

ÉVALUATION DU RISQUE DE TRANSMISSION DU VIRUS DE L'ARTHRITE ENCEPHALITE CAPRINE (CAEV) PAR LES BIOTECHNOLOGIES DE LA REPRODUCTION

EVALUATION OF THE RISK OF CAEV (CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS VIRUS) TRANSMISSION VIA ASSISTED REPRODUCTION TECHNIQUES

Par Francis FIENI⁽¹⁾

Communication présentée le 23 mai 2014

RÉSUMÉ

Le virus de l'arthrite encéphalite caprine (CAEV) a été identifié dans les tissus de l'appareil génital mâle et femelle, dans la semence, dans les sécrétions utérines et vaginales et dans le liquide de lavage utérin lors de récoltes d'embryons. Un risque sanitaire lors d'inséminations artificielles (IA), de fécondations *in vitro* (FIV) et de transfert embryonnaire (TE) existe. Cependant, il a été démontré que la fraction spermatique de la semence, l'ovocyte dépourvu des cellules de la granulosa, l'embryon à zone pellucide intacte et lavé dix fois, prélevés chez des animaux naturellement infectés, étaient indemnes de CAEV. Ainsi en respectant des procédures précises, l'IA, la FIV et le TE présentent un risque négligeable de transmission du CAEV et il est démontré que le TE est utilisable comme technique de prophylaxie sanitaire.

Mots-clés : CAEV, risque sanitaire, insémination artificielle, fécondation *in vitro*, transfert embryonnaire, prophylaxie sanitaire.

SUMMARY

Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) has been identified in the tissues of male and female genital tract, in the semen, in uterine and vaginal secretions, and in embryo flushing medias. So a health risk is associated with artificial insemination (AI), In vitro fecundation (IVF) and embryo transfer (ET). However, it has been demonstrated that sperm fraction, oocytes free of granulosa cells, embryo with intact zona pellicida and after ten washing, take off from naturally infected goats are free of CAEV. So with the respect of definite process, IA, IVF and ET are associated with low level CAEV transmission risk and TE can be use as preventive health measure.

Key words: CAEV, sanitary risks, artificial insemination In vitro fecundation and embryo transfer, preventive health measure.

(1) Professeur agrégé, Dr Vet, Dr Sc, HDR, Dipl. ECAR, Directeur de l'équipe Sécurité Sanitaire des Biotechnologies de la Reproduction, ONIRIS (École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique), CS 40706-44307 Nantes CEDEX 3.
Courriel : francis.fieni@oniris-nantes.fr

INTRODUCTION

Chez les caprins l'insémination artificielle (IA) ou le transfert embryonnaire (TE) sont fréquemment utilisés pour augmenter la pression de sélection, produire des animaux d'élite, préserver les races en danger et surtout pour exporter le patrimoine génétique. Ce commerce international des gamètes et des embryons représente un risque potentiel de diffusion de maladie. En effet, les agents pathogènes, présents dans les voies génitales mâles et femelles, peuvent adhérer à la surface des spermatozoïdes, des cellules non spermatiques ainsi qu'à la zone pellucide de l'embryon (Quayle *et al.*, 1997 ; Wrathall & Suttmöller, 1998 ; Pudney *et al.*, 1999). Ce risque persiste dans le temps puisque la plupart des pathogènes résistent aux phénomènes physiques liés à la cryoconservation. Ainsi, la réalisation d'IA et de TE avec respectivement du sperme ou des embryons infectés est susceptible d'infecter les femelles ou leurs produits.

L'agent pathogène, de l'arthrite encéphalite caprine, appelé communément CAEV (pour Caprine Arthritis Encephalitis Virus), est un rétrovirus appartenant au genre *Lentivirus* (Crawford & Adams, 1981). Le CAEV provoque chez la chèvre une maladie grave à évolution lente, progressive et irréversible qui se traduit le plus souvent par des arthrites chroniques avec parfois des symptômes pulmonaires (pneumonie interstitielle) et/ou mammaires (mammites induratives). Chez les chevrettes entre deux et six mois, l'encéphalite est le symptôme le plus fréquemment observé.

