

# Un milieu de cryoconservation approprié permet à 30 % de blastocystes transférés de donner naissance à des porcelets

Françoise BERTHELOT, Françoise MARTINAT-BOTTÉ, Christine PERREAU,  
Alain LOCATELLI, Patrick MANCEAU (1), Michel TERQUI

Institut National de la Recherche Agronomique  
Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements – 37380 Nouzilly  
(1) Unité Expérimentale d'Insémination Caprine et Porcine – 86480 Rouillé

## Un milieu de cryoconservation approprié permet à 30% de blastocystes transférés de donner naissance à des porcelets

L'objectif de notre étude est de choisir le milieu de dilution des cryoprotecteurs qui optimise la survie des blastocystes porcins après vitrification avec la méthode OPS.

Des blastocystes de génotypes PiétrainxMeishan (PxMS) et PiétrainxLarge White hyperprolifique (PxLWh) sont répartis entre les lots PBS et TCM (milieux de base pour la dilution des cryoprotecteurs). Ils sont vitrifiés par la méthode OPS selon la technique décrite précédemment. La viabilité des blastocystes cryoconservés est évaluée après transfert chirurgical de 20 blastocystes dans chacune des 40 receveuses Meishan (MS). Au moment de la mise bas, les nombres de porcelets nés vivants ou mort-nés sont enregistrés ainsi que les poids à la naissance et à 21 jours.

Le taux de mise bas des receveuses ayant porté des blastocystes PxMS est similaire entre les lots PBS et TCM (80% vs 100%  $p=0,28$ ). Par contre, une amélioration significative ( $p=0,036$ ) est notée en faveur du lot TCM pour les blastocystes PxLWh (80% vs 30% pour le PBS). Le milieu de dilution des cryoprotecteurs interfère aussi sur la survie des embryons transférés et permet d'effacer les différences entre génotypes : PxMS=32% et PxLWh=29,5% pour le lot TCM vs PxMS=13,5% et PxLWh=5,5% pour le lot PBS. De plus, des grandes portées (+ de 8 porcelets) sont observées pour le lot TCM quel que soit le génotype. Aucune anomalie n'a été détectée chez les porcelets après la naissance. Leur croissance durant la lactation est satisfaisante.

La méthode OPS est donc utilisable et reproductible pour vitrifier les blastocystes porcins.

## The use of an appropriate cryo-preservation medium allows 30% of transferred blastocysts to produce live piglets

The purpose of this study was to select the best cryo-protection dilution medium (TCM or PBS) in order to improve survival of porcine blastocysts after vitrification with the Open Pull Straw (OPS) method.

Unhatched blastocysts from PiétrainxMeishan (PxMS) and PiétrainxLarge White hyperprolific (PxLWh) crosses were allocated to either a PBS or a TCM group (basal media for cryo-protection dilution). Vitrification was performed using OPS technology. Embryo viability was evaluated after surgical transfer of 20 embryos/Meishan recipient ( $n=40$ ).

No difference was observed in farrowing rate for PxMS blastocysts between treatments (PBS, 80% vs TCM, 100%,  $P=0.28$ ). Conversely, the farrowing rate of PxLWh blastocysts was higher ( $P=0.036$ ) for TCM (80%) than for PBS (30%). In the TCM group no significant difference in viability rates was observed between genotypes (MS=32%, LWh=29.5%) however there was a difference for the PBS group (MS=13.5%, LWh=5.5%). Moreover, a greater number of large litters (> 8 piglets) was observed with TCM, whatever the genotype used. TCM medium should be used for vitrification.

Piglets displayed no anatomical abnormalities after farrowing and growth rate during lactation was within the normal range.

The OPS method is therefore appropriate for cryo-preservation of unhatched porcine blastocysts.

