts recommandée pour le génotypage de RUV et n'a pas été incluse dans l'analyse phylogénétique ci-dessus mais le génotype a quand même pu être déterminé. Des séquences ont été obtenues pour toutes les années, sauf 2009 (2008 : 2 ; 2010 : 1 ; 2011 : 1 ; 2012 : 1 ; 2013 : 9 ; 2014 : 9 ; 2015 : 12 ; 2016 : 2). La grande majorité des séquences provenaient de patients venant de Bangui (RS7 ; n = 24 ; 64,9%). Seules quelques souches étaient disponibles dans les autres régions sanitaires, à l'exception de la RS5, pour lequel aucune information n'a été obtenue (RS1 : 4 ; RS2 : 3 ; RS3 : 2 ; RS4 : 3 ; RS6 : 1). L'analyse phylogénétique a identifié trois génotypes différents du RuV, à savoir les génotypes 1E (n = 12), 1G (n = 5) et 2B (n = 20) (Figure 10). Les séquences signalées aux États-Unis en 2008 et 2012 (numéros d'accèsion GenBank JN635286 et KC866357) et au Soudan en 2005 (FJ775000) étaient les plus proches de celles des souches de génotype 1E retrouvées en RCA. Les séquences de génotype 1G provenant de l'Ouham dans la RS3 en 2008 étaient très peu différentes de celles du Cameroun (MG754229), de la Côte d'Ivoire (JX679266) et de l'Ouganda (EF588978). La séquence de la souche 1G de Mambere-Kadei dans la RS2 trouvée en 2015 était proche de celle de Californie (MF490288). Des séquences identiques de 2 souches 1G de Bangui (RS7), avaient les meilleures correspondances BLAST avec celle du Cameroun de 2013 (MG754223) et celle de Côte d'Ivoire de 2008 (JX679266). Les 20 séquences de la RCA et celles de 4 souches de République démocratique du Congo de 2012 et 2014 (KU218400, MH654796, MH654800 et MH654801), toutes du génotype 2B, étaient regroupées avec une valeur de bootstrap de 99%.

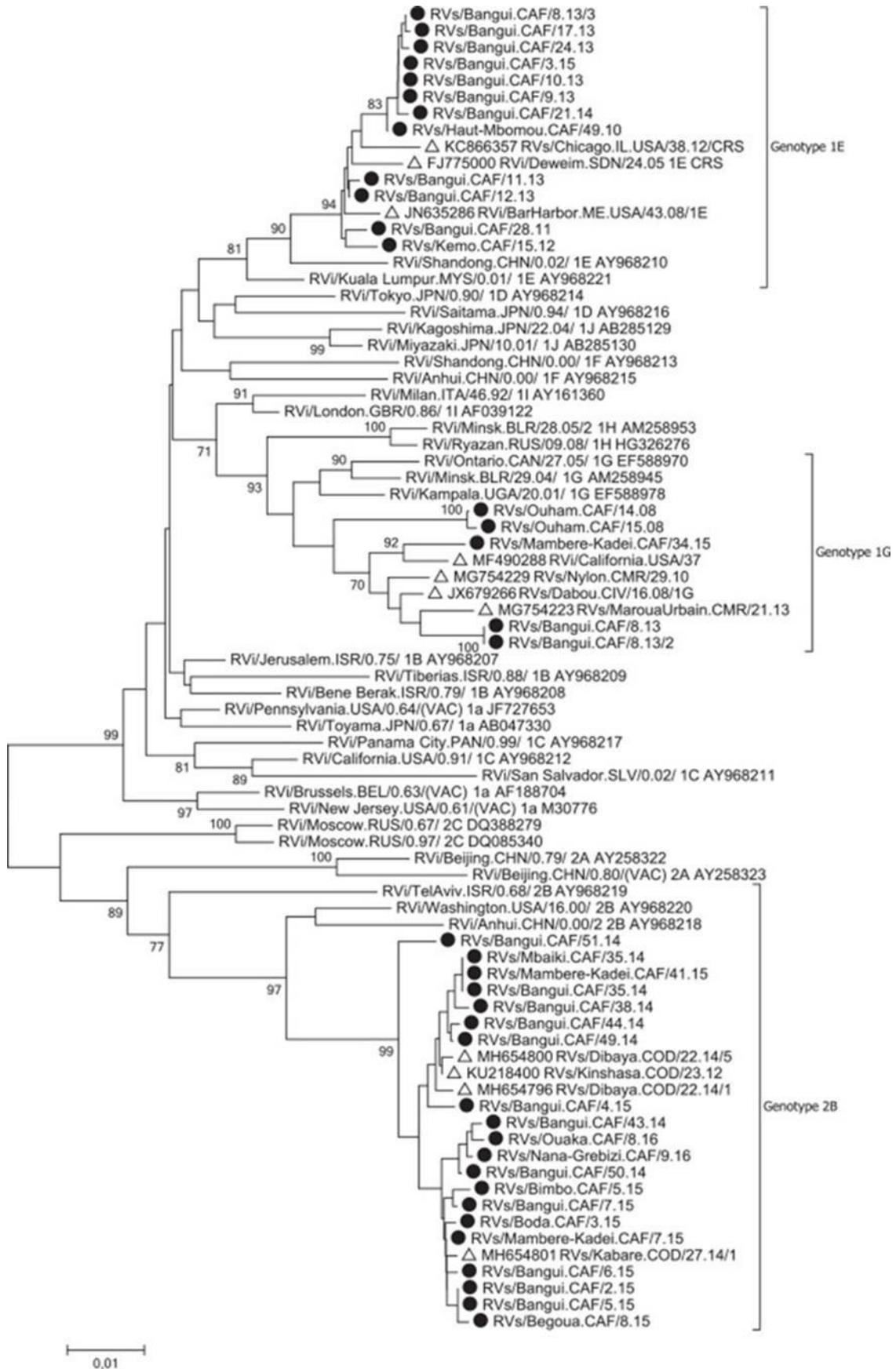
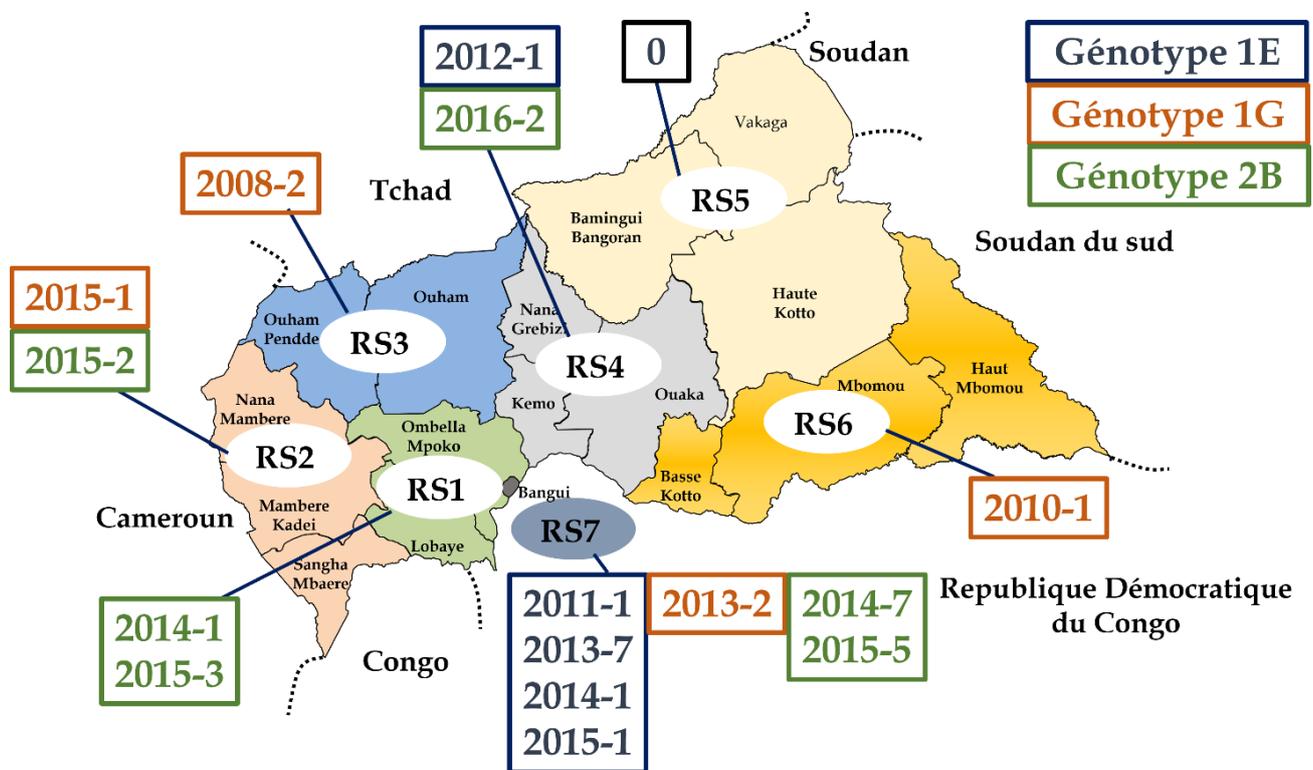


Figure 10 : Arbre phylogénétique des RuV de RCA.

Ces résultats permettent de souligner une dynamique de circulation des génotypes de RuV en RCA. Alors qu'en 2008, seul le génotype 1G était détecté. Entre 2010 et 2012, seul le génotype 1E était présent, mais les deux ont co-circulé à Bangui en 2013. Dans le pays, le génotype 2B a été mis en évidence pour la première fois en 2014 et était, jusqu'en 2015, prédominant (une seule souche de génotype 1G et deux souches de génotype 1E ont été détectées entre 2014 et 2015) et a été seul mis en évidence en 2016. Cette dynamique de circulation des génotypes est aussi très variable d'une RS à l'autre. Alors que dans trois RS, un seul génotype a été trouvé (RS1 : 2B ; RS3 : 1G ; RS6 : 1E), deux ont été mis en évidence dans 3 RS (RS2 : 1G et 2B ; RS4 : 1E et 2B), tandis qu'à Bangui les 3 ont été présents (Figure 11).



**Figure 11 : Répartition des génotypes selon la région sanitaire.**

En 2008, 7 cas de rubéole ont été détectés dans l'Ouham (RS3) entre les semaines épidémiologiques 10 et 15 et des séquences très proches de génotype 1G ont été obtenues chez deux de ces patients. Sept cas de rubéole ont été confirmés en 2010. En 2011-2015, 10 souches de génotype 1E ont été obtenues à Bangui. Deux étaient isolées sur l'arbre phylogénétique une en 2011 et l'autre en 2014. En revanche 3 étaient identiques (2 en 2013 et 1 en 2015) tandis que trois autres (2013) étaient différentes mais proches. Les années 2014 et 2015 ont vu une forte incidence, du fait de l'épidémie, mais aucune

information sur les différentes chaînes de transmission n'est disponible et 12 souches du génotype B ont été obtenues à Bangui et une à Bimbo, ville adjacente à Bangui (RS7). Ces souches sont dispersées sur l'arbre phylogénétique mais ceci peut être lié à une forte circulation dans la population responsable de la survenue de mutations. Les deux souches retrouvées en région 2 (Manbere Kadei), éloignées sur l'arbre phylogénétique, pourraient être liées à des souches de Bangui. Il n'y a pas été établi de lien épidémiologique entre les deux patients porteurs de souches de génotype 2B retrouvées dans la RS4 en 2016, mais ces souches, bien que proches sur l'arbre phylogénétique, proviennent de 2 provinces différentes (Ouaka et Nana Grebizi dans la RS4). (Figure 11).

## VI. Discussion

En dépit des distances à parcourir entre les centres de santé et Bangui, le transport des échantillons dans les 3 jours, dans la majorité des cas, se déroule de manière satisfaisante, et ceci malgré l'état des routes. Les variations entre les RS peuvent être liées à des différences de densité de population et d'accès aux centres de santé. Cependant les problèmes d'insécurité jouent surtout pour la RS 5 qui est aussi la plus éloignée et qui ne fournit qu'un faible nombre d'échantillons. L'insécurité peut également limiter ponctuellement les transports d'échantillons à partir d'autres RS. Le fait que la majorité des prélèvements provient de Bangui est lié à la taille de la population (1/4 de celle du pays) mais aussi à la proximité du laboratoire ce qui assure une bonne qualité des échantillons reçus (tout ceci peut expliquer le pourquoi du grand nombre de séquences obtenues pour la RS7). Une fois reçu, les prélèvements sont conservés dans de bonnes conditions (-80°C), les congélateurs étant protégés des coupures de courant (récurrentes) par onduleur et groupes électrogènes. Cependant on peut regretter que les données épidémiologiques, en dehors de celles fournies par les fiches accompagnant les prélèvements, ne soient que rarement obtenues.

Dans la période allant de 2008 à 2014, 26,7% (362/1221) des échantillons recueillis étaient négatifs ou équivoques pour la recherche d'IgM anti-rougeoleuses [156]. Dans l'étude menée en 2015-2016 près de la moitié 49,5% (411/831) étaient positifs pour les IgM anti-rubéoleuses. Ceci est certainement lié à la grande épidémie de rubéole en 2015 (Figure 7). Les résultats obtenus entre 2008 et 2014 ont montré une augmentation des cas en 2014 correspondant au début de cette épidémie [156]. Ces travaux montrent que le personnel médical des centres de santé ne se conforme vraisemblablement pas à la définition clinique des cas de rougeole de l'OMS [160] et que la rubéole est endémique en RCA, avec des poussées épidémiques, et, jusqu'à présent, a été peu ou pas considérée. Le fait que la rubéole soit plus fréquente que la rougeole est lié à la vaccination anti-rougeoleuse qui n'est cependant qu'imparfaitement mise en œuvre.

Les cas de rubéole identifiés dans le cadre de la surveillance de la rougeole entre 2007 et 2014 [156], mais également en 2015 et 2016 [78] ont montré une évolution saisonnière, avec des pics d'incidence pendant la saison sèche entre janvier et mars. Une telle observation est également faite dans plusieurs pays de la région Afrique : Zimbabwe [161], Ethiopie [162], Cameroun [163], Côte d'ivoire [76], Nigeria [164] et Liberia [165]. Une telle augmentation du nombre de cas est probablement associée à des variables météorologiques, telles que la température et l'humidité relative. Une telle relation entre le climat et les cas de rubéole a été suggérée dans une étude réalisée à Pékin, [166].

Une épidémie très importante a également été observée en 2007 [156] ce qui laisse supposer que les épidémies de rubéole en RCA se produisent tous les 7 à 8 ans, comme cela a été décrit en Afrique centrale [161]) et orientale [162]. L'épidémie de 2015 était probablement associée à la crise sociopolitique de 2012-2016, qui a conduit à des déplacements de personnes des zones rurales en particulier vers Bangui et ses environs [167]. Les camps de déplacés internes (PDI), construits spontanément avec des moyens de fortune puis avec des aides d'origines diverses, sont devenus des abris à long terme largement surpeuplés ce qui a pu faciliter la propagation du virus [168]. Bien que seulement 6 cas de rubéole aient été répertoriés chez des réfugiés dans la présente étude, des travaux réalisés sur des personnes déplacées et/ou des réfugiés, dans d'autres pays africains, ont montré des augmentations de l'incidence ou des épidémies de plusieurs maladies infectieuses, associées à des conditions de vie malsaines, à la surpopulation et à la marginalisation sociale [169;170;171;172;173].

Bien que le nombre de cas observés concerne surtout les enfants de 5 à 10 ans et à un moindre degré ceux de 1 à 4 ans, la prévalence des infections est faible avant 1 an et après 15 ans, et ne diffère que peu entre 1 et 14 ans. En RCA, les enfants entrent à l'école entre 3 ans (écoles privées) et 5 ans (écoles publiques), souvent avec plus de 40 enfants par classe et par enseignant, ce qui facilite la propagation des infections et explique la forte incidence dans ces tranches d'âge. En revanche, la faible incidence observée chez les nourrissons de moins d'un an pourrait s'expliquer par la protection fournie par les anticorps maternels et à un risque d'exposition plus faible. La rubéole reste en grande partie une maladie infantile dans le pays avec plus de 95% des cas IgM positifs chez les moins de 15 ans. Des résultats similaires ont été rapportés au Cameroun (97%) [163], en Éthiopie (94%) [162] et au Zimbabwe (98%) [161]. Après 15 ans la majorité de la population est immunisée mais les femmes en âge de procréer gardent un risque élevé de contracter une rubéole puisque celle-ci a été observée chez 15 sur 36 d'entre elles, quel que soit leur âge, entre 15 et 59 ans (13 avaient moins de 40 ans). Aussi, des cas de SRC sont-ils susceptibles de se produire et ont déjà été, de fait, décrits dans le pays. Une thèse de médecine [174], rapporte que sur 85 cas de malformations congénitales, 13 pouvaient être rattachés à un SRC.