Lorsqu'elle s'installe dans une zone de production, cette infection peut intéresser 80 à 95 % des cheptels caprins avec des conséquences économiques importantes liées à la chute de la production laitière, aux réformes anticipées et aux ralentissements des échanges (Greenwood, 1995). Ces restrictions peuvent aller jusqu'à l'annulation des ventes de reproducteurs et s'opposer au développement des biotechnologies de la reproduction en raison du risque de transmission du virus (Peretz & Cimarosti, 1990).

Les cellules de la lignée monocytes-macrophages sont la cible principale du CAEV *in vivo*. L'infection suit un cours irrégulier avec des périodes de latence, lorsque le virus est présent dans les monocytes sanguins à l'état de provirus et des périodes actives pendant lesquelles le virus se développe et se multiplie à partir des monocytes infectés qui se différencient en macrophages dans les tissus cibles (Zink & Johnson, 1994).

APPRÉCIATION DU RISQUE SANITAIRE

Risques liés à l'insémination artificielle

Le pro-virus de CAEV a été identifié dans le prépuce, le testicule, l'épididyme, les canaux déférents et les glandes vésiculaires de boucs naturellement infectés (Peterson *et al.*, 2008 ; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008b). En 2013, Lamara *et al.*, démontrent, *in vitro*, que les cellules de l'épididyme sont la cible de la réplica-

tion virale. Ces observations confirment que l'appareil génital mâle est un réservoir potentiel de CAEV susceptible d'infecter l'éjaculat.

L'examen de la semence de boucs, expérimentalement ou naturellement infectés, montre qu'elle peut contenir du pro-virus de CAEV (Travassos *et al.*, 1998 ; Travassos *et al.*, 1999). Des études plus récentes démontrent l'existence de l'ADN proviral de CAEV et de l'ARN viral dans le plasma séminal et dans la fraction cellulaire non spermatique (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008b). Cependant, aucune étude n'a identifié du CAEV au niveau de la fraction spermatique.

L'utilisation de semence de boucs naturellement infectés n'a pas permis d'observer de séroconversion chez les chèvres au cours des 18 mois suivant l'IA (Adams *et al.*, 1983). Cependant, sept jours après saillie naturelle avec un bouc naturellement infecté ou après insémination artificielle intra-utérine sous contrôle endoscopique avec de la semence infectée *in vitro*, il est possible d'identifier de l'ADN proviral de CAEV dans les sécrétions vaginales et utérines de chèvres indemnes (Ali Al Ahmad *et al.*, 2012a).

En conséquence, un risque de transmission du CAEV par l'IA est présent et des études complémentaires sont nécessaires pour en préciser la valeur.

Risques liés au transfert embryonnaire

L'analyse des différents tissus de l'appareil génital de chèvres donneuses d'embryons a permis de mettre en évidence de l'ADN proviral de CAEV dans les ovaires, les cellules de la corona radiata, l'oviducte et l'utérus (Fieni *et al.*, 2003 ; Ali Al Ahmad *et al.*, 2005) mais sans précision du type cellulaire infecté (monocytes/macrophages ou cellules épithéliales).

Lors de cultures *in vitro*, les cellules de la granulosa (Lamara *et al.*, 2001) comme les cellules épithéliales d'oviductes (Lamara *et al.*, 2002a) ont été démontrées permissives à la répllication du virus. *In vivo*, l'utilisation combinée de techniques d'immunofluorescence et d'hybridation *in situ* a permis de démontrer que les cellules épithéliales utérines étaient infectées par le CAEV (Ali Al Ahmad *et al.*, 2012b).

Il est important de souligner que l'infection par le CAEV de l'appareil génital de la chèvre n'est pas corrélée à la détection d'anticorps anti CAEV ou de l'ADN proviral dans les cellules mononucléées du sang périphérique (Fieni, résultats non publiés).

L'ADN proviral de CAEV (Fieni *et al.*, 2002) ainsi que l'ARN viral (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008a) ont été mis en évidence dans le milieu de récolte d'embryons de chèvres superovulées. Lors de sa vie intra-tubaire et intra-utérine, l'embryon est donc potentiellement en contact avec des cellules infectées par le CAEV.

