

Congélation du sperme de verrat en paillettes fines de 0,25 ml Résultats observés sur le terrain

P. THILMANT

Centre Interprofessionnel pour l'Amélioration et la Promotion animales (C.I.A.P.)
5, Rue Saint Rémy - B-4601 Argenteau, Belgique

Congélation du sperme de verrat en paillettes fines de 0,25 ml. Résultats observés sur le terrain

Une méthode de congélation-décongélation du sperme de verrat a été mise au point au C.I.A.P. en utilisant les paillettes françaises de 0,5 ml.

Afin de simplifier le processus de décongélation qui nécessite un chronométrage précis (12 sec) du temps d'immersion dans un bain-marie à 55°C., nous proposons l'utilisation des paillettes fines de capacité de 0,25 ml comme nouveau conditionnement. La décongélation de la semence serait facilitée car ces paillettes permettent une décongélation tout aussi rapide dans un bain-marie à 38°C pendant un temps indéterminé (au-dessus de 10 secondes) sans risquer de donner une température excessive à la semence.

Nous nous sommes assurés de la bonne qualité de la semence décongelée issue de ce nouveau protocole par des examens *in vitro* réalisés par opérateur et par analyseur d'images.

L'expérimentation sur le terrain concerne 66 truies qui sont triées au hasard en 3 lots égaux. Dans ces 3 lots (5m, 10f et 5f), la dose d'insémination est constituée respectivement du contenu de 5 paillettes médium (soit 3,8 10⁹ spermatozoïdes), 10 paillettes fines (3,8 10⁹ spz.) et 5 paillettes fines (1,9 10⁹ spz.). Le lot 5m est considéré comme le lot témoin.

L'échographie nous a permis de diagnostiquer 100% de gestations dans le lot 5m; 90,9% pour le lot 10f et 86,4% pour le lot 5f. Les écarts de fertilité entre les lots ne peuvent être statistiquement établis par manque de données.

En ce qui concerne la prolificité des groupes 5m, 10f et 5f, nous avons obtenu respectivement 11,4; 11,8 et 11,1 porcelets nés totaux sans différence significative (moyennes moindre carrés).

La réduction de moitié du nombre de spz par dose d'insémination dans le lot 5f (1,9 milliards de spermatozoïdes) n'influence en rien les résultats observés *in vivo*. Cette constatation nous encourage tout particulièrement dans la poursuite de nos investigations.

Cryopreservation of boar semen in 0.25 ml (mini) French straws. Field results

The CIAP has developed a freezing-thawing method for boar semen using 0.5 ml medium French straws.

In order to simplify the thawing process which requires immersing the straw in a water bath at 55°C for exactly 12s, we propose a method using 0.25 ml mini straws. Semen thawing should be easier because these straws allow fast thawing in a water bath at 38°C for an undefined period (over 10s) without running the risk of heat damaging the semen.

We made sure the frozen semen obtained by this process was of a good quality by *in vitro* measurements performed by a technician and CASA (computer assisted semen analysis).

A field experiment was conducted using 66 sows randomly allocated to one of 3 groups. The insemination dose used for the 3 treatment groups was respectively, 5m (5 medium straws = 3.8x10⁹ spermatozoa), 10f (10 mini straws = 3.8x10⁹ spz.) and 5f (5 mini straws = 1.9x10⁹ spz.). The 5m group was considered as the control.

Ultrasonography gave pregnancy rates of 100%, 90.9% and 86.4% (5m, 10f and 5f, respectively). Statistical differences in fertility between groups were not observed due to lack of data.

Prolificity (total piglets born) was not affected by treatment (5m was 11.4, 10f was 11.8 and 5f was 11.1; least square mean).

The effect of reducing by half of the number of spermatozoa per insemination dose in group 5f (1.9x10⁹ spermatozoa) had no bearing whatsoever on *in vivo* results. This study has produced encouraging results which should be pursued.

INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, la conservation du sperme de verrat à basse température a fait l'objet de nombreuses recherches (POLGE et al., 1970; PURSEL et JOHNSON 1971, 1975; CRABO et EINARSSON, 1971; PAQUIGNON et al., 1974; LARSSON et EINARSSON, 1976; WESTENDORF et al., 1975; HAMMITT et al., 1989a, b). Celles-ci ont porté sur la composition du dilueur, la nature et la concentration du cryopréservateur ainsi que sur la méthode de congélation en pastilles, en pailles (PAQUIGNON et al., 1986) et, plus récemment, en paillettes (FISER et FAIRFULL, 1990) ou en pochettes (BWANGA et al., 1991; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1996). Bien que des progrès considérables aient été enregistrés (ALMID et HOFMO, 1996), les résultats de fertilité et de prolificité restaient encore souvent à la limite de la rentabilité en raison des dommages encourus par les spermatozoïdes pendant le processus de congélation-décongélation (COURTENS et PAQUIGNON, 1985).