Bien que les sérums positifs pour les IgM anti-rubéoleuses aient été conservés jusqu'à 9 ans à -80°C, 37 séquences ont été obtenues, à partir d'échantillons reçus au laboratoire et prélevés 3 jours après le début d'éruption cutanée. Notre taux de réussite de génotypage de 10,6%, supérieur aux 8% rapportés dans une étude ougandaise utilisant des sérums stockés jusqu'à 5 ans à -20°C [175], est presque identique aux 10,5% rapportés dans une étude rétrospective de 4 ans effectuée en Côte d'Ivoire comprenant uniquement des échantillons de la capitale [76]. Les raisons possibles de notre réussite sont une sélection rigoureuse des échantillons en fonction du temps après l'apparition de l'éruption cutanée et des conditions de réception et stockage au laboratoire, ainsi que l'utilisation d'un

protocole de PCR nichée sensible. Les échantillons nasaux, pharyngés et urinaires sont considérés comme adaptés aux investigations moléculaires selon l'OMS [88], mais, comme dans ce travail, des données de géotypage peuvent être obtenues à l'aide de sérums prélevés précocement pour la détection des anticorps IgM et même à partir de DBS [77].

L'analyse phylogénétique a identifié trois géotypes du RuV en RCA entre 2008 et 2016, 1G, 1E et 2B. L'enclavement du pays et les mouvements de population augmentent la probabilité d'introduction de virus par des étrangers [176;177]. Ainsi, les trois géotypes identifiés en RCA ont également été signalés dans d'autres pays africains, notamment les pays voisins, le Soudan, le Soudan du Sud [178], la République démocratique du Congo [75] et le Cameroun [179]. Certaines similitudes entre les séquences des souches de RCA, du Soudan (1E), du Cameroun (1G) et de la République démocratique du Congo (2B) pourraient s'expliquer par des mouvements transfrontaliers liés au commerce et à l'emploi [180]. Les similitudes avec les séquences des États-Unis et de la Côte d'Ivoire pourraient être, en partie, liées à la présence de militaires de ces pays auprès des Forces Armées Centrafricaines, notamment pour les périodes 2011-2017 pour les États-Unis [181] ainsi que 1998-2000 et 2014 à aujourd'hui pour la Côte d'Ivoire [182].

Les géotypes 1G et 1E étaient présents en RCA dès 2008, tandis que le géotype 2B, pourrait avoir été importées de la République démocratique du Congo (RDC), où il était présent en 2012 et devenu prédominant à partir de 2014 [77]. Cette hypothèse est renforcée par la proximité géotypique des 4 souches de RDC et celles de RCA (Figure 10) mais d'autres études sont nécessaires pour déterminer si un remplacement de géotype s'est produit, comme cela a été décrit en Chine [183]. Le peu d'informations sur et le nombre limité de géotypes trouvés dans les différentes RS ne permettent aucune conclusion en ce qui concerne les différences régionales de leur distribution en RCA. Néanmoins, nos données seront utiles pour suivre le succès du programme de vaccination contre la rubéole et de sa mise en œuvre et, éventuellement, confirmer l'interruption de la circulation de ce virus, endémique dans le pays.

## VII. Conclusion

La rubéole reste une infection endémique, avec des poussées épidémiques en RCA car, selon les critères de l'OMS, il n'y a pas eu, jusqu'à présent, d'introduction du vaccin anti-rubéoleux dans le pays. L'absence de protection d'une partie non négligeable des femmes en âge de procréer rend nécessaire la mise en place d'une vaccination systématique de la population jeune pour prévenir la survenue de SRC.

Cette étude a confirmé le rôle important de la rubéole en tant que fièvre éruptive en RCA. Les analyses effectuées sur les données épidémiologiques et moléculaires de la surveillance des infections rubéoleuses en RCA fournissent les premières données virologiques précises complètes sur l'épidémiologie de la rubéole dans le pays et soulignent qu'il est possible d'obtenir des données de génotype à partir d'échantillons sériques prélevés pour la détection d'anticorps, même dans des contextes très difficiles. Malgré leurs limites, les informations fournies par le séquençage serviront de données de référence et la poursuite des études moléculaire permettront de surveiller l'efficacité de la mise en place du contrôle de la rubéole censé être initié dans un avenir proche.

L'étude se poursuit actuellement chez les nouveau-nés répondant à la définition de cas de SRC, cliniquement confirmé selon les critères de l'OMS. Des prélèvements sont effectués chez eux à la recherche du RuV et les souches obtenues auront leur génotype déterminé. En effet, l'impact réel de la rubéole en cours de grossesse est actuellement inconnu dans le pays. Le but de cette étude est de déterminer la fréquence des SRC et de sensibiliser les autorités sanitaires pour qu'elles renforcent le programme d'élimination du RuV.

En attendant, les données déjà obtenues pourront servir d'outil de travail stratégique pour :

- L'élaboration d'un plaidoyer au niveau des partenaires (ministère de la Santé et de la population /OMS), montrant la nécessité de continuer ce travail par la mise en place d'une surveillance de la rubéole et du SRC dans le pays et,
- *In fine*, servir d'appui dans la prise de décision d'introduction du vaccin anti rubéoleux en RCA.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Lanzieri T, Redd S, Abernathy E, Icenogle J. Rubella. In Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases CDC, Centers for diseases control and prevention, Atlanta GA.2011:1-12. [Accessed 16.10.2022]. Available on line at: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/index.htm>
2. Winter AK, Moss WJ. Rubella. *The Lancet*. 2022;399(10332):1336-46.
3. Measles and Rubella Initiative. Measles and rubella strategicframework: 2021-2030. 2020. [Accessed 16.10.2022]. Available on line at: [https://www.immunizationagenda2030.org/images/documents/measles\\_rubella\\_initiative\\_Digital3.pdf](https://www.immunizationagenda2030.org/images/documents/measles_rubella_initiative_Digital3.pdf)
4. Bosma T, Best J, Corbett K, Banatvala J, Starkey W. Nucleotide sequence analysis of a major antigenic domain of the E1 glycoprotein of 22 rubella virus isolates. *Journal of General Virology*. 1996;77(10):2523-30.
5. Bennett AJ, Paskey AC, Ebinger A, Pfaff F, Priemer G, Höper D, et al. Relatives of rubella virus in diverse mammals. *Nature*. 2020;586(7829):424-8.
6. Lee J-Y, Bowden DS. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000;13(4):571-87.
7. Neva FA, Alford Jr CA, Weller TH. Emerging perspective of rubella. *Bacteriological Reviews*. 1964;28(4):444-51.
8. Gregg NM. Congenital cataract following German measles in the mother. *Problems of Birth Defects*. 1941:170-80.
9. Cooper LZ, Krugman S. Clinical manifestations of postnatal and congenital rubella. *Archives of Ophthalmology*. 1967;77(4):434-9.
10. Banatvala JE, Brown DW. Rubella. *Lancet*. 2004;363(9415):1127-37.
11. Banatvala J, Peckham C. Rubella viruses. 1<sup>st</sup> Edition: Elsevier Sciences, Amsterdam; 2006; 138 p.
12. Grimwood RM, Holmes EC, Geoghegan JL. A novel rubi-like virus in the Pacific electric ray (*Tetronarce californica*) reveals the complex evolutionary history of the Matonaviridae. *Viruses*. 2021;13(4):585.
13. Geoghegan JL, Di Giallonardo F, Wille M, Ortiz-Baez AS, Costa VA, Ghaly T, et al. Virome composition in marine fish revealed by meta-transcriptomics. *Virus Evolution*. 2021;7(1):veab005.
14. Lambert N, Strebel P, Orenstein W, Icenogle J, Poland GA. Rubella. *The Lancet*. 2015;385(9984):2297-307.
15. Chen R, Mukhopadhyay S, Merits A, Bolling B, Nasar F, Coffey LL, et al. ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. *Journal of General Virology*. 2018;99(6):761-2.
16. Dwyer DE, Robertson PW, Field PR, Board of Education of the Royal College of Pathologists of A. Broadsheet: Clinical and laboratory features of rubella. *Pathology*. 2001;33(3):322-8.
17. Potter JE, Banatvala J, Best JM. Interferon studies with Japanese and US rubella virus strains. *British Medical Journal*. 1973;1(5847):197-9.
18. Chen M-H, Icenogle JP. Rubella virus capsid protein modulates viral genome replication and virus infectivity. *Journal of Virology*. 2004;78(8):4314-22.
19. Hobman TC, Lemon HF, Jewell K. Characterization of an endoplasmic reticulum retention signal

- in the rubella virus E1 glycoprotein. *Journal of Virology*. 1997;71(10):7670-80.
20. Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *Journal of Virology*. 1968;2(10):955-61.
  21. Lee J-Y, Marshall J, Bowden D. Replication complexes associated with the morphogenesis of rubella virus. *Archives of Virology*. 1992;122(1):95-106.
  22. Mangala Prasad V, Klose T, Rossmann MG. Assembly, maturation and three-dimensional helical structure of the teratogenic rubella virus. *PLoS Pathogens*. 2017;13(6):e1006377.
  23. Risco C, Carrascosa JL, Frey TK. Structural maturation of rubella virus in the Golgi complex. *Virology*. 2003;312(2):261-9.
  24. Kujala P, Ahola T, Ehsani N, Auvinen P, Vihinen H, Kääriäinen L. Intracellular distribution of rubella virus nonstructural protein P150. *Journal of Virology*. 1999;73(9):7805-11.
  25. Matthews JD, Tzeng WP, Frey TK. Analysis of the function of cytoplasmic fibers formed by the rubella virus nonstructural replicase proteins. *Virology*. 2010;406(2):212-27.
  26. Sakata M, Katoh H, Otsuki N, Okamoto K, Nakatsu Y, Lim C-K, et al. Heat shock protein 90 ensures the integrity of rubella virus p150 protein and supports viral replication. *Journal of Virology*. 2019;93(22):e01142-19.
  27. Atreya CD, Lee NS, Forng R-Y, Hofmann J, Washington G, Marti G, et al. The rubella virus putative replicase interacts with the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Virus Genes*. 1998;16(2):177-83.
  28. Atreya C, Mohan K, Kulkarni S. Rubella virus and birth defects: molecular insights into the viral teratogenesis at the cellular level. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2004;70(7):431-7.
  29. Matthews JD, Tzeng W-P, Frey TK. Determinants in the maturation of rubella virus p200 replicase polyprotein precursor. *Journal of Virology*. 2012;86(12):6457-69.
  30. Law LJ, Ilkow CS, Tzeng W-P, Rawluk M, Stuart DT, Frey TK, et al. Analyses of phosphorylation events in the rubella virus capsid protein: role in early replication events. *Journal of Virology*. 2006;80(14):6917-25.
  31. Beatch MD, Hobman TC. Rubella virus capsid associates with host cell protein p32 and localizes to mitochondria. *Journal of Virology*. 2000;74(12):5569-76.
  32. Beatch MD, Everitt JC, Law LJ, Hobman TC. Interactions between rubella virus capsid and host protein p32 are important for virus replication. *Journal of Virology*. 2005;79(16):10807-20.
  33. Ilkow CS, Goping IS, Hobman TC. The Rubella virus capsid is an anti-apoptotic protein that attenuates the pore-forming ability of Bax. *PLoS Pathogens*. 2011;7(2):e1001291.
  34. Xu J, Kong J, Lyu B, Wang X, Qian Q, Zhou X, et al. The capsid protein of rubella virus antagonizes RNA interference in mammalian cells. *Viruses*. 2021;13(2):154.
  35. Sakata M, Otsuki N, Okamoto K, Anraku M, Nagai M, Takeda M, et al. Short self-interacting N-terminal region of rubella virus capsid protein is essential for cooperative actions of capsid and nonstructural p150 proteins. *Journal of Virology*. 2014;88(19):11187-98.
  36. Ilkow CS, Mancinelli V, Beatch MD, Hobman TC. Rubella virus capsid protein interacts with poly (a)-binding protein and inhibits translation. *Journal of Virology*. 2008;82(9):4284-94.
  37. Yao J, Gillam S. A single-amino-acid substitution of a tyrosine residue in the rubella virus E1 cytoplasmic domain blocks virus release. *Journal of Virology*. 2000;74(7):3029-36.

38. Green KY, Dorsett PH. Rubella virus antigens: localization of epitopes involved in hemagglutination and neutralization by using monoclonal antibodies. *Journal of Virology*. 1986;57(3):893-8.
39. Das PK, Kielian M. Molecular and structural insights into the life cycle of rubella virus. *Journal of Virology*. 2021;95(10):e02349-20.
40. Hobman TC, Woodward L, Farquhar MG. Targeting of a heterodimeric membrane protein complex to the Golgi: rubella virus E2 glycoprotein contains a transmembrane Golgi retention signal. *Molecular Biology of the Cell*. 1995;6(1):7-20.
41. Atreya CD, Singh NK, Nakhasi HL. The rubella virus RNA binding activity of human calreticulin is localized to the N-terminal domain. *Journal of virology*. 1995;69(6):3848-51.
42. Derdeyn CA, Frey TK. Characterization of defective-interfering RNAs of rubella virus generated during serial undiluted passage. *Virology*. 1995;206(1):216-26.
43. Bowden D, Pedersen J, Toh B, Westaway E. Distribution by immunofluorescence of viral products and actin-containing cytoskeletal filaments in rubella virus-infected cells. *Archives of Virology*. 1987;92(3):211-9.
44. Maassab HF, Veronelli J. Characteristics of serially propagated monkey kidney cell cultures with persistent rubella infection. *Journal of Bacteriology*. 1966;91(1):436-41.
45. Perelygina L, Icenogle J, Sullivan KE. Rubella virus-associated chronic inflammation in primary immunodeficiency diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2020;20(6):574.
46. Banatvala J, Potter JE, Best JM. Interferon response to Sendai and Rubella viruses in human foetal cultures, leucocytes and placental cultures. *Journal of General Virology*. 1971;13(2):193-201.
47. Adamo MP, Zapata M, Frey TK. Analysis of gene expression in fetal and adult cells infected with rubella virus. *Virology*. 2008;370(1):1-11.
48. Schilling E, Grahert A, Pfeiffer L, Koehl U, Claus C, Hauschildt S. the impact of rubella virus infection on a secondary inflammatory response in polarized human macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:772595.
49. Sakuragi S, Liao H, Yajima K, Fujiwara S, Nakamura H. Rubella virus triggers type I interferon antiviral response in cultured human neural cells: involvement in the control of viral gene expression and infectious progeny production. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(17):9799.
50. Pugachev KV, Frey TK. Rubella virus induces apoptosis in culture cells. *Virology*. 1998;250(2):359-70.
51. Frey TK. Molecular biology of rubella virus. *Advances in Virus Research*. 1994;44:69-160.
52. Duncan R, Muller J, Lee N, Esmaili A, Nakhasi HL. Rubella virus-induced apoptosis varies among cell lines and is modulated by bcl-xland caspase inhibitors. *Virology*. 1999;255(1):117-28.
53. Hofmann J, Pletz M, Liebert U. Rubella virus-induced cytopathic effect in vitro is caused by apoptosis. *Journal of General Virology*. 1999;80(7):1657-64.
54. Duncan R, Esmaili A, Law LMJ, Bertholet S, Hough C, Hobman TC, et al. Rubella virus capsid protein induces apoptosis in transfected RK13 cells. *Virology*. 2000;275(1):20-9.
55. Cooray S, Jin L, Best JM. The involvement of survival signaling pathways in rubella-virus induced apoptosis. *Virology Journal*. 2005;2(1):1-12.

