

Le transfert embryonnaire chez la chèvre : un outil de gestion du risque de transmission du virus de l'arthrite encéphalite caprine (CAEV)

FIENI F. (1), ALI AL AHMAD M. Z. (1), LAMARA A. (1), BOUZAR B.A. (2), BARIL G. (3), BOUVIER F. (4), CHATAGNON G. (1), LEBOEUF B. (5), PEPIN M. (6), GUIBERT J.M. (7), RUSSO P. (7), MANFREDI E. (8), MARTIN J. (9), CHEBLOUNE Y.(2,10)

(1) UP Risques sanitaires liés aux biotechnologies de la reproduction ENVN, (2) INRA, Département de pathologie animale, (3) INRA, UMR85 Physiologie de la reproduction et des comportements - Nouzilly, (4) INRA Unité expérimentale caprine, Bourges, (5) INRA de Rouillé, (6) AFSSA Lyon, (7) AFSSA Sophia Antipolis, (8) UR631-INRA de Toulouse, (9) Station caprine de Moissac, (10) MMD Labs, Kansas University of Medical Center, USA.

RÉSUMÉ - Le virus de l'arthrite encéphalite caprine (CAEV) a été identifié 1) dans les tissus de l'appareil génital de chèvres infectées et donneuses d'embryons et 2) dans les liquides de récoltes d'embryons. En absence de membrane pellucide, l'embryon caprin, infecté in vitro, est susceptible d'être vecteur du CAEV. Les blastocystes sont sensibles / permissifs au virus et permettent la réplication du CAEV. L'embryon caprin, infecté in vitro, et protégé par la membrane pellucide n'est pas en revanche vecteur du CAEV. Le CAEV n'adhère pas à la membrane pellucide et est éliminé après quatre lavages. Après lavage et élimination des cellules de la granulosa, l'ovocyte est indemne de CAEV alors même que les cellules de la granulosa qui l'entourent peuvent être infectées.

Une étude de terrain réalisée dans un contexte infectieux extrême a démontré que l'application des procédures sanitaires définies par l'*International Embryo Transfer Society* (IETS) pour les embryons bovins c'est-à-dire transfert d'embryons de bonne qualité avec une membrane pellucide intacte et lavés dix fois, permet la production de chevreaux indemnes de CAEV à partir de mères infectées.

Goat embryo transfer: a tool to control the transmission risk of CAEV

FIENI F. (1), ALI AL AHMAD M. Z. (1), LAMARA A. (1), BOUZAR B.A. (2), BARIL G. (3), BOUVIER F. (4), CHATAGNON G. (1), LEBOEUF B. (5), PEPIN M. (6), GUIBERT J.M. (7), RUSSO P. (7), MANFREDI E. (8), MARTIN J. (9), CHEBLOUNE Y.(2,10)

(1) UP Risques sanitaires liés aux biotechnologies de la reproduction ENVN BP 40706, 44307 NANTES CEDEX 03 - fieni@vet-nantes.fr

SUMMARY : The presence of CAEV-infected cells has been demonstrated in the goat genital tract and in flushing media. Experimentally infected embryos without zona pellucida, are able to transmit CAEV. Blastocyst cells are susceptible to infection by CAEV and allow the replication of the virus. In contrast, intact zona pellucida protects the embryo against CAEV in vitro infection. Experimentally infected embryos with zona pellucida are not able to transmit CAEV. CAEV does not bind to the zona pellucida and is excluded after 4 washings with culture media. After washing and removal of the cumulus cells, Oocytes from CAEV-infected goats do not carry virus particles, whilst the cells of the surrounding cumulus can be infected. A field trial study with acute conditions for infection demonstrates that the use of the sanitary protocol recommended by the International Embryo Transfer Society (IETS) for bovine embryos, (ie) transfer of good quality embryo with intact zona pellucida and washed ten times with culture media allows to produce CAEV-free kids from CAEV-infected biological mothers.

