

R9701

## RESULTATS RECENTS EN MATIERE DE TECHNOLOGIE DE LA CONSERVATION DE LA SEMENCE DE VERRAT

*PAQUIGNON M. (1), BUSSIÈRE J. (2), BARITEAU F. (2)*

*(1) Institut Technique du Porc, M.N.E. 149 Rue de Bercy, 75595 PARIS CEDEX 12*

*(2) I.N.R.A. S.E.I.A., 86480 ROUILLE*

### I - INTRODUCTION

Depuis la création du premier centre à LOUDEAC, l'insémination artificielle porcine en France, comparée à celle des pays nordiques comme la Hollande, le Danemark, la Norvège et la Finlande, s'est assez peu développée.

Cependant, la manière, dont elle est maintenant perçue par les éleveurs semble avoir sensiblement évolué. Considérée dès le début comme un outil de dépannage au service des petits élevages, un certain nombre d'éleveurs voient, maintenant, dans l'insémination, en plus de son rôle de diffusion des meilleurs géniteurs une technique destinée à améliorer la conduite d'élevage des truies en bande.

La mise en place par inséminateurs spécialisés a alors fait place à celle par l'éleveur lui-même à partir de semence produite par un centre de production ou après prélèvement des verrats à la ferme.

En pratique compte tenu du fait que cette dernière technique de mise en place connaît un développement considérable et que l'expédition de la semence chez l'éleveur implique des délais d'acheminement longs, il est indispensable que les technologies de dilution et de conservation soient bien adaptées et permettent à la semence de garder son pouvoir fécondant pendant un temps suffisamment long.

L'objet de ce rapport est de faire le point sur la technologie de préparation de la semence en vue de sa conservation soit sous forme liquide soit sous forme congelée.

### II - CONSERVATION A L'ETAT LIQUIDE

Après la collecte, les spermatozoïdes mélangés au seul plasma séminal ont une faible durée de vie. L'incorporation d'un milieu susceptible de prolonger leur survie et de maintenir leur fécondance est donc indispensable. Pour être efficace il doit fournir l'énergie nécessaire pour assurer le bon fonctionnement et le maintien de l'intégrité des cellules, avoir un système tampon s'opposant aux fortes variations de pH, éviter le développement des germes microbiens et présenter un équilibre ionique satisfaisant.

## 1) LES DILUEURS

### a) Composition

Beaucoup de dilueurs ont été utilisés pour la conservation de la semence à l'état liquide. Leur composition (Tableau 1) présente des différences notables qui entraînent des variations importantes dans la valeur de leur pH et de leur pression osmotique.

**TABLEAU 1**  
COMPOSITION CHIMIQUE DES DIFFÉRENTS DILUEURS UTILISÉS POUR LA CONSERVATION DE LA SEMENCE À L'ÉTAT LIQUIDE

Produits (g)	Dilueurs					
	I.V.T.	BL1	B.T.S.	GUELPH	MODENE	ZORLESCO
Glucose	3	29	37	60	27,5	11,5
Citrate de Na 2H <sub>2</sub> O	19,9	10,0	6,0	3,7	6,9	11,7
Bicarbonate de Na	2,1	2,0	1,25	1,2	1,0	1,8
E.D.T.A.	—	—	1,25	3,7	2,3	2,1
KCL	0,4	0,3	0,75	—	—	—
Sulfanilamide	3,0	—	—	—	—	—
TRIS	—	—	—	—	—	6,5
Acide Citrique	—	—	—	—	2,9	4,1
B.S.A. (g/v)	—	—	—	—	—	5,0
Cysteine	—	—	—	—	—	0,08
Eau Distillée (ml)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Cinq d'entre eux: I.V.T. (du MESNIL du BUISSON *et al.*, 1958), BL1 (PURSEL *et al.*, 1973a), B.T.S.(solution initialement utilisée pour la décongélation) (PURSEL et JOHNSON, 1975a), GUELPH, KIEV, MERCK ou VAROHM (HAEGER et MACKLE, 1971), MODENE (MORETTI, 1979) sont essentiellement des solutions salines qui diffèrent entre elles par les quantités de glucose, citrate de sodium, bicarbonate de sodium et par la présence ou l'absence de chlorure de potassium, d'E.D.T.A. (acide éthylène diamine tetraacétique) et d'acide citrique.

Le glucose, mieux assimilé par les spermatozoïdes que le fructose est la meilleure source d'énergie et le seul sucre de ces dilueurs. Il contribue aussi au maintien de l'équilibre osmotique du milieu. Le citrate de sodium, le bicarbonate de sodium et le Tris sont les seuls tampons retenus pour la semence de verrat.

**TABLEAU 2**  
EFFET DE L'ADDITION D'E.D.T.A. DANS LE MILIEU DE DILUTION SUR LE POUVOIR FÉCONDANT DU SPERME APRÈS 3 A 8 JOURS DE CONSERVATION

E.D.T.A. (g/litre)	Gestation (%) (1)	Survie Embryonnaire (%)
0	52,3 (86) <sub>a</sub>	61,4 <sub>a</sub>
1,85	70,0 (90) <sub>b</sub>	70,1 <sub>b</sub>
3,7	63,6 (88) <sub>ab</sub>	68,1 <sub>b</sub>

(1) Abattage à 60 jours de gestation

( ) Nombre de femelles inséminées

Les valeurs non suivies verticalement de la même lettre sont significativement différentes (P < 0.05).

L'E.D.T.A. contenu dans la plupart de ces dilueurs jouerait un rôle de stabilisateur du volume cellulaire (BREDDERMAN et FOOTE, 1971). Par ses propriétés chélatrices, il préviendrait la peroxydation des phospholipides membranaires néfaste pour le maintien du pouvoir fécondant des spermatozoïdes (SHANNON et CURSON, 1972). Afin de mieux apprécier l'importance de sa

présence dans les dilueurs, nous avons entrepris une expérience dans laquelle des échantillons de sperme ( $3 \times 10^9$  spz) étaient dilués dans 100ml d'un milieu contenant des quantités différentes d'E.D.T.A. (O-1.85-3.7 g/litre). Les résultats montrent que l'addition d'E.D.T.A. accroît significativement la survie des spermatozoïdes après 8 jours de stockage et 5 heures d'incubation à  $+37^\circ\text{C}$  ainsi que le pouvoir fécondant du sperme et la survie embryonnaire. Il n'y a pas de différence significative entre les deux concentrations d'E.D.T.A., mais la réussite maximum est obtenue avec une concentration de 1.85 g/litre (Tableau 2).

Le composé protéique, l'albumine sérique bovine (B.S.A.) contenue dans le dilueur ZORLESCO (GOTTARDI *et al.*, 1980), par ses capacités d'adsorption des produits du métabolisme des spermatozoïdes et des bactéries (BAMBA et SONE, 1981), permet de mieux préserver la survie des spermatozoïdes (HARRISON *et al.*, 1978; PAQUIGNON *et al.*, 1980a).

D'autres dilueurs, le SCK7 (TAYLOR, 1976) et le MRA (PEREZ LYS, 1984) ont été proposés mais leur composition n'est pas connue.

Tous ces éléments sont dissouts dans un diluant constitué la plupart du temps par de l'eau distillée. Celle-ci peut être remplacée par de l'eau déionisée sans que le taux de conception et la mortalité embryonnaire ne soient affectés (DIEHL et STEWART, 1980). Cependant, il convient d'être prudent quant à la source d'eau utilisée car une expérimentation comparant l'efficacité de l'eau distillée à celle de l'eau de Vittel montre qu'avec cette dernière, après 3 jours de conservation, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est plus faible (61% contre 53% respectivement pour l'eau distillée et l'eau de Vittel).

