

Congélation du sperme de verrat : comparaison de différents dilueurs, techniques de préparation de la semence, modes de conditionnement et températures de décongélation

M. PAQUIGNON, P. QUELLIER (*) et J.L. DACHEUX (*)

Institut Technique du Porc, 149, rue de Bercy, F 75595 Paris Cedex 12

** INRA, Physiologie de la Reproduction, F 37380 Monnaie*

Résumé

Deux expériences ont été réalisées pour examiner l'effet de deux techniques de préparation de la semence (A vs B), trois modes de conditionnement (pastilles vs paillettes et pailles Hülsenberg), deux dilueurs (jaune d'œuf, glucose vs jaune d'œuf, lactose, O.E.P.) et deux températures de décongélation (37 °C vs 50 °C) sur la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes, après décongélation et 3 heures d'incubation à + 37 °C.

Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est significativement plus élevé après préparation de la semence selon la technique B, qu'après préparation selon la technique A. Il décroît significativement quand la semence est conditionnée en pailles plutôt qu'en paillettes ou pastilles. Quel que soit le dilueur, il ne varie pas quand la semence est congelée en paillettes. En revanche, les meilleurs pourcentages de spermatozoïdes mobiles sont obtenus avec le dilueur glucose pour le conditionnement en pastilles et avec le dilueur lactose O.E.P. pour le conditionnement en pailles.

Le pourcentage de spermatozoïdes à acrosomes normaux, quelles que soient les techniques de préparation de la semence, ne varie pas quand elle est conditionnée en pastilles. En revanche, quand elle est conditionnée en paillettes ou pailles, il est plus élevé après préparation selon la technique B, qu'après préparation selon la technique A. Il est également significativement plus élevé quand la semence est conditionnée en paillettes plutôt qu'en pastilles ou pailles et quand on utilise le dilueur lactose-O.E.P. plutôt que le dilueur glucose.

La meilleure qualité de la semence est obtenue après conditionnement en paillettes et décongélation à + 37 °C.

Mots clés : Verrat, spermatozoïdes, congélation, décongélation, qualité semence.

I. Introduction

L'insémination artificielle porcine dispose actuellement de technologies permettant la conservation du pouvoir fécondant de la semence à l'état liquide pendant plusieurs jours à 15 °C. La fertilité et la prolificité sont proches de ceux obtenus en saillie naturelle (JOHNSON *et al.*, 1982 ; PAQUIGNON *et al.*, 1982). En revanche, la conservation par congélation n'est pas aussi performante. Ces quinze dernières années, des

techniques de refroidissement et des dilueurs appropriés à la semence de verrat ont abouti à la mise au point de technologies particulières permettant d'obtenir une fertilité encourageante mais encore très inférieure à celle obtenue après insémination avec du sperme frais : taux de mise bas inférieur de 20 à 30 p. 100 et 1 à 3 porcelets en moins par portée (PAQUIGNON, 1984).

Quatre techniques de congélation sont principalement utilisées, pour trois d'entre elles, la semence est congelée sous forme de pastilles (PAQUIGNON *et al.*, 1974 ; PURSEL & JOHNSON, 1975 ; LARSSON, EINARSSON & SWENSSON, 1977), pour la quatrième sous forme de pailles (WESTENDORF, RICHTER & TREU, 1975). Cette dernière présente des avantages pratiques, le conditionnement en pailles est moins fastidieux qu'en pastilles, et semble assurer une meilleure fertilité (JOHNSON, 1980). Cependant des essais entrepris pour congeler en paille de la semence préparée selon la technologie utilisée pour la congélation en pastilles ont montré que les technologies de préparation de la semence n'étaient pas transposables d'un mode de congélation à l'autre (SCHRADER, TREU & HAHN, 1977).

Toutefois ces études ne nous indiquent pas la part relative des différents éléments de ces technologies qui intervient respectivement dans cette mauvaise adaptation.

Aussi l'objet de ce travail a-t-il été d'étudier les interactions pouvant exister entre différentes techniques de préparation de la semence, différents dilueurs et modes de conditionnement sur la qualité du sperme de verrat après dégel, en y associant la comparaison de l'efficacité de deux températures de décongélation pour le conditionnement de la semence en paillette.