Afin d'étudier le rôle de vecteur que pourrait jouer l'embryon caprin pour le CAEV, deux séries d'infection expérimentale ont été réalisées sur des embryons protégés ou non par la zone pellucide (Lamara *et al.*, 2002b). Cette étude confirme le rôle protecteur de la zone pellucide qui ne permet pas l'attachement du virus, et qui se trouve alors éliminée après deux lavages réali-

sés selon la procédure recommandée pour l'embryon bovin par l'international embryo transfert society (IETS). Elle démontre aussi que les embryons caprins de 8 à 16 cellules, sans membrane pellucide et infectés expérimentalement, sont susceptibles de transmettre le virus. De façon complémentaire, la permissivité au CAEV et l'aptitude à la réplication virale des cellules embryonnaires sont mises, *in vitro*, en évidence (Ali Al Ahmad *et al.*, 2006).

Ces différentes études indiquent l'existence d'un risque d'infection de l'embryon par le CAEV et de transmission de celui-ci lors de transferts embryonnaires. Elles soulignent aussi un risque lors de FIV lié à la sensibilité des cellules de la granulosa qui entourent l'ovocyte mais aussi des cellules épithéliales souvent utilisées lors de culture *in vitro* des embryons (Watson *et al.*, 1994.) Ces travaux mettent par ailleurs en évidence un certain nombre d'éléments qui concourent à la sécurité sanitaire du transfert embryonnaire et qui sont, soit directement liés à l'embryon (zone pellucide), soit en relation avec la technique utilisée (lavage des embryons).

ÉLÉMENTS DE SÉCURITÉ SANITAIRE

Lors de l'IA

Si la séroconversion d'une chèvre après saillie par un mâle infecté a été rapportée par Rowe *et al.*, (1992) aucune étude ne rapporte la transmission du CAEV suite à insémination artificielle.

L'étude de l'infection des différentes phases du sperme, récolté chez un bouc naturellement infecté, a montré que la phase spermatique obtenue par simple centrifugation sur gradient de saccharose était indemne de CAEV (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008b). Cette résistance des spermatozoïdes (SPZ) à l'infection CAEV pourrait être due, soit aux protéines épидидymaires qui protègent les gamètes mâles durant leur transit dans les voies génitales, soit simplement à l'absence de récepteur nécessaire à l'internalisation du virus sur la membrane des SPZ. La structure de ces récepteurs demeure à déterminer pour le CAEV. Chez l'homme, les récepteurs au VIH (Virus de l'immunodéficience acquise) sont connus (CD4, CCR5 et CXCR4) et il a été démontré que les spermatozoïdes ne les exprimaient pas (Quayle *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 1999). Ainsi, chez l'Homme, il est possible de préparer des doses de sperme fécondant, par centrifugation sur gradient, complétée par une technique de « swim up ».

Le risque de transmission du CAEV *via* l'IA apparaît donc faible. Cependant, les expérimentations sont actuellement trop peu nombreuses pour émettre un avis certain (Blacklaws *et al.*, 2004).

Lors de transfert embryonnaire

La membrane pellucide est une structure glycoprotéique qui entoure l'ovocyte à partir du stade de follicule secondaire, puis l'embryon jusqu'à J8-J9. Il a été clairement démontré que la zone pellucide de l'embryon caprin le protège contre une infection

in vitro de CAEV à une concentration de 10^4 TCID₅₀/ml et que ce virus n'adhère pas à cette structure, puisque qu'il est éliminé systématiquement par les cinq premiers lavages (Lamara *et al.*, 2002b ; Ali Al Ahmad *et al.*, 2006 ; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008a).

L'utilisation du transfert embryonnaire à des fins de prophylaxie sanitaire n'est possible que si le matériel cellulaire initial, c'est-à-dire l'ovocyte, est totalement indemne de l'agent pathogène ciblé. Après avoir constaté que les cellules de la granulosa qui entourent l'ovocyte pendant son développement ovarien et le début de son développement intra-oviductal, peuvent être naturellement infectées par le CAEV, Ali Al Ahmad *et al.*, (2005) ont démontré que l'élimination par lavages enzymatiques de ces cellules permet d'obtenir un ovocyte indemne d'infection virale.

Le caractère indemne des ovocytes caprins, la protection apportée par la membrane pellucide, la propriété de non-adhésion du CAEV à celle-ci et l'efficacité des lavages permettent de penser que les mesures sanitaires recommandées par l'International Embryo Transfert Society (IETS) pour l'embryon bovin, à savoir la sélection, pour le transfert ou la congélation, uniquement des embryons à zone pellucide intacte et ayant subi dix lavages (Stringfellow & Seidel, 1998), pourraient être utilisées pour produire, à partir de chèvres infectées par le CAEV, fécondées par de la semence certifiée indemne, des embryons indemnes de CAEV qui, transférés chez des receveuses indemnes, donneraient des chevreaux indemnes de CAEV.