A ces dilueurs sont inclus des antibiotiques. Ils contrôlent la prolifération des microorganismes, dont la production d'éléments toxiques, est néfaste sur la qualité de la semence. Généralement une combinaison de pénicilline G (1.000.000 UI/l) et streptomycine (1g/l) a été utilisée pour fournir un spectre assez large d'activité antibactérienne. Cependant, d'autres antibiotiques: dibekacin, amikacin et gentamicin, à des concentrations beaucoup plus faibles et avec un spectre d'activité beaucoup plus large sont encore plus efficaces. Ils réduisent considérablement la prolifération bactérienne et augmentent le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et à acrosomes normaux après plusieurs jours de conservation (SONE, 1982) (Tableau 3). La dialyse est un autre moyen d'éliminer les produits toxiques fournis par la semence. Elle contribue à améliorer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et à acrosomes normaux comparé à un stockage du sperme dans des tubes (BAMBA *et al.*, 1979).

TABLEAU 3

CARACTÉRISTIQUES DE LA SEMENCE DE VERRAT APRÈS STOCKAGE A  $+ 15^\circ\text{C}$  PENDANT 7 JOURS EN PRÉSENCE DE DIBEKACIN

	Dibekacin	Streptomycine + Pénicilline
Nbre d'échantillons	74	15
Motilité (%)	75,4 <sup>a</sup>	37,3 <sup>b</sup>
Acrosomes normaux (%)	82,7 <sup>a</sup>	52,6 <sup>b</sup>
Echantillons avec bactéries (%)	21,6	73,3
Nb bact/ml (log)	3,2	4,8
pH	6,8	6,4

Les pourcentages non suivis horizontalement de la même lettre sont significativement différents ( $P < 0.05$ ) (d'après SONE, 1982).

#### b) Efficacité de ces dilueurs

L'efficacité de ces dilueurs peut être appréciée par le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et à acrosomes normaux et par leur pouvoir fécondant après conservation.

Comparé à l'I.V.T. qui fut l'un des tous premiers dilueurs utilisé pour la conservation du sperme, le dilueur BL1 assure un pourcentage de spermatozoïdes mobiles plus élevé durant le stockage de

la semence (BARITEAU *et al.*, 1976). Avec le dilueur GUELPH, leur survie n'est que très légèrement améliorée comparée à celle obtenue avec le dilueur BL1 (PAQUIGNON *et al.*, 1979). Une étude récente (PURSEL, 1983) confirme ce résultat et montre qu'après 7 jours de conservation, les meilleurs pourcentages de spermatozoïdes mobiles et à acrosomes normaux sont obtenus avec le dilueur BTS (Tableau 4). D'autres études comparant l'efficacité des dilueurs ZORLESCO, BTS, MODENE et GUELPH montrent également qu'après 2 à 4 jours de conservation, le dilueur BTS procure les meilleurs pourcentages de spermatozoïdes mobiles et à acrosomes normaux (GOTTARDI *et al.*, 1980; AALBERS *et al.*, 1983; ALMLID *et al.*, 1984). Il apparaît donc, selon les premiers critères énoncés précédemment, une supériorité du dilueur B.T.S. sur les autres dilueurs.

**TABLEAU 4**  
ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DE LA SEMENCE APRÈS 7 JOURS DE CONSERVATION  
DANS DIFFÉRENTS DILUEURS

Critères qualitatifs	Dilueurs			
	BL1	B.T.S.	GUELPH	MODENE
Spz mobile (%)	28 <sub>a</sub>	68 <sub>b</sub>	39 <sub>c</sub>	59 <sub>d</sub>
Acrosomes normaux (%)	63 <sub>a</sub>	80 <sub>b</sub>	78 <sub>b</sub>	63 <sub>a</sub>

Les pourcentages non suivis horizontalement d'une même lettre sont significativement différents ( $P < 0.05$ ) (d'après PURSEL, 1983).

La qualité de la semence évolue aussi avec la durée de conservation. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles décroît très rapidement dès le deuxième jour de conservation avec les dilueurs I.V.T. et BL1. Par contre, il est à peu près stable avec les autres dilueurs jusqu'au 3ème jour après la récolte puis décroît avec l'augmentation de la durée de conservation (BARITEAU *et al.*, 1976; PAQUIGNON *et al.*, 1979; GOTTARDI *et al.*, 1980; ALMLID *et al.*, 1984). Il en est de même de l'évolution de la qualité des acrosomes. Ainsi, une étude en microscopie électronique montre que, 10 à 15mn après dilution dans le GUELPH, 11.2% des spermatozoïdes ont déjà des acrosomes anormaux. Leur membrane est soulevée et chez quelques spermatozoïdes, il y a disparition complète de la membrane de l'acrosome et de son contenu. Le pourcentage d'acrosomes gonflés s'accroît après 24 heures et devient très important après 6 jours de stockage (15.6% et 54.2% respectivement)(COURTENS et PAQUIGNON, 1985).

Le pouvoir fécondant évolue aussi en fonction des dilueurs et de la durée de conservation.

Le dilueur I.V.T. largement utilisé pendant plusieurs années gardait le pouvoir fécondant de la semence à un haut niveau seulement pendant deux jours: le jour de la récolte (J0) et le lendemain (J1). Comparé à ce dilueur, le BL1 a permis d'accroître d'une journée la durée de conservation du sperme (J0, J1, J2) (BARITEAU *et al.*, 1977). Avec le dilueur GUELPH, le pouvoir fécondant est préservé plus efficacement de J0 à J2 (PAQUIGNON *et al.*, 1982; JOHNSON *et al.*, 1982). En plus, il permet d'accroître d'une journée la durée de conservation de la semence (J0, J1, J2, J3) sans baisse de la fertilité mais avec une légère chute de prolificité (PAQUIGNON *et al.*, 1982). Le troisième jour après la récolte semble être sa limite d'utilisation. A partir de J4, la fertilité et la prolificité diminuent rapidement (BARITEAU *et al.*, 1984).

Une étude entreprise au centre d'insémination artificielle de Rouillé, comparant l'efficacité des dilueurs BTS et GUELPH montre que quel que soit le jour de conservation (J0, J1, J2, J3) le taux de mise bas et la prolificité obtenus avec le dilueur BTS sont toujours au moins égaux ou supérieurs à ceux obtenus avec le dilueur GUELPH. Jusqu'au 2ème jour de conservation, la fertilité et la prolificité sont de l'ordre de 75% et 11 porcelets avec le dilueur BTS, alors qu'avec le dilueur GUELPH ils sont inférieurs. La semence diluée dans le BTS peut même être utilisée jusqu'en J3 sans baisse brutale de la fertilité et de la prolificité mais ces derniers résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de truies (Tableau 5).

L'ensemble de ces données est en accord avec celles montrant que lorsque les dilueurs BTS et GUELPH sont utilisés comparativement, le taux de mise bas et la prolificité sont améliorés avec le

dilueur B.T.S. quand la semence est conservée jusqu'en J2 (AALBERS *et al.*, 1984) ou jusqu'en J3 (ALMLID *et al.*, 1984).

Les autres dilueurs, le SCK7, ZORLESCO, MODENE et le MRA devaient permettre une conservation du pouvoir fécondant de J3 à J8 et même jusqu'à J12. Cependant, le dilueur GUELPH s'est avéré être supérieur au dilueur SCK7 (PAQUIGNON *et al.*, 1980b). De même, le taux de mise bas et la prolificité n'ont pas été améliorés avec le dilueur ZORLESCO comparé au dilueur GUELPH après une conservation de deux jours (AALBERS *et al.*, 1983), trois jours (ALMLID *et al.*, 1984) ou cinq jours (MEDING, 1982). Le dilueur de MODENE utilisé jusqu'en J2 procure également une fertilité et une prolificité inférieures à celles obtenues avec le dilueur GUELPH (AALBERS *et al.*, 1983). Bien qu'étant annoncé comme devant permettre une conservation de 8-10 jours avec une supériorité sur le dilueur ZORLESCO, le dilueur MRA doit encore faire l'objet de nombreuses comparaisons avant que l'on puisse se prononcer définitivement sur ses qualités.