C'est pourquoi, en nous inspirant des résultats de ces recherches déjà publiées, nous avons mis au point une technique de congélation en paillettes françaises (IMV) médium de 0,5 ml qui soit réalisable sur le terrain avec un taux de réussite proche de celui de la semence fraîche (THILMANT, 1997). Les premières inséminations ont été réalisées en exploitations durant les années 1995 et 1996 (THILMANT, 1999).

Pour rappel, le processus de décongélation des paillettes médium doit s'effectuer par l'immersion de celles-ci (au nombre de 5 pour l'obtention d'une dose) dans un bain-marie à 55°C pendant 12 secondes en vue d'arriver le plus rapidement possible à la température de 38°C (1170°C/min). Cette façon d'agir permet de supprimer au maximum la stagnation de la température pendant la période de fusion et d'éviter ainsi le phénomène de recristallisation. Passé ce délai, le contenu des paillettes est versé dans le BTS (95 ml pour 1 dose, milieu de décongélation) à 38°C. L'insémination est alors réalisée le plus rapidement possible après la décongélation et durant la période d'immobilité de la truie.

Ce processus de décongélation est relativement lourd et fastidieux car il nécessite un chronométrage précis du temps de l'immersion et la présence de 2 niveaux différents de températures au même moment (55°C pour la température du bain-marie et 38°C pour celle du BTS).

En vue de simplifier cette technique, nous proposons l'utilisation des paillettes fines de capacité de 0,25 ml comme nouveau conditionnement. La décongélation de la semence serait facilitée car ces paillettes permettent une décongélation tout aussi rapide dans un bain-marie à 38°C pendant un temps indéterminé (au-dessus de 10 secondes) sans risquer de donner une température excessive à la semence (comme c'est le cas avec les paillettes médium de 0,5 ml si on procède pendant un temps d'immersion trop long).

Il est donc nécessaire d'étudier l'efficacité du conditionnement de la semence en paillettes fines qui simplifie le protocole de décongélation assurant, ainsi, une pénétration plus rapide de l'usage de la semence congelée au sein des exploitations.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Protocole de congélation-décongélation de la semence en paillettes médium et fines

Celui-ci est effectué suivant la méthode du C.I.A.P. (THILMANT, 1997). 28 éjaculats issus de 5 verrats différents de race Piétraïn Belge sont utilisés pour cette expérimentation. Chaque éjaculat est conditionné en paillettes (IMV) médium (0,5 ml) et fines (0,25 ml). Les deux modes de conditionnement sont donc refroidis et congelés de façon identique. La décongélation des paillettes moyennes est réalisée par l'immersion de celles-ci dans un bain-marie à 55°C pendant 12 secondes (méthode 1, témoin). La décongélation des paillettes fines est, quant à elle, effectuée dans un bain-marie à 38°C pendant 1 minute (méthode 2). Le contenu de 1 paillette est ensuite directement redilué dans 10 ml de BTS à 38° pour les paillettes médium et dans 5 ml pour les fines.

Nous avons étudié en outre et uniquement dans le cadre de l'examen *in vitro*, les effets de la décongélation dans un bain-marie à 38°C de la semence conditionnée en paillettes médium (méthode 3).

1.2. Contrôle *in vitro*, par opérateur et après décongélation, de la qualité de la semence rediluée

Ont été réalisées :

- Une évaluation de la motilité et du pourcentage de spermatozoïdes mobiles de la semence diluée à 38°C juste après décongélation (grossissement 100 fois sur fond noir) et après 1 heure.

Les spermatozoïdes ont été classés en 5 catégories:

- 5 = spermatozoïdes fléchants
- 4 = déplacements rapides et rectilignes des spermatozoïdes
- 3 = trajectoires curvilignes et/ou déplacements lents
- 2 = spermatozoïdes vibrants faibles déplacements
- 1 = spermatozoïdes vibrants en rotation sur eux-mêmes

- Une coloration à l'éosine-nigrosine et examen microscopique sur fond noir de 200 spermatozoïdes au grossissement 1000x en vue d'évaluer l'intégrité acrosomiale et le pourcentage de spermatozoïdes vivants.

