

LE VIRUS BOZO (ArB 7343) :  
UN NOUVEL ARBOVIRUS DU GROUPE BUNYAMWERA  
ISOLÉ EN RÉPUBLIQUE CENTRAFRICAINE ;  
SA TRANSMISSION EXPÉRIMENTALE  
PAR *Aedes aegypti*

par J.-F. Saluzzo <sup>(1)</sup> (\*), M. Germain <sup>(2)</sup>, M. Huard <sup>(1)</sup>, Y. Robin <sup>(3)</sup>,  
J.-P. Gonzalez <sup>(3)</sup>, J.-P. Hervé <sup>(2)</sup>, A.-J. Georges <sup>(1)</sup>, G. Heme <sup>(3)</sup>  
et J.-P. Digoutte <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Institut Pasteur, BP 923, Bangui (RCA),

<sup>(2)</sup> ORSTOM, BP 803, Bangui, et

<sup>(3)</sup> Institut Pasteur, BP 220, Dakar (Sénégal)

SUMMARY

BOZO VIRUS (ArB 7343): A NEW ARBOVIRUS  
OF THE BUNYAMWERA GROUP ISOLATED  
IN CENTRAL AFRICAN REPUBLIC;  
EXPERIMENTAL TRANSMISSION BY « *Aedes aegypti* »

Bozo virus (ArB 7343), a new arbovirus, was isolated in 1975 from a pool of 100 *Aedes opok* collected near the village of Bozo in a forest-gallery of semi-humid savannahs in the south of Central African Republic. Its group relation was established by complement fixation test within the Bunyamwera group; its distinctness from other Bunyamwera viruses was determined by neutralisation test.

Subsequently 55 strains were isolated from *Aedes gr. africanus* (52 strains) *Culex pruina* (2 strains) and *Anopheles funestus* (1 strain).

Transmission of Bozo in suckling mice by orally infected *A. aegypti* was demonstrated.

Virological and serological studies in the Bozo region established the existence of a selvatic cycle for Bozo virus in which principally *Aedes gr. africanus* and monkeys occur. The support mechanism which maintains the Bozo virus in the gallery-forests is discussed.

KEY-WORDS: Bozo virus, Arbovirus, *Aedes aegypti*; Central African Republic, Experimental transmission.

Manuscrit reçu le 28 octobre 1982, accepté le 2 avril 1983.

(\*) Demandes de tirés à part.

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 28672

Cote : B

## INTRODUCTION

Le groupe Bunyamwera comprend 18 arbovirus dont la plupart ont été isolés sur le continent américain. Quatre arbovirus de ce groupe ont été isolés en Afrique : Bunyamwera, Germiston, Ilesha et Birao, ainsi que le virus Shokwe non encore enregistré au catalogue des arbovirus.

En 1975, une souche virale ArB 7343 a été isolée en République Centrafricaine d'un lot de 100 *Aedes opok* (Corbet et Van Someren) capturés dans le secteur des savanes soudanaises, près du village de Bozo. Cette souche du groupe Bunyamwera a pu être facilement différenciée des autres virus de ce groupe au moyen de la réaction de séroneutralisation.

Cinquante-cinq souches de ce même virus ont été, par la suite, isolées dans cette région ainsi que dans le secteur des savanes préforestières et en forêt.

Nous rapportons la description de ce nouvel arbovirus, pour lequel nous proposons le nom de Bozo. Les propriétés virologiques et immunologiques, son aptitude à se multiplier et à être transmis par *Aedes (Stegomyia) aegypti* sont décrites.

La distribution géographique et l'origine vectorielle des 56 souches isolées ainsi que les résultats d'une enquête sérologique parmi les populations humaines de la RCA nous permettent de présenter l'écologie de ce nouveau virus.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) *Matériel entomologique.*

La quasi-totalité des moustiques ayant permis les isollements provient de galeries forestières situées à proximité des villages de Bozo (5°10 N, 18°30 E) et de Bouboui (4°36 N, 18°19 E), appartenant respectivement aux secteurs soudanais et préforestier (fig. 1). Les caractéristiques phytogéographiques et climatiques de ces régions ont été décrites de façon détaillée dans un précédent article [5]. En outre, une partie du matériel culicidien a été récoltée lors d'une mission à Lobé (3°48 N, 17°34 E), en zone forestière.