II. Matériel et méthodes

A. Récolte du sperme

Quatre verrats, deux Gascons, un Basque et un Porc Blanc de l'Ouest (PBO), âgés de 15 à 30 mois et placés dans les mêmes conditions de milieu (alimentation, logement, hygiène), sont récoltés une fois par semaine. Pour chaque expérience, trois éjaculats d'un même verrat ont été congelés.

Après récolte manuelle et filtration sur de la gaze, la qualité de la semence est examinée sous microscope à contraste de phase (les pourcentages de spermatozoïdes mobiles et d'acrosomes normaux sont en moyenne respectivement de 85 p. 100 et 95 p. 100) et la concentration en spermatozoïdes est évaluée à l'aide d'un hématimètre.

B. Traitement du sperme avant congélation

Deux techniques de préparation ont été utilisées pour ces expériences : la technique A (PAQUIGNON *et al.*, 1974) et la technique B (WESTENDORF, RICHTER & TREU, 1975).

Dans la technique A, l'éjaculat est centrifugé à 800 g pendant 15 minutes à 30 °C. Le plasma séminal est retiré et le culot est remis en suspension dans 5 ml du premier dilueur. La semence est ensuite refroidie de 30 à 15 °C en 1 heure puis

maintenue à cette température pendant 4 heures. Après avoir ajusté la concentration à $1\,200 \times 10^6$ spz/ml à l'aide du premier dilueur, on effectue la dilution glycérolée selon le rapport 1:1 avec le second dilueur, puis on refroidit la semence à 5 °C en 1 heure avant de la congeler.

Dans la technique B, on effectue une première dilution avec le dilueur Guelph ou Kiev (HAEGER & MACKLE, 1971) selon le rapport 2:3 et on refroidit la semence à 15 °C en 4 heures. Elle est ensuite centrifugée à 800 g pendant 8 minutes. Le plasma séminal est retiré et le culot dilué avec 4 ml du premier dilueur. Au cours du refroidissement à 5 °C en 2 heures, la concentration en spermatozoïdes est ajustée à 900×10^6 spz/ml à l'aide du premier dilueur. Puis, on effectue la dilution glycérolée dans le rapport 2:1 avec le second dilueur juste avant la congélation.

Pour chaque technique de préparation de la semence la concentration finale en spermatozoïdes avant congélation est de 600×10^6 spz/ml.

C. Les dilueurs

Les dilueurs de congélation utilisés dans les différentes expériences sont à base de glucose et jaune d'œuf (POLGE, SALAMON & WILMUT, 1970) ou lactose, jaune d'œuf et Orvus Es Paste (O.E.P., détergent synthétique) (WESTENDORF, RICHTER & TREU, 1975).

Les premiers dilueurs ne contiennent ni glycérol, ni O.E.P. Par contre tous les seconds dilueurs préparés à partir des précédents contiennent du glycérol. Seuls ceux préparés à partir de celui de WESTENDORF, RICHTER & TREU (1975) contiennent en plus de l'O.E.P. Les concentrations de glycérol et d'O.E.P. varient selon les techniques de préparation de la semence. Elles sont respectivement de 4 p. 100 et 1 p. 100 pour la technique A et de 6 et 1,5 p. 100 pour la technique B.

Dans toutes les comparaisons les concentrations finales en glycérol sont de 2 p. 100 et celles d'O.E.P., lorsqu'il y en a, de 0,5 p. 100.

Dilueur de décongélation

La solution INRA-ITP (PAQUIGNON & COUROT, 1976) est employée pour la décongélation et le test d'incubation dans toutes les expériences.

D. Mode de conditionnement de la semence

La semence est congelée soit en pastilles de 0,1 ml sur carbo-glace à -76 °C pendant 3 mn (NAGASE & NIWA, 1964), ou soit dans des paillettes de 0,5 ml (CASSOU, 1968) ou des pailles Hülsenberg de 5 ml (WESTENDORF, RICHTER & TREU, 1975) toutes deux maintenues horizontalement à 5 cm au-dessus du niveau d'azote liquide pendant 15 mn à une température d'environ -145 °C. La vitesse moyenne de congélation jusqu'à -60 °C est de l'ordre de 45 °C/mn pour les pastilles et paillettes et 20 °C/mn pour les pailles.