Nous avons aussi réparti les spermatozoïdes en 4 classes (BAMBA, 1988):

- classe 1 : non teintés et acrosomes normaux
- classe 2 : teintés et acrosomes normaux
- classe 3 : non teintés et acrosomes anormaux
- classe 4 : teintés et acrosomes anormaux

1.3. Contrôle *in vitro*, par analyseur d'images (computer assisted semen analysis - CASA)

Par la suite, d'autres essais comparatifs furent effectués avec l'aide d'un analyseur d'images ou computer-assisted semen analysis - CASA (Hamilton Thorne Research) visant à donner plus

objectivement les résultats des différents paramètres étudiés.

Entre 15 et 30 minutes après la décongélation et remise en dilution, chaque échantillon est placé dans l'analyseur. Les paramètres observés sont les suivants:

- le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (en excluant les spz lents) et progressifs
- vitesses de déplacement d'un point à un autre (vsl - progressive velocity) ainsi que celles de leurs trajectoires réelles (vcl - track speed) ou pondérées (vap - path velocity)
- leurs rectitudes (vsl/vap)
- leurs linéarités (vsl/vcl)
- classification en spermatozoïdes rapides, médium et lents

1.4. Essai sur le terrain

Cette expérimentation concerne 66 truies de phénotype Landrace Belge se trouvant dans 2 exploitations différentes. Ces truies sont triées au hasard en 3 lots égaux et inséminées deux fois durant les chaleurs qui suivent le sevrage et pendant leur période d'immobilité.

Les éjaculats congelés et utilisés proviennent de 3 verrats de race Piétrain Belge. Nous avons tenu compte des critères minimum d'utilisation de la semence décongelée pour les inséminations (THILMANT, 1997).

Dans les 3 lots de truies (5m, 10f et 5f), la dose d'insémination est constituée respectivement du contenu de 5 paillettes médium (soit $3,8 \cdot 10^9$ spermatozoïdes), 10 paillettes fines ($3,8 \cdot 10^9$ spz.) et 5 paillettes fines ($1,9 \cdot 10^9$ spz.). La semence décongelée est directement rediluée cette fois dans 95 ml de BTS à 38°C et utilisée endéans l'heure qui suit. Le lot 5m est considéré comme le lot témoin.

Les études de la fertilité (taux de gestation contrôlé par échographie entre 23 et 42 jours) et de la prolificité (nombre de porcelets nés vivants et mort-nés) sont menées conjointement pour ces 3 lots. Les résultats du lot 5f sont particulièrement intéressants car en cas de réussite de celui-ci, il nous permettra de diminuer considérablement le nombre de spermatozoïdes utilisés et de ne pas augmenter le nombre de paillettes par dose.

1.5. Les analyses statistiques

Les données sont étudiées par l'analyse de variance à 2 critères avec interactions verrats, méthodes, verrats*méthodes en utilisant la procédure du modèle général linéaire de SAS (1985) pour les examens in vitro et in vivo. Un test de t est aussi utilisé pour comparer les résultats de prolificité (différence non significative si $p > 0,05$).

2. RÉSULTATS

2.1. Résultats in vitro

2.1.1. Par opérateur

Nous n'avons pas remarqué de différence significative au niveau du pourcentage d'acrosomes normaux et des spermatozoïdes vivants entre les 3 méthodes (tableau 1).

En ce qui concerne l'estimation de la motilité directe (tableau 2), elle apparaît meilleure pour les paillettes médium décongelées à 55° que pour les fines ($p = 0,012$) en tenant compte de l'écart entre les moyennes moindre carrés (4,4 vs 4,0). Cependant, dans le cadre de la méthode 2, les résultats de l'expérimentation avec les paillettes fines ont été initialement faussés car la déshydratation des échantillons contrôlés s'est réalisée trop rapide-

Tableau 1 - Résultats des colorations après décongélation (contrôle effectué par opérateur)

Méthode	Paillettes	Temp. bain-marie (°C)	Acrosomes normaux (%)	Vivants (%)
1	médium	55	56,9 a	66,4 a
2	fines	38	55,2 a	63,4 a
3	médium	38	54,5 a	64,1 a

Les valeurs affichées sont les moyennes moindre carrés

Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %

Tableau 2 - Comparaison des motilité et mobilité directes et après 1 heure (contrôle effectué par opérateur)