56. Claus C, Manssen L, Hübner D, Roßmark S, Bothe V, Petzold A, et al. Activation of the mitochondrial apoptotic signaling platform during rubella virus infection. *Viruses*. 2015;7(12):6108-26.
57. Best JM, Banatvala J. Studies on rubella virus strain variation by kinetic haemagglutination-inhibition tests. *Journal of General Virology*. 1970;9(3):215-23.
58. Umino Y, Sato T, Katow S, Matsuno T, Sugiura A. Monoclonal antibodies directed to E1 glycoprotein of rubella virus. *Archives of virology*. 1985;83(1):33-42.
59. Ho-Terry L, Terry G, Cohen A, Londesborough P. Immunological characterisation of the rubella E 1 glycoprotein. *Archives of Virology*. 1986;90(1):145-52.
60. Gerna G, Revello MG, Dovis M, Petruzzelli E, Achilli G, Percivalle E, et al. Synergistic neutralization of rubella virus by monoclonal antibodies to viral haemagglutinin. *Journal of General Virology*. 1987;68(7):2007-12.
61. Chaye H, Chong P, Tripet B, Brush B, Gillam S. Localization of the virus neutralizing and hemagglutinin epitopes of E1 glycoprotein of rubella virus. *Virology*. 1992;189(2):483-92.
62. Mitchell LA, Zhang T, Ho M, Decarie D, Tingle A, Zrein M, et al. Characterization of rubella virus-specific antibody responses by using a new synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30(7):1841-7.
63. Londesborough P, Ho-Terry L, Terry G. Sequence variation and biological activity of rubella virus isolates. *Archives of Virology*. 1995;140(3):563-70.
64. Dominguez G, Wang C-Y, Frey TK. Sequence of the genome RNA of rubella virus: evidence for genetic rearrangement during togavirus evolution. *Virology*. 1990;177(1):225-38.
65. Nakhasi HL, Thomas D, Zheng D, Liu T-Y. Nucleotide sequence of capsid, E2 and E1 protein genes of Rubella virus vaccine strain RA27/3. *Nucleic Acids Research*. 1989;17(11):4393.
66. Pugachev K, Abernathy E, Frey T. Genomic sequence of the RA27/3 vaccine strain of rubella virus. *Archives of Virology*. 1997;142(6):1165-80.
67. Katow S, Minahara H, Ota T, Fukushima M. Identification of strain-specific nucleotide sequences in E1 and NS4 genes of rubella virus vaccine strains in Japan. *Vaccine*. 1997;15(14):1579-85.
68. Frey TK, Abernathy ES, Bosma TJ, Starkey WG, Corbett KM, Best JM, et al. Molecular analysis of rubella virus epidemiology across three continents, North America, Europe, and Asia, 1961–1997. *Journal of Infectious Diseases*. 1998;178(3):642-50.
69. Zheng D-P, Frey TK, Icenogle J, Katow S, Abernathy ES, Song K-J, et al. Global distribution of rubella virus genotypes. *Emerging Infectious Diseases*. 2003;9(12):1523.
70. WHO. World Health Organization. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wildtype rubella viruses. 2005. *Weekly Epidemiological Record*. 2005;80(14):126-32. [Accessed 16.04.2022]. Available On line at: <https://www.who.int/publications/i/item/WER8014>
71. Rivaille P, Abernathy E, Icenogle J. Genetic diversity of currently circulating rubella viruses: a need to define more precise viral groups. *The Journal of General Virology*. 2017;98(3):396.
72. World Health Organization, Santé Omdl. The role of extended and whole genome sequencing for tracking transmission of measles and rubella viruses: report from the Global Measles and Rubella Laboratory Network meeting, 2017. *Weekly Epidemiological Record*. 2018;93(6):55-9.
73. Caidi H, Abernathy ES, Benjouad A, Smit S, Bwogi J, Nanyunja M, et al. Phylogenetic analysis of rubella viruses found in Morocco, Uganda, Cote d'Ivoire and South Africa from 2001 to 2007.

Journal of Clinical Virology. 2008;42(1):86-90.

74. Namuwulya P, Abernathy E, Bukenya H, Bwogi J, Tushabe P, Birungi M, et al. Phylogenetic analysis of rubella viruses identified in Uganda, 2003–2012. *Journal of Medical Virology*. 2014;86(12):2107-13.
75. Pukuta E, Waku-Kouomou D, Abernathy E, Illunga BK, Obama R, Mondonge V, et al. Genotypes of rubella virus and the epidemiology of rubella infections in the Democratic Republic of the Congo, 2004–2013. *Journal of Medical Virology*. 2016;88(10):1677-84.
76. Kadjo HA, Waku-Kouomou D, Adagba M, Abernathy ES, Abdoulaye O, Adjogoua E, et al. Epidemiology of rubella infection and genotyping of rubella virus in Cote d'Ivoire, 2012-2016. *Journal of Medical Virology*. 2018;90(11):1687-94.
77. Bankamp B, Sein C, Pukuta Simbu E, Anderson R, Abernathy E, Chen M-H, et al. Use of FTA cards to transport throat swabs and oral fluid samples for molecular detection and genotyping of measles and rubella viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019;57(5):e00048-19.
78. Pagonendji MS, Gouandjika-Vasilache I, Charpentier E, Sausy A, Alain L, Duval RE, et al. Rubella epidemiology in the Central African Republic, 2015-2016 and molecular characterization of virus strains from 2008-2016. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021;111:303-9.
79. Mori Y, Miyoshi M, Kikuchi M, Sekine M, Umezawa M, Saikusa M, et al. Molecular epidemiology of rubella virus strains detected around the time of the 2012–2013 epidemic in Japan. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1513.
80. Van Le S, Le DH, Hoang HT, Hoang H, Nguyen NT, Chu HH. Characterization of rubella virus genotypes among pregnant women in northern Vietnam, 2011–2013. *Journal of Medical Virology*. 2015;87(2):338-43.
81. Cheng WY, Wang HC, Liu MT, Wu HS. Molecular surveillance of rubella viruses in Taiwan from 2005 to 2011. *Journal of Medical Virology*. 2013;85(4):745-53.
82. Chen M, Zhu Z, Liu D, Huang G, Huang F, Wu J, et al. Rubella epidemic caused by genotype 1E rubella viruses in Beijing, China, in 2007–2011. *Virology Journal*. 2013;10(1):1-10.
83. Vaidya SR, Kasibhatla SM, Kamble MB, Munivenkatappa A, Kumbhar NS, Jayaswamy MM, et al. Genetic and antigenic characterization of wild type rubella viruses isolated from India. *Vaccine*. 2021;39(6):876-81.
84. Curti SP, Figueiredo CA, de Oliveira MI, Andrade JQ, Zugaib M, Frugis Yu AL, et al. Molecular epidemiology of rubella viruses involved in congenital rubella infections in São Paulo, Brazil, between 1996 and 2009. *Journal of Medical Virology*. 2013;85(11):2034-41.
85. Pierlanfranco d'Agaro, Dal Molin G, Zamparo E, Rossi T, Micuzzo M, Busetti M, et al. Epidemiological and molecular assessment of a rubella outbreak in North-Eastern Italy. *Journal of Medical Virology*. 2010;82(11):1976-82.
86. Vauloup-Fellous C, Hübschen JM, Abernathy ES, Icenogle J, Gaidot N, Dubreuil P, et al. Phylogenetic analysis of rubella viruses involved in congenital rubella infections in France between 1995 and 2009. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(7):2530-5.
87. Lazar M, Abernathy E, Chen M-h, Icenogle J, Janta D, Stanescu A, et al. Epidemiological and molecular investigation of a rubella outbreak, Romania, 2011 to 2012. *Eurosurveillance*. 2016;21(38):30345.
88. WHO. World health organization. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 3rd edition. Chapter 1, Measles and rubella: An overview, Part B: Rubella WHO (Genève): 2018. [Accessed 06.09.2022]. Available online at:

<https://www.cdc.gov/measles/lab-tools/who-lab-manual.html>

89. Bouthry E, Picone O, Hamdi G, Grangeot-Keros L, Ayoubi JM, Vauloup-Fellous C. Rubella and pregnancy: diagnosis, management and outcomes. *Prenatal Diagnosis*. 2014;34(13):1246-53.
90. Bouthry E., Vauloup-Fellous C. Rubéole. *EMC Maladies Infectieuses* 2021;38:1-11 [Article 8-050-H-10]
91. Dudgeon J. Teratogenic Effect of Rubella Virus. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1970;63(12):1254–1257..
92. Atreya C, Kulkarni S, Mohan K. Rubella virus P90 associates with the cytokinesis regulatory protein Citron-K kinase and the viral infection and constitutive expression of P90 protein both induce cell cycle arrest following S phase in cell culture. *Archives of Virology*. 2004;149(4):779-89.
93. Perelygina L, Zheng Q, Metcalfe M, Icenogle J. Persistent infection of human fetal endothelial cells with rubella virus. *PLoS One*. 2013;8(8):e73014.
94. Webster WS. Teratogen update: congenital rubella. *Teratology*. 1998;58(1):13-23.
95. Namiki T, Takano C, Aoki R, Trinh QD, Morioka I, Hayakawa S. Parenchymal calcification is associated with the neurological prognosis in patients with congenital rubella syndrome. *Congenital Anomalies*. 2022;62(1):38-41.
96. Miller E. Rubella reinfection. *Archives of disease in childhood*. 1990;65(8):820.
97. Robinson K, Mostratos A, Grecis RK. Generation of rubella virus-neutralising antibodies by vaccination with synthetic peptides. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 1995;10(3-4):191-8.
98. Leonor MC, Mendez MD. Rubella. *StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2022*.
99. Ezike E. Pediatric Rubella. *Medscape e-medicine*. Updated: Feb 09, 2017 [Accessed 19.20.2021]. Available on line at: <https://emedicine.medscape.com/article/968523-overview>
100. OMS. Organisation mondiale de la Santé 2015. Introduction du vaccin antirubéoleux dans les programmes de vaccination nationaux : guide pas-à-pas. Report No.: 9242549371. [accessed on 12.07.2022]. Accessible on line at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204124>
101. Leung AK, Hon K, Leong K. Rubella (German measles) revisited. *Hong Kong Medical Journal*. 2019;25(2):134.
102. Belanger BG, Lui F. Embryology, teratology TORCH. *StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2021*.
103. Mao Y, Lin S, Zhu C, Liu X, Wu H, Ou S. Cytokine changes in the aqueous humor in rubella-related Fuchs heterochromic iridocyclitis. *Disease Markers*. 2022;2022:8906752.
104. Quentin CD, Reiber H. Fuchs heterochromic cyclitis: rubella virus antibodies and genome in aqueous humor. *American Journal of Ophthalmology*. 2004;138(1):46-54.
105. Wang H, Tao Y. Relationship between the higher inflammatory cytokines level in the aqueous humor of Fuchs uveitis syndrome and the presence of cataract. *BMC Ophthalmology*. 2021;21(1):1-9.
106. Medscape. Pediatric Rubella Clinical Presentation. Updated Apr 18 2022. [Accessed on 05.08.2022]. Available on line at: <https://emedicine.medscape.com/article/968523-clinical#b5>
107. Duszak RS. Congenital rubella syndrome—major review. *Optometry-Journal of the American Optometric Association*. 2009;80(1):36-43.

108. Wang T, Li Q, Chen L, Ni B, Sheng X, Huang P, et al. Maternal viral infection in early pregnancy and risk of congenital heart disease in offspring: a prospective cohort study in Central China. *Clinical Epidemiology*. 2022;14:71.
109. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. manual for birth defects surveillance. Chapitre 5. Congenital infectious syndromes. 5.1 Congenital rubella syndrome (CRS). 2020. [Accessed: 16.04.2022]. Available on line at: <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/surveillancemanual/ind.html>
110. Mawson AR, Croft AM. Rubella virus infection, the congenital rubella syndrome, and the link to autism. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019;16(19):3543.
111. Gordon-Lipkin E, Hoon A, Pardo CA. Prenatal cytomegalovirus, rubella, and Zika virus infections associated with developmental disabilities: past, present, and future. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2021;63(2):135-43.
112. Hübschen J, Bork S, Brown K, Mankertz A, Santibanez S, Mamou MB, et al. Challenges of measles and rubella laboratory diagnostic in the era of elimination. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23(8):511-5.
113. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Rubella (German Measles, Three-Day Measles). Congenital Rubella Syndrome (CRS) and birth defects. 2020. [Accessed 16.04.2022]. Available on line at: <https://www.cdc.gov/rubella/>
114. Plotkin, A S, Farquhar J, Katz M, Ingalls Th. A new attenuated rubella virus grown in human fibroblasts: Evidence for reduced nasopharyngeal excretion. *American Journal of Epidemiology*. 1967;86(2):468-77.
115. Izadi S, Zahraei SM, Mokhtari-Azad T. Seroprevalence of antibodies to measles and rubella eight months after a vaccination campaign in the southeast of Iran. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2018;14(6):1412-6.
116. Ong SWX, Vasoo S, Sadarangani SP, Cui L, Marimuthu K, Lim PL, et al. Vaccine-associated Rubella—a report of two cases and a review of the literature. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2021;17(1):224-7.
117. Seppälä EM, López-Perea N, de Mier MdVT, Echevarría JE, Fernández-García A, Masa-Calles J. Last cases of rubella and congenital rubella syndrome in Spain, 1997–2016: the success of a vaccination program. *Vaccine*. 2019;37(1):169-75.
118. ECDC. European Center for Disease Prevention and Control, Updated 2022 08. Surveillance atlas of infectious disease, *Rubella*. [Accessed on 10.02.2022]. Available on line at: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=45>
119. Gamage D, Galagoda G, Palihawadana P. Impact of rubella vaccination on elimination of congenital rubella syndrome in Sri Lanka: progress and challenges. *WHO South-East Asia Journal of Public Health*. 2015;4(2):189-96.
120. Jasmine A. Coverage survey of Measles-Rubella mass vaccination campaign in a rural area in Tamil Nadu. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 2019;8(6):1884.

121. WHO. World health organization. Immunization coverage. News Room 2022 [Accessed on 17.06.2022]. Available on line at:  
<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>.
122. Goodson JL, Masresha B, Dosseh A, Byabamazima C, Nshimirimana D, Cochi S, et al. Rubella epidemiology in Africa in the prevaccine era, 2002–2009. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011;204(suppl\_1):S215-S25.
123. WHO. World health organization. Rubella vaccination coverage.[Accessed: 16.10 2022]. Available on line from:  
<https://immunizationdata.who.int/pages/coverage/rcv.html?CODE=AFR&YEAR=>
124. Zimmerman LA, Knapp JK, Antoni S, Grant GB, Reef SE. Progress toward rubella and congenital rubella syndrome control and elimination—Worldwide, 2012–2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2022;71(6):196.
125. Clarke M, Schild G, Boustred J, McGregor I, Williams K. Epidemiological studies of rubella virus in a tropical African community. *Bulletin of the World Health Organization*. 1980;58(6):931.
126. Kebede S, Nokes DJ, Cutts FT, Nigatu W, Sanderson F, Beyene H. Maternal rubella-specific antibody prevalence in Ethiopian infants. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000;94(3):333-40.
127. Cutts F, Abebe A, Messele T, Dejene A, Enquesselassie F, Nigatu W, et al. Sero-epidemiology of rubella in the urban population of Addis Ababa, Ethiopia. *Epidemiology & Infection*. 2000;124(3):467-79.
128. Manirakiza A, Kipela JM, Sosler S, Daba RMB, Gouandjika-Vasilache I. Seroprevalence of measles and natural rubella antibodies among children in Bangui, Central African Republic. *BMC Public Health*. 2011;11(1):1-7.
129. Fokunang C, Chia J, Ndumbe P, Mbu P, Atashili J. Clinical studies on seroprevalence of rubella virus in pregnant women of Cameroon regions. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 2010;11(2).
130. Amina M-D, Oladapo S, Habib S, Adebola O, Bimbo K, Daniel A. Prevalence of rubella IgG antibodies among pregnant women in Zaria, Nigeria. *International Health*. 2010;2(2):156-9.
131. Linguissi LSG, Nagalo BM, Bisseye C, Kagoné TS, Sanou M, Tao I, et al. Seroprevalence of toxoplasmosis and rubella in pregnant women attending antenatal private clinic at Ouagadougou, Burkina Faso. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012;5(10):810-3.
132. Obijimi O, Ajetomobi A, Sule W, Oluwayelu D. Prevalence of rubella virus-specific immunoglobulin-g and-m in pregnant women attending two tertiary hospitals in southwestern Nigeria. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 2013;14(3):134-9.
133. Adewumi M, Olusanya R, Oladunjoye B, Adeniji J. Rubella IgG antibody among Nigerian pregnant women without vaccination history. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 2013;14(1):40-4.
134. Tahita MC, Hübschen JM, Tarnagda Z, Ernest D, Charpentier E, Kremer JR, et al. Rubella seroprevalence among pregnant women in Burkina Faso. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13(1):1-3.
135. Oyinloye S, Amama C, Daniel R, Ajayi B, Lawan M. Seroprevalence survey of rubella antibodies among pregnant women in Maiduguri, Borno State, Nigeria. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 2014;15(3):151-7.