## INTRODUCTION

En France, la conservation de la diversité génétique des races locales à faibles effectifs ou de lignées génétiques spécifiques et leur protection de l'extinction qui pourrait être causée par des maladies réémergeantes (brucellose) nécessitent la création d'une cryobanque. Une banque de semence est déjà en cours de constitution (LABROUE et LUQUET, 1999). La naissance de porcelets après cryoconservation de blastocystes et de morulae (BERTHELOT et al, 2001a ; BERTHELOT et al, 2001b) permet d'envisager de compléter cette banque avec des embryons. Deux équipes (BERTHELOT et al, 2001c ; DOBRINSKY, 2001) ont fait très récemment le point sur les différentes méthodes élaborées pour la cryoconservation. La méthode la plus simple est la vitrification avec les micro-paillottes OPS (VAJTA et al, 1998) que nous avons adaptée au porc (BERTHELOT et al, 2000b ; BERTHELOT et al, 2001a). Elle évite toute manipulation et traitement de l'embryon (BERTHELOT et al, 2000a); elle permet de le conserver à l'intérieur de sa pellicule jusqu'au transfert afin d'assurer une protection sanitaire maximum comme l'exige la réglementation de l'IETS (STRINGFELLOW et SEIDEL, 1998 ; THIBIER, 2001) ; enfin elle est applicable aux stades blastocyste et morula.

Le but de cette étude est d'améliorer la survie des blastocystes après vitrification en optimisant le milieu de dilution des cryoprotecteurs. D'après les premiers résultats (BERTHELOT et al, 2001b), le milieu de dilution semblait en effet un facteur essentiel de la réussite de la vitrification OPS. Deux races de donneuses ont été utilisées pour s'assurer que la technique n'était pas adaptée qu'à un seul génotype.

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1.1. Animaux

Les cochettes donneuses et receveuses d'embryons sont toutes issues du troupeau expérimental de l'INRA de Nouzilly. Elles sont cycliques et âgées de 5 à 8 mois au moment de leur introduction dans l'expérience.

Les donneuses sont de génotypes Meishan (MS ; n = 61) et Large White hyperproliférique (LWh ; n = 44). Les receveuses sont des Meishan (n = 40).

## 1.2. Production et collecte des embryons

### 1.2.1 Production d'embryons

Les donneuses d'embryons ne reçoivent aucun traitement de superovulation. La détection des oestrus est faite deux fois par jour à l'aide d'un verrat ; les truies sont inséminées artificiellement sur chaleur naturelle.

La collecte et la préparation des doses de semence sont réalisées par l'UEICP- INRA, Rouillé (86480). Les truies donneuses sont inséminées deux fois ( $3.10^9$  spermatozoïdes / donneuse) avec de la semence de verrat de génotype différent (Piétrain =P) afin de bénéficier de la vigueur hybride (MARTINAT-BOTTE et al., 1992 a). Les embryons seront donc de génotype PxLWh ou PxMS.

### 1.2.2 Collecte d'embryons

Les cochettes donneuses d'embryons sont abattues 5 à 6 jours après la première insémination, leur tractus génital est immédiatement prélevé, les cornes utérines sont perfusées avec du sérum physiologique à 39°C additionné de 2 % de sérum de veau nouveau-né. Les embryons sont collectés dans une boîte de Pétri. Seuls les embryons au stade blastocyste sont sélectionnés pour cette étude.

## 1.3. Schéma expérimental de vitrification

Les blastocystes de génotype PxMS et PxLWh encore dans leur zone pellicule sont répartis chacun en 2 lots expérimentaux (PBS et TCM, milieux de base de dilution des cryoprotecteurs).

Le milieu de base qui sert à la dilution des cryoprotecteurs pour la vitrification est soit :

- le PBS, qui est un tampon phosphate de Dulbecco dont l'osmolarité a été ajustée à 290 mOsm (à l'aide du même tampon 2 fois concentré) pour compenser la dilution saline due à la forte concentration de cryoprotecteurs.
- le TCM, qui est du TCM 199 tamponné à l'hépès, (M7528 : SIGMA, France). Ces 2 milieux sont additionnés de 20 % de sérum de veau nouveau-né.

La technique a été décrite préalablement par (BERTHELOT et al, 2000a). Pour la vitrification et le réchauffement, les

**Tableau 1** - Schéma expérimental de la vitrification et du réchauffement des blastocystes

| Milieux de base (MB) | T    | Vitrification                         | Temps (min.) | Réchauffement       | Temps (min.) |
|----------------------|------|---------------------------------------|--------------|---------------------|--------------|
| TCM<br>ou<br>PBS     | 39°C | MB seul                               | 1            | MB + 0,13M sucrose  | 1            |
|                      |      | MB seul                               | 1            | MB + 0,13M sucrose  | 5            |
|                      |      | MB + 7,5% EG + 7,5% DMSO              | 3            | MB + 0,075M sucrose | 5            |
|                      |      | MB + 18% EG + 18% DMSO + 0,4M sucrose | 1            | MB seul             | 5            |

EG = Ethylène Glycol DMSO= Diméthylsulfoxyde TCM= Hépès-TCM199 +20% Sérum de veau nouveau-né  
PBS = PBS +20% Sérum de veau nouveau-né T = température de tous les milieux

embryons sont passés successivement dans les 4 bains décrits dans le tableau 1.