Les moustiques sont capturés individuellement dans des tubes de verre qui sont ensuite bouchés avec un tampon de coton. Ils sont alors identifiés sur le vivant ou après anesthésie et regroupés en lots monospécifiques de 30 individus. Ils sont conservés sur le terrain à  $-20^{\circ}\text{C}$ , puis stockés au laboratoire à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

2) *Inoculations intrathoraciques au moustique d'élevage.*

La technique utilisée est celle de Rosen et Gubler [7] modifiée par Coz et coll. [4]. Une souche de *A. aegypti* originaire de Bangui est utilisée à cet effet. Des moustiques adultes âgés de 48 h sont inoculés par injection intrathoracique. Cette technique a été utilisée d'une part pour les tentatives d'isolement d'arbovirus à partir de

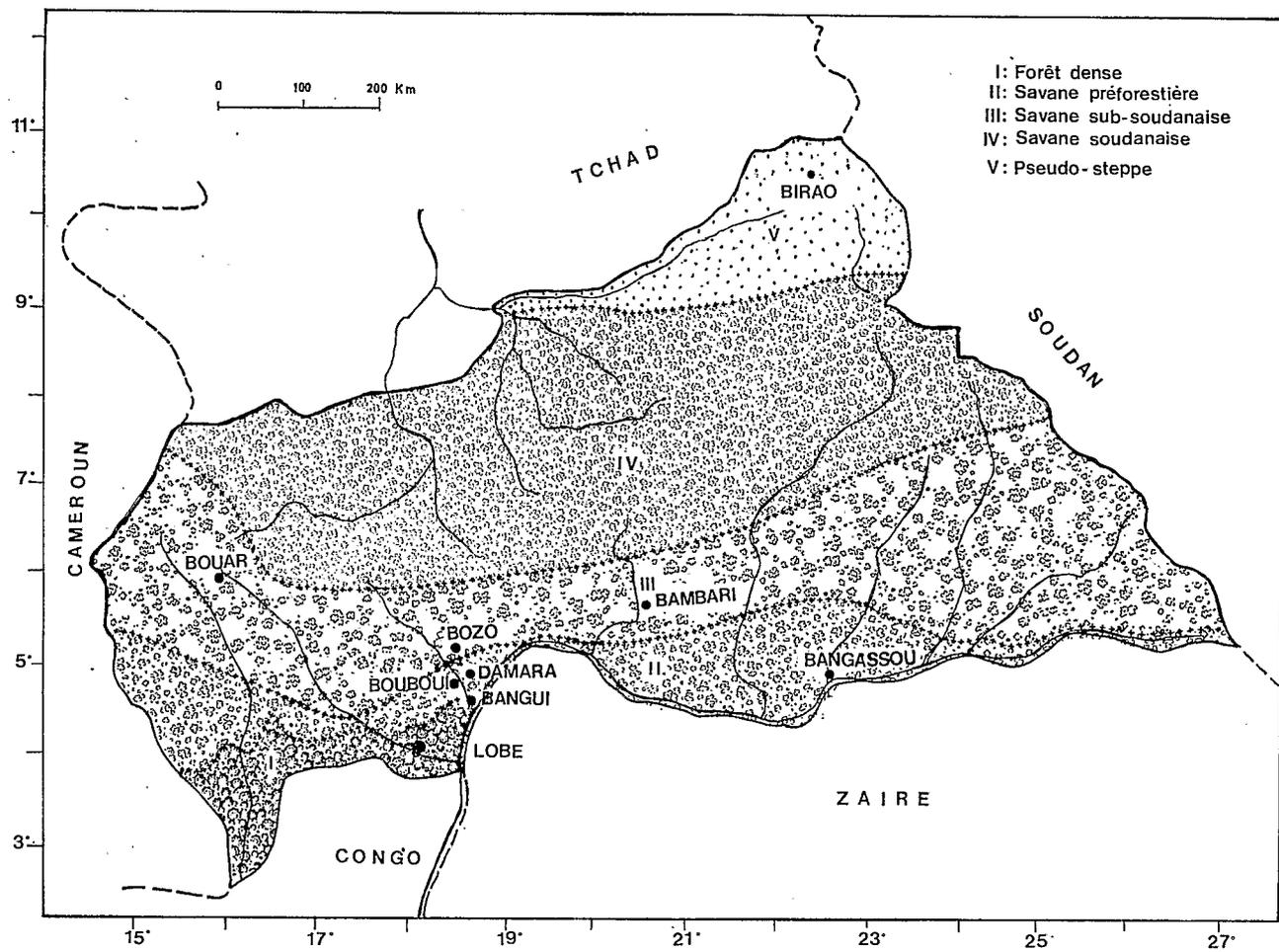


FIG. 1. — Carte des zones phytogéographiques de la République Centrafricaine.

broyats de moustiques et d'autre part, lors des expériences de multiplication et de transmission du virus.

### 3) *Multiplication et transmission expérimentale du virus par A. aegypti.*

La multiplication du virus Bozo chez *A. aegypti* a été réalisée avec le broyat initial de la souche ArB 14898 provenant d'un lot de *A. africanus* (Theo) selon le protocole qui suit. Trois cents moustiques sont inoculés par voie thoracique puis maintenus en survie dans une cage ; ils se nourrissent sur un tampon d'ouate imbibé de saccharose et sont maintenus dans une humidité de 85 à 90 % et à une température de  $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Des lots sont constitués à partir de la 24<sup>e</sup> heure et destinés au titrage sur souriceau. A cet effet, les lots sont broyés dans du liquide de Hanks albuminé (contenant des antibiotiques) afin d'obtenir une dilution de  $10^{-1}$ . Des dilutions de 10 en 10 sont ensuite inoculées par voie cérébrale à des souriceaux âgés de 24-48 h pour la détermination du titre par la méthode de Reed et Muench [6].