INTRODUCTION

Le transfert embryonnaire est une méthode artificielle de reproduction permettant de diffuser le patrimoine génétique par la voie femelle. Pour des raisons économiques il est utilisé chez la chèvre pour produire des animaux d'élite mais aussi et surtout pour l'exportation du patrimoine génétique. L'embryon congelé permet sous un faible volume d'exporter de très nombreux animaux qui bénéficieront dans le pays de destination et à la naissance de la protection colostrale de la mère contre les risques infectieux autochtones. Protégé par la membrane pellucide, l'embryon constitue généralement un matériel génétique pourvu d'une grande qualité sanitaire intrinsèque (Guerin *et al.*, 1997). Néanmoins, en permettant le transport de cellules mais aussi de sécrétions génitales de la femelle donneuse aux femelles receveuses, le transfert embryonnaire peut aussi être un vecteur de micro-organismes et donc de diffusion d'infections.

Chez la chèvre, l'arthrite encéphalite virale est une pathologie dont l'importance est fonction du degré d'industrialisation du pays et de l'intensification de l'élevage. L'agent pathogène, appelé communément CAEV (pour *Caprine Arthritis Encephalitis Virus*), est un rétrovirus

appartenant au genre *Lentivirus*, (Crawford et 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 chez les chèvres adultes avec parfois des symptômes pulmonaires (pneumonie interstitielle) et / ou mammaires (mammite indurative). Chez les chevrettes de deux à 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 et Cimarosti, 1990).

L'objectif de cet exposé est de présenter les facteurs de risques dus au CAEV lors de transfert d'embryonnaire et d'analyser les éléments de sécurité sanitaire liés à cette technique afin de déterminer si elle peut être utilisée comme moyen de prophylaxie sanitaire.

1. ÉVALUATION DU RISQUE SANITAIRE LORS DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE

Les cellules de la lignée monocytes-macrophages sont la cible principale du CAEV *in vivo*. Dans cette population cellulaire la réplication du virus a lieu lors de la différenciation des monocytes en macrophages (Narayan *et al.*, 1983). 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 (= ADN viral inséré dans le génome de la cellule infectée), 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 et Johnson, 1994). Des transcrits viraux ont aussi été isolés dans d'autres types cellulaires, parmi lesquels les cellules de type endothélial et épithélial de différents organes : aorte, glande mammaire, rein, tube digestif. (Zink *et al.*, 1990, Le Jan *et al.*, 2000).

Tenant compte de ce tropisme viral le premier élément d'évaluation du risque a été de diagnostiquer la présence du CAEV dans les tissus de l'appareil génital et / ou dans les liquides de récolte des embryons.

1.1. INFECTION DE L'APPAREIL GENITAL PAR LE CAEV

L'analyse des différents tissus de l'appareil génital de chèvres donneuses d'embryons par PCR nichée (Guiguen *et al.*, 2000), a permis de mettre en évidence de l'ADN proviral de CAEV, dans les ovaires, l'oviducte et l'utérus (Fieni *et al.*, 2003). Il est important de souligner que l'infection par le CAEV de l'appareil génital n'est pas corrélée à la détection d'anticorps anti CAEV ou de l'ADN proviral dans les cellules mononuclées du sang périphérique. Si *in vivo*, aucune étude actuellement n'a permis de mettre en évidence une infection des cellules épithéliales de l'appareil génital, *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 réplication du virus.

1.2. PRESENCE DE CAEV DANS LES LIQUIDES DE RECOLTE DES EMBRYONS

Lors de la récolte d'embryon chez quatre-vingt-neuf chèvres superovulées dont vingt-cinq présentaient de l'ADN proviral dans le sang, l'ADN proviral de CAEV a été mis en évidence dans le milieu de récolte de 11 d'entre elles (Fieni *et al.*, 2001).

1.3. ROLE DE VECTEUR DE CAEV DE L'EMBRYON

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 de chèvres récoltés à J4 ou J5 (Lamara *et al.*, 2002b).