Dans le 4<sup>ème</sup> bain de vitrification, les embryons sont rassemblés, dans un maximum de 2µl de la solution de vitrification, immédiatement aspirés par capillarité dans une micro paillette OPS (VAJTA et al, 1998) et plongés dans l'azote liquide où ils sont stockés pour une durée d'une semaine à 4 mois. Après stockage, les embryons sont réchauffés avant leur transfert dans des receveuses.

#### 1.4. Transfert

Tous les transferts sont réalisés sur des cochettes de génotype MS. Il a été montré que la survie embryonnaire est meilleure avec ce génotype (MARTINAT-BOTTÉ et al, 1992b). Aucune receveuse n'est inséminée, l'oestrus est apparu 24 heures après celui de la donneuse.

Le transfert est réalisé par voie chirurgicale (MARTINAT-BOTTÉ et al, 1992a), 1 à 2 heures après le réchauffement des embryons.

Toutes les receveuses reçoivent chacune un maximum de 20 blastocystes réchauffés. Si parmi les 20 blastocystes réchauffés pour un transfert, un ou plusieurs d'entre eux ont perdu leur pellucide pendant le réchauffement, ils sont éliminés afin de respecter la réglementation de l'IETS et les seuls embryons restants sont transférés quelque soit leur apparence morphologique. Ces pertes sont en moyenne très faibles 0,25 %; (BERTHELOT et al, 2001c). Les embryons sont introduits à l'aide d'une seringue dans un cathéter souple et stérile et déposés dans le haut d'une des 2 cornes utérines.

Si la receveuse ne revient pas en oestrus dans un délai normal (18-24 jours), une échographie est réalisée entre 25 et 30 jours pour confirmer que la truie est bien gravide (MARTINAT-BOTTÉ et al, 2000).

#### 1.5. Collecte des données et analyse statistique

Pour chaque donneuse, trois paramètres ont été enregistrés : les nombres de corps jaunes, d'embryons et de blastocystes.

Les taux de gestation et de mise bas ont été notés ainsi que le moment du retour en oestrus de la receveuse.

A la mise bas, les nombres de porcelets nés vivants ou morts-nés ont été enregistrés ainsi que les poids à la naissance et à 21 jours.

Le taux d'ovulation, le nombre d'embryons des deux génotypes, les taux de gestation, de mise bas et de survie entre lots et génotypes ont été analysés selon différentes procédures du logiciel S-PLUS (STATISTICAL SCIENCE, 1996) (analyse de variance, test de proportionnalité, test de répartition des populations) et du logiciel SAS (SAS INSTITUTE INC., 1997).

## 2. RÉSULTATS

Le taux d'ovulation des cochettes donneuses LWh est significativement plus élevé que celui des MS ( $19,1 \pm 2,9$  vs  $13,8 \pm 2,6$ ;  $p < 0,01$ ). Il en est de même pour les paramètres : nombre d'embryons collectés et nombre de blastocystes qui diffèrent entre génotypes maternels :  $15,2 \pm 3,8$  et  $10,7 \pm 5,3$  chez les LWh et  $10,7 \pm 3,0$  et  $7,1 \pm 3,8$  chez les MS ( $p < 0,01$ ). Le taux de collecte des embryons est en moyenne de 78 %. Deux embryons collectés sur 3 sont au stade blastocyste.

### 2.1. Taux de gestation

Les résultats de gestation contrôlée par échographie à 25 jours sont indiqués dans le tableau 2. Globalement, le taux de gestation est de 82,5 % pour les 40 transferts réalisés.

Il n'y a pas de différence significative ( $p=0,84$ ) entre le taux de gestation des receveuses qui ont porté des blastocystes PxMS vitrifiés soit avec du PBS (90 %) soit avec du TCM (100 %). En ce qui concerne les blastocystes PxLWh, un écart des pourcentages de gestation de 40 % est observé entre les 2 milieux de vitrification (tableau 2) ; cette différence importante est presque significative ( $p=0,07$ ).