La transmission du virus d'un souriceau virémique à un souriceau sain par *A. aegypti* a été réalisée avec la souche ArB 17251. L'infection naturelle de *A. aegypti* a été réalisée en plaçant ceux-ci dans des gobelets de verre recouverts de gaze. Des souriceaux virémiques sont maintenus sur la gaze. Au bout de 4 à 5 h, on procède à la séparation des femelles gorgées. Celles-ci sont placées dans une cage et mises à pondre avant d'être présentées à des souriceaux nouveau-nés pour essai de transmission.

### 4) *Méthodes d'isolement.*

Les tentatives d'isolement ont été réalisées par inoculation aux souriceaux de 24 h. La technique de préparation des broyats et d'inoculation aux souriceaux est celle décrite par Cornet et coll. [3]. A partir de décembre 1978, les broyats qui s'avéraient négatifs par inoculation directe aux souriceaux ont été traités selon la technique d'enrichissement sur *A. aegypti*.

### 5) *Méthodes d'identification.*

La caractérisation et l'identification des souches ont été réalisées selon les techniques du laboratoire des Arbovirus de l'Institut Pasteur de Dakar.

### 6) *Méthodes sérologiques.*

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination a été réalisée selon la méthode de Clarke et Casals [2].

La réaction de fixation du complément (FC) a été réalisée selon la méthode LBCF en microtechnique [1].

La réaction de séroneutralisation a été effectuée selon deux techniques. 1) Les sérums humains non dilués et inactivés ont été mis en présence de 50-100 DL<sub>50</sub> de virus, pendant 1 h au bain-marie à 37° C avant l'inoculation de ces mélanges à une portée de 9 souriceaux. On a considéré comme positif tout sérum présentant un taux de protection d'au moins 80 %. 2) Les sérums de singe non dilués et inactivés ont été mis en présence des dilutions de virus de raison 10. Après une incubation de 1 h au bain-marie à 37° C, les mélanges ont été inoculés à des souriceaux. Le titre, établi par la méthode de Reed et Muench, a permis de déterminer l'indice de neutralisation.

Ces réactions sérologiques ont été appliquées d'une part aux sérums humains prélevés dans différentes zones phytogéographiques, d'autre part à des sérums de singes sentinelles *Cercopithecus aethiops tantalus* (Linné) placés dans les galeries forestières de la région de Bozo. Ces derniers ont fait l'objet d'un contrôle préalable, permettant de vérifier l'absence d'anticorps pour le virus Bozo.