Méthode	Motilité directe	Mobilité directe (%)	Motilité + 1 h	Mobilité + 1 h (%)
1	4,4 a	72,5 a	4,1 a	58,8 a
2	4,0 b	67,2 a	3,1 b	36,0 b
3	4,2 a	67,8 a	3,5 b	47,8 a,b

Les valeurs affichées sont les moyennes moindre carrés

Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %

Tableau 3 - Résultats de décongélation (contrôle effectué par analyseur d'images)

Méthode	Mobilité %	Progr. %	vap µm/s	vsl µm/s	vcl µm/s	Rectitude %	Linéarité %	Rapide %	Moyen %	Lent %
1	45,7 _a	19,0 _a	70,9 _a	53,6 _a	133,5 _a	71,2 _a	40,7 _a	32,2 _a	13,4 _a	15,0 _a
2	42,4 _a	17,4 _a	74,7 _a	55,7 _a	137,8 _a	72,1 _a	41,3 _a	31,4 _a	11,1 _a	13,5 _a
3	41,1 _a	18,8 _a	70,9 _a	55,8 _a	128,4 _a	76,1 _b	44,5 _b	29,6 _a	11,4 _a	13,1 _a

Les valeurs affichées sont les moyennes moindres carrées

Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %

ment. En effet, le volume (5 ml) de ces échantillons (paillettes fines) s'est avéré deux fois plus réduit que celui des mêmes échantillons utilisés dans les méthodes 1 et 3 (10 ml).

D'autre part, l'utilisation de récipients à fond trop large a augmenté la vitesse d'évaporation du milieu de décongélation entraînant l'augmentation de la concentration des solutés et donc de la pression osmotique, laquelle diminue considérablement la motilité des spermatozoïdes. Il en résulte donc qu'à ce stade nous n'avons pas été en mesure de récolter une quantité suffisante d'informations estimables pour en déduire des conclusions valables au niveau de la thermorésistance de la méthode 2.

Comparativement à la méthode 1 (témoin), nous constatons dans la méthode 3, une baisse significative de la motilité et une baisse non significative du pourcentage de spermatozoïdes mobiles après la première heure (4,1 vs 3,5 et 58,8 vs 47,8% respectivement).

2.1.2. Par analyseur d'images

Nous observons tout d'abord que les pourcentages de spermatozoïdes mobiles et progressifs sont relativement bas dans notre expérimentation. Ceci provient essentiellement du fait que nous n'avons pas été en mesure de paramétrer, directement et de façon optimale, l'analyseur d'images. En effet, au cours de son utilisation nous avons remarqué qu'il confondait certaines particules inertes avec des spermatozoïdes diminuant ainsi le pourcentage de mobiles. De même, en ce qui concerne l'estimation de la progressivité, nous avons adopté arbitrairement un seuil qui correspond à une vitesse (vap) > 50mm/sec et à une rectitude > 80%, seuil sous lequel le spermatozoïde n'est pas considéré comme progressif. Ce seuil s'est avéré par la suite trop élevé surtout pour le deuxième facteur. Néanmoins, nous n'avons pas voulu modifier nos paramètres au cours de l'expérience afin de ne pas compromettre les comparaisons entre les données.

L'examen du tableau 3, nous permet de constater un pourcentage de spermatozoïdes mobiles et progressifs légèrement supérieur pour les paillettes médium décongelées à 55° (lot témoin) par rapport aux méthodes 2 et 3; Cependant ces écarts ne sont pas significatifs. De même, les spermatozoïdes provenant des paillettes fines semblent avoir une meilleure vélocité mais il n'existe là non plus aucune différence significative par rapport aux 2 autres lots.

On note, cependant une différence significative ($p < 0,03$) pour la rectitude (76,1 vs 71,2 et 72,1% resp.) et la linéarité (44,5 vs 40,4 et 41,3% resp.) des spermatozoïdes du lot des paillettes médium décongelées à 38°, cette méthode enregistrant un meilleur score.

Il n'existe pas de différence significative entre les 3 lots pour l'établissement des 3 classes (rapides, médium et lents)

2.2. Essais de terrain

L'échographie nous a permis de diagnostiquer 22 gestations sur 22 truies inséminées (100%) dans le lot 5m, 20 sur 22 (90,9%) pour le lot 10f, et 19 sur 22 (86,4%) pour le lot 5f. Les écarts de fertilité entre les lots ne peuvent être statistiquement établis par manque de données (tableaux 4 et 5).