Les délais de retours sont donnés dans le tableau 3. La plu-

**Tableau 2** - Taux de gestation des receveuses en fonction des lots et des génotypes des embryons

| Lots | Génotypes des embryons | Nombre de transferts | Taux de gestation (Nbre de gestations/ Nbre total de transferts) |
|------|------------------------|----------------------|--|
| PBS  | PxMS                   | 10                   | 90 % (9/10) <sup>a</sup>   |
|      | PxLWh                  | 10                   | 50 % (5/10) <sup>b</sup>   |
| TCM  | PxMS                   | 10                   | 100 % (10/10) <sup>a</sup>                                       |
|      | PxLWh                  | 10                   | 90 % (9/10) <sup>c</sup>   |

<sup>b,c</sup> $p=0,07$

**Tableau 3** - Délais de retours en oestrus des receveuses

| Lots | Génotype des embryons | PxLWh          |             | PxMS       |             |
|------|-----------------------|----------------|-------------|------------|-------------|
|      |                       | <21 jours      | > 25 jours* | < 21 jours | > 25 jours* |
| PBS  |                       | 20-19-20-18-19 | 29-39       | 20         | 27          |
| TCM  |                       | 20             | 27          |            |             |

\* Après la confirmation de la gestation à l'échographie entre 25 et 28 jours de gestation

part des retours sont apparus dans des délais normaux (avant 21 jours). Quelques-uns sont observés plus tardivement (après 25 jours). Ces receveuses avaient été observées gravides à l'échographie.

## 2.2. Taux de mise bas et de survie des embryons transférés

Les taux de mises bas (nombre de receveuses ayant mis bas / nombre total de receveuses) et les taux de survie (nombre de porcelets nés vivants / nombre d'embryons transférés) exprimés en %, sont indiqués dans le tableau 4.

Le taux de mises bas est de 67,5 % pour l'ensemble des 40 transferts. Comme pour le taux de gestation, aucune différence significative ( $p=0,28$ ) n'est notée chez les receveuses qui ont reçu des blastocystes PxMS vitrifiés soit avec du PBS (80 %) soit avec du TCM (100 %). En revanche, une amélioration significative est enregistrée pour les blastocystes PxLWh ( $p=0,036$ ) en faveur du milieu TCM (80 % versus 30 % lot PBS).

Le milieu de dilution des cryoprotecteurs affecte fortement la survie des embryons transférés. Une amélioration importante de 18,5 % et 24 % de la survie est observée en faveur du

TCM respectivement pour le génotype PxMS ( $p=0,003$ ) et PxLWh ( $p=0,008$ ).

## 2.3. Taille des portées et poids des porcelets à la naissance et au sevrage

Au total 168 porcelets sont nés et 161 étaient vivants à la naissance. Le pourcentage de morts nés est de 4 % et affecte indifféremment les 2 génotypes. Aucune anomalie anatomique ou comportementale n'a été constatée au moment de la naissance ou dans les jours qui ont suivi celle-ci.