## RÉSULTATS

1) *Isolement et passages.*

La souche prototype du virus Bozo a été isolée à partir d'un lot de 100 *A. opok* (lot numéro ArB 7343), récolté le 19 novembre 1975 dans une galerie forestière de la région de Bozo. Le lot a été inoculé le 9 décembre 1975.

L'isolement a été obtenu à partir d'un souriceau malade prélevé le 7<sup>e</sup> jour. La mortalité à l'isolement a été de 15 %. Dès le premier passage, le temps d'incubation était de 2 jours avec une mortalité de 100 %, comme pour les passages suivants. Il n'a pas été effectué de tentatives de réisolement de cette souche.

2) *Propriétés physiques et chimiques du virus.*

Les titrages et épreuves de sensibilité ont été réalisés sur le 5<sup>e</sup> passage.

Le virus Bozo filtre bien sur millipore de 200 nm (titre avant filtration 7,6 log DL<sub>50</sub>, titre après filtration 7,0 log DL<sub>50</sub>). Il est sensible au chloroforme avec une baisse de 3,1 log DL<sub>50</sub> après traitement.

3) *Pouvoir pathogène expérimental.*

Le titre d'une préparation standard de virus Bozo par inoculation au souriceau de 24 h par voie cérébrale est de 7,6 log DL<sub>50</sub>/0,02 ml avec un temps moyen de survie de 2 jours. Il est pathogène pour les souris de 21 jours inoculées par voie cérébrale (titre 5,5 log DL<sub>50</sub>) et non pathogène par voie péritonéale.

4) *Propriétés immunologiques.*

La souche ArB 7343 ne produit pas d'antigène hémagglutinant les globules rouges d'oise après extraction par la méthode saccharose-acétone. En FC, le même antigène réagit avec les ascites immunes du groupe Bunyamwera (tableau I). La réaction de séroneutralisation (tableaux II et III) permet de différencier le virus Bozo des autres virus du groupe Bunyamwera.

5) *Autres isolements du virus Bozo.*

Cinquante-cinq autres souches du virus Bozo ont été isolées (tableau IV). Elles proviennent de moustiques capturés dans trois zones phytogéographiques différentes : forêt (Lobé), savane préforestière (Bouboui) et savane subsoudanaise (Bozo). Toutes les souches ont été obtenues à partir de *Aedes* du groupe *africanus*, à l'exception de deux souches isolées de *Culex pruina* (Theo) et d'une souche isolée de *Anopheles funestus* (Giles). Les observations virologiques dans la région de Bozo sont mentionnées sur la figure 2.

La quasi-totalité de ces souches a été obtenue par inoculation directe des

TABLEAU I. — Réaction croisée de FC avec la souche ArB 7343 et les virus du groupe Bunyamwera (Institut Pasteur Bangui).

Ascites immunes	Antigènes			
	ArB 7343	Bunyamwera	Ilesha	Birao
ArB 7343	128/128 (*)	64/64	64/64	16/32
Bunyamwera	64/128	128/128	32/128	32/32
Ilesha	32/64	32/64	64/64	16/32
Birao	64/64	64/128	32/64	64/32

(\*) Titre de l'ascite immune/titre de l'antigène.

TABLEAU II. — Réaction croisée de séroneutralisation avec la souche ArB 7343 et les virus du groupe Bunyamwera (Institut Pasteur Bangui).

Ascites immunes	Virus				
	ArB 7343	Bunyamwera	Ilesha	Birao	Germiston
SLN (log titre)	6,9	9,25	6,0	6,5	6,0
ArB 7343	4,9 (*)	≤ 1,5	0,7	0,5	0,8
Bunyamwera	3,15	5,75	0,6	NT	NT
Ilesha	1,4	2,75	3,5	NT	NT
Birao	1,4	3,5	1,0	≥ 3,5	NT
Germiston	0,5	NT	NT	NT	5,5

(\*) Log 10 de l'indice de neutralisation.  
NT = non testé.

TABLEAU III. — Réaction croisée de séroneutralisation avec la souche ArB 7343 et les virus du groupe Bunyamwera (Institut Pasteur de Dakar).