Une fois congelée, la semence est transférée dans un container d'azote liquide, elle y séjourne au minimum pendant 3 jours avant de pouvoir être décongelée et examinée.

E. *Mode de décongélation*

Les pastilles sont décongelées directement dans la solution INRA-ITP : 10 pastilles, soit 1 ml de semence diluée, sont versées dans 5 ml de solution chauffée à 50 °C.

Les paillettes sont décongelées par immersion, pendant 30 secondes, dans un bain-marie chauffé à 37 °C ou pendant 20 secondes dans un bain-marie à 50 °C. Les pailles Hülsenberg sont décongelées en 50 secondes dans un bain-marie à 50 °C. Le contenu des paillettes et des pailles est ensuite dilué dans la solution INRA-ITP à 37 °C selon le rapport 1:5.

La température de 0 °C est atteinte après 20 s pour les pastilles et paillettes et 40 s pour les pailles.

F. *Evaluation de la qualité de la semence*

La qualité de la semence est évaluée au microscope à contraste de phase, entre lame et lamelle, après 1/4 d'heure et 3 heures d'incubation à 37 °C, par les pourcentages de spermatozoïdes mobiles et de spermatozoïdes à bord apical normal. L'ensemble des mesures est réalisé sans connaître l'origine des échantillons.

L'évaluation du pourcentage de spermatozoïdes mobiles est effectué à l'œil par le même observateur.

Le pourcentage de spermatozoïdes ayant un bord apical normal est déterminé après comptage, sur une lame, de 100 spermatozoïdes totaux préalablement fixés dans une solution de glutaraldéhyde à une concentration finale de 1 p. 100.

G. *Analyse des résultats*

Les résultats obtenus sous forme de pourcentages (P) sont transformés en valeurs X ($X = \text{Arcsin}(P/100)^{1/2}$) puis soumis à une analyse de variance à deux ou trois facteurs. Le test de Fischer donne le niveau des différences observées et les interactions éventuelles entre les facteurs (SNEDECOR, 1956).

H. *Plan expérimental*

1. *Première expérience*

Cette expérience factorielle ($2 \times 2 \times 3$) compare à partir d'un éjaculat fractionné l'efficacité de deux techniques de préparation de la semence avant congélation (technique A vs technique B), deux dilueurs (glucose jaune d'œuf, vs lactose-jaune d'œuf - O.E.P.) et trois modes de conditionnement du sperme (pastilles vs paillettes et pailles). Les paillettes sont décongelées à 37 °C.

2. *Deuxième expérience*

Cette expérience compare l'effet de deux températures de décongélation (37 °C vs 50 °C) sur la qualité de la semence préparée selon les techniques décrites précédemment et congelée en paillettes.

III. Résultats

A. Effet de la technique de préparation de la semence, du dilueur et du mode de conditionnement du sperme

1. Pourcentage de spermatozoïdes mobiles aussitôt après décongélation et après 3 heures d'incubation (fig. 1)

Juste après décongélation, quels que soient le dilueur et le mode de conditionnement, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est significativement plus élevé après préparation de la semence selon la technique B, qu'après préparation selon la technique A (20,3 vs 18,3 ; $P < 0,01$). Il diminue significativement lorsque des pailles sont utilisées à la place de paillettes ou de pastilles (14,6 vs 22,3 et 21,1 ; $P < 0,01$). En revanche, il ne varie pas significativement lorsqu'on remplace le dilueur « glucose » par le dilueur « lactose-O.E.P. » (18,8 vs 19,8). Cependant, l'efficacité du dilueur dépend du mode de conditionnement. Ainsi, quand la semence est conditionnée en pastilles, le dilueur « glucose » est supérieur au dilueur « lactose-O.E.P. ». Lorsque le conditionnement s'effectue en paillettes, les deux dilueurs assurent le maintien d'une mobilité équivalente. En revanche, avec les pailles Hülsenberg, le dilueur « lactose-O.E.P. » est supérieur au dilueur « glucose » (Interaction dilueur \times mode de conditionnement : $P < 0,01$).