La première série a concerné soixante dix-huit embryons de huit à seize cellules dont la zone pellucide a été éliminée par un traitement à la pronase (1 %) et la seconde série a concerné cinquante-neuf embryons dont la zone pellucide était restée intacte. Chaque groupe d'embryons a été expérimentalement infecté par incubation pendant deux heures dans un milieu contenant 10^4 TCID₅₀ / ml de CAEV-pBSCA. Deux lots témoins contenant respectivement cinquante et quarante embryons et non infectés ont été inclus dans l'étude. Les embryons ont été lavés cinq fois. Chaque

lavage représentait une dilution supérieure au 1/100 et les pipettes à usage unique ont été changées entre chaque bain. Les embryons infectés et témoins avec et sans zone pellucide ont ensuite été cultivés pendant soixante douze heures sur un tapis cellulaire mixte constitué de 80 % de cellules épithéliales d'oviducte caprin (support du développement embryonnaire *in vitro*) et 20 % de cellules synoviales caprines (cellule sensible à l'infection par le CAEV). Après six jours de culture, le tapis cellulaire a été fixé pour rechercher l'existence d'effets cytopathiques caractéristiques de l'infection virale. La recherche du CAEV dans les milieux de lavage a été réalisée par inoculation de culture de cellules synoviales caprines et examinées après six jours pour la recherche d'effets cytopathiques.

Aucun effet cytopathique n'a été observé pour les tapis correspondant à la culture d'embryons témoins non infectés et d'embryons infectés *in vitro* à zone pellucide intacte. Dans ce dernier cas, seuls les deux premiers bains de lavage ont été infectés (4/4 répétitions). En revanche, des effets cytopathiques caractéristique de la présence de CAEV (cellules géantes multinuclées) ont été observés pour les 4/4 tapis correspondant à la culture des embryons infectés *in vitro* sans membrane pellucide.

Cette étude démontre que les embryons caprins de huit à seize cellules, sans membrane pellucide et infectés expérimentalement, sont susceptibles de transmettre le virus. Elle confirme aussi le rôle protecteur de la zone pellucide qui ne permet pas l'attachement du virus, et qui se trouve alors éliminé après deux lavages.

1.4. SENSIBILITE DES BLASTOCYTES A L'INFECTION CAEV

La précédente étude a permis de déterminer que le CAEV pouvait être transporté par les cellules embryonnaires mais elles ne donnent pas d'indication quant à la susceptibilité de ces cellules à l'infection virale.

Pour répondre à cette question, quarante et un blastocystes dépellucidés, issus de six jours de co-culture dans un insert sur un tapis cellulaire mixte infecté et produisant en moyenne 10^5 TCID₅₀ / ml de CAEV-pBSCA ont été lavés dix fois et les milieux de lavage congelés. Vingt blastocystes dépellucidés ont été utilisés comme témoins et cultivés sur un tapis mixte mais non infecté. Après lavage et pendant six heures, 28/41 blastocystes infectés ont été cultivés, dans un insert sur un tapis de cellule synoviale caprine (cellules indicatrices) indemne de virus et 13/41 blastocystes ont été mis directement en contact d'un tapis cellulaire de même composition. Les effets cytopathiques caractéristiques de l'infection virale ont été recherchés sur les tapis de cellules indicatrices pendant cinq semaines. Les vingt-huit blastocystes cultivés en insert ont ensuite été lavés puis mis en culture dans un milieu acellulaire pendant vingt-quatre heures. La production virale a été appréciée par titrage du milieu de culture. Enfin ces mêmes embryons ont été trypsinés puis cultivés à plat pendant quatre à huit jours afin de rechercher la présence par immunocytochimie de la protéine P28 de la capsid, par PCR d'ADN proviral et par RT-PCR d'ARN viral (Ali Al Ahmad, 2006).