Tableau 4 - Performances de reproduction selon le mode de conditionnement

Conditionnement	Fertilité (1)	Prolificité (2)
Paill. médium	100 (22)	11,7 ± 2,4 _a (22)
Paill. fines	88,6 (44)	12,0 ± 2,8 _a (37)

(1) Fertilité: truies gestantes/truies inséminées (n)x100

(2) Prolificité: nombre moyen de goretts nés totaux par mise bas (n)
Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %

Tableau 5 - Performances de reproduction selon le mode de conditionnement et le nombre de spermatozoïdes par dose

Lots	Spz/dose	Fertilité (1)	Prolificité (2)
5m	3,8. 109	100 (22)	11,4 ± 0,7 _a (22)
10f	3,8. 109	90,9 (22)	11,8 ± 0,7 _a (20)
5f	1,9. 109	86,4 (22)	11,1 ± 0,8 _a (17)

(1) Fertilité: truies gestantes/truies inséminées (n)x100

(2) Prolificité: les valeurs sont les moyennes moindres carrées des goretts nés totaux par mise bas (n) Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %

Nous avons enregistré dans le premier groupe 22 mises bas, 20 dans le second (soit 2 retours en oestrus) et 17 dans le troisième. Pour ce dernier, nous avons constaté outre 3 retours, un avortement et une truie morte.

En ce qui concerne la prolificité des groupes 5m, 10f et 5f, (tableau 5), nous avons obtenu respectivement 11,4; 11,8 et 11,1 porcelets nés totaux sans différence significative (moyennes moindre carrés).

3. DISCUSSION

Les analyses réalisées par opérateur ne nous ont pas permis de différencier significativement les trois méthodes de décongélation en ce qui concerne la détermination des pourcentages des acrosomes normaux et des spermatozoïdes vivants par la coloration éosine-nigrosine.

Quant à la motilité directe, on constate une différence significative entre les résultats obtenus par la méthode témoin (1) et celle (méthode 2) utilisant les paillettes fines à 38° (4,4 vs 4,0).

Nous pouvons expliquer cette différence par l'évaporation du milieu de décongélation en volume trop réduit ainsi que cela a déjà été souligné auparavant à propos de la thermorésistance. La différence de motilité après une heure de décongélation des paillettes médium entre la méthode 1 et 3 ne peut cependant s'expliquer de la même façon car les volumes du milieu de décongélation utilisés sont identiques.

A ce niveau il semble bien que les spermatozoïdes en paillettes médium décongelés à 38° comparés à ceux décongelés à 55° ne retrouvent pas toutes leurs potentialités énergétiques pour leurs déplacements.

Quant aux examens réalisés avec l'analyseur d'images (entre 15 et 30 minutes après décongélation), nous retrouvons une atténuation du nombre de spermatozoïdes mobiles des paillettes médium décongelées à 38° (méthode 3) mais qui n'est cependant pas significative. Les plus rapides déplacements sont observés lors de la décongélation des paillettes fines à 38°, ceci sans différences significatives par rapport aux deux autres méthodes. Un écart significatif dans le sens d'une amélioration est par contre observé en ce qui concerne la rectitude et la linéarité des déplacements des spermatozoïdes dans le cadre de la décongélation suivant la méthode 3. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'on observe dans cette catégorie une diminution de la vitesse de la vap et de la vcl et par conséquent une motricité amoindrie du spermatozoïde se déplaçant ainsi de façon plus rectiligne et linéaire. Cette observation va de pair avec le fait que nous retrouvons un pourcentage plus réduit de spermatozoïdes de la classe rapide dans cette catégorie (3) par rapport aux deux autres (29,6 vs 32,2 et 31,4 respectivement).

Les essais sur le terrain nous fournissent beaucoup plus de renseignements fiables quant à la qualité de la semence que les tests *in vitro*. Nous n'avons pas testé *in vivo* la décongélation des paillettes médium à 38° car il nous semblait a priori que les paillettes fines seraient mieux adaptées au pro-

cessus de la congélation-décongélation, la température du milieu restant en effet plus homogène pendant les périodes de refroidissement et de réchauffement. Au demeurant, l'amélioration des résultats de fertilité et de prolificité s'était déjà fait sentir avec l'abandon des " gros " conditionnements (pailles de 5 ou de 1 ml et pochettes) et avec l'utilisation de paillettes médium (THILMANT, 1999). Dans cette logique, nous avons voulu obtenir le plus rapidement possible des résultats préliminaires sur le terrain en utilisant des paillettes fines et en faisant varier le nombre de spermatozoïdes par dose d'insémination. La réduction de moitié du nombre de ceux-ci par dose d'insémination permet en effet d'en diminuer le coût en produisant deux fois plus de doses par éjaculat.