**TABLEAU 5**  
FERTILITÉ ET PROLIFICITÉ DE TRUIES INSÉMINÉES AVEC DE LA SEMENCE CONSERVÉE  
DANS LES DILUEURS GUELPH ET BTS

Dilueurs	Jours de stockage (1)	Femelles inséminées (2)	Mise bas (%)	Prolificité
GUELPH	0	353	73,1	10,9
	1	406	74,9	10,4
	2	107	72,9	11,1
	3	43	55,8	9,4
TOTAL		909	73,0	10,7
B.T.S.	0	343	74,1	11,0
	1	428	77,1	10,9
	2	104	76,9	11,0
	3	50	68,0	10,8
TOTAL		925	75,5	11,0

(1) Pour J2 et J3, 2 doses de  $3 \times 10^9$  spz par insémination

(2) Toutes femelles confondues inséminées une ou deux fois par l'inséminateur ou l'éleveur.

Sur la base des précédentes informations, le BTS semble être le meilleur dilueur actuel pour la dilution et la conservation de la semence. Il peut être utilisé jusqu'au troisième jour après la récolte sans chute brutale de la fertilité et de la prolificité. Par rapport au dilueur GUELPH il a aussi l'avantage de ne pas mettre les spermatozoïdes en anabiose, facilitant ainsi leur observation au microscope, et d'avoir un coût de fabrication inférieur de 58%.

## 2) TECHNOLOGIE DE PREPARATION DE LA SEMENCE

Le volume de semence collecté et les conditions de dilution sont très importants pour la conservation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

Quand ils sont dilués et conservés pendant 5 jours, le taux de mise bas obtenu avec l'éjaculat entier est significativement plus élevé que celui obtenu avec la fraction riche de l'éjaculat (PAQUIGNON *et al.*, 1982). Ces résultats confirment d'ailleurs ceux obtenus par MEDING (1976) montrant que l'élimination du plasma seminal par centrifugation avant la dilution abaisse le taux de mise bas. Sachant que l'éjaculat entier diffère de la fraction riche par la production en fin d'éjaculation des sécrétions des vésicules séminales, on peut leur attribuer un rôle majeur dans le processus contrôlant le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

Pour chaque type de dilueur, il existe un taux optimum de dilution. Quand le sperme est dilué avec le BL1, il n'y a pas d'effet du taux de dilution:  $30 \times 10^6$  vs  $120 \times 10^6$  spz/ml, par contre avec le dilueur GUELPH le taux de mise bas obtenus après 3 ou 5 jours de conservation est plus élevé pour une concentration de  $30 \times 10^6$  spz/ml que pour une concentration de  $120 \times 10^6$  spz/ml (JOHNSON *et al.*, 1982; PAQUIGNON *et al.*, 1982).

Dans la plupart des expériences, la dilution de la semence avec le dilueur BTS s'effectue à une concentration de  $30 \times 10^6$  spz/ml ( $3 \times 10^9$  spz par dose de 100ml). Une étude récente semble indiquer qu'un taux de mise bas normal peut être obtenu après une insémination contenant  $1 \times 10^9$  spz dans 70 ou 20ml de ce dilueur. Cependant, ces résultats méritent confirmation car il apparait tout de même une légère baisse de la fertilité et de la prolificité quand le nombre de spermatozoïdes et le volume inséminés diminuent (GILES *et al.*, 1986).

Afin d'obtenir la fertilité et la prolificité les plus élevées possible, il apparait nécessaire, dans l'état présent de nos connaissances, d'utiliser l'éjaculat entier et de diluer la semence dans le dilueur B.T.S. afin d'obtenir  $3 \times 10^9$  spz dans un volume total de 100ml.

### 3) TEMPERATURE DE STOCKAGE

Une température de stockage comprise entre  $+15^\circ\text{C}$  et  $+18^\circ\text{C}$  a généralement été proposée pour assurer la meilleure conservation de la semence. Cependant, si le contrôle de cette température peut être facilement obtenu au laboratoire, il devient plus difficile à réaliser lors de l'expédition de la semence chez l'éleveur. Les doses sont alors soumises aux variations externes de température et la qualité de la semence en est affectée (Tableau 6). Ceci pose le choix du matériel de transport pour éviter les variations de température à l'intérieur des doses. L'emballage est souvent réalisé en boîte de polyester de différentes formes, dimensions et d'épaisseurs de paroi. Parmi différents emballages, de provenances variées: ROUILLE, U.N.C.E.I.A., HAZEBROUKE, S.A.D. et MUNSTER, la meilleure isolation au froid et à la chaleur est assurée par ceux utilisés par les centres d'HAZEBROUKE et de ROUILLE tandis que la plus mauvaise est obtenue avec celui commercialisé par la S.A.D.. La présence de flacons d'acide acétique congelé (point de fusion  $+15^\circ\text{C}$ ) dans les emballages permet de réduire la température interne de la boîte quand la température externe est élevée ( $+30^\circ\text{C}$ ) mais est sans effet quand celle-ci est basse ( $-5^\circ\text{C}$ ). C'est par une augmentation des capacités thermiques de l'emballage (expédition d'un nombre important de doses dans le même emballage) plutôt que par la recherche de matériaux sophistiqués que l'on pourra maintenir une température interne voisine de  $+15^\circ\text{C}$  malgré des températures externes pouvant atteindre  $-10^\circ\text{C}$  (Von MULLER-SCHLOSSER *et al.*, 1980).

**TABLEAU 6**  
ÉVOLUTION DE LA TEMPÉRATURE, DU POURCENTAGE DE SPERMATOZOÏDES MOBILES  
ET D'ACROSOMES NORMAUX APRÈS 6 HEURES DE STOCKAGE  
À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES ENVIRONNANTES.

Températures environnantes	Températures semence ( $^\circ\text{C}$ )		Spz mobiles (%)		Acrosomes normaux (%)	
	D	F	D	F	D	F
- 5 $^\circ\text{C}$	25	0,8	86,6 <sub>a</sub>	58,8 <sub>b</sub>	97,1 <sub>a</sub>	84,4 <sub>b</sub>
+ 5 $^\circ\text{C}$	25	7,4	86,6 <sub>a</sub>	73,3 <sub>b</sub>	97,1 <sub>a</sub>	90,2 <sub>b</sub>
+ 30 $^\circ\text{C}$	15	28,2	86,6 <sub>a</sub>	76,1 <sub>a</sub>	97,1 <sub>a</sub>	95,3 <sub>a</sub>

D = Début      F = Fin      n = 9

Pour chaque test d'appréciation de la qualité de la semence, les valeurs non suivies horizontalement de la même lettre sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

### III - CONGELATION DE LA SEMENCE

Depuis les premières naissances de porcelets après insémination de semence congelée (POLGE *et al.*, 1970; PURSEL et JOHNSON, 1971; CRABO et EINARSSON, 1971), plusieurs techniques de congélation (PURSEL et JOHNSON, 1975a; WESTENDORF *et al.*, 1975; PAQUIGNON et COURROT, 1975a; LARSSON *et al.*, 1977) ont été proposées. Elles diffèrent entre elles par les dilueurs et les processus de congélation-décongélation.

#### 1) LES DILUEURS DE CONGELATION ET DECONGELATION

##### a) Dilueurs de congélation

###### — Composition

Plusieurs dilueurs sont maintenant utilisés pour la congélation de la semence de verrat (Tableau 7). Ils sont caractérisés par une faible force ionique et un pH ajusté au voisinage de la neutralité.

