



HAL
open science

Cryoconservation de cellules spermatiques et de cellules souches pluripotentes de mammifères dans un milieu synthétique et chimiquement défini

Lucie Gavin-Plagne

► To cite this version:

Lucie Gavin-Plagne. Cryoconservation de cellules spermatiques et de cellules souches pluripotentes de mammifères dans un milieu synthétique et chimiquement défini. Biologie de la reproduction. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1197 . tel-02107702

HAL Id: tel-02107702

<https://theses.hal.science/tel-02107702>

Submitted on 23 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1197

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° accréditation

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences - Santé

Spécialité de doctorat : Cryobiologie

Discipline : Biotechnologies de la Reproduction

Soutenue publiquement le 19/10/2018, par :

Lucie GAVIN-PLAGNE

Cryoconservation de cellules spermatiques et de cellules souches pluripotentes de mammifères dans un milieu synthétique et chimiquement défini

Devant le jury composé de :

GUÉRIN Jean-François Professeur, CHU Lyon
FIENI, Francis Professeur Oniris-Nantes
LABBÉ, Catherine DR INRA Rennes
PELLÉ, Anne Professeure INSERM
CHAVATTE-PALMER, Pascale Professeure INRA
JOLY, Thierry HDR ISARA-Lyon

Président
Rapporteur
Rapporteuse
Rapporteuse
Examineur
Directeur de thèse

Co-encadrants de thèse :

BUFF, Samuel HDR MC VetAgro Sup
AFANASSIEFF, Marielle HDR CR INRA Lyon

Co-directeur de thèse
Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je remercie **Mr Jean-François Guérin** de me faire l'honneur de présider cette thèse.

Mes remerciements vont à **Mr Francis Fieni** pour sa précieuse expertise sur ce travail.

Catherine, tu es la première à avoir accepté sans hésiter de rapporter ce travail, merci d'avoir été l'élément déclencheur de ma soutenance de thèse ! Je te remercie pour tous les bons moments passés ensemble lors des rendez-vous CRB Anim ! J'espère qu'on pourra continuer de collaborer sur des projets de recherche...

Mme Anne Pellé, c'est un réel plaisir de vous avoir comme rapporteur !

Pascale, je vous remercie d'avoir accepté d'examiner ma thèse ! J'espère que j'aurai bientôt l'opportunité de travailler avec vous !

Je remercie bien entendu mes directeurs de thèse,

Thierry, comment vous remercier après toutes ces années ? Je vous suis reconnaissante de m'avoir fait confiance dès le début et de m'avoir offert des opportunités auxquelles on ne peut pas dire non. Merci d'avoir supporté ma musique « tic-tic-tic », mes questions existentielles, nos débats sur la religion, la liberté ou l'euthanasie assistée, ainsi que toutes les discussions de filles avec Magda, Anaïs, Pénélope et Céline pendant nos innombrables trajets en voiture.

Samuel, je vous remercie pour votre patience, votre disponibilité et votre confiance. Merci de m'avoir en tout premier lieu acceptée dans votre super service en Reproduction et avoir écrit le sujet de ma thèse en un week-end pour obtenir les financements. Vous m'avez toujours poussée à me former, aidée à saisir les bonnes opportunités, permis d'aller à divers congrès internationaux et soutenue dans chaque projet dans lequel je me suis lancée. Merci.

Marielle, je te remercie pour ces 8 derniers mois intenses à tes côtés. Merci de m'avoir adoptée dans cette merveilleuse équipe que vous formez au SBRI. Je te remercie pour ta patience, ton partage et ta réactivité. Je suis admirative de tous les projets que tu entreprends en même temps. Comme le dit si bien tes doctorants, tu es vraiment une maman lapin qui pense à tout et à tout le monde. Merci.

Il m'est difficile de remercier toutes les personnes qui ont pu contribuer de près ou de loin à cette thèse, **tellement** elles sont **nombreuses** et **essentiels** au développement de ce projet et à mon épanouissement personnel. Je pense qu'elles se reconnaîtront et j'espère qu'elles ne me tiendront pas rigueur pour cette originalité.

Merci pour tout.

Je commencerai ce manuscrit par des citations de mon directeur de thèse pour un peu de légèreté. Thierry, je suis désolée d'afficher vos plus belles paroles ; ces expressions illustrent toutes les manips et les déplacements effectués ensemble depuis 2013 !