Les résultats observés pour les paillettes fines sont particulièrement encourageants si on les compare à ceux du lot témoin des paillettes médium. En effet, même si les résultats de fertilité (88,6%) des paillettes fines n'atteignent pas ceux du lot témoin (100%), ces derniers sont néanmoins tout à fait exceptionnels.

Quant à la prolificité, nous n'avons pas de différence significative entre les deux modes de conditionnement. Les résultats sont favorables dans les deux cas. La réduction de moitié du nombre de spermatozoïdes par dose d'insémination dans le lot 5f (1,9 milliards de spermatozoïdes) n'influence en rien les résultats observés *in vivo* hormis le fait que nous avons détecté un retour en oestrus supplémentaire dans ce lot. Cette constatation nous encourage tout particulièrement dans la poursuite de nos investigations. Nous pouvons, en effet, penser qu'une réduction du nombre de spermatozoïdes pourrait être tout aussi efficace lors de l'insémination avec de la semence congelée car cette dernière est utilisée extemporanément après décongélation et aucun délai de conservation n'est indispensable (comme en semence fraîche).

CONCLUSION

D'intéressantes perspectives se manifestent dans l'utilisation des paillettes fines compte tenu des bons résultats déjà acquis sur le terrain.

Dans le futur, il s'agira de déterminer le nombre idéal de spermatozoïdes nécessaires par dose d'insémination. L'utilisation systématique de l'analyseur d'images apportant des données objectives (à condition d'établir des paramètres qui reflètent encore mieux la réalité) nous aidera certainement à finaliser cet objectif (HOLT et al., 1997).

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier très vivement monsieur le professeur émérite F. ECTORS de la F.M.V., U.L.G., le Docteur J. VERSTEGEN, chargé de cours au service d'obstétrique et trouble de la reproduction, petits animaux, pour l'utilisation de l'analyseur d'images et Monsieur F. FARNIR, 1er assistant, du service de biostatistique.

Cette recherche a été subsidiée par la Province de Liège et la Région Wallonne (arrêté ministériel du 24/6/1999).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALMLID T., HOFMO P.O. , 1996. *Reprod. Domest. Anim.*, 31, 169-173.
- BAMBA K., 1988. *Theriogenology*, 29,1245-1251.
- BWANGA C.O., EINARSON S., RODRIGUEZ- MARTINEZ H., 1991. Deepfreezing of boar semen packaged in plastic bags and straws. *Reprod. Domest. Anim.*, 26, 117-125.
- COURTENS J.L., PAQUIGNON M., 1985. Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of boar: First Int.Conf.Deep Freezing Boar Semen, Uppsala, 61-87.
- CRABO B., EINARSSON S., 1971. *Acta Vet; Scand.*, 12,125-127.
- FISER P.S., FAIRFULL R.W., 1990. *Molecular Reproduction and Development*, 25, 123-129.
- HAMMITT D.G., MARTIN P.A., 1989a, *Theriogenology*, 32,359-368.
- HAMMITT D.G., MARTIN P.A., 1989b. *Theriogenology*, 32,369-384.
- HOLT C., HOLT W.V., MOORE H.D. et al., 1997. *J. Androl.*, 18(3), 312-323.
- LARSSON K., EINARSSON S., 1976. *Acta Vet.Scand.*, 17,43-62.
- PAQUIGNON M., MERGOUNIS D., COUROT M., DU MESNIL DU BUISSON F., 1974. *Journées Rech.Porcine en France*, 71-76.
- PAQUIGNON M., QUELLIER P., DACHEUX J.L., 1986. *Ann. Zootech.*, 35, 173-184.
- POLGE C., SALAMON S., WILMUT I., 1970. *Vet.Rec.* , 87,424-428.
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., 1971. *J.Anim.Sci.*, 33,265(abstr).
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., 1975. *J.Anim.Sci.*, 40,99-102.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H.,ERIKSSON B.,LUNDEHEIM N., 1996. *Reprod. Domest. Anim.*, 31,161-168.
- SAS (Statistical Analysis System), 1985. In: *SAS User's Guide. Statistics*, SAS INST., Cary, NC, USA.
- THILMANT P., 1997. *Ann. méd. vét.*, 141, 457-462
- THILMANT P., 1999. *Journées Rech. Porcine en France*, 31, 59-64
- WESTENDORF P., RICHTER L., TREU H., 1975. *Dtsch.Tierärztl.Wschr*, 82,261-267.