



Biological Resource Centers
for Domestic Animals

4th International Seminar of CRB-Anim Infrastructure

CRB-Anim : past, present and futur

May 30-31, 2022

De nouveaux milieux de cryoconservation permettent d'améliorer la sécurité sanitaire des échantillons

Samuel Buff¹, Thierry Joly², Pierre Bruyere¹, Loris Commin¹

¹Université de Lyon, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France;

²Université de Lyon, ISARA Lyon, Lyon, France

Les produits d'origine animale sont utilisés depuis longtemps pour conserver le sperme ou les embryons congelés chez de nombreuses espèces. Depuis 1939, le jaune d'œuf est régulièrement ajouté aux milieux de congélation des spermatozoïdes pour minimiser les dommages liés au froid. En effet, il assure une protection contre le choc thermique et a un effet protecteur sur la membrane plasmique. Néanmoins, l'utilisation de produits d'origine animale présente de nombreux inconvénients, le premier étant le risque sanitaire. Ce risque contraint de nombreux pays à limiter les importations de ressources biologiques conservées dans de tels milieux afin de prévenir tout risque d'introduction accidentelle d'un éventuel agent pathogène. Pour certains produits tels que le sérum de veau fœtal, leurs modalités de production soulève aujourd'hui des questionnements éthiques qui tendent également à limiter leur acceptation sociétale. La composition des produits d'origine animale est également éminemment variable, ce qui rend les résultats obtenus d'autant moins reproductibles. La présence de débris dans certains composés et leur plus grande viscosité parfois tendent à rendre la standardisation de certaines analyses plus délicate (ex. CASA pour les spermatozoïdes). De même, le jaune d'œuf peut contenir des acides aromatiques qui contribuent à la production de réactifs oxygénés par les spermatozoïdes morts, au détriment des spermatozoïdes vivants. Aujourd'hui, il existe des alternatives aux produits d'origine animale pour la congélation du sperme. Les milieux à base de lécithine de soja et de liposomes sont ainsi largement utilisés chez de nombreuses espèces pour remplacer les milieux contenant des protéines animales, mais leur effet cryoprotecteur reste variable compte tenu de l'instabilité chimique de la plupart des structures utilisés.

Dans le cadre de l'infrastructure CRB-Anim et de financements complémentaires, nous avons évalué un sérum synthétique développé par la société Stem Alpha (CRYO3) sur la cryopréservation de multiples échantillons biologiques (sperme, ovocytes, embryons, tissus ovariens, cellules souches) chez différentes espèces (lapins, chiens, chats, moutons, bovins, porcs...). CRYO3 est un milieu breveté sans sérum, sans protéine et sans dextran (fabriqué selon les bonnes pratiques de fabrication [cGMP-annexe 1] conformément à la directive 2001/83/CE). CRYO3 est composé d'acide hyaluronique (HA) synthétique de haut poids moléculaire (> 106 D), de glucose, de glucides, d'acides aminés, de sels minéraux, de vitamines, d'esters d'acides gras et de tampons. Il a été initialement conçu pour des applications cliniques, afin de remplacer le sérum dans le milieu de congélation des cellules souches somatiques et adultes humaines. Nous présentons et commentons ici les résultats obtenus sur des embryons (lapins et bovins), sur des spermatozoïdes (lapins, chiens, taureaux, béliers), sur du tissu gonadique (cortex ovarien de lapins, chiennes, reines et bovins) et sur des cellules souches mésenchymateuses ou embryonnaires (lapins, chiens, chats). Si les résultats obtenus ne permettent pas toujours l'utilisation commerciale du CRYO3 (ex. coût plus important, moindre mobilité des spermatozoïdes), l'utilisation de techniques de reproduction assistée adaptée permet de constituer des collections d'échantillons dont la valorisation ultérieure ne sera pas compromise par l'utilisation des produits d'origine animale.





Biological Resource Centers
for Domestic Animals

4th International Seminar of CRB-Anim Infrastructure

CRB-Anim : past, present and futur

May 30-31, 2022

New preservation media to increase biological safety of a range of biological materials

Samuel Buff¹, Thierry Joly², Pierre Bruyere¹, Loris Commin¹

¹Université de Lyon, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France;

²Université de Lyon, ISARA Lyon, Lyon, France

Animal-derived products have long been used to preserve frozen sperm or embryos in many species. Since 1939, egg yolk has been routinely added to the sperm freezing media for minimizing cryoinjuries. Indeed, it provides protection against cold shock and has a protective effect on the plasma membrane. Nevertheless, the use of animal-derived products presents numerous drawbacks, the first major problem being the sanitary risk. This risk forces many countries to limit importations of biological resources preserved in such media to prevent any risk of accidental introduction of a possible pathogen. For some products, such as fetal calf serum, their production methods now raise ethical questions which also tend to limit their societal acceptance. The composition of animal-derived products is also highly variable, which makes results more difficult to reproduce. The presence of debris in certain compounds and their greater viscosity sometimes tend to make the standardization of certain analyses more delicate (e.g. CASA for spermatozoa). Similarly, egg yolk may contain aromatic amino acids that contribute to the production of ROS by dead spermatozoa, to the detriment of living spermatozoa. Today, there are alternatives to animal products for sperm freezing. Soy lecithin and liposome-based media are widely used in many species to replace media containing animal proteins, but their cryoprotective effect remains variable due to the chemical instability of most of the structures used.

Within the framework of the CRB-Anim infrastructure and additional funding, we evaluated a synthetic serum developed by the company Stem Alpha (CRYO3) on the cryopreservation of multiple biological samples (sperm, oocytes, embryos, ovarian tissues, stem cells) in different species (rabbits, dogs, cats, sheep, cattle, pigs, etc.). CRYO3 is a patented serum-free, protein-free and dextran-free medium (manufactured according to Good Manufacturing Practice [cGMP-annex 1] in compliance with Directive 2001/83/EC). CRYO3 is composed of synthetic high molecular weight (>106 D) hyaluronic acid (HA), glucose, carbohydrates, amino acids, minerals, vitamins, fatty acid esters and buffers. It was originally developed for clinical applications to replace serum in the freezing medium of human somatic and adult stem cells.

We present and comment here the results obtained on embryos (rabbits and cattle), on sperm cells (rabbits, dogs, bulls, rams), on gonadic tissue (ovarian cortex from rabbits, bitch, queens and cattle) and on mesenchymal or embryonic stem cells (rabbits, dogs, cats). If the results obtained do not always allow a commercial use of CRYO3 (e.g. higher cost, lower sperm mobility), the use of adapted assisted reproduction techniques makes it possible to biobank collections whose subsequent valorization will not be compromised by the use of products of animal origin. Today, 4 France Relance R&D funds allow to pursue the developments initiated in the framework of CRB-Anim, with stakeholders such as VetBioBank, Axiom and US Rom / Fedatest.