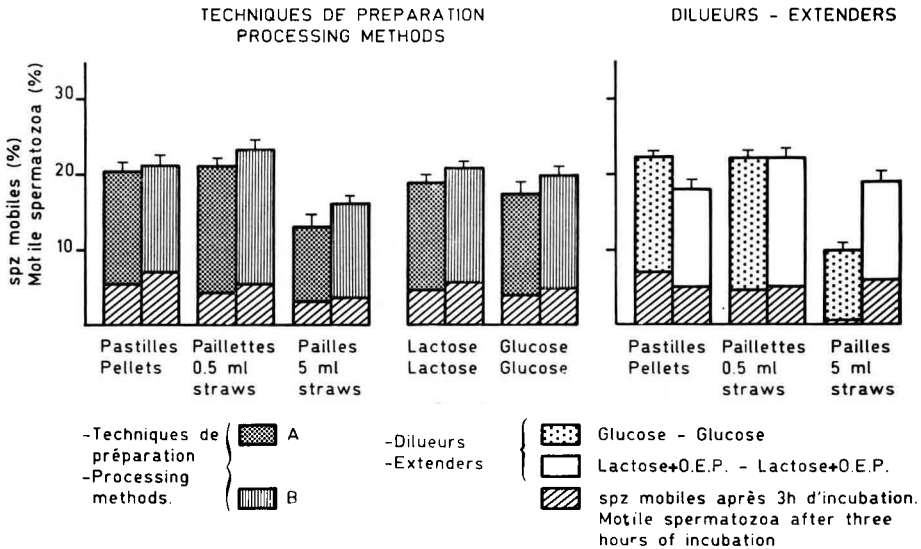


FIG. 1

Effet de la technique de préparation du dilueur et du mode de conditionnement sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles après dégel et 3 heures d'incubation.

Effect of the processing method, extender and deep-freezing method on the percentage of motile spermatozoa after thawing and three hours of incubation.

Après 3 heures d'incubation, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est très faible. Les deux techniques de préparation de la semence ne diffèrent plus significativement, cependant l'efficacité du dilueur dépend toujours du mode de conditionnement (interaction dilueur \times mode de conditionnement : $P < 0,01$).

2. Pourcentage d'acrosomes normaux aussitôt après décongélation et après 3 heures d'incubation (fig. 2)

Le pourcentage de spermatozoïdes à acrosomes normaux, quels que soient la technique de préparation et les dilueurs, est significativement plus élevé quand la semence est conditionnée en paillettes, plutôt qu'en pastilles ou pailles (33,3 vs 18,4 et 20,5 ; $P < 0,05$).