Je vous laisse deviner les diverses situations dans lesquelles ces phrases ont été prononcées :

- 'Soit t'es de taille, soit tu cours'
- 'Ça ne va pas te boucher le trou de balle'
- 'Devant l'homme de 110 kg, l'homme de 75 se tait'
- 'Etre ridé(e) comme un dessous de couille'
- 'Avoir la culotte dans la main'
- 'Le string ficelle va siffler'
- 'La dernière goutte c'est toujours pour le slip'
- 'Café bouillu, café foutu, pan pan cul cul'
- 'Si on était des bœufs, on chasserait les mouches avec notre queue'
- 'Pleure un coup, tu pisseras moins'
- 'Il y a le foin qui déborde de la charrette'
- 'La peur n'évite pas le danger'
- 'La faim (ou le froid, ou toute autre sensation/émotion), c'est qu'une conception de l'esprit'
- 'Je remplis tout, je suis plein comme un œuf, je n'ai pas une seule ride, j'en ai qu'une et je suis assis dessus'

Encore merci pour ces moments de détente au travail. Vous m'avez appris à apprécier les valeurs des personnes plutôt que leurs compétences ou leurs connaissances. Merci pour ça !

À Jean, Léonne & Sabine,

« La simplicité est la sophistication suprême »

Léonard de Vinci

Cryoconservation de cellules spermatiques et de cellules souches pluripotentes de mammifères, dans un milieu synthétique et chimiquement défini.

Aujourd'hui, les ressources biologiques reproductives (embryons, sperme, ovocytes) et somatiques (fibroblastes et cellules souches pluripotentes) sont conservées dans des milieux contenant des produits d'origine animale (sérum, jaune d'œuf, lait), qui soulèvent des problématiques tant sanitaires (risque de contamination) que scientifiques (manque de reproductibilité des résultats du fait de la variabilité de leur composition). Cette étude a pour objectif de remplacer les produits d'origine animale en évaluant l'effet d'un milieu de préservation synthétique et chimiquement défini, STEMALPHA.CRYO3® (Stem Alpha, France), sur la cryoconservation de sperme ovin et bovin, et de cellules souches pluripotentes de lapin.

Dans un premier temps, une approche physique a fait l'objet d'une étude des cinétiques de refroidissement et de caractérisation des propriétés thermodynamiques des milieux de congélation. La calorimétrie différentielle à balayage a permis de définir leurs températures de transition de phase (la température de cristallisation, la température de fin de fusion et la variation d'enthalpie de cristallisation, proportionnelle à la quantité de glace cristallisée).

Dans un second temps, une approche biologique a été mise en place pour la congélation de sperme bovin et ovin, et de cellules souches pluripotentes de lapin. L'analyse des spermatozoïdes de taureaux par cytométrie en flux et par automatisation des mesures de mobilité (CASA) montre que le milieu STEMALPHA.CRYO3® détériore la semence, en comparaison avec un milieu composé de produits d'origine animale. Ces résultats *in vitro* sont confirmés chez le bélier. Pour autant, l'insémination artificielle par laparoscopie (n = 270 brebis) compense ce déficit et permet d'obtenir un taux de gestation moyen de 70 %. Plus encore, sans aucun additif dans le milieu de congélation, un taux de gestation similaire a été obtenu.

L'étude du profil d'expression des gènes de pluripotence et l'analyse des taux de viabilité et de croissance pour la congélation de cellules souches pluripotentes chez le lapin confirme que des milieux synthétiques, STEMALPHA.CRYO3® (additionné de 4, 5 ou 10 % de cryoprotecteur) et CryoStor® CS10 (contenant 10 % de cryoprotecteur) sont plus efficaces qu'un milieu contenant du sérum.

Nous démontrons qu'il est possible de conserver des cellules spermatiques et cellules souches pluripotentes dans des milieux synthétiques et chimiquement définis. Nos résultats confirment l'intérêt d'une approche standardisée pour les procédures de cryoconservation de ressources génétiques chez les mammifères. Ce travail répond ainsi à des questionnements liés aux activités des cryobanques (démarche qualité) et à l'évolution de la réglementation dans le cadre des échanges internationaux.

Mots clés

Cryobanque, Ressources génétiques animales, Sperme, Cellules souches pluripotentes, Produits d'origine animale, Milieu synthétique, Calorimétrie différentielle à balayage, Mammifères

Cryopreservation of mammal sperm and pluripotent stem cells, in a synthetic and chemically defined medium.