L'ARN viral a été détecté par RT-PCR dans les quatre premiers bains de lavage des embryons infectés. Par contre la recherche de l'ARN viral a été négative pour tous les échantillons du groupe contrôle. Après lavage, une co-culture dans un insert (vingt-huit blastocystes) ou directe (treize blastocystes) des embryons avec des cellules synoviales

caprines saines indicatrices ont été utilisés pour révéler la présence du CAEV. Après six heures de co-culture l'ARN viral a été identifié par RT-PCR dans le milieu de culture et des effets cytopathiques caractéristiques de l'infection virale ont été visualisés sur les cellules indicatrices à l'issue de la quatrième semaine. Après lavage et vingt-quatre heures de culture en milieu acellulaire le titre viral mesuré varie de $10^{3.25}$ TCID₅₀ / ml à $10^{4.5}$ TCID₅₀ / ml. Enfin, la culture à plat a permis de confirmer la présence d'ARN viral ainsi que la production d'ADN-proviral et l'expression de la protéine constitutive de la capsid dans les blastomères.

Cette expérimentation démontre clairement la permissivité et l'aptitude à la réplication virale des cellules embryonnaires caprines à l'infection par le CAEV.

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 transfert embryonnaire. Elles mettent aussi 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 (lavage des embryons).

2. ÉLÉMENTS DE SÉCURITÉ SANITAIRE

2.1. MEMBRANE PELLUCIDE

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. Nous avons clairement démontré (Lamara *et al.*, 2002b) 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 éliminé par les premiers lavages.

2.2. LAVAGES DES EMBRYONS

En effet, plusieurs études ont prouvé que le virus du CAEV, même présent à des concentrations très importantes ($\pm 10^4$ TCID₅₀ / ml), était éliminé par des lavages en série avec du milieu de culture, chaque lavage représentant une dilution au 1/100. L'absence de virus dans le milieu de lavage a été constatée à partir du troisième (Lamara *et al.*, 2002b) ou du cinquième bain de lavage (Ali Al Ahamad *et al.*, 2006).

2.3. STATUT INDEMNES DES GAMETES FEMELLES

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.

Pour vérifier cette condition dans le cas du CAEV et compte tenu du fait que les chèvres donneuses peuvent être infectées au niveau de l'appareil génital, deux cent quarante-six ovaires ont été prélevés à l'abattoir. Les complexes cumulus-ovocyte ont été récoltés par ponction des follicules présents à la surface de l'ovaire puis lavés dix fois. Pour les cent quatre-vingt-dix premiers ovaires, les ovocytes ont été répartis en deux lots par ovaires. Le premier lot était constitué d'ovocytes entourés de leur cumulus. Les ovocytes du second lot ont été débarrassés des cellules du cumulus par un traitement à la hyaluronidase puis lavés dix fois. Pour les cinquante six derniers ovaires, tous les ovocytes ont été séparés individuellement des cellules du cumulus, lavés dix fois, puis ils ont été regroupés en un seul lot.

L'examen par PCR de l'ADN des cellules mononuclées du sang périphérique a montré que 75/123 (61 %) des chèvres

étaient infectées par le CAEV. La recherche d'ADN proviral a été positive pour 42/190 lots d'ovocytes avec cumulus prélevés sur les cent quatre-vingt-dix premiers ovaires et pour 22/56 lots de cellules de cumulus éliminés après lavage enzymatique des ovocytes prélevés sur les cinquante derniers ovaires, soit 64/246 (26 %) d'échantillons positifs. Par contre cette recherche s'est révélée négative pour tous les lots d'ovocytes pour lesquels les cellules du cumulus ont été éliminées par lavage enzymatique.

Cette étude démontre clairement que la technique utilisée de séparation des cellules de la granulosa de l'ovocyte à un stade peri-ovulatoire de chèvres infectées par le CAEV permet d'obtenir un ovocyte indemne d'infection virale, alors même que les cellules constitutives du cumulus oophorus qui l'entourent, pendant son développement ovarien et le début de son développement intra-oviductal, peuvent être infectées. (Ali Al Ahmad *et al.*, 2005).