TABLEAU 7  
COMPOSITION DES PRINCIPAUX DILUEURS DE CONGÉLATION

Références	Produits
POLGE <i>et al.</i> (1970) WESTENDORF <i>et al.</i> (1975)	Glucose : 5.67 g, Jaune d'œuf : 22.5 ml, eau distillée : 77.5 ml Solution de lactose 11 % : 100 ml, Jaune d'œuf : 25 ml, O.E.P. : 0.5 %
VISSER et SALAMON (1974)	Tampon Tris 250 mM, Fructose : 111 mM, E.D.T.A. : 15 mM, Acide citrique : 79.5 mM, Jaune d'œuf : 15 %
OBANDO <i>et al.</i> (1984)	Tris : 2.432 g, Glycine : 0.939 g, Acide citrique : 1.354 g, Glucose : 0.75 g, Eau distillée : 100 ml, Jaune d'œuf : 22.5 ml
PURSEL et JOHNSON (1975a)	TES : 1.2 g, Tris : 0.2 g, Glucose : 3.2 g, Jaune d'œuf : 20 ml, O.E.P. : 0.5 ml, ajusté à 100 ml avec Eau distillée
LARSSON <i>et al.</i> (1977)	TES : 4.17 g, Solution NaOH (0.325 M) : 10.5 ml, Solution KOH (0.325 M) : 3.5 ml, Solution de glucose 5.5 % : 10 ml, Jaune d'œuf : 20 ml, Eau distillée : 56 ml, O.E.P. : 0.5 %

Ils sont constitués des principaux éléments suivants: agent cryoprotecteur, sucre, protéine et additif. Chacun de ces éléments joue un rôle spécifique dans la protection des spermatozoïdes.

###### — Rôle

Parmi un grand nombre d'agents cryoprotecteurs, seul le glycérol, l'érythritol, le xylitol, l'adonitol, l'acétamide et le diméthylsulfoxyde (D.M.S.O.) ont un rôle de protection quand ils sont additionnés au dilueur de congélation. Cependant, quand leur concentration s'accroît le pourcentage de spermatozoïdes mobiles augmente mais le pourcentage de spermatozoïdes avec des acrosomes normaux diminue (WILMUT et POLGE, 1972, 1977a; SALAMON *et al.*, 1973).

Le meilleur pourcentage de spermatozoïdes mobiles et le maximum d'œufs fécondés sont toujours obtenus avec le glycérol quand il est comparé aux autres agents cryoprotecteurs ou en combinaison avec eux (SALAMON *et al.*, 1973; VISSER et SALAMON, 1974). Ainsi en dépit d'un grand nombre d'investigations sur les agents cryoprotecteurs, le glycérol reste le plus largement utilisé pour la congélation du sperme de verrat. Cependant, il doit être utilisé à faible concentration depuis qu'il a été montré qu'un niveau de 7% ou plus dans le dilueur réduit ou inhibe le pouvoir fécondant des spermatozoïdes (WILMUT et POLGE, 1974). Les raisons de cette réduction ne sont pas encore bien identifiées. Cependant de fortes concentrations altèrent la perméabilité membranaire des spermatozoïdes (BOWER *et al.*, 1973) réduisent le pourcentage de spermatozoïdes à acrosomes normaux (GRAHAM et CRABO, 1972) et le pourcentage d'œufs fécondés, même après insémi-

nation par voie chirurgicale (WILMUT et POLGE, 1972, 1977a), abaissent la consommation d'oxygène (SANFORD *et al.*, 1972) et réduisent la survie des spermatozoïdes après 3 heures d'incubation à +37°C (PAQUIGNON et COUROT, 1975b).

La réduction de la concentration de glycérol dans les dilueurs à un taux optimum de 2% permettant d'obtenir le maximum de spermatozoïdes mobiles avec le maximum de spermatozoïdes à acrosomes normaux (PURSEL *et al.*, 1978a) a été probablement l'une des principales améliorations dans la technologie de la congélation (WESTENDORF *et al.*, 1975; PURSEL et JOHNSON, 1975a; PAQUIGNON et COUROT, 1976; LARSSON *et al.*, 1977). A l'extrême POLGE (1976) conclut même que sa présence n'est pas indispensable.

Le fructose, le glucose et le lactose sont les principaux sucres additionnés aux dilueurs. Ils agissent par leur propriété osmotique et comme cryoprotecteur extracellulaire. L'effet protecteur de ces sucres dépend pour beaucoup de leur interaction avec les autres constituants du milieu, de leur concentration et du critère utilisé pour apprécier la qualité de la semence (SALAMON *et al.*, 1973; VISSER et SALAMON, 1974; WILMUT et POLGE, 1977b).

Le jaune d'oeuf entre dans la composition de tous les dilueurs. Il contribue à améliorer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et à acrosomes normaux (VISSER et SALAMON, 1974). Les mécanismes par lesquels le jaune d'oeuf protège les spermatozoïdes ne sont pas bien connus. Cependant il peut agir par une moindre déshydratation cellulaire au moment de la congélation (COURTENS et PAQUIGNON, 1985) ou par une meilleure stabilisation de la membrane plasmique (FOULKES, 1977).

Un détergent synthétique (Orvus Es Paste) (OEP) a été introduit dans certains dilueurs pour préserver l'intégrité cellulaire. Il accroît le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et à acrosomes normaux (GRAHAM *et al.*, 1971; ROMENY *et al.*, 1974) et augmente le pouvoir fécondant du sperme (PURSEL *et al.*, 1978b). Le mécanisme d'action de l'O.E.P. n'est pas encore bien connu, mais certains résultats montrent qu'il agit en altérant la composition du jaune d'oeuf plutôt que directement sur la membrane des spermatozoïdes (PURSEL *et al.*, 1978b). Sa concentration optimum est de l'ordre de 1 à 2% (WESTENDORF *et al.*, 1975; PURSEL *et al.*, 1978b).

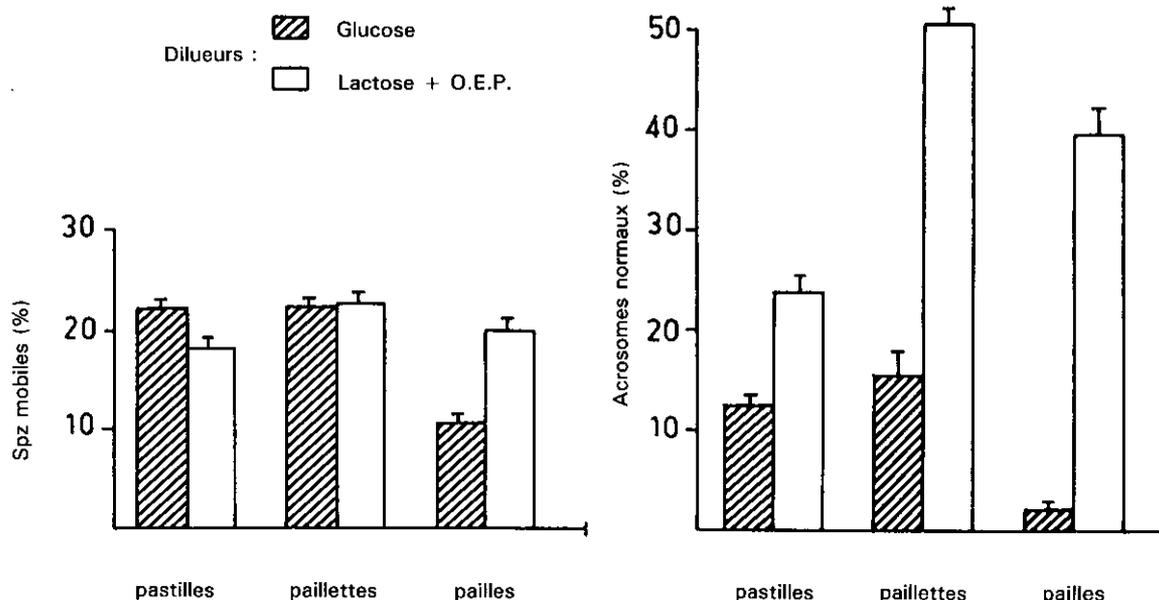
#### — Efficacité des dilueurs

Peu d'études systématiques ont été entreprises pour comparer l'efficacité de ces dilueurs. En prenant comme critère de qualité le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, OBANDO *et al.* (1984) ont montré que le dilueur TRIS, glycine, glucose était supérieur aux dilueurs BF5 ou TES-Na-K. En réalité, la supériorité d'un dilueur sur l'autre dépend pour beaucoup du taux de dilution, du processus de refroidissement, de la méthode de congélation et des critères utilisés pour apprécier la qualité du sperme.