Ascites immunes	Virus				
	ArB 7343	Bunyamwera	Ilesha	Shokwe	Birao
SLN (log titre)	7,6	8,0	7,7	7,7	5,5
ArB 7343	3,6 (*)	1,2	1,2	0,6	0,7
Bunyamwera	2,0	4,1	0,3	0,1	0,2
Ilesha	1,3	0,6	4,2	2,0	NT
Shokwe	1,0	NT	NT	4,1	NT
Birao	1,0	NT	NT	NT	3,8

(\*) Log 10 de l'indice de neutralisation.  
NT = non testé.

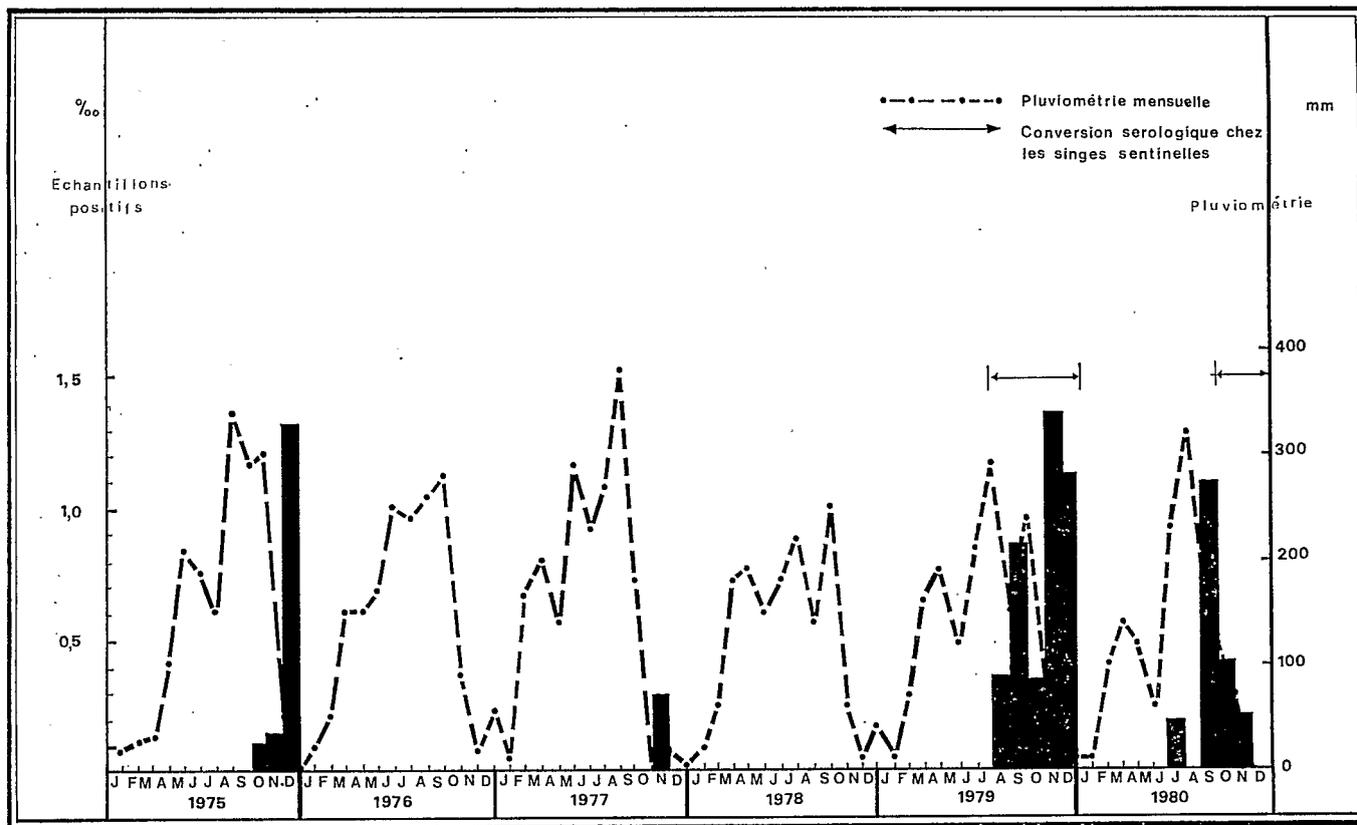


FIG. 2. — Détection du virus Bozo dans les galeries forestières de la région de Bozo par l'isolement des souches virales chez *A. gr. africanus* (colonnes noires = nombre de souches isolées pour mille moustiques) et/ou par la détection de conversions sérologiques chez les singes sentinelles.