136. Mwambe B, Mirambo MM, Mshana SE, Massinde AN, Kidenya BR, Michael D, et al. Seropositivity rate of rubella and associated factors among pregnant women attending antenatal care in Mwanza, Tanzania. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2014;14(1):1-5.
137. De Paschale M, Ceriani C, Cerulli T, Cagnin D, Cavallari S, Cianflone A, et al. Antenatal screening for *Toxoplasma gondii*, Cytomegalovirus, rubella and *Treponema pallidum* infections in northern Benin. *Tropical Medicine & International Health*. 2014;19(6):743-6.
138. Adewumi OM, Olayinka OA, Olusola BA, Faleye TO, Sule WF, Adesina O. Epidemiological evaluation of rubella virus infection among pregnant women in Ibadan, Nigeria. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2015;36(6):613-21.
139. Kwofie TB, Ayensu F, Mutocheluh M, Narkwa P, Nguah SB, Turpin CA, et al. Seroprevalence of Rubella Virus, Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus 2 among pregnant women at the Komfo Anokye Teaching Hospital, Ghana. *Journal of Public Health in Developing Countries*. 2015;1(2):56-63.
140. Jonas A, Cardemil CV, Beukes A, Anderson R, Rota PA, Bankamp B, et al. Rubella immunity among pregnant women aged 15–44 years, Namibia, 2010. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;49:196-201.
141. Alleman MM, Wannemuehler KA, Hao L, Perelygina L, Icenogle JP, Vynnycky E, et al. Estimating the burden of rubella virus infection and congenital rubella syndrome through a rubella immunity assessment among pregnant women in the Democratic Republic of the Congo: Potential impact on vaccination policy. *Vaccine*. 2016;34(51):6502-11.
142. Tamirat B, Hussen S, Shimelis T. Rubella virus infection and associated factors among pregnant women attending the antenatal care clinics of public hospitals in Hawassa City, Southern Ethiopia: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2017;7(10):e016824.
143. Zanga J, Mbanzulu MK, Kabasele A-F, Ngatu NR, Wumba DR. Rubella Seroprevalence and real-time PCR detection of RUBV among Congolese pregnant women. *BMC Infectious Diseases*. 2017;17(1):1-7.
144. Völker F, Cooper P, Bader O, Uy A, Zimmermann O, Lugert R, et al. Prevalence of pregnancy-relevant infections in a rural setting of Ghana. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2017;17(1):1-7.
145. Wondimeneh Y, Tiruneh M, Ferede G, Abera B, Workineh M, Birhanie M, et al. Rubella virus infections and immune status among pregnant women before the introduction of rubella vaccine in Amhara Regional State, Ethiopia. *International Journal of Infectious Diseases*. 2018;76:14-22.
146. Nisbet AI, Omuse G, Revathi G, Adam RD. Seroprevalence data at a private teaching hospital in Kenya: an examination of *Toxoplasma gondii*, cytomegalovirus, rubella, hepatitis A, and *Entamoeba histolytica*. *PloS One*. 2018;13(10):e0204867.
147. Mirambo MM, Aboud S, Majigo M, Groß U, Mshana SE. Adverse pregnancy outcomes among pregnant women with acute rubella infections in Mwanza City, Tanzania. *International Journal of Infectious Diseases*. 2019;78:72-7.
148. Gubio AB, Mamman AI, Abdul M, Olayinka AT. The risk factors of exposure to rubella among pregnant women in Zaria 2013. *The Pan African Medical Journal*. 2019;32(Suppl 1).
149. Taku NA, Ndze VN, Abernathy E, Hao L, Waku-Kouomou D, Icenogle JP, et al. Seroprevalence of rubella virus antibodies among pregnant women in the Center and South-West regions of Cameroon. *PLoS One*. 2019;14(11):e0225594.
150. Gieles NC, Mutsaerts EA, Kwatra G, Bont L, Cutland CL, Jones S, et al. Rubella seroprevalence in pregnant women living with and without HIV in Soweto, South Africa. *International Journal of*

Infectious Diseases. 2020;91:255-60.

151. Vueba A, Faria C, Almendra R, Santana P, Sousa MdC. Seroepidemiology study of Cytomegalovirus and Rubella in pregnant women in Luanda, Angola: geospatial distribution and its association with socio-demographic and clinical-obstetric determinants. *BMC Infectious Diseases*. 2022;22(1):1-10.
152. Chotta NA, Mgongo M, Uriyo JG, Msuya SE, Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen A. Rubella seroprevalence among children in Kilimanjaro region: a community based study prior to the introduction of rubella vaccine in Tanzania. *Italian Journal of Pediatrics*. 2017;43(1):1-7.
153. Alfonso VH, Doshi RH, Mukadi P, Higgins SG, Hoff NA, Bwaka A, et al. Prevalence of rubella antibodies among children in the Democratic Republic of the Congo. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2018;37(1):28-34.
154. Mirambo MM, Majigo M, Scana SD, Mushi MF, Aboud S, Groß U, et al. Rubella natural immunity among adolescent girls in Tanzania: the need to vaccinate child bearing aged women. *BMC Women's Health*. 2018;18(1):1-6.
155. Pegha Moukandja I, Ngoungou EB, Lemamy GJ, Bisvigou U, Gessain A, Toure Ndouo FS, et al. Non-malarial infectious diseases of antenatal care in pregnant women in Franceville, Gabon. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2017;17(1):1-10.
156. Farra A, Pagonendji M, Manikariza A, Rawago D, Ouambita-Mabo R, Guifara G, et al. Epidemiology of primary rubella infection in the Central African Republic: data from measles surveillance, 2007–2014. *BMC Infectious Diseases*. 2016;16(1):1-6.
157. Farra A. Etude des malformations congénitales observées à Bangui : A propos de 85 cas. . 28/03. Thèse de Doctorat en Médecine, Faculté des sciences de la Santé, Université de Bangui 2003:123.
158. OMS. Organisation mondiale de la santé Rubéole : Normes de surveillance des maladies évitables par la vaccination. Mise à jour 15.10.2018. p32. [Accessed on 18.10.2022]. Available on line at: <https://www.who.int/fr/publications/m/item/vaccine-preventable-diseases-surveillance-standards-rubella>.
159. Zhu Z, Xu W, Abernathy ES, Chen M-H, Zheng Q, Wang T, et al. Comparison of four methods using throat swabs to confirm rubella virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45(9):2847-52.
160. OMS. Organisation Mondiale de la Santé. Guide technique pour la surveillance intégrée de la maladie et la riposte dans la région africaine de l’OMS. Volume 2 – Sections 1, 2 et 3. Troisième édition. Brazzaville; 2015. Bureau régional de l’Afrique. Section 1 : Détecter et enregistrer les cas de maladies, d’affection et d’événements prioritaires, p39, [Accessed on 10.09.2022]. Available on line at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331387>
161. Chimhuya S, Manangazira P, Mukaratirwa A, Nziramasanga P, Berejena C, Shonhai A, et al. Trends of rubella incidence during a 5-year period of case based surveillance in Zimbabwe. *BMC Public Health*. 2015;15(1):1-8.
162. Getahun M, Beyene B, Gallagher K, Ademe A, Teshome B, Tefera M et al. Epidemiology of rubella virus cases in the pre-vaccination era of Ethiopia, 2009-2015. 2016.
163. Mengouo MN, Ndze VN, Baonga F, Kobela M, Wiysonge CS. Epidemiology of rubella infection in Cameroon: a 7-year experience of measles and rubella case-based surveillance, 2008– 2014. *BMJ open*. 2017;7(4):e012959.
164. Omoleke SA, Udenenwu HC. Incidence of rubella in a state in North-western Nigeria: a call for action. *The Pan African Medical Journal*. 2016;25.

165. Woyessa AB, Ali MS, Korkpor TK, Tuopileyi R, Kohar HT, Dogba J, et al. Rubella transmission and the risk of congenital rubella syndrome in Liberia: a need to introduce rubella- containing vaccine in the routine immunization program. *BMC infectious diseases*. 2019;19(1):1-8.
166. Zhang X, Ma S-l, Liu Z-d, He J. Correlation analysis of rubella incidence and meteorological variables based on Chinese medicine theory of Yunqi. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2019;25(12):911-6.
167. UNHCR. UN High Commissioner for Refugees. Analyse du nombre d' IDPs dans les sites de Bangui (07/09/15). [Accessed on 09. 08.2022]. Available on line at: <https://www.refworld.org/docid/560101994.html>
168. Shetty AK. Infectious diseases among refugee children. *Children*. 2019;6(12):129.
169. Hassanain SA, Edwards JK, Venables E, Ali E, Adam K, Hussien H, et al. Conflict and tuberculosis in Sudan: a 10-year review of the National Tuberculosis Programme, 2004-2014. *Conflict and Health*. 2018;12(1):1-9.
170. Ndombo P, Ndze V, Mbarga F, Anderson R, Acho A, Chia JE, et al. Molecular characterisation of measles virus strains among refugees from Central African Republic in Cameroon in 2014. *Epidemiology & Infection*. 2018;146(3):319-23.
171. Roberts L. Nigeria's invisible crisis. *Science*. 2017;356(6333):18-23
172. Roggen I, van Berlaer G, Gijs G, Hubloue I. Clinical characteristics of the inhabitants of an internally displaced persons camp in Brazzaville, Republic of Congo after the arms dump blast on March 4, 2012. *Prehospital and Disaster Medicine*. 2014;29(5):516-20.
173. van Berlaer G, Carbonell FB, Manantsoa S, de Béthune X, Buyl R, Debacker M, et al. A refugee camp in the centre of Europe: clinical characteristics of asylum seekers arriving in Brussels. *British Medical Journal Open*. 2016;6(11):e013963.
174. Farra A. Etude des malformations congénitales observées à Bangui : à propos de 85 cas. [thèse de doctorat en médecine]. Bangui : Université de Bangui ; 2003. Non publiée. P 123. 2003.
175. Tushabe P, Bwogi J, Abernathy E, Birungi M, Eliku JP, Seguya R, et al. Descriptive epidemiology of rubella disease and associated virus strains in Uganda. *Journal of Medical Virology*. 2020;92(3):279-87.
176. Durowade KA, Musa OI, Osagbemi GK. Rubella transmissibility and reproduction number (Ro): A critical appraisal of the prospects for its control in Nigeria. *Nigerian Postgraduate Medical Journal*. 2020;27(3):156.
177. Yoshikura H. Impact of population size on incidence of rubella and measles in comparison with that of other infectious diseases. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2014;67(6):447-57.
178. Adam O, El Hussein A, El Eragi A, Jin L. Primary investigation of 31 infants with suspected congenital rubella syndrome in Sudan. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(6):678-82.
179. Obam Mekanda FM, Monamele CG, Simo Nemg FB, Sado Yousseu FB, Ndjonka D, Kfutwah AKW, et al. First report of the genomic characterization of rubella viruses circulating in Cameroon. *Journal of Medical Virology*. 2019;91(6):928-34.
180. IPIS. International Peace Information Service. 2018. République centrafricaine. Cartographie du conflit. [On line] . Anvers : IPIS . 2018:1-120. Chapitre III Stratégie de prédation des groupes armés le long des routes de transit, p49. [Accessed on 25.09.2022]. Available on line at: [https://ipisresearch.be/wp-content/uploads/2018/09/1902-CAR-conflict-mapping\\_french.pdf](https://ipisresearch.be/wp-content/uploads/2018/09/1902-CAR-conflict-mapping_french.pdf)
181. AFP. Agence France Presse. 2017 *Fin de la traque contre Kony pour les forces spéciales*

*américaines en Centrafrique*. [Accessed on 17.10.2022]. Available on line at:  
<https://www.voafrique.com/a/centrafrique-fin-de-la-traque-contre-kony-pour-les-forces-speciales-americaines/3824412.html>

182. MINUSCA. Mission multidimensionnelle intégrée des Nations Unies pour la stabilisation en Centrafrique 2015. *Mission multidimensionnelle intégrée des Nations Unies pour la stabilisation en Centrafrique. 28 Casques bleus du contingent ivoirien de la MINUSCA reçoivent la médaille de l'ONU 2015*. [Accessed on 18.10.2022]. Available on line at:  
<https://minusca.unmissions.org/28-casques-bleus-du-contingent-ivoirien-de-la-minusca-re%C3%A7oivent-la-m%C3%A9daille-de-l%E2%80%99onu>
183. Bozick BA, Worby CJ, Metcalf CJE. Phylogeography of rubella virus in Asia: Vaccination and demography shape synchronous outbreaks. *Epidemics*. 2019;28:100346.

# **ANNEXES**

# ANNEXE 1 : Formulaire de notification des cas de rubéole et les instructions pour le remplir

Ministère de la Santé et de la  
population Publique et fixant les  
attributions du ministre



OMS

Institut Pasteur de Bangui

**FORMULAIRE DE NOTIFICATION DES CAS DE ROUGEOLE  
NOTIFICATION OBLIGATOIRE**  
Prière de remplir toutes les cases

Utilisation officielle seulement	NO. EPID	Pays	Région	Préfecture	Année	N° cas	Reçu le
----------------------------------	----------	------	--------	------------	-------	--------	---------

**IDENTIFICATION**

District de Santé : \_\_\_\_\_ Province : \_\_\_\_\_ Nom de la Formation Sanitaire la plus proche \_\_\_\_\_

Village/Quartier \_\_\_\_\_ Ville : \_\_\_\_\_  Urbaine / Rurale  
1 = Urbaine  
2 = Rurale

Nom du patient : \_\_\_\_\_ Nom du Père / Mère \_\_\_\_\_

Adresse du patient \_\_\_\_\_

Date de naissance du patient : \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Age : \_\_\_\_\_ Sexe  M / F

**NOTIFICATION**

Date cas vu à la formation Sanitaire \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Date de notification au District \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Hospitalisation  1=Oui ; 2= Non

**HISTORIQUE DE LA MALADIE**

Date de début de l'éruption (rash) \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Evolution du malade  Nbre de dose valide du vaccin Anti-rougeoleux  Date de la dernière vaccination Anti-rougeoleuse \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

1 = Oui, décédé  
2 = Non, vivant  
9 = Inconnu

**ECHANTILLON DE SANG (PLASMA)**

Date de prélèvement \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Date d'expédition du prélèvement Vers le labo \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Date de réception au labo \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Date de réception des résultats au PEV \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

CPC Résultats au PEV

Résultats de IgM Indirect de Rougeole  1 = Positif  
2 = Négatif  
3 = Indéterminé

Résultat de IgM Rubéole  1 = Positif  
2 = Négatif  
3 = Indéterminé

Autres résultats \_\_\_\_\_

**CLASSIFICATION FINALE DU CAS**

- 1 = Cas confirmé par labo ou lien épidémiologique avec un autre cas confirmé
- 2 = Clinique (compatible/suspect). Test de labo non réalisés
- 3 = Exclu

Date d'expédition des résultats du labo  
Au clinicien/district qui a envoyé le sang \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**INVESTIGATION DANS LA COMMUNAUTE**

Source de l'infection identifiée :  1 = Oui  
2 = Non

Si le test de confirmation IgM de rougeole positif Investigation communautaire faite ?  1 = Oui  
2 = Non

Si oui, décrire le résultat de l'investigation : \_\_\_\_\_

---

**INFORMATION SUR LA PERSONNE QUI A NOTIFIE**

Nom \_\_\_\_\_ Titre \_\_\_\_\_

Unité : \_\_\_\_\_ Adresse \_\_\_\_\_ Tél : \_\_\_\_\_

## **INSTRUCTIONS POUR REMPLIR LE FORMULAIRE ROUGEOLE**

Ces instructions sont données pour aider l'infirmier, le médecin ou le responsable du laboratoire au remplissage.

**N° EPID** : le remplissage est réservé au Responsable du Centre Pasteur de Yaoundé

**IDENTIFICATION** : remplissage fait par l'enquêteur

- Préfecture : marquer le nom de la préfecture sanitaire dans laquelle réside le cas de Rougeole
- Région : marquer le nom de la région administrative
- Nom de la formation sanitaire : marquer le nom de la formation sanitaire la plus proche du lieu de résidence du malade
- Nom du village/quartier : lieu de résidence du malade
- Nom de la ville : nom de la ville où réside le malade. Marquer dans le carré 1, si le cas provient de la zone urbaine, 2 si le cas provient de la zone rurale
- Nom et prénom du patient :
- Nom du Père/Mère : Nom du parent dont on a marqué l'adresse
- Adresse du malade : adresse du malade ou celle des parents permettant de le joindre dans la communauté (B.P., Téléphone, ou autres moyens)
- Date de naissance : Jour, mois, année.
- Age : nombre années / nombre de mois
- Sexe : marquer dans le carré M, si masculin, F si féminin

### **NOTIFICATION**

- Date cas vu à la formation sanitaire : date à laquelle le cas a été vu à la formation sanitaire (jour, mois, année)
- Date de notification au district : date à laquelle le personnel de santé en charge du cas a notifié au service de santé de district.

### **HISTORIQUE DE LA MALADIE**

- Date de début de l'éruption : à remplir par le personnel de santé : jour, mois, année.
- Evolution du malade : 1 s'il est décédé, 2 s'il est vivant, 9 inconnus. Marquer dans la case le numéro correspondant.
- Nombre de doses valide du vaccin anti rougeoleux : consulter le carnet de santé au parent
- Date de la vaccination anti rougeoleux : marquer la date de la dernière vaccination anti rougeoleux

### **ECHANTILLON DE SANG (PLASMA)**

- Date de prélèvement : jour, mois, année. (à remplir par le personnel de santé de la Formation Sanitaire)
- Date d'expédition par le personnel vers le Centre Pasteur de Garoua ou de Yaoundé (jour, mois, année)
- Date de réception au labo : date de réception par le Centre Pasteur de Yaoundé (jour, mois, année)
- Date de réception des résultats au PEV. A remplir par le PEV (jour, mois, année)
- Résultats de IgM Rougeole : inscrire le chiffre correspondant dans le carré.
- Résultats de IgM Rubéole : inscrire le chiffre correspondant dans le carré
- Autres résultats : autres résultats du labo
- Date d'expédition des résultats : date d'expédition par le PEV au clinicien qui a envoyé le sang (jour, mois, année)

### **CLASSIFICATION FINALE DU CAS**

- Marquer le n° qui correspond.
- Compatible/suspect : cas probable/cas suspect

### **INVESTIGATION DANS LA COMMUNAUTE**

- A remplir par le personnel de santé de l'endroit où l'infection a été constatée. Marquer le n° correspondant à la réponse dans le cadre.