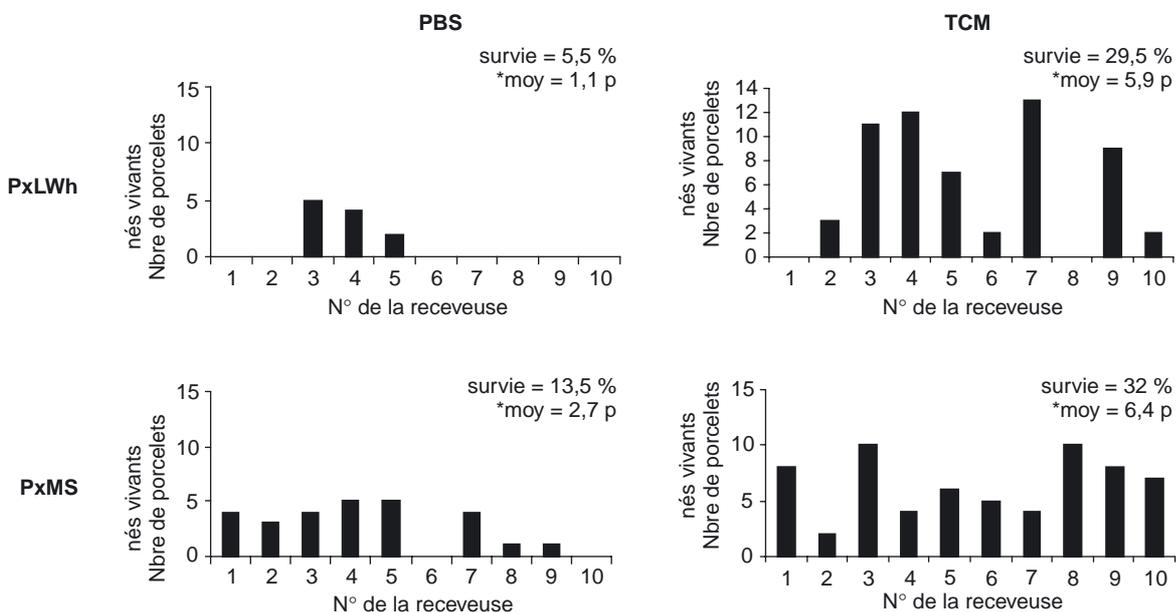
La figure 1 montre le nombre de porcelets nés vivants pour chaque receveuse en fonction des lots et du génotype. Le lot TCM permet d'engendrer des portées plus nombreuses par comparaison au lot PBS et ceci quelque soit le génotype PxMS ou PxLWh. Si on considère que des portées inférieures ou égales à 8 porcelets nés constituent des petites portées (LEBRET, 1999), le lot TCM a permis, chez les PxLWh, d'avoir 4 portées normales et chez les PxMS, 4 portées normales. Pour le lot PBS, les portées sont toutes des petites portées. En moyenne, la taille des portées est de 6 porcelets pour le lot TCM quelque soit le génotype. Pour le lot PBS, elle n'est que de 1,1 et 2,7 porcelets pour les PxLWh et les PxMS respectivement.

**Tableau 4** - Résultats obtenus après transferts de 20 blastocystes vitrifiés/ réchauffés par receveuse

| Lots | Génotypes des embryons | Nombre de Transferts | Taux de mises bas<br>(Nbre de mises bas/Nbre de transferts) |                      | Taux de survie<br>(Nbre de porcelets vivants/<br>Nbre d'embryons transférés) |                       |
|------|------------------------|----------------------|---|----------------------|--|-----------------------|
|      |                        |                      |   |                      |  |                       |
| PBS  | PxMS                   | 10                   | 80%   | (8/10) <sup>a</sup>  | 13,5%  | (27/200) <sup>e</sup> |
|      | PxLWh                  | 10                   | 30%   | (3/10) <sup>b</sup>  | 5,5%   | (11/200) <sup>g</sup> |
| TCM  | PxMS                   | 10                   | 100%  | (10/10) <sup>a</sup> | 32%  | (64/200) <sup>f</sup> |
|      | PxLWh                  | 10                   | 80%   | (8/10) <sup>c</sup>  | 29,5%  | (59/200) <sup>h</sup> |

<sup>b, c</sup>  $p = 0,036$  ; <sup>e, f</sup>  $p = 0,003$  ; <sup>g, h</sup>  $p = 0,008$

**Figure 1** - Répartition des porcelets nés vivants par receveuse en fonction du génotype de la donneuse et du lot



\*moy = Nombre total porcelets / Nombre receveuses

**Tableau 5** - Poids des porcelets à la naissance et au sevrage après vitrification et transfert chirurgical des embryons

| Génotypes    | Poids des porcelets (en kg)<br>A la naissance | Poids des porcelets (en kg)<br>A 21 jours |
|--------------|---|---|
| <b>PxMS</b>  | 1,2 ± 0,3 (76)                                | 4,8 ± 1,1 (67)                            |
| <b>PxLWh</b> | 1,1 ± 0,3 (70)                                | 4,1 ± 1.0 (63)                            |

( ) Nombre de porcelets

Les poids des porcelets à la naissance ne diffèrent, ni entre génotype ( $p=0,3$ ), ni entre lot ( $p=0,25$ ). Par contre un effet receveuse est noté ( $p=0,008$ ). A 21 jours, le même effet est constaté (tableau 5).

### 3. DISCUSSION

La cryoconservation des embryons de porc a été longtemps un rêve pour l'industrie porcine et un cauchemar pour les chercheurs, jusqu'à l'apparition de la vitrification, et en particulier de la méthode OPS (VAJTA et al, 1998). Les premiers porcelets obtenus avec cette méthode sont nés en 1999. Cependant les taux de mise bas et de survie étaient encore faibles et en particulier pour les PxLWh.