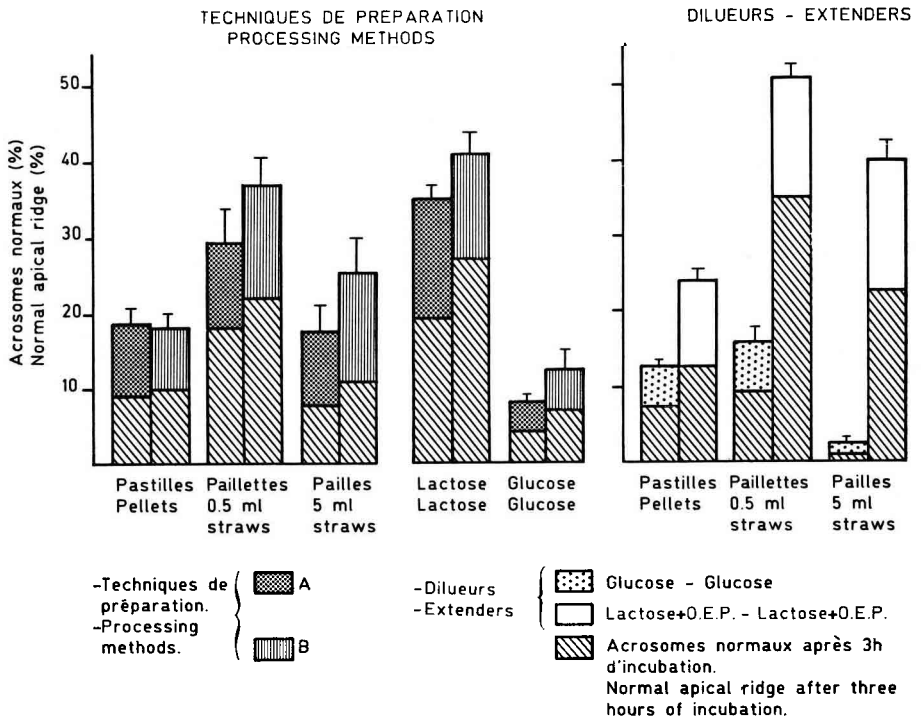


FIG. 2

Effet de la technique de préparation du dilueur et du mode de conditionnement sur le pourcentage d'acrosomes normaux après dégel et 3 heures d'incubation.

Effect of the processing method, extender and deep-freezing method on the percentage of normal apical ridge after thawing and three hours of incubation.

Quels que soient les dilueurs, il est aussi significativement plus élevé quand la semence est préparée selon la technique B plutôt que préparée selon la technique A (26,8 vs 21,6 ; $P < 0,01$). Cependant, lorsque la semence est conditionnée en pas-

tilles, les deux techniques de préparation sont équivalentes alors que lorsqu'elle est conditionnée en paillettes ou en pailles Hülsenberg le pourcentage d'acrosomes normaux est significativement plus élevé quand la semence est préparée selon la technique B plutôt que préparée selon la technique A (interaction technique de préparation × mode de conditionnement : $P < 0,05$).

Le dilueur « lactose-O.E.P. » comparé au dilueur « glucose » augmente significativement le pourcentage d'acrosomes normaux (38,3 vs 10,0 ; $P < 0,01$). Cependant, l'efficacité du dilueur dépend du mode de conditionnement. Avec le dilueur « lactose-O.E.P. » le pourcentage d'acrosomes normaux obtenu avec les pailles Hülsenberg est plus élevé que celui obtenu avec les pastilles, par contre avec le dilueur « glucose », ce pourcentage est le plus élevé quand la semence est conditionnée en pastilles ou en paillettes (interaction dilueur × mode de conditionnement : $P < 0,01$).

Après 3 heures d'incubation, le pourcentage d'acrosome normaux a fortement diminué. L'efficacité respective des modes de conditionnement varie toujours selon les techniques de préparation de la semence (interaction mode de conditionnement × technique de préparation) et selon les dilueurs (interaction dilueur × mode de conditionnement : $P < 0,01$). Lorsqu'on utilise le dilueur lactose-O.E.P. au lieu du dilueur glucose, les acrosomes sont moins endommagés.

B. *Effet de la température de dégel (tabl. 1)*

Après dégel et 3 heures d'incubation, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est identique pour les deux températures de décongélation. Par contre, la proportion de spermatozoïdes avec des acrosomes normaux est plus élevée, mais non significativement différente quand la semence est décongelée à 37 °C plutôt qu'à 50 °C.

TABLEAU 1

Effet de deux températures de dégel sur la qualité de la semence.

Effect of two thawing temperature on semen quality.

Température de décongélation (°C) <i>Thawing temperature (°C)</i>	Durée d'incubation (heures) <i>Incubation time (hours)</i>	Spermatozoïdes (m ± sm) <i>Spermatozoa</i>	
		Mobiles (%) <i>Motile (%)</i>	Acrosomes (%) normaux <i>Normal apical (%) ridge</i>
37	0	22,4 ± 0,8	33,3 ± 3,0
	3	4,8 ± 0,8	22,0 ± 2,2
50	0	23,6 ± 0,7	25,8 ± 2,1
	3	4,5 ± 0,6	15,8 ± 1,6

n = 48.