PAQUIGNON *et al.* (1986) ont montré qu'un dilueur lactose, O.E.P., jaune d'oeuf comparé à un dilueur glucose-jaune d'oeuf améliore les pourcentages de spermatozoïdes mobiles et d'acrosomes normaux après décongélation et trois heures d'incubation. Cependant, des variations importantes apparaissent en fonction du mode de conditionnement de la semence. Il apparaît que le dilueur "glucose" est le mieux adapté pour le maintien du pourcentage de spermatozoïdes mobiles lors du conditionnement en pastilles mais très peu adapté pour le conditionnement en pailles de 5ml, alors que le dilueur lactose O.E.P. peut être utilisé pour tous les modes de conditionnement (pastilles ou pailles de 0.5 et 5ml), en assurant toujours la meilleure protection des acrosomes (Figure 1). L'examen en microscopie électronique de ces dilueurs fixés après congélation montre que le dilueur glucose présente une structure dense, homogène, avec très peu de microcristaux de glace, alors que le dilueur lactose, O.E.P. contient des microcristaux plus gros et plus nombreux de 0.1 à 0.5 microns (COURTENS et PAQUIGNON, 1985). Ainsi, l'effet bénéfique du lactose, O.E.P. sur le glucose pourrait résider dans une moindre déshydratation du dilueur et des cellules qu'il contient au moment de la congélation. Lors de la décongélation, étape importante pour le maintien de l'intégrité des acrosomes, les spermatozoïdes subiraient alors un moindre choc osmotique (COURTENS et PAQUIGNON, 1985).

FIGURE 1:

EFFET DU DILUEUR ET DU MODE DE CONDITIONNEMENT SUR LA QUALITÉ DU SPERME APRÈS DÉGEL (d'après PAQUIGNON *et al.*, 1986).



La comparaison de l'efficacité des dilueurs est très difficile car la plupart d'entre eux ont été développés comme une partie intégrante d'un processus de congélation si bien qu'ils ne sont généralement pas transférables d'une méthode à l'autre.

### Solutions de décongélation

L'utilisation du plasma séminal comme milieu de dégel a été considérée comme un élément essentiel quand cette nouvelle technologie a été proposée (CRABO et EINARSSON, 1971). Cependant, LARSSON et EINARSSON (1976) ont obtenu des fertilités équivalentes quand la semence a été décongelée dans du plasma séminal avec ou sans protéine ou dans de l'OLEP (plasma séminal synthétique). Des dilueurs synthétiques appropriés peuvent donc remplacer entièrement ou en partie le plasma séminal. Ainsi les solutions de dégel les plus communément utilisées sont maintenant des solutions salines. Elles comprennent le B.T.S. (PURSEL et JOHNSON, 1975a), le D8 d'Hülseberg (WESTENDORF *et al.*, 1975) l'INRA-ITP (PAQUIGNON et COUROT, 1976) et l'OLEP (LARSSON et EINARSSON, 1976) (Tableau 8).

TABLEAU 8  
COMPOSITION DES SOLUTIONS DE DÉCONGÉLATION

Produits (g)	Solution de dégel			
	B.T.S.	OLEP	Hülseberg	INRA-ITP
Fructose	—	5	—	—
Glucose	37	—	57,5	3
Lactose	—	—	2,5	—
Citrate de Na 2H <sub>2</sub> O	6	—	4,5	19,9
E.D.T.A.	1,25	—	3,5	3,7
Bicarbonate de Na	1,25	0,84	1,2	2,1
Kcl	0,75	1,2	0,4	0,4
Pyruvate de Na	—	5	—	—
CaCl <sub>2</sub>	—	0,66	—	—
MgCl <sub>2</sub>	—	0,865	—	—
NaCl	—	3,5	—	—
H <sub>2</sub> O distillée (ml)	1000	1000	1000	1000

Le glucose est le principal sucre de ces solutions. Il est associé avec du lactose dans la solution Hülsenberg et remplacé par le fructose et le pyruvate de sodium dans l'OLEP. L'E.D.T.A. présent dans les milieux d'Hülsenberg, B.T.S. et INRA-ITP, améliore la survie des spermatozoïdes après incubation (VISSER et SALAMON, 1974). Contrairement aux dilueurs de congélation, l'efficacité des solutions de décongélation est maximale lorsque la concentration en électrolytes est élevée (SENEGACNIK *et al.*, 1980). Les solutions utilisées sont pour la plupart isotoniques; seuls WESTENDORF *et al.* (1975) adoptent une hypertonie. Celle-ci limiterait le choc osmotique lié à la décongélation et améliorerait la qualité de la semence au dégel (SALAMON *et al.*, 1973; VASQUEZ et GRAHAM, 1980).

L'effet des solutions de dégel sur la qualité de la semence et son pouvoir fécondant dépend de leur composition. Ainsi comparée aux solutions Hülsenberg, BL1, plasma séminal et lait, la solution BTS permet d'obtenir les meilleurs pourcentages de spermatozoïdes mobiles et à acrosomes normaux (PURSEL et JOHNSON, 1975a). Cependant, la survie des spermatozoïdes durant l'incubation, le taux de gestation et la survie embryonnaire sont significativement plus élevés avec la solution INRA-ITP qu'avec la solution BTS (PAQUIGNON *et al.*, 1977).

## 2) PROCESSUS DE CONGELATION ET DECONGELATION

### a) Refroidissement avant congélation

La préparation et le refroidissement ont pour but d'amener la semence de la collecte à la congélation dans les meilleures conditions de qualité. Les spermatozoïdes sont d'abord mis à équilibrer dans le plasma séminal avant centrifugation (PURSEL et JOHNSON, 1975a; LARSSON *et al.*, 1977) ou dans un milieu avec ou sans plasma séminal durant le refroidissement à +15°C (PAQUIGNON *et al.*, 1974; WESTENDORF *et al.*, 1975). Cette équilibration a la particularité d'augmenter la résistance des spermatozoïdes au choc au froid. Le développement de cette résistance est une caractéristique propre du spermatozoïde. Le plasma séminal l'améliore mais ne semble pas essentiel (PURSEL *et al.*, 1973b). Son rôle durant cette période n'est d'ailleurs pas encore bien défini. De différentes études plus ou moins contradictoires il peut être conclu que sa présence ou son absence ne modifie pas d'une façon appréciable la qualité de la semence (PURSEL *et al.*, 1973b; MOORE et HIBBITT, 1977). Dans le succès de ces nouvelles technologies, c'est peut être davantage la durée d'équilibration et de refroidissement qui est importante. En effet, toutes les techniques de congélation donnant une fertilité satisfaisante recommandent une durée de refroidissement supérieure à 4 heures, pour amener la température de la semence de 37°C à +5°C entre la collecte et la congélation. C'est pourquoi, dans la plupart des techniques proposées, l'élimination du plasma séminal par centrifugation a pour simple but d'augmenter la concentration des spermatozoïdes au moment de la congélation pour diminuer le volume de stockage.