UTILISATIONS SANITAIRES DES BIOTECHNOLOGIES DE LA REPRODUCTION

Utilisation du TE pour la production d'embryon indemnes de CAEV avec de la semence infectée

L'utilisation de semence infectée *in vitro* (10^4 TCID₅₀/mL) pour l'insémination artificielle intra-utérine sous contrôle endoscopique de 14 chèvres superovulées, permet d'obtenir, après lavages, 49 embryons indemnes de CAEV, alors que l'ADN proviral de CAEV est détecté le jour de la récolte dans 8/14 frotis vaginaux et 9/14 liquides de récolte des embryons. Cette étude confirme que l'IA, avec de la semence infectée par le CAEV, est susceptible de transmettre ce virus dans l'utérus des femelles inséminées mais aussi que, quelque soit l'état sanitaire de la semence, il est possible d'obtenir des embryons indemnes de CAEV (Ali Al Ahmad *et al.*, 2012a).

Utilisation de la FIV pour la production d'embryons indemnes de CAEV avec de la semence infectée

La possibilité d'obtenir des embryons par FIV, en présence de CAEV et à partir de sperme infecté *in vitro* a été éprouvée par utilisation de 789 ovocytes. Le sperme est infecté *in vitro* avec 10^5 TCID₅₀/ml de CAEV pendant la phase de maturation (30 min à 38,5 °C), puis mis en présence des ovocytes pendant

18h00 à 38,5°. La phase de fécondation se réalise donc en présence de CAEV à une concentration de 10^4 TCID₅₀/ml. Les embryons sont finalement lavés 12 fois, puis mis en culture.

Pour les 5 répétitions de l'expérience, le diagnostic par biologie moléculaire n'a révélé ni l'ADN proviral, ni l'ARN viral dans les lots d'embryons comme dans les bains de lavages à partir du quatrième bain (Fieni *et al.*, 2012).

Cette étude démontre que la présence de CAEV lors de la phase de fécondation des ovocytes n'entraîne pas l'infection des embryons et qu'il est possible de produire, par FIV, avec de la semence infectée *in vitro*, des embryons indemnes de CAEV. Soulignons que pour prévenir toutes transmissions virales, si le statut des donneurs d'ovocytes est inconnu, il convient d'utiliser des ovocytes protégés par une zone pellucide intacte, après élimination de la totalité des cellules de la corona radiata, et lavés selon les recommandations de l'IETS.

Utilisation du TE pour la production de chevreaux indemnes de CAEV issus de mères infectées

Le but de cette étude était de confirmer *in vivo*, en station expérimentale, sur un nombre significatif d'opérations de transfert, réalisées à partir de donneuses à risque sanitaire maximal, c'est-à-dire hébergeant le CAEV dans leur appareil génital, l'efficacité des procédures recommandées par l'IETS pour produire des chevreaux indemnes de CAEV (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008a).

Vingt-trois chevreaux, dont 16 ont été suivis jusqu'à la fin de l'étude (4 mois), ont été obtenus par récolte d'embryons, chez des chèvres dont l'utérus était infecté par le CAEV, et transferts de ces embryons sur des chèvres indemnes.

Lors de chaque collecte (30/30) l'ARN viral de CAEV a été identifié par RT-PCR dans les trois premiers bains de lavage des embryons avant congélation. Par contre, aucun des prélèvements (sang, lochies, tissus) réalisés chez les 16 chèvres receveuses 10 jours avant, pendant et 10 jours après la parturition et chez les 16 chevreaux, euthanasiés à l'âge de 4 mois (sang, tissus) avant et après immunodépression n'a permis d'identifier par PCR, l'ADN proviral de CAEV. Cette étude, réalisée dans les conditions de la pratique courante du transfert embryonnaire, dans un contexte infectieux extrême et avec des techniques diagnostiques sensibles, associée à un protocole d'immunosuppression facilitant la répllication virale si le CAEV était présent à l'état latent, a montré clairement que le transfert embryonnaire peut être un moyen efficace pour produire des chevreaux indemnes de CAEV provenant de mères à haut

potentiel génétique mais issues de troupeaux très infectés, où l'éradication du CAEV se révèle très compliquée, voire impossible.