TABLEAU IV. — Souches de virus Bozo isolées en République Centrafricaine.

Année	Mois	Espèce	Nb de souches	Provenance	
1975	10	<i>A. opok</i>	1	Bozo	
	11	<i>A. opok</i>	2	Bozo	
	12	<i>A. africanus</i>	2	Bozo	
1977	11	<i>C. pruina</i>	1	Lobé	
		<i>A. africanus</i>	1	Bozo	
1978	11	<i>C. pruina</i>	1	Bozo	
1979	8	<i>A. africanus</i>	1	Bozo	
	9	<i>A. africanus</i>	3	Bozo	
	10	<i>A. opok</i>	1	Bozo	
	11	<i>A. africanus</i>	5	Bozo	
	—	<i>A. opok</i>	1	Bozo	
	—	<i>A. gr. africanus</i>	11	Bozo	
	12	<i>A. africanus</i>	3	Bozo	
		<i>A. africanus</i>	1	Bouboui	
	1980	7	<i>A. africanus</i>	1	Bozo
		9	<i>A. africanus</i>	9	Bozo
		<i>A. opok</i>	2	Bozo	
10		<i>A. africanus</i>	4	Bozo	
—		<i>A. africanus</i>	1	Bouboui	
—		<i>A. funestus</i>	1	Bouboui	
11		<i>A. africanus</i>	2	Bouboui	
—		<i>A. africanus</i>	1	Bozo	
—		<i>A. opok</i>	1	Bozo	
			Total : 55		

broyats de moustiques aux souriceaux. Seules trois d'entre elles ont nécessité un enrichissement préalable sur *A. aegypti*.

Les propriétés physicochimiques et le pouvoir pathogène de ces 55 souches sont très voisines de celles de la souche prototype ArB 7343. L'identification de toutes ces souches a été réalisée par la réaction de séroneutralisation à l'Institut Pasteur de Dakar.

#### 6) Multiplication et transmission du virus Bozo par *Aedes aegypti*.

Dès la 48<sup>e</sup> h, le titre du virus Bozo chez *A. aegypti* infecté par voie thoracique est de 3,75 log DL<sub>50</sub>. Ce titre atteint 5,0 log DL<sub>50</sub> à partir de la 96<sup>e</sup> h et se maintient à ce niveau ( $\pm 0,4$  log DL<sub>50</sub>) jusqu'au 8<sup>e</sup> jour.

La transmission de souriceau virémique à souriceau sain, par l'intermédiaire de *A. aegypti*, a pu être établie du 3<sup>e</sup> jour jusqu'au 12<sup>e</sup> jour (fin de l'expérimentation) après infection naturelle de *A. aegypti*. La mortalité des souriceaux intervient entre le 6<sup>e</sup> et le 8<sup>e</sup> jour après la piqûre.

#### 7) Enquêtes sérologiques.

*Sérologie chez les singes sentinelles.* — Des conversions sérologiques chez des singes sentinelles placés dans la galerie de Bozo ont été observées au cours de la saison des pluies de 1979 et 1980 (fig. 2). Les résultats de la réponse immunitaire observée chez les singes sont mentionnés dans le

tableau V. Les observations effectuées chez les 2 singes nous permettent de conclure qu'après une probable infection due au virus Bozo la persistance des anticorps fixant le complément est probablement de courte durée. La surinfection expérimentale obtenue par inoculation de 10 000 DL<sub>50</sub>/1 ml par voie sous-cutanée au singe n° 1 (tableau V) provoque dès le 10<sup>e</sup> jour l'apparition d'anticorps inhibant l'hémagglutination de l'antigène Bunyamwera. Au cours de cette expérience, des anticorps fixant le complément

TABLEAU V. — Réponse immunitaire observée chez deux singes sentinelles placés dans la galerie forestière de Bozo après une probable infection par le virus Bozo.