### **LA PERSONNE QUI A NOTIFIE**

- Nom du personnel de santé qui a notifié le cas

**ANNEXE 2A : Modèles de feuille de rendu de résultat rougeole**

**RESULTATS DE LA SEROLOGIE IgM ROUGEOLE**  
(Technique E.L.I.S.A. :Enzignost ; Siemens, Marburg, Allemagne) et  
**TENTATIVE D'ISOLEMENT DU VIRUS ROUGEOLEUX**



<b>Numéro EPID :</b>	_____	_____	_____	_____	_____
	Pays	Région/Prov	District	Année début	N° du cas
<b>Nom et prénom du malade :</b>	_____				

<b>Prélèvement du sang</b>	<b>Prélèvement des urines</b>
<b>N° Laboratoire :</b>	<b>N° Laboratoire :</b> _____
<b>Prélèvement :</b>	<b>Prélèvement</b> <input type="checkbox"/>
1 adéquat 2 Non adéquat	1 adéquat 2 Non adéquat
<b>Date de réception :</b>	<b>Date de réception :</b> ___/___/___ <input type="checkbox"/>
<b>Etat des sérums à leur réception</b> <input type="checkbox"/>	<b>Etat des urines à leur réception</b> <input type="checkbox"/>
1 Bonne condition 2 Mauvaises conditions	1 Bonne condition 2 Mauvaises conditions
<b>Date de test :</b>	<b>Date d'infection :</b> ___/___/___
<b>Résultats :</b> <input type="checkbox"/>	<b>Résultats</b> <input type="checkbox"/>
1 Positif 2 Négatif 3 Indéterminé	1 Positif 2 Négatif

<i>Adéquat –Sang : prélever dans les 28 jours après l'éruption</i>
<i>-Urines : prélever dans les 5 jours après l'éruption</i>
<i>Bonne condition -Sérum : absence d'hémolyse, température &lt; 4°C</i>
<i>-Urines : volume suffisant (10-50 ml) température entre 4°C et 8°C</i>

<b>Date d'expédition des résultats :</b>
<b>Nom de la personne qui envoie les résultats :</b>
<b>Signature</b>

<b>A remplir seulement au PEV</b>
<b>Date de réception des résultats au PEV :</b> ___/___/___
<b>Nom de la personne qui reçoit les résultats :</b> _____

**ANNEXE 2B : Modèle de feuille de rendu de résultat rubéole**



**RESULTATS DE LA SEROLOGIE IgM RUBEOLE**

(Technique E.L.I.S.A. : Enzignost ; Siemens, Marburg, Allemagne)

**Numéro EPID :** \_\_\_\_\_  
Pays      Région/Prov      District      Année début      N° du cas  
**Nom et prénom du malade :**

**Prélèvement du sang**

**N° Laboratoire :**

**Prélèvement :**

1 adéquat 2 Non adéquat

**Date de réception :**

**Etat des sérums à leur réception :**

1 Bonne condition 2 Mauvaises conditions

**Date de test :**

**Résultats :**

1 Positif 2 Négatif 3 Indéterminé

**Adéquat - Sang :** *prélever dans les 28 jours après l'éruption*

*- Urines/gorge/ salive : prélever dans les 57 jours après l'éruption*

**Bonne condition -Sérum :** *absence d'hémolyse, température < 4°c*

*- Urines/gorge/salive : volume suffisant (10-50 ml) pour l'urine, température entre 4°c et 8°Cc*

**Date d'expédition des résultats :**

**Nom de la personne qui envoie les résultats :**

**Signature**

**A remplir seulement au PEV**

**Date de réception des résultats au PEV :** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Nom de la personne qui reçoit les résultats :** \_\_\_\_\_

### ANNEXE 3 : Feuille de paillasse (RuV diagnostic cdc- taqman)

RV-CDC Diagnostic One step															
Date:	16/03/20417		Lot N° OneStep kit:	154052995											
Nb of samples:	95		Expiry date:	6/7/2018											
Cycler:	CFX1														
Technician:	Marilou														
<b>Primer sequences:</b>															
NB:			2 reverse primers to detect both clades of rubella virus RV12 for the detection of most of the clade 1 viruses RV12.2 for the detection of most of the clade 2 viruses												
<b>Protocol:</b>			5'-3'			Date primer stock									
30 min 50°C, 15 min 95°C			RV11	CAACACGCCCGCACGGACAAC											
40 cycles 30s 95°C, 30s 57°C, 30s 72°C			RV12	CCACAAGCCCGAGCAGTCA											
			RV12.2	CCACGAGCCCGAAGCAGTCC											
			RubProb	FAM-AGTCCAGGTCCCGCCGAC-BHQ1											
			<b>Plate setup:</b>												
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
			A	CAF17-H-288	CAF17-H-296	CAF17-H-300	CAF17-H-311	CAF17-H-319	CAF17-H-328	CAF17-H-338	CAF17-H-343	CAF17-H-351	CAF17-H-258	NC Extr. 1	NC PCR
			B	CAF17-H-288	CAF17-H-296	CAF17-H-304	CAF17-H-312	CAF17-H-320	CAF17-H-328	CAF17-H-336	CAF17-H-344	CAF17-H-352	CAF17-H-259	NC Extr. 2	
			C	CAF17-H-289	CAF17-H-297	CAF17-H-305	CAF17-H-313	CAF17-H-321	CAF17-H-329	CAF17-H-337	CAF17-H-345	CAF17-H-353		NC Extr. 3	
			D	CAF17-H-290	CAF17-H-298	CAF17-H-306	CAF17-H-314	CAF17-H-322	CAF17-H-330	CAF17-H-338	CAF17-H-346	CAF17-H-354		NC Extr. 4	
			E	CAF17-H-291	CAF17-H-299	CAF17-H-307	CAF17-H-315	CAF17-H-323	CAF17-H-331	CAF17-H-339	CAF17-H-347	CAF17-H-355		PC Extr. 4	
			F	CAF17-H-292	CAF17-H-300	CAF17-H-308	CAF17-H-316	CAF17-H-324	CAF17-H-332	CAF17-H-340	CAF17-H-348	CAF17-H-356		PC Extr. 3	
			G	CAF17-H-293	CAF17-H-301	CAF17-H-309	CAF17-H-318	CAF17-H-326	CAF17-H-334	CAF17-H-342	CAF17-H-350	CAF17-H-228		PC Extr. 2	
			H	CAF17-H-294	CAF17-H-302	CAF17-H-310	CAF17-H-318	CAF17-H-326	CAF17-H-334	CAF17-H-342	CAF17-H-350	CAF17-H-226		PC Extr. 1	NC PCR
<b>Real-time PCR results:</b>															
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
			A	38.51	33.52	N/A	39.26	N/A	37.13	37.41	N/A	N/A	36.03	N/A	22.37
			B	N/A	N/A	39.15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	37.28	N/A	29.74	
			C	N/A	N/A	N/A	N/A	34.45	37.13	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
			D	34.71	N/A	36.12	35.75	38.47	39.35	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
			E	N/A	36.05	N/A	N/A	N/A	39.49	N/A	N/A	N/A	N/A	29.42	
			F	N/A	N/A	N/A	34.1	36.21	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	30.23	
			G	N/A	N/A	N/A	N/A	38.22	38.99	35.62	N/A	N/A	N/A	N/A	
			H	N/A	N/A	N/A	N/A	38.77	36.84	N/A	N/A	N/A	N/A	30.1	28.87
<b>Negatifs and positifs samples</b>															
<b>Comments:</b>															

# ANNEXE 4 : Feuille de paillasse (rv hk genotyping\_1st)

RV_HK_Nested																
Date:	09 03 2017			Lot N° Platinum Taq:	1701651			Primer 739F1/894SF (10nM)	aliquot 16/06/2016							
Nb of samples:	78			Expiry date:	Apr-2017			Primer 9112R/9549R (10nM)	aliquot 16/06/2016							
Cycler:	CFX2 et 3															
Technician:	Marilou			<b>Primer sequences:</b>												
<b>Protocol:</b>				Primer name	Primer sequence (5' to 3')											
94°C 5min, 40 cycles 30s 94°C, 30s 60°C, 30s 72°C, 72°C 5min,				739F1	CCCCACCGACACCGTGAT GAG			Fingment 1								
				9112R	GGCCGCTGAGACCTATGAC			Fingment 1								
				894SF	TGGGCCTCCCCGGT TTG			Fingment 2								
				9549R	GCAGTGGTGTGTGCCAT AC			Fingment 2								
<b>RV Genotyping PCR 2st round (HK)</b>																
	<b>1 sample</b>		<b>78</b>													
H2O	15,85 µl		1236,3 µl													
Buffer (10X)	2,5 µl		195,0 µl													
MgCl2 (50 mM)	1 µl		78,0 µl													
dNTP (10 mM)	0,5 µl		39,0 µl													
Primer F (10 uM)	1 µl		78,0 µl													
Primer R (10 uM)	1 µl		78,0 µl													
DMSO	1,25 µl		97,5 µl													
SybrGreen	0,25 µl		19,5 µl													
Platinum Taq	0,15 µl		11,7 µl													
template (1st	1,5 µl		117,0 µl													
<b>total</b>	25 µl		1950,0 µl													
				<b>Plate setup:</b>	CFX2											
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				A												
				B												
				C												
				D												
				E												
				F												
				G												
				H												
				739F1/9112R												
				<b>Plate setup:</b>	CFX3											
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				A												
				B												
				C												
				D												
				E												
				F												
				G												
				H												
				894SF/9549R												

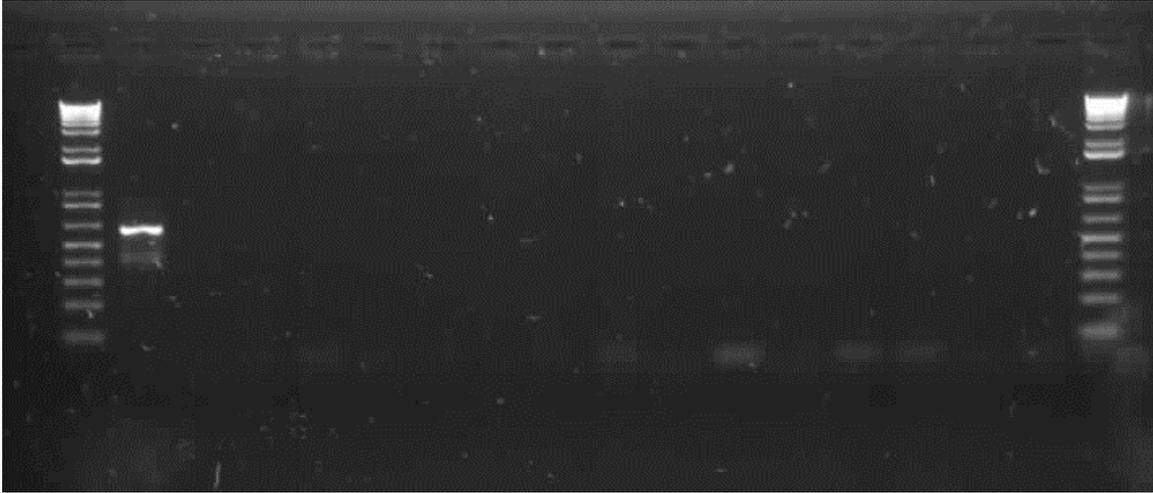
## ANNEXE 5 : Feuille de paillasse (rv hk genotyping\_nested 2nd)

Genotyping PCR 1st round (HK)																																																																																																																																			
Date: 10/03/2017		Lot N°Promega Access RT-PCR Syste 0000182453				ordered 19/04/2016		<b>Primer sequences:</b>																																																																																																																											
Nb of samples: 50		Expiry date:		A1250		8633F		AGCGACCGCGCCTGCTGGGG																																																																																																																											
Cycler: CFX3		cat #				9577R		CGCCCAGGTCGCGGGGTCTC																																																																																																																											
Technician: Marilou																																																																																																																																			
		8633F (8633-8652)				9577R (9557-9577)																																																																																																																													
<b>Cycling conditions</b>																																																																																																																																			
45°C	45 min	First round RT-PCR (948bp)																																																																																																																																	
95°C	2 min	739F (8636-8676) 9112A (9092-9112)																																																																																																																																	
95°C	30s	Set A-nested-PCR (447bp)																																																																																																																																	
58°C	1 min	8945f (8945-8962) 9549R (9529-9549)																																																																																																																																	
68°C	2 min	Set B-nested-PCR (505bp)																																																																																																																																	
68°C	7min																																																																																																																																		
15°C	10min																																																																																																																																		
		Date primer		STOCK		ALIQUOT		22/10/2015		25/01/2017																																																																																																																									
		22/10/2015		25/01/2017																																																																																																																															
<b>Protocol:</b>																																																																																																																																			
<b>RV Genotyping PCR 1st round (HK)</b>																																																																																																																																			
		1 sample		50		<b>Plate setup:</b>																																																																																																																													
H2O	11 µl	550.0 µl																																																																																																																																	
5X RT-PCR buffer	5 µl	250.0 µl																																																																																																																																	
dNTP 10mM	0.5 µl	25.0 µl																																																																																																																																	
DMSO	1.25 µl	62.5 µl																																																																																																																																	
Forward primer 8633F - 10uM	1.25 µl	62.5 µl																																																																																																																																	
Reverse primer 9577R - 10uM	1.25 µl	62.5 µl																																																																																																																																	
MgSO4 25mM	1 µl	50.0 µl																																																																																																																																	
SybrGreen	0.25 µl	12.5 µl																																																																																																																																	
AMV Reverse Transcriptase (5U/ul)	0.5 µl	25.0 µl																																																																																																																																	
T7 DNA polymerase (5U/ul)	0.5 µl	25.0 µl																																																																																																																																	
RNA	2.5 µl	125.0 µl																																																																																																																																	
total	25 µl	1250.0 µl																																																																																																																																	
			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>B</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>D</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>E</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>F</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>G</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>H</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>													1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A													B													C													D													E													F													G													H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																																							
A																																																																																																																																			
B																																																																																																																																			
C																																																																																																																																			
D																																																																																																																																			
E																																																																																																																																			
F																																																																																																																																			
G																																																																																																																																			
H																																																																																																																																			

**ANNEXE 6 : Electrophorèse des produits de PCR nichées de séquençage**

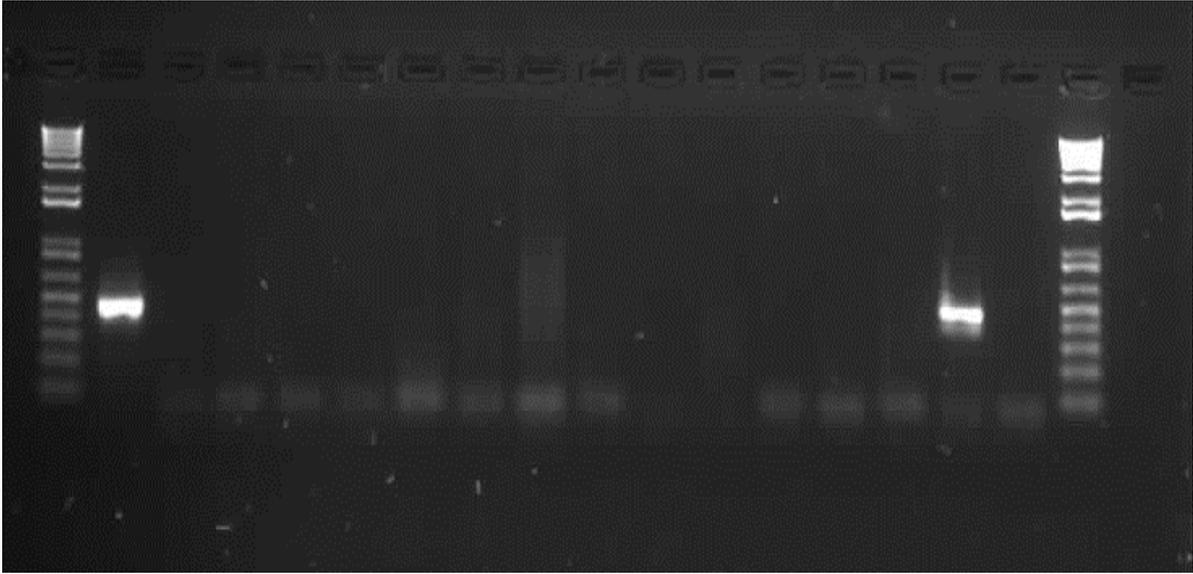
Size	ICAF1 7-	Size																
scale	H-17	H-18	H-19	H-20	H-21	H-22	H-23	H-24	H-25	H-26	H-27	H-28	H-29	H-30	H-31	H-32	scale	

A :  
Fragment 2  
(605 pb)



Size	AFI 7-	Size															
scale	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	scale

B :



Fragment 1 (457 pb)

## ANNEXE 7 : Valorisation des travaux de recherche

La majorité des travaux présentés dans ce manuscrit sont issus de l'article :

**Pagonendji, M. S.**, Gouandjika-Vasilache, I., Charpentier, E., Sausy, A., Le Faou A., Duval, R. E., & Hübschen, J. M. (2021). Rubella epidemiology in the Central African Republic, 2015-2016 and molecular characterization of virus strains from 2008-2016. *Int J Infect Dis* 2021;111:303-309. doi.org/10.1016/j.ijid.2021.08.050

Ils s'inscrivent dans la poursuite des travaux menés par Farra A. :

Farra A, Loumandet TN, **Pagonendji M**, Manirakiza A, Manengu C, Mbailao R, et al. Epidemiologic profile of measles in Central African Republic: A nine year survey, 2007-2015. *PLoS ONE* 2019;14(3):e0213735. doi.org/10.1371/journal.pone.0213735

Autres travaux :

Farra A, **Pagonendji M**, Manirakiza A, Rawago D, Ouambita-Mabo R, Guifara G, Gouandjika-Vasilache I. Epidemiology of primary rubella infection in the Central African Republic: data from measles surveillance, 2007-2014. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):505. doi.org/10.1186/s12879-016-1842-2

Bechtold P, Wagner P, Hosch S, Gregorini M, Stark WJ, Gody JC, Kodia-Lengueta ER, **Pagonendji MS**, Donfack OT, Phiri WP, Garcia GA, Nsanzanbana C, Daubenberger CA, Schindler T, Vickos U. Development and evaluation of PlasmoPod: A cartridge-based nucleic acid amplification test for rapid malaria diagnosis and surveillance. *PLOS Glob Public Health* 2023;3(9):e0001516. doi.org/10.1371/journal.pgph.0001516

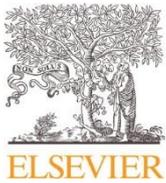
Dote J, Tricou V, Gnikpingo LK, **Pagonendji M**, Charpentier E, Hübschen JM, Gouandjika-Vasilache I.J Molecular characterization of measles viruses in Central African Republic, 2012-2016. *Med Virol*. 2023;95(8):e29003. doi.org/10.1002/jmv.29003.