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 Transfer Society* (IETS) et par OIE 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 et Seidel, 1990), 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.

3. ÉTUDE EN STATION EXPERIMENTALE DE LA PRODUCTION DE CHEVREAUX INDEMNES DE CAEV ISSUES 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 Hamad *et al.*, 2008).

3.1. MATERIEL ET METHODES

Trente chèvres infectées par le CAEV confirmées par une sérologie positive et une PCR positive sur les cellules sanguines périphériques et sur les cellules utérines ont été utilisées comme donneuses d'embryons. Les récoltes chirurgicales ont permis de collecter trois cent trente-quatre embryons dont cent quatre ont été congelés. Les opérations de transfert ont été réalisées sur quarante-neuf chèvres receveuses certifiées et contrôlées indemnes de CAEV. Seize chèvres ont mis bas et ont donné naissance à vingt-trois chevreaux dont seize ont été suivis jusqu'à la fin de l'étude (quatre mois).

Chez les chèvres receveuses, trois prélèvements de sang sur tube hépariné ont été réalisés dix jours avant, pendant et dix jours après la mise bas ainsi qu'un prélèvement par cytobrosse des lochies au cours de la mise bas. Après la mise bas, les mères ont été euthanasiées afin de réaliser des prélèvements d'organes (poumon, mamelle, nœuds lymphatiques rétro-mammaire et préscapulaire).

Dès leur naissance, les chevreaux ont été séparés de leur mère et isolés. A l'âge de quatre mois, les chevreaux ont été soumis à une immunodépression médicalement induite sous couverture antibiotique (Guiguen *et al.*, 1990). La recherche des anticorps sériques anti-CAEV par ELISA et de l'ADN proviral de CAEV par PCR dans les leucocytes du sang a été réalisée tous les mois, jusqu'à l'âge de quatre mois, puis trois fois à quinze, vingt et un et vingt-huit jours après le début du traitement immunosuppresseur. Les chevreaux ont été ensuite euthanasiés et des prélèvements tissulaires intéressants : synoviale des carpes, poumons, nœud lymphatique préscapulaire, inguinaux et rétro-mammaires et utérus (chez les femelles) ont été réalisés.

3.2. RESULTATS

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 seize chèvres receveuses et chez les seize chevreaux (sang, tissus) avant et après immunodépression n'a permis d'identifier par PCR, l'ADN proviral de CAEV.

3.3. DISCUSSION

Cette étude, réalisée dans les conditions de la pratique courante, dans un contexte infectieux extrême et avec des techniques de diagnostic sensibles, associée à un protocole d'immunosuppression facilitant la réplication 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 s'avère 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. Dans ces deux études, la sélection des chèvres donneuses infectées par le CAEV, s'est réalisée sur le seul test sérologique. En conséquence, ni la virémie, ni l'infection du tractus génital n'ont été démontrées chez ces donneuses. La seconde particularité de notre étude réside dans l'utilisation de la détection de l'infection virale par PCR et RT-PCR chez les chèvres receveuses et chez les chevreaux. Dans l'expérimentation de Wolf *et al.*, (1987), l'infection virale n'était recherchée que par l'examen de la séroconversion des receveuses et des chevreaux jusqu'à l'âge de quatre mois et par culture virale à partir du colostrum, du placenta et des tissus des mort-nés et nouveau-nés, technique peu sensible. Dans celle de Cavalcante *et al.*, (1998), l'infection virale n'a été recherchée que par l'étude de la séropositivité des chevreaux jusqu'à l'âge de six mois. En raison du délai très long de séroconversion, des faux négatifs peuvent être observés chez les chevreaux jusqu'à l'âge de huit mois (Rimstad *et al.*, 1993). Par ailleurs, la culture virale ne met en évidence que les particules virales infectieuses, pour autant qu'elles soient présentes dans les prélèvements réalisés, sans détecter les témoins de l'infection comme l'ADN proviral.