Cette concentration doit cependant rester dans des valeurs limites raisonnables. Pour le maintien de la qualité de la semence, à l'heure actuelle, une concentration comprise entre 450 et 600 x 10<sup>6</sup> spz/ml est habituellement utilisée (WESTENDORF *et al.*, 1975; PAQUIGNON et COUROT, 1975b).

La température à partir de laquelle la semence doit être congelée doit être la plus basse possible. L'optimum se situe vers 4-5°C. Dans ces conditions la survie des spermatozoïdes est améliorée en comparaison à une congélation à partir de températures comprises entre 8 et 22°C (GRAHAM et CRABO, 1972; PAQUIGNON *et al.*, 1974; WESTENDORF *et al.*, 1975).

L'incubation du sperme avec ou sans plasma séminal, l'addition de dilueurs après l'élimination du plasma séminal, le maintien d'une haute concentration en spermatozoïdes durant le refroidissement à +15°C sont les principaux points communs aux différentes technologies durant la période précédant la congélation.

### b) La congélation

Au cours de la congélation proprement dite, quel que soit le mode de conditionnement de la semence, pastille ou paille, les spermatozoïdes traversent une zone de température critique dans

laquelle ils sont fortement endommagés. Soixante dix à quatre vingt pour cent des anomalies dues à la congélation apparaissent entre 0 et -20°C (PURSEL et PARK, 1985). Cette perte est la conséquence de la formation dans cette zone de température de cristaux de glace (NIWA et TAGUCHI, 1981).

Ces dommages peuvent être réduits quand les vitesses de congélation sont adaptées au mode de conditionnement de la semence.

Avec les premières techniques, les vitesses de congélation étaient très lentes. Dans ces conditions le pourcentage de spermatozoïdes mobiles le plus élevé était obtenu quand la concentration en glycérol était supérieure à 5% mais, alors, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes était nul (DALRYMPLE et McPHERSON, 1969). Depuis 1970, il est généralement admis que des vitesses de congélation plus rapides obtenues par la congélation en pastille (NAGASE et NIWA, 1964) en combinaison avec de faibles concentrations de glycérol sont avantageuses pour la survie des spermatozoïdes et le maintien de leur pouvoir fécondant. Cette méthode est utilisée dans les principales techniques actuellement proposées (PURSEL et JOHNSON, 1975a; PAQUIGNON et COUROT, 1975a; LARSSON *et al.*, 1977). La taille des pastilles peut varier de 0.05 à 0.2ml sans affecter la qualité de la semence (SALAMON, 1973; PURSEL et JOHNSON, 1976); au delà, il y a une baisse de cette qualité (KOZUMPLIK, 1978).

Les spermatozoïdes peuvent également être congelés en pailles de différentes dimensions. En général, la qualité de la semence obtenue après congélation en paillette de 0.5ml est supérieure à celle obtenue après congélation en paille de 5ml (PAQUIGNON *et al.*, 1986). Cependant en pratique pour des raisons de volume de semence à congeler, ce sont les pailles de 5ml qui sont utilisées (WESTENDORF *et al.*, 1975). Avec des volumes supérieurs le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est faible (LARSSON *et al.*, 1976).

### c) La décongélation

Jusqu'à maintenant, il était difficile d'apprécier d'une façon objective, dans la chute de la qualité de la semence, la part revenant au processus de congélation de celle revenant au processus de décongélation. Une expérience récente de cryosubstitution, montrant que seulement 1 à 2% des spermatozoïdes ont des acrosomes gonflés au moment de la congélation alors que 60% d'entre eux ont la même anomalie après dégel, indique qu'un des principaux problèmes de la technologie de congélation est un problème de décongélation (COURTENS et PAQUIGNON, 1985) (Tableau 9).

**TABLEAU 9**  
ASPECT QUALITATIF DES SPERMATOZOÏDES AU COURS DU PROCESSUS  
CONGÉLATION-DÉCONGÉLATION

Anomalies	Spermatozoïdes		
	+ 5 °C	Congelés	Décongelés
Acrosomes gonflés (%)	1.6	1.4	56.4
Flagelles vacuolisés	+	++++	++++

(d'après COURTENS et PAQUIGNON, 1985)

Plus celle-ci est rapide, meilleure est la qualité de la semence (SALAMON *et al.*, 1973; PURSEL et JOHNSON, 1976). C'est pourquoi des solutions de dégel, en accélérant les échanges thermiques, sont utilisées pour la décongélation des pastilles (PURSEL et JOHNSON, 1976). La température de dégel est aussi un facteur de réussite. Son action est primordiale pour la décongélation des pastilles mais a moins d'effet pour la décongélation des pailles (WESTENDORF *et al.*, 1975; PEREZCANTO-FERNANDEZ, 1978). Il existerait donc une vitesse de décongélation optimale variant selon les techniques de congélation. Dans la pratique courante, les pastilles sont décongelées dans une solution à +50°C (PURSEL et JOHNSON, 1976; PAQUIGNON et COUROT, 1976; LARSSON *et al.*, 1977) et les pailles dans un bain d'eau chaude à 50°C (WESTENDORF *et al.*,

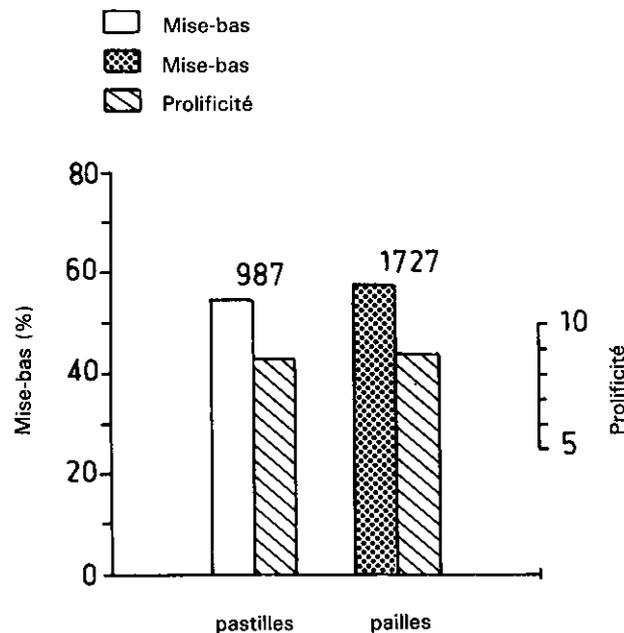
1975) avec une durée d'immersion qui ne doit pas être inférieure à 40s et supérieure à 50s (PURSEL et PARK, 1985).

### 3) RESULTATS DE FERTILITE

Beaucoup d'études ont été réalisées pour développer des tests de laboratoire pouvant prédire le pouvoir fécondant du sperme: morphologie des acrosomes (PURSEL *et al.*, 1972) décharge de G.O.T. (CRABO *et al.*, 1972), résistance à l'incubation (LARSSON, 1976), pouvoir de fixation des protéines (PAVELKO et CRABO, 1976), contenu en A.T.P. (AALBERS *et al.*, 1985). Cependant, si chacun d'entre eux en donne une bonne indication aucun ne peut prédire la fertilité. Aussi l'ultime test pour déterminer l'efficacité d'une technique est le taux de mise bas et la prolificité.

**FIGURE 2**

COMPARAISON DE L'EFFICACITÉ DE LA CONGÉLATION EN PASTILLES OU EN PAILLES SUR LA CONSERVATION DU POUVOIR FÉCONDANT DU SPERME (d'après JOHNSON, 1985).