Présentation à un congrès :

8<sup>ème</sup> Conférence internationale IMED (International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance) du 4 au 5 Novembre 2021, Atlanta, GA, USA.

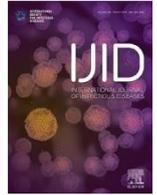
Présentation orale en ligne : Pagonendji M. Rubella epidemiology in the Central African Republic, 2015-2016 and molecular characterization of virus strains from 2008-2016





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijid](http://www.elsevier.com/locate/ijid)

# Rubella epidemiology in the Central African Republic, 2015–2016 and molecular characterization of virus strains from 2008–2016

Marilou S. PAGONENDJI<sup>a</sup>, Ionela GOUANDJIKA-VASILACHE<sup>a</sup>, Emilie CHARPENTIER<sup>b</sup>, Aurélie SAUSY<sup>b</sup>, Alain LE FAOU<sup>c</sup>, Raphaël E. DUVAL<sup>d</sup>, Judith M. HÜBSCHEN<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Enteric viruses and Measles Laboratory, Institut Pasteur de Bangui, BP 923, Central African Republic

<sup>b</sup> Department of Infection and Immunity, Luxembourg Institute of Health, 29 rue Henri Koch, L-4354 Esch-sur-Alzette, Luxembourg.

<sup>c</sup> Université de Lorraine, EA3452, CITHEFOR, Faculté de Pharmacie and Faculté de Médecine, F-54000 Nancy, France

<sup>d</sup> Université de Lorraine, CNRS, L2CM, F-54000 Nancy, France

## article info

### Article history:

Received 18 June 2021

Revised 19 August 2021

Accepted 21 August 2021

### Keywords:

rubella virus  
surveillance  
genotype  
rash  
Central African Republic  
epidemiology

## abstract

**Objectives:** Rubella cases in the Central African Republic (CAF) are currently identified during measles surveillance. This study aimed to investigate rubella epidemiology between 2015 and 2016 and to provide baseline genotype data for monitoring future rubella control efforts.

**Methods:** 831 measles IgM negative or equivocal sera from 2015/2016 were tested for rubella IgM antibodies and 350 rubella IgM positive sera collected between 2008 and 2016 were selected for PCR and sequencing.

**Results:** 411 of the 831 sera (49.5%) were rubella IgM positive and most cases (n=391, 95.1%) occurred between January and April. Most patients were between 5 and 9 years old (50.2%) and more than half of the rubella cases (56.7%) originated from the capital Bangui. Genotype information was obtained for 37 of the 350 selected rubella IgM-positive specimens, with the majority of the patients originating from Bangui (n=24, 64.9%) and sequences covering all years except 2009. Phylogenetic analysis identified genotypes 1E (n=12), 1G (n=5) and 2B (n=20), with 2B being detected from 2014 onwards.

**Conclusions:** Our study confirmed the important role of rubella as a rash and fever disease in CAF and provided comprehensive data on rubella epidemiology and the first information on rubella genotypes in the country.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## INTRODUCTION

Rubella virus (RV) belongs to the genus *Rubivirus* in the family *Matonaviridae* (Walker et al., 2019). It is an RNA virus with a single serotype, but 13 genotypes distributed into two clades (WHO, 2013). Its public health importance is mainly due to the teratogenic potential of the virus. Infection especially in the first trimester of pregnancy can lead to miscarriage, fetal death or birth of an infant with congenital rubella syndrome (CRS) (Banatvala and Brown, 2004, Edlich et al., 2005). It was estimated that world-wide more than 100 000 children with CRS are born each year (Lambert et al., 2015). As a consequence of rubella vaccination pro-

grams, disease incidence has declined considerably in many countries and the endemic transmission of RV in the World Health Organization (WHO) region of the Americas has been interrupted since 2009 (WHO, 2011). However, many people living in African countries remain susceptible to rubella infection due to missing or low coverage rubella vaccination, and about 5% of the reported rubella cases occur in women of child-bearing age, suggesting that CRS is still a public health burden (Goodson et al., 2011).

The WHO has recommended that countries take advantage of current measles control and elimination efforts to introduce rubella vaccination in the form of a combined measles/rubella vaccine. Governments were requested to evaluate the burden of rubella and CRS before inclusion of rubella vaccination into routine immunization programs (WHO, 2015, 2019b).

The Central African Republic (CAF) presently recommends one dose of measles-containing vaccine for children of 9 months of age, but has not yet included rubella vaccination into its national

\* Corresponding author: Judith M. Hübschen, Department of Infection and Immunity, Luxembourg Institute of Health, 29 rue Henri Koch, L-4354 Esch-sur-Alzette, Luxembourg

E-mail address: [judith.huebschen@lih.lu](mailto:judith.huebschen@lih.lu) (J.M. HÜBSCHEN).

immunization program. Neither rubella nor CRS are currently under surveillance. Rubella cases are identified only in the context of measles surveillance since all measles IgM negative or equivocal samples are tested for rubella-specific IgM antibodies. Therefore, information about rubella in CAF is very scarce so far. A study investigating rubella IgG antibodies in children under 15 years of age in Bangui in 2008 detected an overall prevalence of 55.4%, with children above 10 years of age having a positivity rate of 87.4% (Manirakiza et al., 2011). Data from measles surveillance between 2007 and 2014 showed that 30.2% of 1409 measles IgM negative or equivocal sera were positive for rubella IgM antibodies. The highest percentages of positives were found among 5–9 and 10–14 year-old children (43.5% and 26.8%, respectively), with most cases occurring during the dry season between November and April (Farra et al., 2016). To update currently available data, the rubella epidemiology between 2015 and 2016 was described in this article. Since nothing is currently known about rubella virus genotypes present in the country, this retrospective study investigated samples collected between 2008 and 2016 to provide baseline genotype data for monitoring rubella control efforts planned for the near future.

## MATERIALS AND METHODS

### 21. Population studied

Between 2008 and 2016, 2918 sera samples of suspected measles cases were received from the seven health regions (HR) of CAF for diagnosis at the WHO National Reference Laboratory for measles and rubella at the Institut Pasteur de Bangui. The blood samples had been collected from people presenting with clinical symptoms of measles (fever  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ , cough/conjunctivitis/coryza, rash) within 28 days after onset of rash (WHO, 2007) in dry tubes and were transported to the laboratory in refrigerated sample holders within 3 days of collection. For each patient, an investigation form was completed including data such as geographical origin, age, sex and date of rash onset.

A total of 866 cases (29.68%) were confirmed in the laboratory as measles, leaving 2052 specimens for rubella IgM antibody testing, of which 737 (35.92%) were positive. Since the data from 2008 to 2014 were investigated previously (Farra et al., 2016), we concentrate in the present manuscript on rubella epidemiology between 2015 and 2016. For investigation by PCR and sequencing, 350 rubella IgM positive sera were selected (collected between 2008 and 2016 within 3 days of rash onset with a volume of at least 250  $\mu\text{l}$  and stored uninterruptedly at  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

### 22. RV sequencing and genotyping

RNA extraction was performed with the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. A nested PCR amplifying the 739 nucleotide (nt) region recommended by WHO for genotyping (WHO, 2013) was done on all RNA extracts using previously published primers (Abernathy et al., 2009, Namuwulya et al., 2014, Seregin et al., 2011). PCR products were visualized using a 1.5% agarose gel and positives were purified with the JetQuick DNA Purification Spin Kit 250 (Genomed, Löhne, Germany). Sequencing was performed using the Big Dye Terminator version 3.1 cycle sequencing kit (Life Technologies, Carlsbad, US) and the 3130xl model of the ABI capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster city, US). Sequence data were analyzed with SeqScape v2.5 software from Applied Biosystems and consensus sequences covering the 739 nt window were aligned with WHO reference sequences (WHO, 2013) in BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999). Phylogenetic analysis was conducted with MEGA7 (Kumar et al., 2016) using the Kimura 2-parameter model and the neighbor-joining algorithm with 1000 bootstrap

replicates. All new RV sequences were submitted to GenBank under accession numbers MW079853–89.

### 23. Data analysis

Patient data were processed with the EPI info version 3.5.4 software (available from: <https://www.cdc.gov/epiinfo/support/downloads/preversions.html>) and analyzed with Stata version 14 (StataCorp LP, Texas, USA) and Microsoft Office Excel 2016. The threshold used for evaluating statistical tests (chi-squared test) was alpha equal to 0.05. Maps were generated in Health Mapper version 4.2 (<https://healthmapper.informer.com/4.2/>).

### 24. Estimates of population size

Estimates of population size were obtained from the Ministry of Health and Population based on the 2003 national census. Forecasts according to age groups, region and sex are available for the years 2004 to 2018. Cumulative incidence was calculated for 100 000 inhabitants per HR.

## RESULTS

### 31. Rubella epidemiology 2015–2016

Of the 831 suspected measles cases tested for rubella-specific IgM antibodies between 2015 and 2016, 411 (49.5%) were positive (371 in 2015 and 40 in 2016), leading to an annual incidence of 7.49 and 0.79 per 100 000 inhabitants, respectively. Most cases ( $n=391$ , 95.1%) occurred between January and April and the peak incidence was observed in February (Figure 1).

Rubella was confirmed in 190 males (46.2%) and 221 females (53.8%;  $p=0.422$ ). The age of the patients ranged from 11 months to 59 years with a median of 5 years. Age information was lacking for one rubella case. Most patients were between 5 and 9 years old (206/410, 50.2%), followed by the 1–4 years age bracket (108/410, 26.3%) and the 10–14 years (72/410, 17.6%) age bracket (Figure 2). Only 4.4% were at least 15 years and 1.5% less than 12 months old. The differences between age groups were statically significant ( $p < 0.0001$ ). Fifteen of the 18 rubella IgM positives of at least 15 years of age (83%) were females (Figure 2).

More than half of the rubella cases (233/411, 56.7%) originated from HR7 (Bangui, the capital of CAF), leading to an incidence of 13.59 per 100 000 inhabitants (Figure 3). The second most affected was HR1 (surrounding Bangui) with 87 cases (21.2%, incidence 5.87), followed by HR4 ( $n=36$ , 8.8%, incidence 2.53), HR2 ( $n=33$ , 8.0%, incidence 1.86), HR3 ( $n=10$ , 2.4%, incidence 0.49), HR6 (comprising the districts Basse Kotto, Mbomou and Haut Mbomou;  $n=9$ , 2.2%, incidence 0.75) and HR5 ( $n=3$ , 0.7%, incidence 0.64) (Figure 3). The difference in the proportion of rubella cases per HR was statistically significant ( $p < 0.0001$ ).

### 32. Genotype distribution 2008–2016

Genotype information was obtained for 37 of the 350 selected rubella IgM-positive specimens, with one sequence (RVs/Bangui. CAF/8.13/3) covering only the first 374 nt of the 739 nt window recommended for RV genotyping (WHO, 2013). Sequences were obtained from all years, except 2009: 2008 ( $n=2$ ); 2010 ( $n=1$ ); 2011 ( $n=1$ ); 2012 ( $n=1$ ); 2013 ( $n=9$ ); 2014 ( $n=9$ ); 2015 ( $n=12$ ); 2016 ( $n=2$ ). The majority of the sequences were from patients from Bangui (HR7;  $n=24$ , 64.9%). Few sequences were obtained from the other HRs (HR1 ( $n=4$ ); HR2 ( $n=3$ ); HR3 ( $n=2$ ); HR4 ( $n=3$ ); HR6 ( $n=1$ )) and no sequences were obtained from HR5. A few sequences were identical in the 739 nt window, but based on available information, no epidemiological link could be established be-

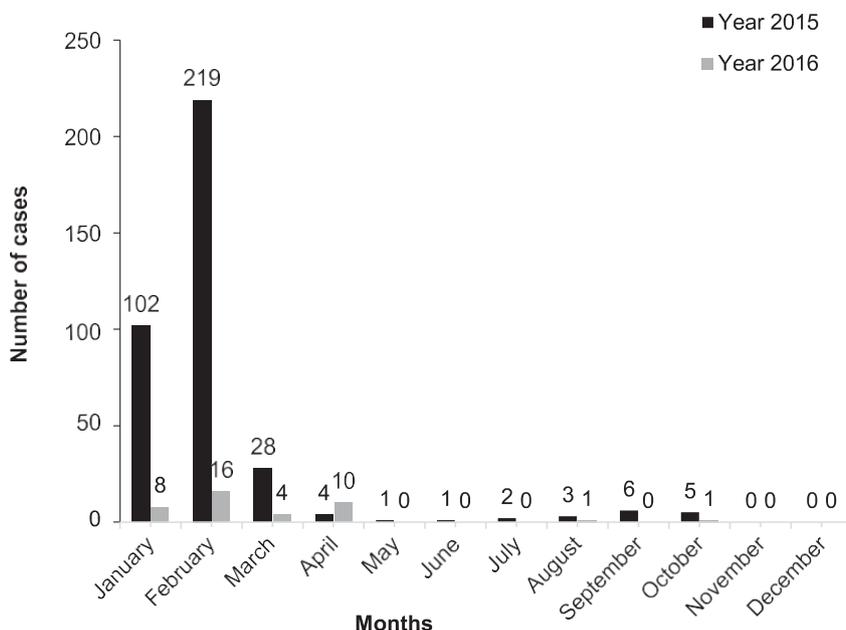


Figure 1. Number of rubella cases by month and year, Central African Republic, 2015-2016.

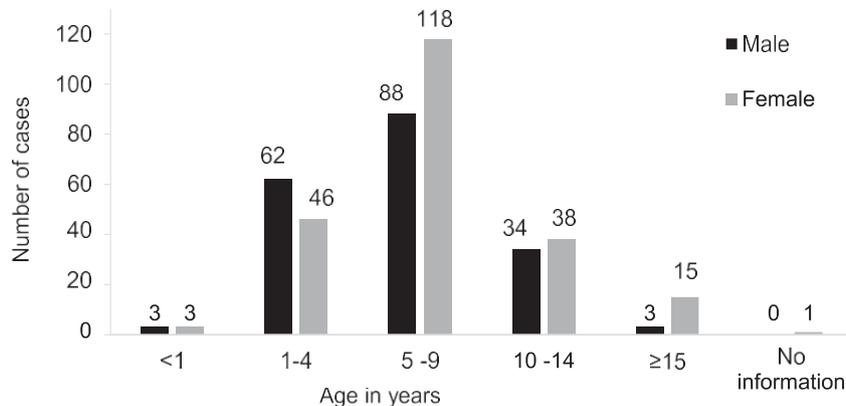


Figure 2. Number of rubella cases by sex and age group, Central African Republic, 2015-2016.

tween the patients. Phylogenetic analysis identified three different genotypes of rubella virus, namely 1E (n=12), 1G (n=5) and 2B (n=20) (Figure 4). Sequences reported from the US in 2008 and 2012 (GenBank accession numbers JN635286 and KC866357) and from Sudan in 2005 (FJ775000) were the most similar sequences to the 1E strains. The genotype 1G sequences reported from Ouham in HR3 in 2008 were most similar to sequences from Cameroon (MG754229), Ivory Coast (JX679266) and Uganda (EF588978), while the strain from Mambere-Kadei in HR2 found in 2015 was most similar to a sequence from the US (MF490288). A sequence from Ivory Coast from 2008 (JX679266) and a sequence from Cameroon from 2013 (MG754223) were the best BLAST matches of two identical sequences from Bangui (HR7) from 2013. The genotype 2B sequences from CAF were most similar to sequences reported from the Democratic Republic of the Congo in 2012 and 2014 (KU218400, MH654796, MH654800 and MH654801, Figure 4).