Réaction	Antigène ou virus	Singe n° 1			Singe n° 2	
		07/1979	06/1980	Réponse après injection de 10 000 DL <sub>50</sub> (07/1980)	12/1980	04/1981
IHA	Bunyamwera	0	0	1/10	0	0
FC	Bozo	0	0	1/128	0	1/32
	Bunyamwera	0	0	1/128	NT	NT
	Ilesha	0	0	1/256	NT	NT
	Birao	0	0	1/64	NT	NT
SN	Bozo	0	4,2	3,5	0	3,6
	Bunyamwera	0	0,75	2,0	NT	NT
	Ilesha	0	0,25	0,25	NT	NT
	Birao	0	0,2	0,2	NT	NT

IHA = inhibition de l'hémagglutination.

FC = fixation du complément.

SN = séroneutralisation (résultat exprimé en log de l'indice de neutralisation).

NT = non testé.

TABLEAU VI. — Résultats de l'enquête sérologique réalisée au moyen de la réaction de séroneutralisation pour le virus Bozo.

Zone phytogéographique	Région ou ville	Nb de sérums testés	% de sérums positifs
Forêt	Basse Lobaye	80 non pygmées	15
		35 pygmées	25
Savane préforestière	Bangassou	46	15
		99	7,6
Savane subsoudanaise	Bozo	91	13
		50	0
Savane soudanaise	Bouar	50	0
Pseudo-steppe	Birao	61	3
Total		462	10,8

ont été décelés au 19<sup>e</sup> jour pour les différents antigènes testés du groupe Bunyamwera. La réaction de séroneutralisation après surinfection reste par contre spécifique. Ces observations nous ont fait retenir la réaction de séroneutralisation pour la réalisation d'enquêtes sérologiques visant à préciser l'incidence du virus Bozo.

*Enquêtes sérologiques chez l'homme.* — Les résultats des enquêtes sérologiques chez l'homme sont rapportés dans le tableau VI. Les sérums prélevés en Basse Lobaye (région de M'Baiki) proviennent de populations pygmées Aka et des populations non pygmées appartenant à l'ethnie Bantou.

## DISCUSSION

L'isolement de nombreuses souches virales identiques entre elles, obtenu à partir de vecteurs différents capturés dans des zones phytogéographiques variées, permet de conclure à l'authenticité de ce nouvel arbovirus. Les relations antigéniques étudiées au moyen de la réaction de FC apparentent ce virus au groupe Bunyamwera. Il peut être facilement différencié des autres virus de ce groupe au moyen de la réaction de séroneutralisation.

L'isolement de plusieurs souches de virus Bozo dans les galeries forestières de la région de Bozo au cours des années 1979 et 1980 et la mise en évidence, au cours de cette période, de conversions sérologiques chez les singes sentinelles permettent de conclure à l'existence d'un cycle selvatique faisant sans doute principalement intervenir les *Aedes gr. africanus* et les singes.

Les observations virologiques et sérologiques effectuées dans la région de Bozo de 1975 à 1980 (fig. 2) montrent que le virus peut se manifester suivant au moins deux modalités distinctes : d'une part sous forme de poussées à caractère épizootique très marqué (saison des pluies 1979 et 1980), d'autre part par une circulation à « bas bruit » mise en évidence par l'isolement d'une souche en 1977 (*A. africanus*) et d'une souche en 1978 (*Culex pruina*).

L'intervalle de 3 années qui a séparé les deux poussées à caractère épizootique peut correspondre au temps nécessaire au renouvellement de la population simienne non immune, nécessaire au processus d'amplification virale. On constate que des poussées épizootiques peuvent se produire deux années consécutives (1979-1980). Il est alors à remarquer qu'après une intense activité du virus en fin de la saison des pluies en 1979, le virus apparaît en 1980, plus précocement que l'année précédente. Une telle distribution des souches virales est en faveur du processus de la transmission transovarienne, tel qu'il existe pour d'autres Bunyavirus [8].