Si l'on considère l'ensemble des inséminations réalisées dans les 10 dernières années, il n'apparaît aucune différence significative dans le taux de mise bas et la prolificité entre les deux techniques de conditionnement de la semence: pailles et pastilles (JOHNSON, 1985) (Figure 2). Cependant d'autres facteurs peuvent influencer les résultats de fertilité.

Pour obtenir une réussite maximum, le moment de l'insémination en semence congelée doit se situer le plus près possible du moment de l'ovulation (PURSEL et JOHNSON, 1975b; LARSSON, 1976). Ainsi 33 contre 70% des truies deviennent gravides quand l'insémination est réalisée respectivement 12 ou 24 heures après l'immobilisation de la truie (PAQUIGNON *et al.*, 1976). Il semble que la plus faible survie, des spermatozoïdes congelés comparée à celle des spermatozoïdes frais soit une des raisons majeures nécessitant l'insémination de la semence congelée le plus près possible du moment de l'ovulation (PURSEL *et al.*, 1978c).

Aussi la détection des chaleurs qui était déjà un élément important dans le succès de l'IA en sperme frais sera encore plus importante en IA en semence congelée. Pour mieux cerner le moment de l'ovulation, il peut être réalisé une double insémination (ALMLID et STAVNE, 1985), mais cette technique a le désavantage d'être très consommatrice en spermatozoïdes.

De nombreuses autres études ont également montré que le verrat (LARSSON, 1976; PAQUIGNON *et al.*, 1980c) ainsi que la race (JOHNSON *et al.*, 1981) influençaient le taux de mise bas. Une variation entre verrat ou entre race de la survie des spermatozoïdes dans le tractus femelle peut expliquer cet effet (LARSSON, 1976).

D'autres facteurs comme l'inséminateur ou la qualité de l'oestrus de la femelle peuvent aussi influencer la fertilité (PAQUIGNON *et al.*, 1980c). Par contre, la durée de stockage dans l'azote liquide ne semble pas affecter le pouvoir fécondant du sperme (JOHNSON, 1985).

Toutes ces données montrent qu'il est possible d'obtenir une fertilité acceptable après insémination en semence congelée. Toutefois, il faut remarquer qu'elle n'a pu être obtenue qu'après un contrôle très strict des conditions de son utilisation. En pratique avec la semence congelée les valeurs du taux de mise bas et de la prolificité sont environ 20 à 30 points en pourcentage et 1 à 3 porcelets inférieures à celles obtenues en sperme frais.

Pour le moment, la technique d'insémination artificielle avec de la semence congelée n'est pas très développée et la plupart des inséminations sont réalisées avec de la semence conservée à l'état liquide. Toutes les techniques doivent être améliorées. Un point critique majeur est le faible taux de spermatozoïdes mobiles obtenu après dégel: 20 à 40% selon les techniques. Aussi le nombre élevé de spermatozoïdes nécessaire pour obtenir une fertilité raisonnable (6 à 10 x 10<sup>9</sup> spz totaux) accroît d'une façon importante le coût de ce nouveau service comparé à celui de la semence liquide.

#### IV - CONCLUSION

Ce rapport a montré que la technologie de préparation de la semence en vue de son utilisation en Insémination Artificielle est effective aussi bien sous forme liquide que congelée.

De l'ensemble des dilueurs proposés, il ressort que le B.T.S. apparait actuellement le mieux adapté pour la conservation de la semence à l'état liquide au moins jusqu'au troisième jour après la récolte. Au delà, nous n'avons pas d'indications suffisantes pour se prononcer. Pour obtenir une fertilité maximum, il est préférable que la dilution s'effectue à partir de la fraction totale de l'éjaculat que de la seule fraction riche.

Différentes techniques de congélation ont été proposées. Dans la pratique, elles sont peu utilisées. Le principal handicap est le nombre très faible de spermatozoïdes réanimés obtenu après dégel. Ces techniques doivent être améliorées. Cependant, aboutissement d'études plus ou moins empiriques, de nouveaux progrès ne pourront être réalisés qu'en approfondissant nos connaissances sur les échanges intervenant entre la cellule et son environnement durant le processus de congélation et décongélation.

#### BIBLIOGRAPHIE

- AALBERS, J.G., RADEMAKER, J.H.M., GROOTEN, H.J.G., JOHNSON, L.A. 1983. *J. Anim. Sci.*, **57**, Suppl. 1, 314-315.
- AALBERS, J.G., JOHNSON, L.A., RADEMAKER, J.H.M., GROOTEN, H.J.G. 1984. *Xth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Urbana*, II, 180.
- AALBERS, J.G., JOHNSON, L.A., AALBERS-SMIT, E.A., RADEMAKER, J.H.M. 1985. *First Int. Conf. Deep. Freezing Boar Semen*, Uppsala, 259-264.
- ALMLID, T., BLICHFELDT, T., STAVNE, S.E. 1984. *Xth Inter. Congr. Anim. Reprod. A.I. Urbana*, II, 1982.
- ALMLID, T., STAVNE, S.E. 1985. *First Int. Conf. Deep. Freezing Boar Semen*, Uppsala, 282-285.
- BAMBA, K., SONE, M., TAKEDA, K. 1979. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **50**, 740-746.