Nowadays, reproductive (embryos, sperm, oocytes) and somatic (fibroblasts and pluripotent stem cells) resources are cryopreserved in media containing animal-derived products (serum, egg yolk, milk). Using these products raises sanitary (risk of contamination) as well as scientific concerns (reproducibility limits due to the variability of their composition). This study aims to replace animal derived-product in assessing the effect of a synthetic and chemically defined medium, STEMALPHA.CRYO3® (Stem Alpha, France), on the cryopreservation of ovine and bovine sperm, and on rabbit pluripotent stem cells.

First, a physical approach permitted to study the cooling rates and the characterization of thermodynamic properties of the freezing media. The differential scanning calorimetry allowed us to define their phase transition temperatures (crystallization temperature, melting temperature and enthalpy variation of crystallization, proportional to the amount of crystallized ice).

Second, a biological approach was used for the cryopreservation of bovine and ovine sperm, as well as rabbit pluripotent stem cells. Flow cytometry and computer-assisted sperm analyses showed that STEMALPHA.CRYO3® impaired bovine sperm, compared to a medium containing animal derived-product. These last results were confirmed in ovine species. Nevertheless, artificial insemination by laparoscopy (n = 270 ewes) counteracts this impairment and allowed an average pregnancy rate of 70 %. Moreover, without any additive in the freezing medium, a similar pregnancy rate was obtained.

The study of pluripotent gene expression profile, and analyses of viability and growth rates for the cryopreservation of rabbit pluripotent stem cells confirmed that synthetic media, STEMALPHA.CRYO3® (with 4, 5 or 10 % of cryoprotectant) and CryoStor® CS10 (containing 10 % of cryoprotectant) were more efficient than serum-based media.

We demonstrate that it is possible to cryopreserve sperm cells and pluripotent stem cells in synthetic and chemically defined media. Our results confirmed the interest of a standardized approach for cryopreservation procedures of genetic resources in mammals. This work meets the needs of cryobanking activities (quality policy) and of the regulation development within the framework of international trade.

Key Words

Cryobanking, Animal genetic resources, Sperm, Pluripotent Stem Cells, Animal-derived Product, Synthetic medium, Differential Scanning Calorimetry, Mammals

Discipline

Reproductive Biotechnologies

UPSP ICE Interactions Cellules Environnement

VetAgro Sup – Veterinary Campus of Lyon

1 avenue Bourgelat

69280 Marcy L'Étoile FRANCE

Tables des matières

REMERCIEMENTS	5
TABLES DES MATIERES	11
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION GENERALE	17
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	23
PRINCIPES DE CRYOBIOLOGIE	25
1. DEFINITIONS	25
1.1. Cristallisation, nucléation et surfusion	26
1.2. Le refroidissement et le réchauffement : intérêt de cinétiques optimales	28
1.3. Les cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants	33
2. DOMMAGES CELLULAIRES LIES A LA CONGELATION	36
2.1. Les dommages liés au froid	36
2.2. Dommages liés à la cristallisation	38
2.3. Pression osmotique	39
3. RISQUES LIES A L'UTILISATION DE CRYOPROTECTEURS ET DE PRODUITS D'ORIGINE ANIMALE LORS DE LA CONGELATION	40
3.1. Risques liés à l'utilisation de cryoprotecteurs pénétrants	40
3.2. Risques liés à l'utilisation des produits d'origine animale	42
4. LA CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE	47
4.1. Principe de la calorimétrie différentielle à balayage	48
4.2. Applications de la calorimétrie différentielle à balayage en cryobiologie	52
LES SPERMATOZOÏDES	57
1. CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DES SPERMATOZOÏDES	57
1.1. Mobilité des spermatozoïdes	58
1.2. Viabilité ou intégrité membranaire	60
1.3. Intégrité de l'acrosome	63
1.4. Statut mitochondrial	64
1.5. Évaluation de l'intégrité de la chromatine	65
1.6. Évaluation fonctionnelle : capacitation, apoptose et stress oxydatif	66
1.7. Prédiction de la fertilité et évaluation <i>in vivo</i>	68
2. SPECIFICITES DE LA CONGELATION DES SPERMATOZOÏDES	70
2.1. Cinétiques de refroidissement et de réchauffement	72
2.2. Milieux couramment utilisés pour la cryoconservation de la semence	74
LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES	85
1. LA PLURIPOTENCE	85
1.1. Définitions générales	85
1.2. Les marqueurs de la pluripotence et de la fonctionnalité des cellules souches pluripotentes	87
1.3. Différence d'état de pluripotence liée à l'origine	92
2. LE MODELE LAPIN	95
2.1. Intérêt du modèle lapin	95
2.2. Particularité des cellules souches pluripotentes de lapin	97
3. SPECIFICITES DE LA CONGELATION DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES	99