While in 2008 only 1G was found and between 2010 and 2012 only 1E, both genotypes co-circulated in Bangui in 2013 (Figure 5). Genotype 2B was found for the first time in 2014 and until 2016 it was the predominant variant (only 1 genotype 1G strain and 2 genotype 1E strains were detected between 2014 and 2015 and exclusively 2B in 2016). While in some HRs only a single genotype

was found (HR1: 2B; HR3: 1G; HR6: 1E), two (HR2: 1G/2B; HR4: 1E in 2012, 2B in 2016) or even all three genotypes (HR7) were detected in others (Figure 5).

In 2008, a total of 7 rubella cases were detected in Ouham (HR3) between epidemiological weeks 10 and 15 and similar genotype 1G sequences were obtained from two of the patients. A total of 6 rubella cases were confirmed in 2010 in Haut Mbomou (HR6) between weeks 32 and 52, of which at least 4 were epidemiologically linked including the patient infected with a genotype 1E strain. The genotype 1E sequence from 2011 is from an isolated case identified in Bangui. In 2012, a total of 7 cases were confirmed in Kemo (HR4), of which at least six occurring between weeks 14 and 16 were epidemiologically linked, including the patient infected with a genotype 1E strain. In 2013, 22 rubella cases were detected in Bangui including the 9 patients for whom we obtained sequence information, but epidemiological links between these patients are largely unknown. 2014 and 2015 were high incidence years with cases being identified in many different regions, but there is basically no information about different transmission chains as our sequence information suggests. There is also no epidemiological link known between the two patients with genotype 2B sequences found in HR4 in 2016.

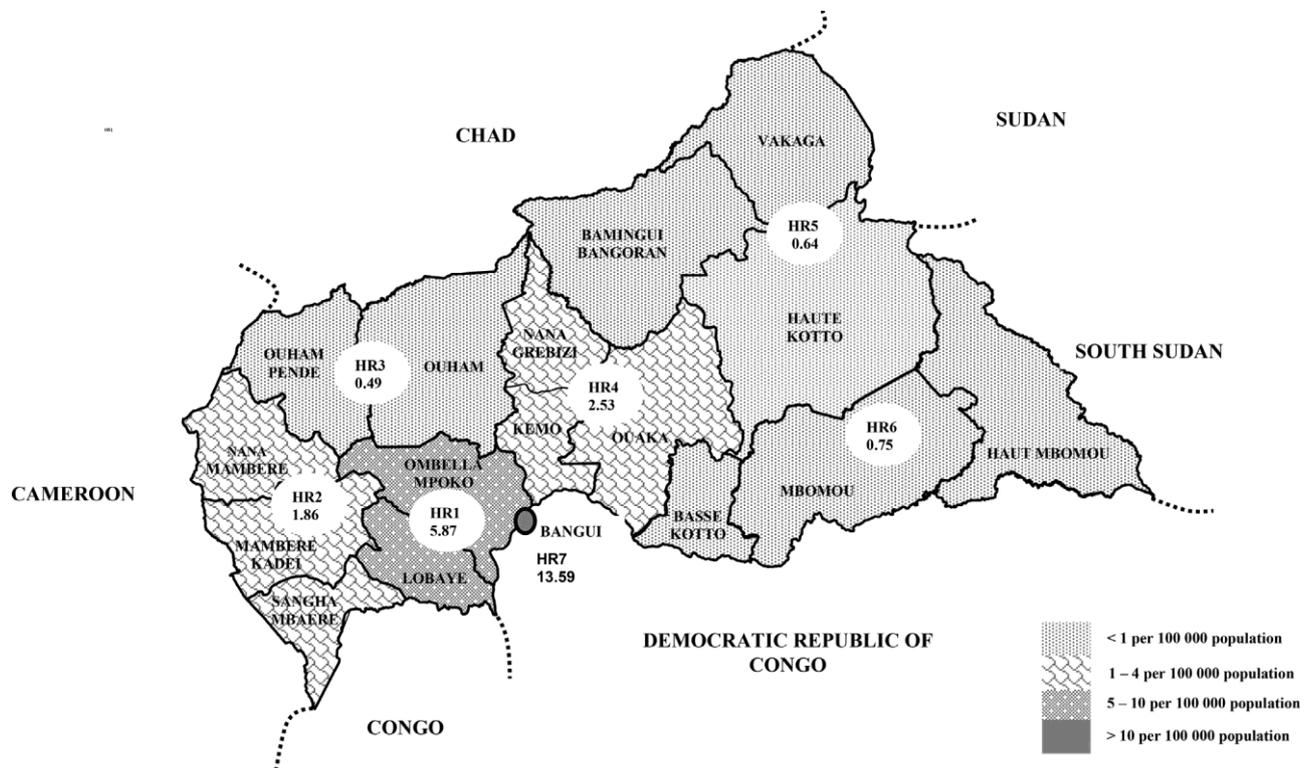


Figure 3. Incidence of rubella per 100 000 population by health region (HR), Central African Republic, 2015–2016.

## DISCUSSION

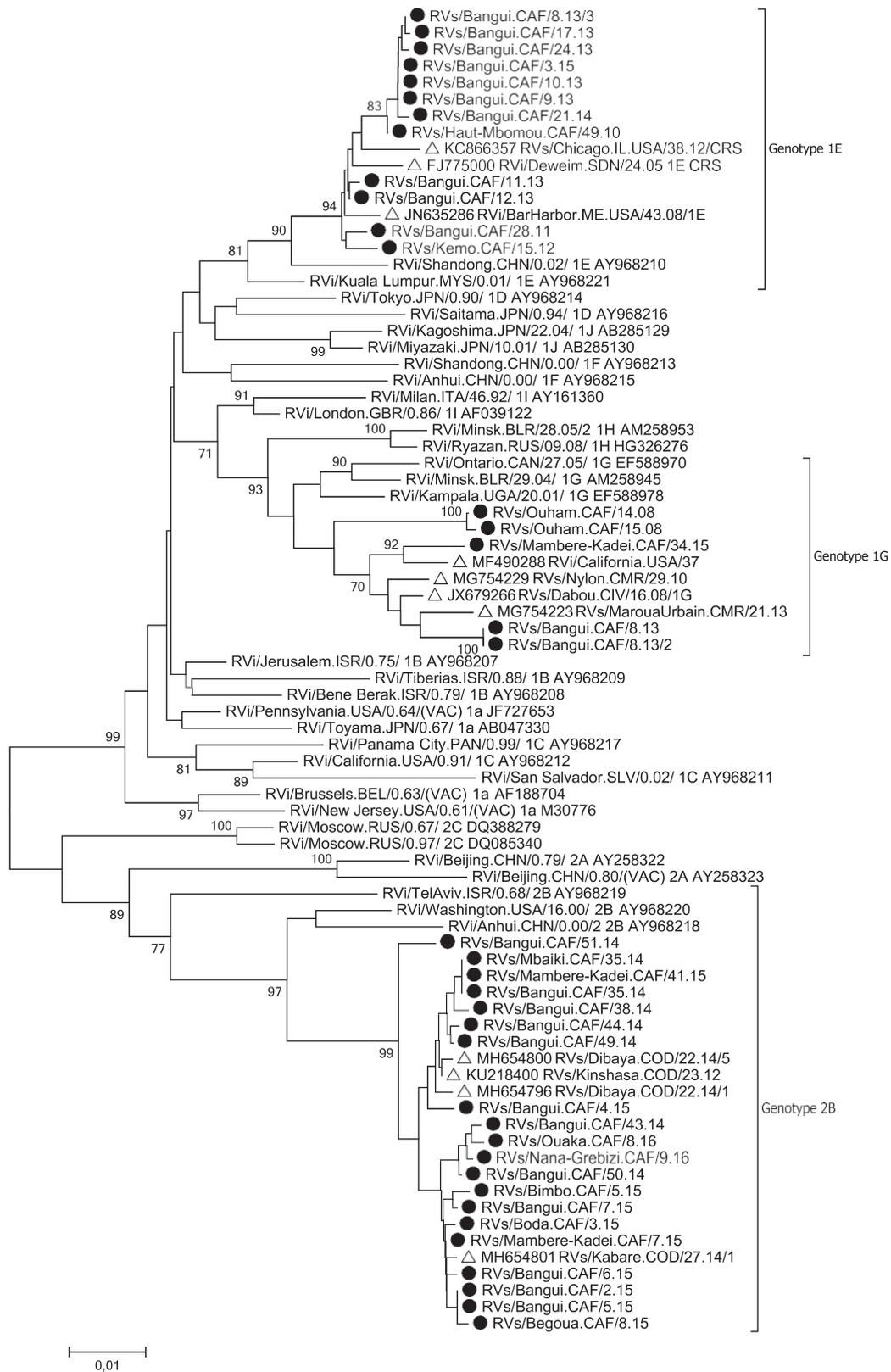
In the present study, nearly half (49.5%) of the measles IgM negative and equivocal samples collected between 2015 and 2016 were positive for rubella IgM antibodies. While this is certainly related to the large rubella outbreak in 2015, a previous re-port analyzing data from 2007 to 2014 found a rate of more than 30% (Farra et al., 2016), suggesting that physicians do not seem to strictly adhere to the WHO measles clinical case definition (WHO, 2019a) and that rubella infection is very common in CAF. Rubella cases identified in the context of measles surveillance between 2007 and 2014 (Farra et al., 2016), but also in the present study looking at 2015 and 2016 data showed an annual seasonal pattern, with peak incidences during the dry season between January and March. An increased incidence of rubella during the dry season was documented in basically all parts of Africa (Chimhuya et al., 2015, Getahun et al., 2016, Kadjo et al., 2018, Nimpa Mengou et al., 2017, Omoleke and Udenenwu, 2016, Woyessa et al., 2019) and as suggested in a study done in Beijing probably associated with meteorological variables, such as temperature and relative humidity (Zhang et al., 2019).

The variations between HR may be related to differences in population density, access to healthcare, sample transportation and likelihood of virus introduction by foreigners (Durowade et al., 2020, Yoshikura, 2014). Rubella epidemics in CAF seem to occur approximately every 7 to 8 years, which is comparable to what has been reported from Central and East Africa (Chimhuya et al., 2015, Getahun et al., 2016). The outbreak in 2015 was probably linked to the socio-political crisis between 2013 and 2016, which led to the migration of people from rural zones to Bangui or close to the capital (UN High Commissioner for Refugees, 2015). Spontaneously and fortuitously constructed Internal Displacement Camps (IDPs) have become largely overcrowded long-term shelters and may have facilitated virus spread (Shetty, 2019). Although only 6 rubella cases are known to have occurred in refugees in the

present study, studies in IDPs and refugees in other African countries have documented incidence increases or outbreaks of various infectious diseases and linked them to unhealthy living conditions, overcrowding and social marginalization (Hassanain et al., 2018, Ndombo et al., 2018, Roberts, 2017, Roggen et al., 2014, van Berlaer et al., 2016).

The most affected age groups in 2015/2016 were the 5 to 9-year-olds followed by the 1 to 4-year-olds. In CAF, children start school between 3 (private schools) and 5 (public schools) years of age, often with more than 40 children per teacher, which facilitates the spread of infections and explains the high incidence in these age groups. In contrast, the low incidence observed in infants younger than 1 year may be related to the protection provided by maternal antibodies and the lower risk of exposure as compared to schoolchildren. Rubella remains largely a childhood disease in CAF with more than 95% of the IgM positive cases among those less than 15 years old, which is similar to reports from Cameroon (97%) (Nimpa Mengou et al., 2017), Ethiopia (94%) (Getahun et al., 2016) and Zimbabwe (98%) (Chimhuya et al., 2015). However, since 83.3% of the rubella patients in the present study who were at least 15 years old were female, CRS cases are likely to occur and have already been described in the country (Farra, 2003). Thus, the introduction of not only rubella, but also CRS surveillance is clearly warranted.

Despite the fact that the rubella IgM positive sera were stored for up to 9 years at  $-80^{\circ}\text{C}$ , 37 sequences were obtained, mostly (86.5%) from samples received in the laboratory a maximum of 3 days after collection. Our genotyping success rate of 10.6% is higher than the about 8% reported in a study from Uganda using sera stored for up to 5 years at  $-20^{\circ}\text{C}$  (Tushabe et al., 2020) and nearly identical to the 10.5% reported in a 4-year retrospective study from Ivory Coast including only samples from the capital (Kadjo et al., 2018). Possible reasons are careful selection of the samples for genotyping based on time after rash onset and storage conditions and also the use of the sensitive nested PCR protocol.



**Figure 4.** Phylogenetic tree based on a sequence alignment covering 739 nucleotides of the rubella virus E1 gene and the Neighbor-Joining and Kimura 2-parameter methods. Phylogenetic interference was tested with the Bootstrap method and values of at least 70% (1000 replicates) are displayed. Sequences from the Central African Republic are marked with black dots, the closest BLAST matches of these sequences are identified by open triangles.

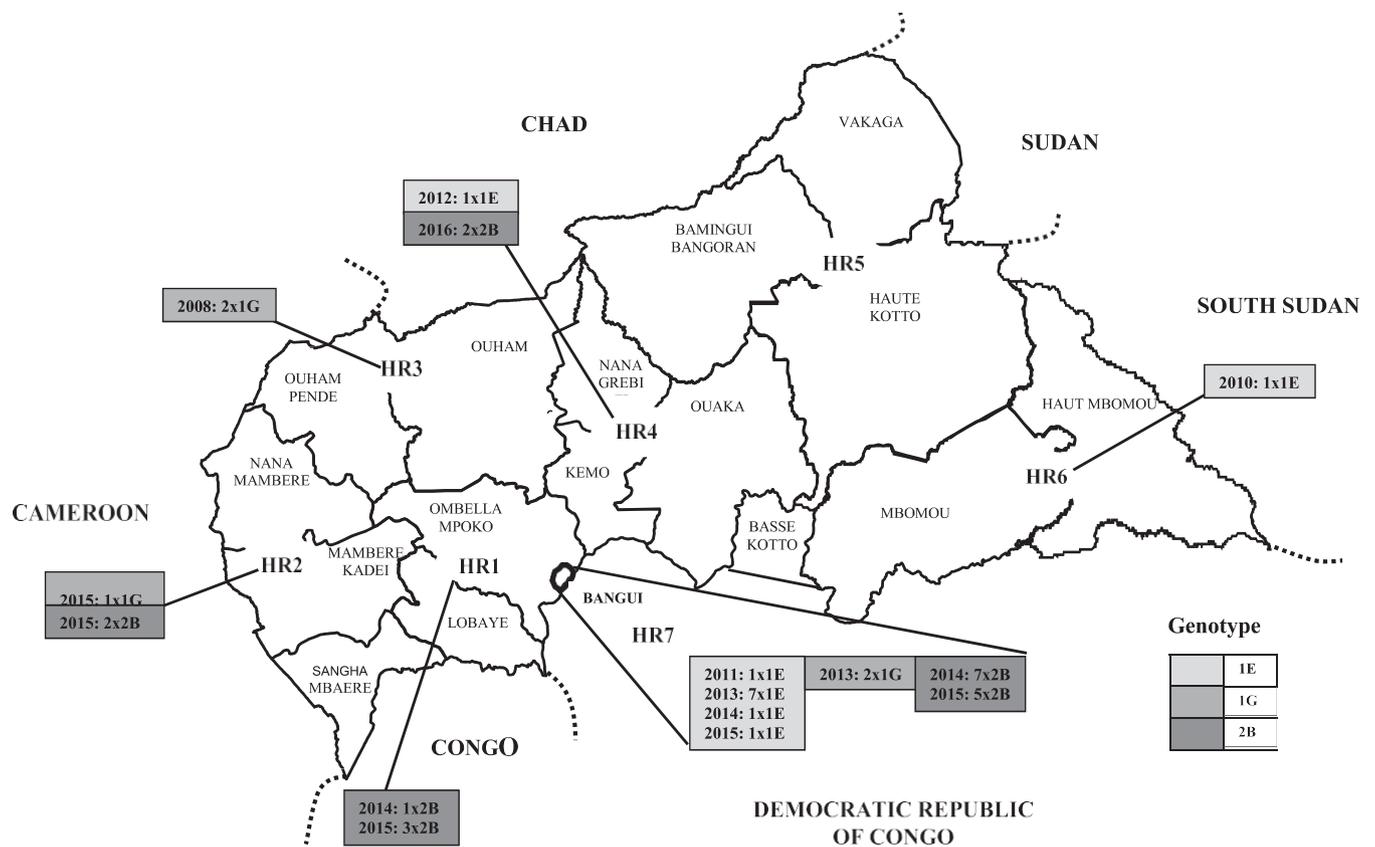


Figure 5. Geographic distribution (by health region, HR) of rubella virus genotypes by year, Central African Republic, 2008–2016.