- BAMBA, K., SONE, M. 1981. *J. Reprod. Fert.*, **62**, 193-197.
- BARITEAU, F., BUSSIÈRE, J., COUROT, M. 1976. *Journées Rech. Porcine en France*, **8**, 171-174.
- BARITEAU, F., BUSSIÈRE, J., COUROT, M. 1977. *Journées Rech. Porcine en France*, **9**, 11-14.
- BARITEAU, F., BUSSIÈRE, J., COUROT, M., PAQUIGNON, M. 1984. *Journées Rech. Porcine en France*, **16**, 173-180.
- BOWER, R.E., CRABO, B.G., PACE, M.M., GRAHAM, E.F. 1973. *J. Anim. Sci.*, **36**, 319-324.
- BREDDERMAN, P.J., FOOTE, R.N. 1971. *Exp. Cell. Res.*, **66**, 458-464.
- COURTENS, J.L., PAQUIGNON, M. 1985. *First Int. Conf. Deep. Freezing Boar Semen*, Uppsala, 61-87.
- CRABO, B., EINARSSON, S. 1971. *Acta. Vet. Scand.*, **12**, 125-127.
- CRABO, B., BROWN, K.I., GRAHAM, E.F. 1972. *J. Anim. Sci.*, **35**, 377-382.
- DALRYMPLE, J.R., McPHERSON, J.W. 1969. *Canad. J. Anim. Sci.*, **49**, 45.
- DIEHL, J.R., STEWART, L. 1980. *J. Anim. Sci.*, **51**, Suppl. 271.
- FOULKES, T.A. 1977. *J. Reprod. Fert.*, **42**, 277-284.
- GILES, J.R., ARKINS, S.F., CAMACHO, T., EICHEN, P.A., HOSMON, B.D., THOMPSON, L.H. 1986. *J. Anim. Sci.*, **63**, Suppl. 327.
- GOTTARDI, L., BRUNEL, L., ZANELLI, L. 1980. *IXth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.*, Madrid, V, 49-53.
- GRAHAM, E.F., RAJAMANNAN, A.H.J., SCHMEHL, H.K.L., MAKI-LAURILA, M., BOWER, R.E. 1971. *A.I.*, Dig. **19**, 12-14.
- GRAHAM, E.F., CRABO, B.G. 1972. *VIIth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.*, Munich, 1629-1632.
- HAEGER, O., MACKLE, N. 1971. *Deutsch Tierarztl. Wschr.*, **78**, 395-397.
- HARRISSON, R.A.P., DOTT, M.M., FOSTER, G.C. 1978. *J. Reprod. Fert.*, **32**, 65-73.
- JOHNSON, L.A., AALBERS, J.G., WILLEMS, C.M.T., SYBESMA, W. 1981. *J. Anim. Sci.*, **52**, 1130-1136.
- JOHNSON, L.A., AALBERS, J.G., WILLEMS, C.M.T., RADEMAKER, J.H.M., REXROAD, C.E. 1982. *J. Anim. Sci.*, **54**, 132-136.
- JOHNSON, L.A. 1985. *First Int. Conf. Deep. Freezing Boar Semen*, Uppsala, 199-222.
- KOZUMPLIK, J. 1978. *Vet. Med.*, Praha, **23**, 457-463.
- LARSSON, K. 1976. *Acta Vet. Scand.*, **17**, 63-73.
- LARSSON, K., EINARSSON, S. 1976. *Acta Vet. Scand.*, **17**, 43-62.
- LARSSON, K., EINARSSON, S., BANE, A. 1976. *VIIIth Int. Congr., Anim. Reprod. A.I.*, Krakow, IV, 1024-1026.
- LARSSON, K., EINARSSON, S., SWENSSON, T. 1977. *Nord. Vet. Med.*, **29**, 113-118.
- MEDING, J.H. 1976. *Nord. Vet. Med.*, **28**, 221-225.
- MEDING, J.H. 1982. *Med. 409*, *Stateus Husdyrbrugsforsog*.
- du MESNIL du BUISSON, F., DAUZIER, L. 1958. *C.R. Acad. Sci., Série D*, **247**, 2472-2475.
- MOORE, H.D.N., HIBBIT, K.G. 1977. *J. Reprod. Fert.*, **50**, 349-352.
- MORETTI, M. 1979. *Communication personnelle*.
- MULLER-SCHLOSSER, F., HEYDORN, K.P., PAUFLER, S. 1980. *Zuchthyg.*, **15**, 211-218.
- NAGASE, H., NIWA, T. 1964. *Vth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Trento*, **4**, 410-415.
- NIWA, T., TAGUCHI, K. 1981. *Iwate Univ., Morioka, Jap. Artic. Insem. Lab. Bulletin n° 1*, 21-35.
- OBANDO, H., TAMAYO, T., ALVARO, C. 1984. *Xth Int. Cong. Anim. Reprod. A.I.*, Urbana, II, 193.
- PAQUIGNON, M., MERGOUNIS, D., COUROT, M., du MESNIL du BUISSON, F. 1974. *Journées Rech. Porcine en France*, **6**, 71-74.
- PAQUIGNON, M., COUROT, M. 1975a. *Ann. Zootech.*, **24** (4), 645-650.
- PAQUIGNON, M., COUROT, M. 1975b. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **15**, 517-523.
- PAQUIGNON, M., COUROT, M. 1976. *VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Krakow*, IV, 1041-1044.
- PAQUIGNON, M., DELAHAYE, C., BUSSIÈRE, J., COUROT, M. 1976. *Journées Rech. Porcine en France*, **8**, 181-184.
- PAQUIGNON, M., DACHEUX, J.L., COUROT, M. 1977. *Journées Rech. Porcine en France*, **9**, 15-18.
- PAQUIGNON, M., BARITEAU, F., BUSSIÈRE, T., COUROT, M. 1979. *Journées Rech. Porcine en France*, **11**, 323-327.
- PAQUIGNON, M., DACHEUX, J.L., BARITEAU, F., COUROT, M. 1980a. *IXth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.*, Madrid, V, 41-44.

- PAQUIGNON, M., BUSSIÈRE, J., BARITEAU, F., LE MAIGNAN de KERANGAT, G., COUROT, M. 1980b. Journées Rech. Porcine en France, **12**, 157-160.
- PAQUIGNON, M., BUSSIÈRE, J., BARITEAU, F., COUROT, M., 1980c. Theriogenology, **14**, 217-226.
- PAQUIGNON, M., BARITEAU, F., BUSSIÈRE, J., DACHEUX, J.L., COUROT, M. 1982. Journées Rech. Porcine en France, **14**, 85-89.
- PAQUIGNON, M., QUELLIER, P., DACHEUX, J.L. 1986. Ann. Zootech., **35** (2), 173-184.
- PAVELKO, M.K., CRABO, B.G. 1976. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I. Krakow, IV, 1045-1048.
- PEREZCANTO-FERNANDEZ, J. 1978. Inaugural Dissertation zur Erlangung des grades cines, Doctor Medicinae Veterinariae, Hannover, pp. 76.
- PEREZ LYS, G., LOZANO-CABANERO, J.J., SANCHEZ-SANCHEZ, R. 1984. I.P.V.S. Gand. 294.
- POLGE, C., SALAMON, S., WILMUT, I. 1970. Vet. Rec., **87**, 424-428.
- POLGE, C. 1976. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Krakow, IV, 1061-1064.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A. 1971. U.S. Dept. Agric. ARS., **44**, 227.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A., RAMPACEK, G.B. 1972. J. Anim. Sci., **34** (2), 278-283.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A., SCHULMAN, L.L. 1973a. J. Anim. Sci., **37**, 532-535.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A., SCHULMAN, L.L. 1973b. J. Anim. Sci., **35**, 580-584.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A. 1975a. J. Anim. Sci., **40**, 99-102.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A. 1975b. J. Anim. Sci., **41**, 375.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A. 1976. J. Anim. Sci., **42**, 927-932.
- PURSEL, V.G., SCHULMAN, L.L., JOHNSON, L.A. 1978a. Theriogenology, **9**, 305-312.
- PURSEL, V.G., SCHULMAN, L.L., JOHNSON, L.A. 1978b. J. Anim. Sci., **47**, 198-202.
- PURSEL, V.G., SCHULMAN, L.L., JOHNSON, L.A. 1978c. Biol. Reprod., **19**, 69-76.
- PURSEL, V.G. 1983. J. Anim. Sci., 57, Suppl. 1, 125-126.
- PURSEL, V.G., PARK, C.S. 1985. First Int. Conf. Deep. Freezing Boar Semen, Uppsala, 147-166.
- ROMENY, E., RICHTER, L., WEITZE, K.F. 1974. Dtsch. Tierärztl. Wschr., **81**, 512-514.
- SALAMON, S. 1973. Aust. J. Biol. Sci., **26**, 239-247.
- SALAMON, S., WILMUT, I., POLGE, C. 1973. Austr. J. Biol. Sci., **26**, 219-230.
- SANFORD, L.M., KING, G.J., MacPHERSON, J.W. 1972. Can. J. Anim. Sci., **52**, 65-72.
- SENEGACNIK, J., VENGUST, M., BAJT, G. 1980. IXth Int. Congr. Anim. Reprod. I.A., Madrid, V, 445-448.
- SHANNON, P., CURSON, B. 1972. J. Dairy Sci., **55** (5), 614-620.
- SONE, M. 1982. Vet. Rec., 11-14.
- TAYLOR, L. 1976. Pig Int., **6**, 19-20.
- VASQUEZ, I.A., GRAHAM, E.F. 1980. IXth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Madrid, V, 442-444.
- VISSER, D., SALAMON, S.S. 1974. J. Biol. Sci., **27**, 485-497.
- WESTENDORF, P., RICHTER, L., TREU, H. 1975. Dtsch. Tierärztl. Wschr, **82**, 261-267.
- WILMUT, J., POLGE, C. 1972. VIIth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Munich, II, 1611-1615.
- WILMUT, J., POLGE, C. 1974. J. Reprod. Fert., **38**, 105-113.
- WILMUT, J., POLGE, C. 1977a. Cryobiology, **14**, 483-491.
- WILMUT, J., POLGE, C. 1977b. Cryobiology, **14**, 479-482.