3.1. Milieux utilisés pour la cryoconservation des cellules souches pluripotentes	100
3.2. Cinétiques de refroidissement	115
ÉTUDE EXPERIMENTALE	131
CHAPITRE 1 : LES SPERMATOZOÏDES	135
1. ÉTUDE D'UN NOUVEAU MILIEU SYNTHETIQUE POUR LA CONGELATION DU SPERME OVIN ET BOVIN	135
1.1. Publication n°1 – Comparison between an animal-derived product medium and a synthetic medium for ram sperm cryopreservation	136
1.2. Publication n°2 – Comparison between animal-derived media and protein-free media for bull sperm cryopreservation	144
1.3. Résultats et Discussion	157
2. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CONGELATION DU SPERME OVIN	178
2.1. Publication n°3 – Laparoscopic insemination method in sheep allows the use of an animal protein-free and inexpensive freezing medium	179
2.2. Résultats et Discussion	180
CHAPITRE 2 : LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES	206
1. PUBLICATION N°4 – Cryopreservation of rabbit pluripotent stem cells in a synthetic medium with reduced DMSO concentration	208
2. RESULTATS ET DISCUSSION	209
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES	235
BIBLIOGRAPHIE	237
ANNEXES	257
	285

Liste des figures

Figure 1. Schématisation des différentes voies possibles pour conserver une espèce ou un individu (d'après [4]).	19
Figure 2. Schéma représentant les vitesses de nucléation et les vitesses de croissance de cristaux en fonction de la température (d'après [5,8]).	27
Figure 3. Taux de survie et dommages d'une cellule après décongélation en fonction de la cinétique de refroidissement [10].	28
Figure 4. Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement [14].	29
Figure 5. Images par cryomicroscopie de l'intérieur d'une paillette (0,25 ml) fracturée, contenant des spermatozoïdes, congelée à une cinétique de refroidissement rapide (environ 50°C/min).	31
Figure 6. Taux de survie de globules rouges humains, congelés à différentes cinétiques de refroidissement et réchauffés lentement ou rapidement [28].	32
Figure 7. Photo du DSC - Diamond (a) et de la tête de mesure (b) (Manuel d'utilisation du DSC Diamond).	49
Figure 8. Schéma de la tête de mesure [5].	49
Figure 9. Exemple d'analyse d'un thermogramme [5].	50
Figure 10. Exemple d'un champ de spermatozoïdes humains pris en photographie par un système CASA (A *) et définition des paramètres de vitesse et de trajectoire étudiés (B **) [142].	59
Figure 11. Changements morphologiques du spermatozoïde dûs à des stress physiques et/ou chimiques suite à la cryoconservation [154].	71
Figure 12. Hypothèse expliquant l'effet protecteur du jaune d'oeuf ou du lait [221].	77
Figure 13. Structure des protéines BSP de bovins [232].	77
Figure 14. Développement embryonnaire précoce chez la souris [282].	85
Figure 15. Les différentes voies de signalisation permettant le maintien de l'auto-renouvellement des mESC [298].	90
Figure 16. Développement embryonnaire chez le lapin et sa correspondance avec celui de l'homme [289].	96
Figure 17. Présentation des articles par types cellulaires et espèces étudiés.	133
Figure 18. Synthèse et discussion générale de la thèse.	238
Figure 19. Synthèse des résultats d'insémination in vivo chez l'espèce ovine.	246

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Principaux changements lors de la congélation entraînant de possibles conséquences sur la structure biologique (d'après [44]).</i>	36
<i>Tableau 2. Résumé des principaux moyens d'évaluation de la qualité d'un éjaculat.</i>	70
<i>Tableau 3. Caractéristiques des mESC, EpiSC et hESC.</i>	93
<i>Tableau 4. Caractéristiques des mESC et rbPSC (lignées du laboratoire)</i>	98
<i>Tableau 5. Milieux synthétiques commerciaux utilisés pour la congélation de cellules souches pluripotentes (comme milieu de base ou milieu prêt à l'emploi).</i>	113
<i>Tableau 6 – Principaux résultats en vitrification chez les PSC.</i>	117
<i>Tableau 7. Principaux résultats des différentes méthodes de congélation lente pour les PSC.</i>	124
<i>Tableau 8. Récapitulatif des travaux réalisés</i>	134