Le mécanisme du maintien à « bas bruit » du virus Bozo dans les galeries forestières au cours des années 1977 et 1978 répond probablement à des processus complexes faisant intervenir des hôtes vertébrés et/ou des vec-

teurs non encore connus. L'isolement du virus Bozo à partir de *C. pruina*, espèce exclusivement ornithophile, pourrait être en faveur de la ré-introduction périodique du virus dans la galerie forestière par l'intermédiaire d'un cycle oiseau-vecteur.

Ces observations traduisent l'existence de cycles complexes, complémentaires du cycle principal singe-*Aedes* gr. *africanus*, qui concourent à assurer le maintien du virus dans une zone phytogéographique donnée.

Les enquêtes sérologiques effectuées dans les populations humaines corroborent les isollements viraux et permettent de délimiter l'aire d'endémicité du virus Bozo au secteur forestier et préforestier ainsi qu'au secteur des savanes soudanaises.

### RÉSUMÉ

Un nouvel arbovirus, le virus Bozo (ArB 7343), a été isolé en 1975 à partir d'un lot de 100 *Aedes opok* récoltés près du village de Bozo, dans une galerie forestière des savanes semi-humides du Sud de la République Centrafricaine.

Les relations antigéniques du virus Bozo étudiées au moyen de la réaction de fixation du complément permettent de rattacher ce virus au groupe Bunyamwera. Il peut être facilement différencié des autres virus de ce groupe au moyen de la réaction de séroneutralisation.

Par la suite, 55 souches de ce même virus ont été isolées respectivement de *Aedes* gr. *africanus* (52 souches) de *Culex pruina* (2 souches) et de *Anopheles funestus* (1 souche).

La transmission du virus Bozo d'un souriceau virémique à un souriceau sain par l'intermédiaire de *A. aegypti* a été démontrée.

Les observations virologiques et sérologiques dans la région de Bozo permettent de conclure à l'existence d'un cycle selvatique pour le virus Bozo faisant intervenir principalement les *Aedes* gr. *africanus* et les singes. Le mécanisme d'entretien du virus Bozo dans les galeries forestières est discuté.

**MOTS-CLÉS :** Virus Bozo, Arbovirus, *Aedes aegypti*; République Centrafricaine, Transmission expérimentale.

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Professeur L. Chambon et le Docteur P. Bres pour les critiques et corrections qu'ils ont bien voulu porter à ce manuscrit.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] CASEY, H. L., Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to microtest. Public Health Monograph n° 74. US Government Printing Office, Washington.

- [2] CLARKE, D. H. & CASALS, J., Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1958, 7, 561-573.
- [3] CORNET, M., ROBIN, Y., CHATEAU, R., HEME, G., ADAM, C., VALADE, M., LE GONIDEC, G., JAN, C., RENAUDET, J., DIENG, P.-L., BANGOURA, J.-F. & LORAND, A., Isolements d'arbovirus au Sénégal Oriental à partir de moustiques (1972-1977) et notes sur l'épidémiologie des virus transmis par les *Aedes*, en particulier du virus amaril. *Cah. O. R. S. T. O. M., sér. Ent. méd. Parasit.*, 1979, 17, 149-163.
- [4] COZ, J., VALADE, M., CORNET, M., LEMOINE, M.-O. & LORAND, A., Utilisation du moustique pour la multiplication des arbovirus. *Cah. O. R. S. T. O. M., sér. Ent. méd. Parasit.*, 1977, 15, 209-212.
- [5] GERMAIN, M., SUREAU, P., HERVÉ, J.-P., FABRE, J., MOUCHET, J., ROBIN, Y. & GEOFFROY, B., Isolement du virus de la fièvre jaune à partir d'*Aedes* du groupe *A. africanus* (Theobald) en République Centrafricaine. Importance des savanes humides et semi-humides en tant que zone d'émergence du virus amaril. *Cah. O. R. S. T. O. M., sér. Ent. méd. Parasit.*, 1976, 14, 125-139.
- [6] REED, L. J. & MUENCH, H., A simple method of estimating fifty per cent end-points. *Amer. J. Hyg.*, 1938, 27, 493-497.
- [7] ROSEN, L. & GUBLER, The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 1974, 23, 1153-1160.
- [8] ROSEN, L., Transmission transovarienne des arbovirus par les moustiques. *Méd. Trop.*, 1981, 41, 23-29.
-