IV. Discussion

La technique de préparation WESTENDORF, RICHTER & TREU (1975), comparée à celle de PAQUIGNON *et al.* (1974) améliore très peu le pourcentage de spermatozoïdes mobiles après décongélation. Par contre, quand on considère le pourcentage d'acrosomes normaux, elle lui est supérieure si la semence est conditionnée en paillettes ou en pailles Hülsenberg mais il n'y a pas de différence entre les deux techniques quand la semence est conditionnée en pastilles. Ainsi, la technique de préparation de PAQUIGNON *et al.* (1974) semble moins adaptée que celle de WESTENDORF, RICHTER & TREU (1975) pour le conditionnement en pailles, alors que celle de WESTENDORF, RICHTER & TREU (1975) peut être utilisée pour tous les modes de conditionnement. Il apparaît donc que le moment de la centrifugation ainsi que la température de centrifugation et de glycérolisation qui différencient ces deux techniques de préparation de la semence soient des éléments importants dans l'aptitude du sperme à être congelé en pastilles ou en pailles. Ainsi, une centrifugation à 15 °C après 4 heures de refroidissement (technique B) semble plus efficace pour la congélation en pailles qu'une centrifugation dès la récolte (technique A). D'ailleurs, SCHRADER, TREU & HAHN (1977) ont déjà montré, avec une congélation en pailles, qu'une centrifugation à 15 °C après 6 heures de refroidissement augmentait le pourcentage d'acrosomes normaux par rapport à une centrifugation à 23 °C après 2 heures de refroidissement. Le moment et la température de la glycérolisation semblent jouer un moindre rôle dans la différence entre ces deux techniques de préparation. En effet, WESTENDORF, RICHTER & TREU (1975) ont montré qu'une glycérolisation à 5 °C avec une période d'équilibration de 10 minutes, au lieu d'une glycérolisation à 15 °C, 2 heures avant une congélation en pailles, n'augmentait que très légèrement les pourcentages de spermatozoïdes mobiles et d'acrosomes normaux. Cependant pour une congélation en pastilles, une glycérolisation à 5 °C donne une mobilité significativement inférieure à celle obtenue lors d'une glycérolisation à 15 °C, 1 heure avant la congélation (PAQUIGNON *et al.*, 1974).

L'utilisation du dilueur « lactose-O.E.P. » au lieu du dilueur « glucose » améliore également les pourcentages de spermatozoïdes mobiles et d'acrosomes normaux après décongélation et trois heures d'incubation. Cependant des variations importantes apparaissent en fonction des modes 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, alors que le dilueur « lactose-O.E.P. » peut être utilisé pour tous les modes de conditionnement, en assurant toujours la meilleure protection sur les acrosomes. Ces résultats confirment ceux déjà obtenus par SALAMON, WILMUT & POLGE (1973) montrant qu'en utilisant des dilueurs à base de glucose ou de lactose pour le conditionnement de la semence en pastilles, la meilleure mobilité est obtenue avec le glucose. De même, les travaux de WILMUT & POLGE (1977) montrant que le lactose protège mieux les acrosomes que d'autres disaccharides ou monosaccharides vont également dans ce sens.

L'action protectrice du lactose sur les acrosomes est renforcée par l'O.E.P. La présence bénéfique de ce détergent dans le dilueur de congélation a été mise en évidence par de nombreux auteurs (GRAHAM & CRABO, 1972 ; WESTENDORF, RICHTER & TREU, 1975 ; PURSEL, SCHULMAN & JOHNSON, 1978). Il semble être indispensable

à la congélation en pailles (SCHRADER, 1976). 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 0,6 microns (COURTENS & 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 ; et, lors de la décongélation, étape importante pour le maintien de l'intégrité des acrosomes, les spermatozoïdes subiraient alors un moindre choc osmotique (COURTENS & PAQUIGNON, 1985).