Liste des abréviations

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ALH :	<i>Amplitude of Lateral Heat Displacement</i> , amplitude de déplacements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement, exprimée (μm)
ASF :	Acrosome Stabilizing Factor
ATP :	Adénosine-5'-Trisphosphate
BCF :	<i>Beat Cross Frequency</i> , fréquence des rythmes de croisements des trajectoires du spermatozoïde (Hertz)
CASA :	<i>Computer-Assisted Sperm Analysis</i> , Analyse automatisée du sperme
<i>Clumps</i> :	agrégats/amas de cellules
CRB :	Centre de Ressources Biologiques
Bulk :	système de vitrification par tamis cellulaire
DMSO :	Dimethyl sulfoxide
DMEM :	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> , milieu de base de culture
DSC :	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> , Calorimétrie différentielle à balayage
EG :	Éthylène glycol
ESC :	<i>Embryonic Stem Cells</i> , Cellules Souches Embryonnaires
hESC :	ESC humaine
mESC :	ESC de souris
nhpESC :	ESC de primate non humain
pESC :	ESC de primate (humaine ou non-humaine)
rbESC :	ESC de lapin
rhESC :	ESC de singe rhésus
FBS ou FCS :	<i>Foetal Bovine Serum</i> ou <i>Foetal Calf Serum</i> , Sérum foetal bovin ou serum de veau foetal
FIV :	Fécondation <i>in vitro</i>
GMQ :	Gain moyen quotidien d'un agneau (grammes/jour)
hMMP :	haut potentiel transmembranaire mitochondrial
HOS :	Hypo-Osmotic Swelling test
Hz :	Hertz
IA :	Insémination Animale/Artificielle
IP :	Iodure de Propidium
ICSI :	<i>Intra-Cytoplasmic Sperm Injection</i> , injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde
iPSC :	<i>induced Pluripotent Stem Cells</i> , Cellules Souches Pluripotentes induites
JC-1 :	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodure
KOSR :	<i>Knock-Out Serum Replacement</i> , sérum de remplacement de composition définie
LDL :	<i>Low-density lipoprotein</i> , Lipoprotéine à faible densité
LIN :	<i>Linearity</i> , linéarité de la trajectoire du spermatozoïde (%)
LN2 :	<i>Liquid Nitrogen</i> , azote liquide
MEF(s) :	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i> , cellules nourricières de souris

MSC :	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> , Cellules Souches Mésenchymateuses
NSC :	<i>New born Calf Serum</i> , sérum de nouveau-né bovin
OPS :	<i>Open-Pulled Straw</i> , système de paillette ouverte
PEG :	Polyéthylène glycol
PNA :	<i>Arachis hypogaea</i> agglutinin
POA :	Produits d'origine animale
PSA :	Agglutine de <i>Pisum Sativum</i>
PSC :	<i>Pluripotent Stem Cells</i> , Cellules Souches Pluripotentes
SCA :	<i>Sperm Class Analyser</i>
SCSA :	<i>Sperm Chromatin Structure Assay</i> , test de la structure de la chromatine du spermatozoïde
SPF :	Specific Pathogen Free
SSC :	Side Scatter
STR :	<i>Straightness</i> , rectitude de trajectoire du spermatozoïde (%)
T _c :	Température de cristallisation
TCG :	Tris-acide Citrique-D(+)Glucose
TCGG :	Tris-acide Citrique-D(+)Glucose et glycérol
TCF :	Tris-acide citrique-Fructose
TCFG :	Tris-acide citrique-Fructose et glycérol
TE :	Transfert Embryonnaire
T _m :	Température de fin de fusion
Tris :	Tris-hydroxymethyl-aminomethane
TUNEL :	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling
VAP :	<i>Average Path Velocity</i> , vitesse selon la trajectoire moyenne du spermatozoïde (μm/s)
VCL :	<i>Curvilinear Velocity</i> , vitesse curviligne, vitesse calculée sur la distance totale parcourue par le spermatozoïde (μm/s)
VSL :	<i>Straight-Line Velocity</i> , vitesse moyenne de déplacement linéaire du spermatozoïde (μm/s)
WOB :	<i>Wobble</i> , oscillation autour de la trajectoire moyenne du spermatozoïde en pourcentage