CONCLUSION

Ces différentes études démontrent que si le risque de transmission du CAEV lors des opérations de transfert d'embryon doit être pris en compte, l'application des 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 dix fois, permet la production de chevreaux indemnes de CAEV à partir de mères infectées. Cette technique de reproduction artificielle peut donc être intégrée dans un programme de prophylaxie sanitaire du CAEV chez la chèvre.

Ali Al Ahmad M.Z., Fieni F., Martignat L., Chatagnon G., Baril G., Bouvier F., Chebloune Y. 2005. *Theriogenology*, 64(7):1656-66

Ali Al Ahmad M.Z., Fieni F., Guiguen F., Larrat M., Pellerin J.L., Roux C., Chebloune Y., 2006. *Virology*, 353:307-315

Ali Al Ahmad M.Z., Chebloune Y., Bouzar B.A., Baril G., Bouvier F., Chatagnon G., Leboeuf B., M. Pépin M., Guibert J.M., Russo P., Manfredi E., Martin J., Fieni F., 2008. *Theriogenology*, 69, 4:408-415

Cavalcante T.V., Salles H.O., Freitas V.J.F., 1998. *14^e meeting of European Embryo transfer association*. Venise 11-12 September, 136

Crawford T.B., Adams D.S., 1981. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 178, 713-719

Fieni F., Rowe J., Van Hoosear K., Burucoa C., Oppenheim S., Anderson G., Murray J., Bondurant R., 2002. *Theriogenology*, 57(2), 931-940

Fieni F., Rowe J., Van Hoosear K., Burucoa C., Oppenheim S., Anderson G., Murray J., Bondurant R., 2003. *Theriogenology*, 59 (7), 1515-1523

Greenwood P.L., 1995. *Austr. Prev. Vet. Med.*, 22, 71-87

Guerin B., Nibart M., Marquant-Le Guienne B., Humblot P., 1997. *Theriogenology*, 47(1) 33-42

Guiguen F., Lerondelle C., Favier C. 1990. *Ann. Rech. Vet.*, 21 (3), 179-185

Guiguen F., Mselli-Lakhal L., Durand J., Du J., Favier C., Fomazero C., Grezel D., Balleydier S., Hausmann E., Chebloune Y., 2000. *Amer. J. Vet. Res.*, 61 (4), 456-461

Lamara A., Fieni F., Mselli-Lakhal L., Tainturier D., Chebloune Y. 2001. *Virus Res.*, 79 (1-2), 165-172

Lamara A., Fieni F., Mselli-Lakhal L., Tainturier D., Chebloune Y., 2002a. *Virus Res.*, 87(1), 69-77

Lamara A., Fieni F., Mselli-Lakhal L., Chatagnon G., Bruyas J.F., Tainturier D., Battut I., Fornazero C., Chebloune Y., 2002b. *Theriogenology*, 58 (6), 1153-1163

Le Jan C., Greenland T., Gounel F., Balleydier S., Mornes J.F. 2000. *Res. Vet. Sci.*, 69, 225-231

Narayan O., Kennedy-Stoskopf S., Sheffer D., Griffin D.E., Clements J.E., 1983. *Infection and Immunity*, 41(1), 67-73

Peretz G., Cimarosti L., 1990. Résumés de la 41^e réunion de la Fédération européenne de Zootechnie, 2, 164-165

Stringfellow D.A., Seidel S.M., 1990. In Champain I.L. (Editor), *Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)*, 41-45

Wolf D.F., Nusbaum K.E., Lauerman L.H., Mysinger P.W., Ridell M.G., Putnam M.R., Shumway L.S., Powe T.A., 1987. *Theriogenology*, 28, 307-316

Rimstad E., East N.E., Torten M., Hinggins J., DeRock E., Pederson N.C., 1993. *Am. J. Vet. Res.*, 54 (11), 1859-1862

Zink M.C., Yager J.A., Myers J.D., 1990. *American Journal of Pathology*, 136, 843-854

Zink M.C., Johnson L.K., 1994. *Virus Research*, 32, 139-154