Our results as well as the findings of the other authors highlight that even in the absence of specimens commonly considered as suitable for molecular investigations (WHO, 2007), some baseline genotype data may be obtained using sera collected for IgM anti-body detection.

Phylogenetic analysis identified three genotypes of rubella virus in CAF between 2008 and 2016, namely 1G, 1E and 2B, which were also reported in other African countries, including the neighboring countries Sudan, South Sudan, Democratic Republic of the Congo and Cameroon (Obam Mekanda et al., 2019, Omer et al., 2010, Pukuta et al., 2016). Some similarities of CAF strains to sequences from Sudan (1E), Cameroon (1G) and Democratic Republic of the Congo (2B) could be explained by cross-border movements related to trading and employment (International Peace Information Service, 2018). Similarities to sequences from the US and Ivory Coast might partially be related to the presence of military staff from these countries in CAF, namely from 2011 to 2017 for the US (Agence France Presse, 2017) and between 1998 and 2000 and from 2014 until now for Ivory Coast (Mission multidimensionnelle intégrée des Nations Unies pour la stabilisation en Centrafrique, 2015).

Our findings suggest that genotypes 1G and 1E were present in CAF during the early years of the studied time range, while 2B strains, potentially imported from Democratic Republic of the Congo, where they had already been found in 2012 (Bankamp et al., 2019), became predominant from 2014 on. Further studies are required to determine whether a genotype replacement occurred, as described from China (Bozick et al., 2019). The currently scarce genotype information from the different HR does not allow any conclusions as far as regional differences related to rubella virus genotypes within CAF are concerned. Nevertheless, our data will be of value to monitor the success of the

immunization program when it is implemented and eventually to confirm interruption of endemic virus circulation in the country.

## CONCLUSIONS

In conclusion, our study confirmed the important role of rubella as a rash and fever disease in CAF and the need to implement rubella and CRS surveillance in the country. Our analyses provide comprehensive data on rubella epidemiology and highlight that it is possible to obtain genotype data from samples collected for antibody detection even in very challenging settings. The sequence information will serve as baseline data to monitor rubella control efforts supposed to start in the near future.

## Funding

This work was supported by the Luxembourg Ministry of Foreign and European Affairs and the Luxembourg Institute of Health (“Microbiology for Development” grant). The funding agencies had no role in study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report or in the decision to submit the article for publication.

## Ethical considerations

This study was approved by the Ethical Committee of the Bangui University and Institut Pasteur de Bangui.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing interests.

## Acknowledgments

We acknowledge the logistical and administrative support of Institut Pasteur de Bangui, the Ministries of Health and Population of the Central African Republic and of WHO-Central Africa. We thank the WHO country office of the Central African Republic for providing the maps used in this manuscript, Prof. Claude P. Muller for his help with the acquisition of funding and Regina Sinner from the Luxembourg Institute of Health for submitting the sequences to GenBank.

## References

- Abernathy E, Cabezas C, Sun H, Zheng Q, Chen MH, Castillo-Solorzano C, et al. Confirmation of rubella within 4 days of rash onset: comparison of rubella virus RNA detection in oral fluid with immunoglobulin M detection in serum or oral fluid. *J Clin Microbiol* 2009;47(1):182–8.
- Agence France Presse. Fin de la traque contre Kony pour les forces spéciales américaines en Centrafrique. 2017. Available from: <https://www.voafrique.com/a/centrafrique-fin-de-la-traque-contre-kony-pour-les-forces-speciales-americaines/3824412.html>. [Accessed 18.11.2020].
- Banatalva JE, Rubella Brown DW. *Lancet* 2004;363(9415):1127–37.
- Bankamp B, Sein C, Simbu EP, Anderson R, Abernathy E, Chen M-H, et al. Use of FTA Cards To Transport Throat Swabs and Oral Fluid Samples for Molecular Detection and Genotyping of Measles and Rubella Viruses. *J Clin Microbiol* 2019;57(5):e00019–48. doi:10.1128/JCM.00048-19.
- Bozick BA, Worby CJ, Metcalf CJE. Phylogeography of rubella virus in Asia: Vaccination and demography shape synchronous outbreaks. *Epidemics* 2019;28. doi:10.1016/j.epidem.2019.100346.
- Chimhuya S, Manangazira P, Mukaratirwa A, Nziramasanga P, Berejena C, Shonhai A, et al. Trends of rubella incidence during a 5-year period of case based surveillance in Zimbabwe. *BMC Public Health* 2015;15:294. doi:10.1186/s12889-015-1642-4.
- Durowade KA, Musa OI, Osagbemi GK. Rubella transmissibility and reproduction number (Ro): A critical appraisal of the prospects for its control in Nigeria. *Niger Postgrad Med J* 2020;27(3):156–62. doi:10.4103/npj.npmj.84\_20.
- Edlich RF, Winters KL, Long WB, 3rd Gubler KD. Rubella and congenital rubella (German measles). *J Long Term Eff Med Implants* 2005;15(3):319–28.
- Farra A. Study of congenital malformations observed in Bangui: About 85 cases. Doctoral Thesis in Medicine. Faculty of Science, University of Bangui; 2003. p. 123.
- Farra A, Pagonendji M, Manikariza A, Rawago D, Ouambita-Mabo R, Guifara G, et al. Epidemiology of primary rubella infection in the Central African Republic: data from measles surveillance. *BMC Infect Dis* 2016;16(1):505. doi:10.1186/s12879-016-1842-2.
- Getahun M, Beyene B, Gallagher K, Ademe A, Teshome B, Tefera M, et al. Epidemiology of rubella virus cases in the pre-vaccination era of Ethiopia. *BMC Public Health* 2016;16(1):1168. doi:10.1186/s12889-016-3841-z.
- Goodson JL, Masresha B, Dosseh A, Byabamazima C, Nshimirimana D, Cochi S, et al. Rubella epidemiology in Africa in the prevaccine era, 2002–2009. *J Infect Dis* 2011;204(1):S215–25.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 1999;41:95–8.
- Hassanain SA, Edwards JK, Venables E, Ali E, Adam K, Hussien H, et al. Conflict and tuberculosis in Sudan: a 10-year review of the National Tuberculosis Programme, 2004–2014. *Confl Health* 2018;12:18. doi:10.1186/s13031-018-0154-0.
- International Peace Information Service. République centrafricaine: Cartographie du conflit. [https://ipisresearch.be/wp-content/uploads/2018/09/1902-CAR-conflict-mapping\\_french.pdf](https://ipisresearch.be/wp-content/uploads/2018/09/1902-CAR-conflict-mapping_french.pdf). 2018:1–120.
- Kadjo HA, Waku-Koumou D, Adagba M, Abernathy ES, Abdoulaye O, Adjogoua E, et al. Epidemiology of rubella infection and genotyping of rubella virus in Cote d'Ivoire, 2012–2016. *J Med Virol* 2018;90(11):1687–94.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33(7):1870–4.
- Lambert N, Strebel P, Orenstein W, Icenogle J, Rubella Poland GA. *Lancet* 2015;385(9984):2297–307.
- Manirakiza A, Kipela JM, Sosler S, Daba RM, Gouandjika-Vasilache I. Seroprevalence of measles and natural rubella antibodies among children in Bangui, Central African Republic. *BMC Public Health* 2011;11:327. doi:10.1186/1471-2458-11-327.
- Mission multidimensionnelle intégrée des Nations Unies pour la stabilisation en Centrafrique. 28 Casques bleus du contingent ivoirien de la MINUSCA. <https://minusca.org/28-casques-bleus-du-contingent-ivoirien-de-la-minusca-re%C3%A7oivent-la-m%C3%A9daille-de-l%27ONU>. [Accessed 20.11.2020].
- Namuwulya P, Abernathy E, Bukonya H, Bwogi J, Tushabe P, Birungi M, et al. Phylogenetic analysis of rubella viruses identified in Uganda, 2003–2012. *J Med Virol* 2014;86(12):2107–13.
- Ndombo P, Ndze V, Mbarga F, Anderson R, Acho A, Chia JE, et al. Molecular characterization of measles virus strains among refugees from Central African Republic in Cameroon in 2014. *Epidemiology & Infection* 2018;146(3):319–23.
- Nimpa Mengouo M, Ndze VN, Baonga F, Kobela M, Wiysonge CS. Epidemiology of rubella infection in Cameroon: a 7-year experience of measles and rubella case-based surveillance, 2008–2014. *BMJ Open* 2017;7(4).
- Obam Mekanda FM, Monamele CG, Simo Nemg FB, Sado Yousseu FB, Ndjonga D, Kfutwah AKW, et al. First report of the genomic characterization of rubella viruses circulating in Cameroon. *J Med Virol* 2019;91(6):928–34.
- Omer A, Abdel Rahim EH, Ali EE, Jin L. Primary investigation of 31 infants with suspected congenital rubella syndrome in Sudan. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(6):678–82.
- Omoleke SA, Udenenwu HC. Incidence of rubella in a state in North-western Nigeria: a call for action. *Pan Afr Med J* 2016;25:49. doi:10.11604/pamj.2016.25.49.10003.
- Pukuta E, Waku-Koumou D, Abernathy E, Illunga BK, Obama R, Mondonge V, et al. Genotypes of rubella virus and the epidemiology of rubella infections in the Democratic Republic of the Congo, 2004–2013. *J Med Virol* 2016;88(10):1677–84.
- Roberts L. Nigeria's invisible crisis. *Science* 2017;356(6333):18–23.
- Roggen I, van Berlaer G, Gijs G, Hubloue I. Clinical characteristics of the inhabitants of an internally displaced persons camp in Brazzaville. Republic of Congo after the arms dump blast on March 4, 2012. *Prehosp Disaster Med* 2014;29(5):516–20.
- Seregin SV, Babkin IV, Petrova ID, Iashina LN, Malkova EM, Petrov VS. Appearance of the Rubella virus genotype 1H in Western Siberia. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 2011;26(4):159–65.
- Shetty AK. Infectious Diseases among Refugee Children. *Children (Basel)* 2019;6(12):129. doi:10.3390/children6120129.
- Tushabe P, Bwogi J, Abernathy E, Birungi M, Eliku JP, Seguya R, et al. Descriptive epidemiology of rubella disease and associated virus strains in Uganda. *J Med Virol* 2020;92(3):279–87.
- UN High Commissioner for Refugees. République Centrafricaine: Analyse du nombre d'IDPs dans les sites de Bangui (07/09/15) 2015. Available from: <https://www.refworld.org/docid/560101994.html> [Accessed 09.03.2020].
- van Berlaer G, Bohle Carbonell F, Manantsoa S, de Bethune X, Buyl R, De-backer M, et al. A refugee camp in the centre of Europe: clinical characteristics of asylum seekers arriving in Brussels. *BMJ Open* 2016;6(11). doi:10.1136/bmjopen-2016-013963.
- Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Dempsey DM, Dutilh BE, et al. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Arch Virol* 2019;164(9):2417–29.
- WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection; 2007. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70211/WHO\\_IVB\\_07\\_01\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70211/WHO_IVB_07_01_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y). [Accessed 01.06.2019].
- WHO. Rubella vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2011;86(29):301–16.
- WHO. Rubella virus nomenclature update: 2013. *Wkly Epidemiol Rec* 2013;88(32):337–43.
- WHO. Introduction du vaccin antirubéoleux dans les programmes de vaccination nationaux: guide pas-à-pas; 2015. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204124> [Accessed 19.10.2018].
- WHO. Integrated Disease Surveillance and Response Technical Guidelines: Book-let two: Sections 1, 2 and 3; 2019a. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312317/WHO-AFWHE-CPI-01-2019-eng.pdf>. [Accessed 29.07.2020].
- WHO. Progress towards control and elimination of rubella and congenital rubella syndrome—worldwide, 2000–2018. *Wkly Epidemiol Rec* 2019b;94(40):449–56.
- Woyessa AB, Ali MS, Korkpor TK, Tuopileyi R, Kohar HT, Dogba J, et al. Rubella transmission and the risk of congenital rubella syndrome in Liberia: a need to introduce rubella-containing vaccine in the routine immunization program. *BMC Infect Dis* 2019;19(1):813. doi:10.1186/s12879-019-4464-7.
- Yoshikura H. Impact of population size on incidence of rubella and measles: comparison with that of other infectious diseases. *Jpn J Infect Dis* 2014;67(6):447–57.
- Zhang X, Ma SL, Liu ZD, He J. Correlation Analysis of Rubella Incidence and Meteorological Variables Based on Chinese Medicine Theory of Yunqi. *Chin J Integr Med* 2019;25(12):911–16.

## Résumé

La rubéole est une maladie aiguë en général bénigne. Elle est due au virus de la rubéole (Rubella virus ou RuV). Son importance en Santé Publique est principalement due au pouvoir tératogène du RuV pour le fœtus du fait de son infection in utero responsable d'accident de grossesse et du Syndrome de Rubéole Congénitale (SRC). Dans les pays qui n'ont pas encore introduit la vaccination, environ 103 000 cas surviennent par an surtout en Afrique et en Asie.

La mise en place de la surveillance de la rubéole et du SRC est demandée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avant l'introduction du vaccin combiné rougeole-rubéole (RR). Cette surveillance est faite dans le cadre du dépistage des cas suspects de rougeole. La République centrafricaine (RCA) est éligible pour l'introduction du vaccin combiné et notre travail se situe dans le cadre de la surveillance préparatoire à une demande d'introduction du vaccin RR.

Dans un premier temps, 831 sérums, récoltés entre 2015 et 2016 dans tout le pays, IgM négatifs ou équivoques pour la rougeole ont été testés pour la détection des IgM de la rubéole : 411 sérums étaient positifs. Les résultats ont aussi montré que les cas de rubéole surviennent de janvier à avril et en majorité chez les jeunes (50,4%, 5-9 ans). Dans un second temps, 350 de ces sérums, positifs en IgM pour la rubéole et répondant aux critères de prélèvement de l'OMS, ont été sélectionnés pour rechercher l'ARN de RuV par qRT-PCR, puis effectuer un séquençage pour la détermination du génotype. Nous avons ainsi pu obtenir le génotype pour 37 échantillons qui se répartissent en 3 groupes : 1E (n = 12), 1G (n = 5) et, seulement à partir de 2014, 2B (n = 20). Ces 3 génotypes correspondent à ceux les plus fréquemment retrouvés en Afrique.

Cette étude, menée selon les prescriptions de l'OMS, a confirmé l'endémicité du RuV en RCA, a permis d'en connaître l'épidémiologie et est un plaidoyer pour la mise en place du vaccin RR en RCA.

Mots-clés : Rubéole ; Rubella virus ; surveillance ; épidémiologie ; génotype ; République centrafricaine

## Abstract

Rubella is an acute infection, usually mild. It is due to the Rubella virus (RuV). It is a public health burden, mainly because of the teratogenicity of the RuV for the fetus when infection occurs in the first trimester of pregnancy responsible of miscarriage and the Congenital Rubella syndrome (CRS). In countries which have not introduced the vaccination, about 105000 cases of CRS occur per year mainly in Africa and Asia.

WHO asks that a surveillance of Rubella is in place before introducing the measles-rubella combined (MR) vaccine. This surveillance is associated with the diagnosis of measles. Central African Republic (CAR) is eligible for the introduction of the MR vaccine and this study was made in the frame of preparatory surveillance.

From 2015 to 2016, 831 sera IgM negative or undetermined for measles, from all over the country, were tested for Rubella IgM: 411 were IgM positive. Most cases of rubella occurred in January to April and in children (50.4%, 5-9). 350 of these sera, IgM positive, have been subjected to RuV RNA search using RT-PCR and if positive, to sequencing and genotyping. Genotypes were obtained for 37 samples. The 3 found genotypes are the same as the ones circulating in Africa: 1E (n = 12), 1G (n = 5) and, from 2014, 2B (n = 20).

This study, undertaken according to WHO prescriptions, has confirmed that the RuV is endemic in CAR, has permitted to know its epidemiology and is a plea to introduce the MR vaccine in the country.

Keywords: Rubella; Rubella virus; surveillance; epidemiology; genotype; Central African Republic