Avec la méthode de vitrification améliorée, les taux de gestation et de mises bas des receveuses sont identiques à ceux qui ont été obtenus après transfert d'embryons frais (MARTINAT-BOTTÉ et al, 1993). Les taux de survie après transfert des blastocystes vitrifiés avec le PBS sont faibles (MS= 13,5 % et LWh= 5,5 %) et différents entre les 2 génotypes ( $p= 0,04$ ), (BERTHELOT et al, 2000a). Ce pourcentage est significativement amélioré à la suite de l'utilisation du TCM pour diluer les cryoprotecteurs (PxMS = 32 % et PxLWh = 29,5 %). Le milieu de vitrification TCM supprime donc les différences de survie entre génotypes. Ce milieu qui contient de nombreux acides aminés joue certainement un rôle protecteur ; l'hépès qui maintient la stabilité du pH peut aussi avoir un effet favorable sur les blastocystes porcins.

Une équipe (CAMERON et al, 2000) a publié des résultats de développement *in vivo* (5 porcelets/ 180 blastocystes vitrifiés) avec la méthode OPS chez le porc mais leurs conditions expérimentales sont très différentes des nôtres (Cytochalasin B et centrifugation, PBS, éthylène glycol + polyvinyl pyrrolidone).

Cette méthode OPS a été aussi utilisée pour vitrifier des embryons de plusieurs autres mammifères domestiques. Des veaux sont nés après vitrification d'ovocytes et de blastocystes (LE GAL et al, 2000a ; LE GAL et al, 2000b ; VAJTA et al, 1998). De même, chez la chèvre (EL-GAYAR et al, 2001) et la brebis (DATTENA et al, 2001) des produits sont nés.

Les porcelets nés ne présentaient aucune anomalie anatomique mais des différences de poids de naissance sont notés

entre les 2 génotypes (PxMS, PxLWh). Les poids à la naissance de porcelets issus de croisements identiques (PxMS et PxLW) après insémination dans 2 élevages expérimentaux (INRA Bourges et Le Magneraud ) sont très proches de ceux nés après vitrification et transfert dans une receveuse MS (1,1 kg vs 1,2 kg ; LAGANT, communication personnelle et tableau 5). Plusieurs équipes ont mesuré l'impact du génotype de la receveuse sur la croissance de l'embryon à 12 jours (YOUNGS et al, 1994) ou 30 jours de gestation (ASHWORTH et al, 1990), du fœtus à 70, 90 et 110 jours (BIENSEN et al, 1996 ; BIENSEN et al, 1999) et à la naissance du porcelet (WILSON et al, 1998). Les résultats obtenus par tous ces auteurs montrent que les embryons LW ou croisés qui se développent dans un utérus MS sont significativement plus légers (40 %) que ceux qui se développent dans un utérus LW ou croisé. Cet écart est très voisin de celui observé (30 %) entre les poids à la naissance des porcelets PxLW (1,5 kg en moyenne : LAGANT, communication personnelle) et ceux des porcelets nés après vitrification et transfert dans une receveuse MS (1,1 kg : tableau 5). Il n'y a donc pas d'effet néfaste de la vitrification et du transfert sur la croissance foetale.

### CONCLUSION

La vitrification ultra rapide avec la méthode OPS nous donne la possibilité de cryoconserver des blastocystes encore à l'intérieur de leur pellucide. Cette étude démontre que le milieu de dilution des cryoprotecteurs est un facteur très important. Le TCM tamponné par l'hépès permet d'obtenir un taux de survie des embryons transférés équivalent entre les 2 génotypes.

La méthode OPS est donc utilisable et reproductible pour vitrifier les blastocystes porcins, les tailles de portées approchent de celles obtenues dans des conditions normales. Aucune anomalie n'a été détectée chez les porcelets au moment de la naissance et leur croissance durant la lactation est satisfaisante.

### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M. E. VENTURI et son équipe de l'élevage porcin, le personnel de l'hôpital-abattoir (PRC – INRA, 37380 Nouzilly) pour leur collaboration efficace lors de la réalisation de ce travail, ainsi que Mme Odile MOULIN pour la préparation des documents.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASHWORTH C. J., HALEY C. S., AITKEN R. P., WILMUT I., 1990. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90, 595-603.
- BERTHELOT F., MARTINAT-BOTTÉ F., LOCATELLI A., PERREAU C., TERQUI M., 2000a. *Cryobiology*, 41, 116-124.
- BERTHELOT F., MARTINAT-BOTTÉ F., LOCATELLI A., TERQUI M., 2000b. *Journées de la Recherche Porcine en France*, 32, 433-437.
- BERTHELOT F., MARTINAT-BOTTÉ F., PERREAU C., TERQUI M., 2001a. *Reproduction, Nutrition, Development*, 41, 1-6.
- BERTHELOT F., MARTINAT-BOTTÉ F., PERREAU C., TERQUI M., 2001b. 6<sup>th</sup> International Conference on Pig Reproduction, Columbia, USA, Abstr. 136.
- BERTHELOT F., MARTINAT-BOTTÉ F., VAJTA G., TERQUI M., 2001c. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the EAAP, Budapest, 210.
- BIENSEN N. J., WILSON M. E., FORD S. P., 1996. *Journal of Animal Science*, 74 (suppl. 1), abstr 434.
- BIENSEN N. J., WILSON M. E., FORD S. P., 1999. *Journal of Animal Science*, 77, 954-959.
- CAMERON R. D. A., BEEBE L. F. S., BLACKSHAW A. W., HIGGINS A., NOTTLE M. B., 2000. *Australian Veterinary Journal*, 78, 195-196.
- DATTENA, M., ISACHENKO, V., ALABART, J. L., FOLCH, J., ACCARDO, C., CAPPAL, P., 2001. 17<sup>e</sup> Colloque de l' Association Européenne de Transfert Embryonnaire (A.E.T.E.), Lyon-France, 114.
- DOBRINSKY J. R., 2001. 6<sup>th</sup> International Congress on Pig Reproduction, Columbia (USA), 105.
- EL-GAYAR M., HOLM P., HOLTZ W., 2001. *Theriogenology*, 55, 305.
- LABROUE F., LUQUET M., 1999. *Techni Porc*, 22, 17-19.
- LE GAL F., DE ROOVER R., VERHAEGHE B., ETIENNE D., MASSIP A., 2000a. *Annales de Medecine Veterinaire*, 144, 33-36.
- LE GAL F., DE ROOVER R., VERHAEGHE B., ETIENNE D., MASSIP A., 2000b. *Veterinary Record*, 146, 469-471.
- LEBRET A., 1999. *Porc Magazine*, 328, 76-79.
- MARTINAT-BOTTÉ F., PLAT M., PROCUREUR R., DESPRÉS P., LOCATELLI A., 1992a. *Journées de la Recherche Porcine en France.*, 24, 315-320.
- MARTINAT-BOTTÉ F., PLAT M., PROCUREUR R., TERQUI M., 1992b. International Symposium on Chinese pig Breeds, Harbin, China., pp 561-564.
- MARTINAT-BOTTÉ F., PROCUREUR R., PLAT M., FORGERIT Y., BUSSIÈRE J., BARITEAU F., DESPRÉS P., LOCATELLI A., TERQUI M., 1993. 9<sup>ème</sup> Colloque de l' Association Européenne de Transfert Embryonnaire (A.E.T.E.), Lyon - France, 236.
- MARTINAT-BOTTÉ F., RENAUD G., MADEC F., COSTIOU P., TERQUI M., 2000. INRA Editions & Hoechst Roussel Vet, Paris-France, 104p.
- SAS INSTITUTE INC., SAS STAT, 1997. CARY NC, SAS,
- STATISTICAL SCIENCE, S-PLUS, 1996.
- STRINGFELLOW D. A., SEIDEL G. E., 1998. 2<sup>nd</sup> Ed. Stringfellow D., Seidel S.M. USA, 67p.
- THIBIER, M., 2001. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of EAAP, Budapest, 211.
- VAJTA G., HOLM P., BOOTH P. J., JACOBSON H., GREVE T., CALLESEN H., 1998. *Molecular Reproduction and development*, 51, 53-58.
- WILSON M. E., BIENSEN N. J., YOUNGS C. R., FORD S. P., 1998. *Biology of Reproduction*, 58, 905-910.
- YOUNGS C. R., CHRISTENSON L. K., FORD S. P., 1994. *Journal of Animal Science*, 72, 725-731.