Ces résultats confirment et renforcent ceux des deux études précédentes de Wolf *et al.*, (1987) et Cavalcante *et al.*, (1998) qui n'observent pas chez des chevreaux, issus de transfert embryonnaire, à partir de donneuses séropositives et/ou exprimant cliniquement la maladie, de séroconversion, respectivement à quatre et six mois d'âge.

CONCLUSION

Ces différentes études démontrent que, si le risque de transmission du CAEV par les biotechnologies de la reproduction est patent, des techniques de traitements spécifiques des spermatozoïdes, des ovocytes et des embryons permettent, même s'ils ont été prélevés chez des animaux infectés, de les utiliser avec un risque minime et acceptable.

Ainsi, une fraction spermatique indemne sera obtenue par centrifugation sur gradient complétée par une phase de « swim up ». Dans le cadre de l'élevage français où les donneurs de semence sont nécessairement sains, cette procédure est intéressante pour conserver en cryobanques du patrimoine génétique de races menacées, à partir de semence de boucs issus d'élevages éventuellement infectés. Un contrôle ultérieur de la qualité sanitaire par échantillonnage pourra être réalisé sur les paillettes congelées. La semence infectée peut aussi être utilisée pour la FIV d'ovocytes provenant d'animaux infectés ou sains, à condition que ces ovocytes soient totalement dépourvus des cellules de la granulosa qui les entourent. En dernier lieu, sans préjuger du risque d'infection des donneuses d'embryons, la semence infectée peut être utilisée chez des donneuses saines ou infectées pour produire des embryons.

En ce qui concerne la voie femelle, l'obtention de chevreaux indemnes de CAEV à partir d'embryons prélevés sur des chèvres infectées et transférés chez des receveuses saines est possible, à condition d'appliquer à ces embryons les procédures sanitaires définies par l'IETS pour les embryons bovins c'est-à-dire le transfert d'embryons de bonne qualité, avec une membrane pellucide intacte et lavés 10 fois.