La supériorité du conditionnement en paillettes sur celui des pastilles et des pailles dans le maintien de la qualité de la semence est certainement la conséquence de phénomènes apparaissant au moment de la congélation ou de la décongélation. Alors que les courbes de vitesse de congélation entre pastille et paillette sont identiques, leurs conditions de dégel sont très différentes. Avec les paillettes les spermatozoïdes sont décongelés dans un milieu hypertonique (750 mOsm/kg H₂O) : leur milieu de congélation, alors qu'avec les pastilles les spermatozoïdes sont décongelés dans une solution de décongélation isotonique (320 mOsm/kg H₂O). Dans ces conditions, il est probable que le moindre choc osmotique que subissent les spermatozoïdes lors de la décongélation des paillettes soit une des causes de la meilleure qualité de la semence. En effet, les acrosomes sont moins endommagés quand la semence est décongelée dans un milieu hypertonique (WESTENDORF, RICHTER & TREU, 1975 ; VASQUEZ & GRAHAM, 1980). L'infériorité des pailles comparées aux paillettes peut-être expliquée par les vitesses de congélation et décongélation beaucoup plus lentes avec les pailles.

Dans les conditions de notre expérience, une température de décongélation des paillettes à 50 °C n'améliore pas le pourcentage de spermatozoïdes mobiles mais diminue le pourcentage d'acrosomes normaux. Ces résultats sont contraires à ceux de PURSEL & JOHNSON (1976) montrant qu'une décongélation des pastilles dans un milieu à 50 °C est supérieure à une décongélation à 40 °C. Cependant, ils confirment ceux de PEREZCANTO-FERNANDEZ (1978) ne montrant pas de différence significative dans les pourcentages de spermatozoïdes mobiles et d'acrosomes normaux quand les pailles Hülsenberg sont décongelées à 35 °C ou à 50 °C. D'autre part, lorsque WESTENDORF, RICHTER & TREU (1975) décongèlent des pailles Hülsenberg à 90 °C au lieu de 55 °C, ils n'observent qu'une légère amélioration de la mobilité et du taux d'acrosomes normaux. Cette contradiction provient sans doute des conditions de dégel très différentes entre pastilles et paillettes. En effet, SALAMON, WILMUT & POLGE (1973) ont montré que la température de décongélation avait peu d'importance quand elle était effectuée sans solution de dégel, alors qu'une décongélation à 50 °C est bénéfique quand une solution est utilisée. Il existe donc une vitesse de décongélation optimale qui varie selon les techniques de décongélation.

Reçu en novembre 1985.

Accepté en mars 1986.

Summary

*Deep-freezing of boar semen :
comparison between different extenders, processing and deep-freezing
methods and thawing temperatures*

Two experiments were conducted to study the effects of two processing (A vs B) and three deep-freezing methods (pellets vs 0.5 and 5 ml-straws), two extenders (Glucose vs Lactose, O.E.P.) and two thawing temperatures (37 °C vs 50 °C) on motility and morphology of boar spermatozoa after thawing and three hours of incubation at 37 °C.

Just after thawing, the percentage of motile spermatozoa was significantly higher with B than with A processing method (20.3 vs 18.3 ; $P < 0.01$) (fig. 1). It significantly decreased when semen was deep-frozen in 5 ml-straws rather than in 0.5 ml-straws or pellets (14.6 vs 22.3 and 21.1 ; $P < 0.01$) (fig. 1). Both glucose and lactose O.E.P. extenders led to similar percentages of motile spermatozoa when semen was deep-frozen in 0.5 ml-straws. On the other hand, the percentage of motile spermatozoa was significantly higher with glucose and lactose O.E.P. extenders, respectively for the pellet and 5 ml-straw deep-freezing method (Interaction extenders \times deep-freezing methods ; $P < 0.05$) (fig. 1).

The percentage of spermatozoa with normal apical ridge was significantly higher with 0.5 ml-straws than with pellet and 5 ml-straw deep-freezing method (33.3 vs 18.4 and 20.5 ; $P < 0.05$) (fig. 2). It was significantly higher with the lactose O.E.P. than with the glucose extender (38.3 vs 10.0 ; $P < 0.01$) (fig. 2). It was similar for both A and B processing methods when semen was deep-frozen in pellets. On the other hand, when semen was deep-frozen in 0.5 or 5 ml-straws it was higher with B than with A processing method (Interaction processing method \times deep-frozen method ; $P < 0.05$) (fig. 2).

After three hours of incubation, the percentage of motile spermatozoa and spermatozoa with normal apical ridge were very low.

The best semen quality was obtained when semen was deep-frozen in 0.5 ml-straws and thawed at 37 °C.