Soulignons que la répétition des expérimentations est nécessaire, pour valider les procédures d'utilisation par IA de la semence de boucs infectés. En revanche, le transfert embryonnaire caprin est, dès à présent, intégré et intégrable dans un programme de prophylaxie sanitaire du CAEV chez la chèvre.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie les personnels et les directeurs des équipes d'Oniris (École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation, Nantes atlantique), de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), de l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail), du CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) et de UC DAVIS (Université de Californie, Davis, USA) qui ont participé à la genèse des résultats présentés dans cet article et dont les noms sont associés au sien dans les références bibliographiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams DS, Kleyjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 1983;44(9):1670-5.
- Ali Al Ahmad MZ, Chebloune Y, Bouzar BA, Baril G, Bouvier F, Chatagnon G, Leboeuf B, Pepin M, Guibert JM, Russo P, Manfredi E, Martin J, Fieni F. Lack of risk of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) after an appropriate embryo transfer procedure. *Theriogenology* 2008a;69:408-15
- Ali Al Ahmad MZ, Chebloune Y, Chatagnon G, Pellerin JL, Fieni F. Is Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) transmitted vertically to early embryo development stages (Morulae or Blastocyst) via in vitro infected frozen semen? *Theriogenology* 2012a (77),8: 1673-1678.
- Ali Al Ahmad MZ, Dubreil L, Chatagnon G, Khayli Z, Theret M, Martignat L, Chebloune Y, Fieni F. Goat uterine epithelial cells are susceptible to infection with Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) *in vivo*. *Vet Research*, 2012b, 43 :5.
- Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Guiguen F, Larrat M, Pellerin JL, Roux C, Chebloune Y. Cultured goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus. *Virology* 2006;353:307-15.
- Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Martignat L, Chatagnon G, Baril G, Bouvier F, Chebloune Y. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology* 2005;64: 1656-66.
- Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Pellerin JL, Guiguen F, Cherel Y, Chatagnon G, Bouzar AB, Chebloune Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology* 2008b; 69:473-80.
- Blacklaws BA, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Watt NJ, de Andres D, Klein D, Harkiss GD. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* 2004;101:199-208.
- Cavalcante TV, Salles HO, Freitas VJF. Ovulatory response and embryo production after superovulatory treatment in goats seropositive for caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV): Preliminary results. 14^e meeting of European Embryo transfer association. Venise, 11-12 September 1998;136, abstract.
- Crawford T.B., Adams D.S., (1981). Caprine arthritis-encephalitis virus: clinical features and presence of antibody in selected goat population. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 178, 713-719.
- Fieni F, Pellerin JL, Roux C, Poulin N, Baril G, Fatet A, Valas S, Chatagnon G, Mermillod P, Guignot F. Can caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) be transmitted by in vitro fertilization with experimentally infected sperm?. *Theriogenology* 2012, 77:644-651.
- Fieni F, Rowe J, Van Hoosear K, Burucoa C, Oppenheim S, Anderson G, Murray J, Bondurant R. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. *Theriogenology* 2002;57(2):931-40.
- Fieni F, Rowe J, Van Hoosear K, Burucoa C, Oppenheim S, Anderson G, Murray J, Bondurant R. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology* 2003;59(7): 1515-23.
- Greenwood P.L., (1995). Effects of arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Austr. *Prev. Vet. Med.*, 22, 71-87.
- Kim LU, Johnson MR, Barton S, Nelson MR, Sontag G, Smith JR, Gotch FM, Gilmour JW. Evaluation of sperm washing as a potential method of reducing HIV transmission in HIV-discordant couples wishing to have children. *AIDS* 1999;13(6):645-51.
- Lamara A, Fieni F, Chatagnon G, Larrat M, Dubreil L, Chebloune Y. Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured 1 epididymal cells from goats. *CIMID* 2013 , 36 :397-404.
- Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhal L, Chatagnon G, Bruyas JF, Tainturier D, Battut I, Fornazero C, Chebloune Y. Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology* 2002b;58(6):1153-63.
- Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhal L, Tainturier D, Chebloune Y. Efficient replication caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Res* 2001;79:165-72.
- Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhal L, Tainturier D, Chebloune Y. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Res.* 2002a;87(1):69-77.
- Peretz G., Cimarosti I., (1990). Conséquences de l'arthrite encéphalite caprine sur la production laitière. Résumé de la 41^e réunion de la Fédération Européenne de Zootechnie, 2, 164-165.
- Peterson K, Brinkhof J, Houwers DJ, Colenbrander B, Gadella BM. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology* 2008;69:433-42.
- Pudney J, Nguyen H, Xu C, Anderson DJ. Microscopic evidence against HIV-1 infection of germ cells or attachment to sperm. *J Reprod Immunol* 1999;44:57-77.
- Quayle AJ, Xu C, Mayer KH, Anderson DJ. T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. *J Infect Dis* 1997; 176(4):960-8.
- Rowe JD, East NE, Franti CE, Thurmond MC, Pederson NC, Theilen GH. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. *Am J Vet Res* 1992;53:2396-403.
- Stringfellow DA, Seidel SM. Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd Edition, Champaign, IL, IETS. Illinois, USA. 3. 1998. 170p.
- Travassos C, Benoît C, Valas S, da Silva A, Perrin G. Detection of caprine arthritis encephalitis virus in sperm of experimentally infected bucks. *Vet Res* 1998;29:579-84.
- Travassos CE, Benoît C, Valas S, da Silva AG, Perrin G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rum Res* 1999;32:101-06.
- Watson AJ, Watson PH, Warnes D, Walker SK, Armstrong DT, Seamark RE. Pre-implantation development of in vitro matured and in vivo fertilized ovine zygotes: comparison between co-cultured on oviductal epithelial monolayers and culture under low oxygen atmosphere. *Biol Reprod* 1994;50:715-24.
- Wolf DF, Nusbaum KE, Lauerman LH, Mysinger PW, Ridell MG, Putnam MR, Shumway LS, Powe TA. Embryo transfer from goats seropositive for caprine arthritis-encephalitis virus. *Theriogenology* 1987;28:307-16.
- Wrathall AE, Suttmöller P. Potential of embryo transfer to control transmission of disease. In: Stringfellow DA, Seidel SM. (Eds.). Manual of the International Embryo Transfer Society, 3rd ed., 1998, p.17-44.
- Zink M.C., Johnson L.K., (1994). Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Research*, 32, 139-154.