Key words : Boar, spermatozoa, deep-freezing, thawing, semen quality.

Références bibliographiques

- CASSOU R., 1968. La miniaturisation des paillettes. *VIIth Int. Cong. Anim. Reprod. A.I.* Paris, II, 1009-1012.
- COURTENS J.L., PAQUIGNON M., 1985. Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar. *Proc. First Int. Conf. Deep-freezing boar semen.* Uppsala. L.J. JOHNSON and K. LARSSON Ed., 61-87.
- GRAHAM E.F., CRABO B.G., 1972. Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa. *VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.* Munich, II, 1629-1632.
- HAEGER O., MACKLE N., 1971. Ein zweiphasen Verduner in der Praxis der Schweinebesamung. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **78**, 395-397.
- JOHNSON L.A., AALBERS J.G., WILLEMS C.M.T., RADEMAKER J.H.M., SYBESMA W., 1982. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18 °C. *J. Anim. Sci.*, **54**, 132-136.
- LARSSON K., EINARSSON S., SWENSSON T., 1977. The development of a practicable method for deep-freezing of boar spermatozoa. *Nord. Vet. Med.*, **29**, 113-118.

- NAGASE H., NIWA T., 1964. Deep-freezing bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival of spermatozoa. *Vth Congr. Anim. Reprod. A.I.*, Trente, IV, 410-415.
- PAQUIGNON M., 1984. Semen technology in the pig. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, **30**, 202-218.
- PAQUIGNON M., MERGOUNIS D., COUROT M., DU MESNIL DU BUISSON F., 1974. Technologie de la congélation de la semence de verrat : étude *in vitro*. *Journées Rech. Porcine en France*, INRA-ITP ed., 71-76.
- PAQUIGNON M., COUROT M., 1976. Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. *VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.*, Cracow, IV, 1041-1044.
- PAQUIGNON M., BARITEAU F., BUSSIÈRE J., DACHEUX J.L., COUROT M., 1982. Effet du dilueur, du taux de dilution et du plasma séminal sur la fertilité des truies après une longue conservation de la semence. *Journ. Rech. Porc. Fr.*, INRA-ITP ed., 85-89.
- PEREZCANTO-FERNANDEZ J., 1978. Einführung des Verfahrens an einer Schweinebesamungsstation, *in vitro* Untersuchungen zur Nachverdünnerzusammensetzung und zum Auftauverfahren sowie Befruchtungsergebnisse nach Einsatz zweier Nachverdünner und der hormonellen Brundstinduktion. *Inaugural Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doctor Medicinae Veterinariae*, Hannover, p. 76.
- POLGE C., SALAMON S., WILMUT I., 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.*, **87**, 424-428.
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., 1975. Freezing of boar spermatozoa. Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, **40**, 99-102.
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., 1976. Frozen boar spermatozoa : methods of thawing. *J. Anim. Sci.*, **42**, 927-932.
- PURSEL V.G., SCHULMAN L.L., JOHNSON L.A., 1978. Effect of Orvus Es Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. Anim. Sci.*, **47**, 198-202.
- SALAMON S., WILMUT I., POLGE C., 1973. Deep-freezing of boar semen. I. Effects of diluent composition, protective agents and method of thawing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, **26**, 219-230.
- SCHRADER R., 1976. Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Ebersamen in Kunststoffrohren. *Inaugural Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doctor Medicinae Veterinariae*. Hannover, p. 112.
- SCHRADER R., TREU H., HAHN R., 1977. Zur Tiefgefrierkonservierung von Ebersamen in Kunststoffrohren. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **84**, 9-12.
- SNEDECOR G.W., 1956. *Statistical methods*. Ames, Iowa, 5th Ed.
- VASQUEZ I.A., GRAHAM E.F., 1980. Effect of dialysis and glycerol on diluents for freezing boar semen. *IXth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.* Madrid, V, 442-444.
- WESTENDORF P., RICHTER L., TREU H., 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma : Labor und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten Verfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **82**, 261-267.
- WILMUT I., POLGE C., 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 2. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk. *Cryobiology*, **14**, 479-482.