Introduction générale

En **1992** s'est tenue à Rio de Janeiro la Conférence des Nations Unies sur **l'environnement et le développement**, dite aussi « Sommet de la Terre ». Cette convention a permis d'établir les fondements généraux liés à la **protection de l'environnement et de la biodiversité** en regroupant 193 pays. Déjà en 1980, la **Stratégie mondiale de la conservation** avait été adoptée, mais c'est la convention de Rio qui permet de **couvrir tous les domaines et de manière universelle** (espaces, espèces, relations entre eux, diversité biologique, conservation *in situ* et *ex situ*, réglementation) [1]. La convention dans son article 2 définit alors le terme de diversité biologique : « variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie ; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes ».

C'est dans ce cadre que la **Cryobanque Nationale** (Groupement d'Intérêt Scientifique rattaché au Ministère de l'Agriculture) a été créée en France, en **1999**, dans le but de conserver des **ressources génétiques d'animaux domestiques** [2]. Ces stratégies de conservation de la biodiversité se sont développées dans plusieurs pays et ont abouti au **Protocole de Nagoya** en **2010**. Cet accord vise à déterminer les modalités d'accès aux ressources biologiques et le « **partage juste et équitable** des avantages découlant de [leur] utilisation ». C'est donc grâce à ce protocole qu'émerge **l'importance des échanges internationaux** et donc de l'attention particulière liée à la **qualité sanitaire** des ressources biologiques. En **2012**, le **projet CRB-Anim** (**Centre de Ressources Biologiques d'Animaux domestiques**, Annexe 1), un programme d'Infrastructure Nationale en biologie et Santé porté par la Cryobanque Nationale et financé jusqu'en 2020 par les Investissements d'Avenir, vise à la compréhension des relations entre génotype et phénotype des animaux domestiques tout en évitant l'érosion de la diversité des populations domestiques.

Parmi les différents enjeux du CRB-Anim, les deux plus importants portent sur :

- **l'enrichissement des collections** en associant les données des ressources génomiques (fluides et collections d'ADN) aux données des ressources de reproduction ;
- **l'amélioration et la standardisation des procédures de cryoconservation** en évaluant leur potentiel après décongélation.

Différentes **techniques de biotechnologies de la reproduction** peuvent être utilisées pour la conservation de ressources biologiques. Afin de **conserver les ressources biologiques d'une espèce** et plus particulièrement **d'un individu** à haute valeur génétique, il est intéressant de noter qu'il existe aujourd'hui trois voies disponibles : la voie mâle, la voie femelle et les tissus somatiques (Figure 1). C'est notamment l'exemple du rhinocéros blanc, espèce la plus menacée, qui a fait l'objet de biotechnologies de reproduction avec la production d'ovocyte, d'embryons et de cellules souches embryonnaires [3].

La **voie mâle** désigne la collecte de sperme (à l'aide d'un vagin artificiel ou par électro-éjaculation), du sperme épидидymaire ou encore des tissus testiculaires. Le sperme épидидymaire peut être prélevé *post mortem* ou à partir des testicules d'un mâle castré : on obtient alors des spermatozoïdes jeunes ou immatures en absence de liquide séminal. Les tissus testiculaires permettent également de reformer des spermatozoïdes à partir d'un individu mort. Ces cellules peuvent être congelées dans l'azote liquide pour ensuite être à destination d'insémination animale (IA), de fécondation in vitro (FIV) ou d'injection intracytoplasmique du spermatozoïde (ICSI). Des descendants peuvent alors être obtenus grâce à la voie mâle.

La **voie femelle** désigne les méthodes de collecte du tissu de cortex ovarien, des ovocytes VG ou MII et des embryons. Après cryoconservation de ces cellules, ces dernières peuvent faire l'objet de différentes techniques. Une allogreffe de tissus de cortex ovarien avec FIV/ICSI peut fournir des descendants dans le même cas que les ovocytes. Les embryons ont également la particularité de pouvoir fournir des cellules souches embryonnaires. Des transferts embryonnaires (TE) peuvent être effectués à l'aide d'embryons cryoconservés afin d'obtenir un descendant. Par ailleurs, les cellules souches embryonnaires et les embryons peuvent servir au clonage et créer un individu de la même génération.

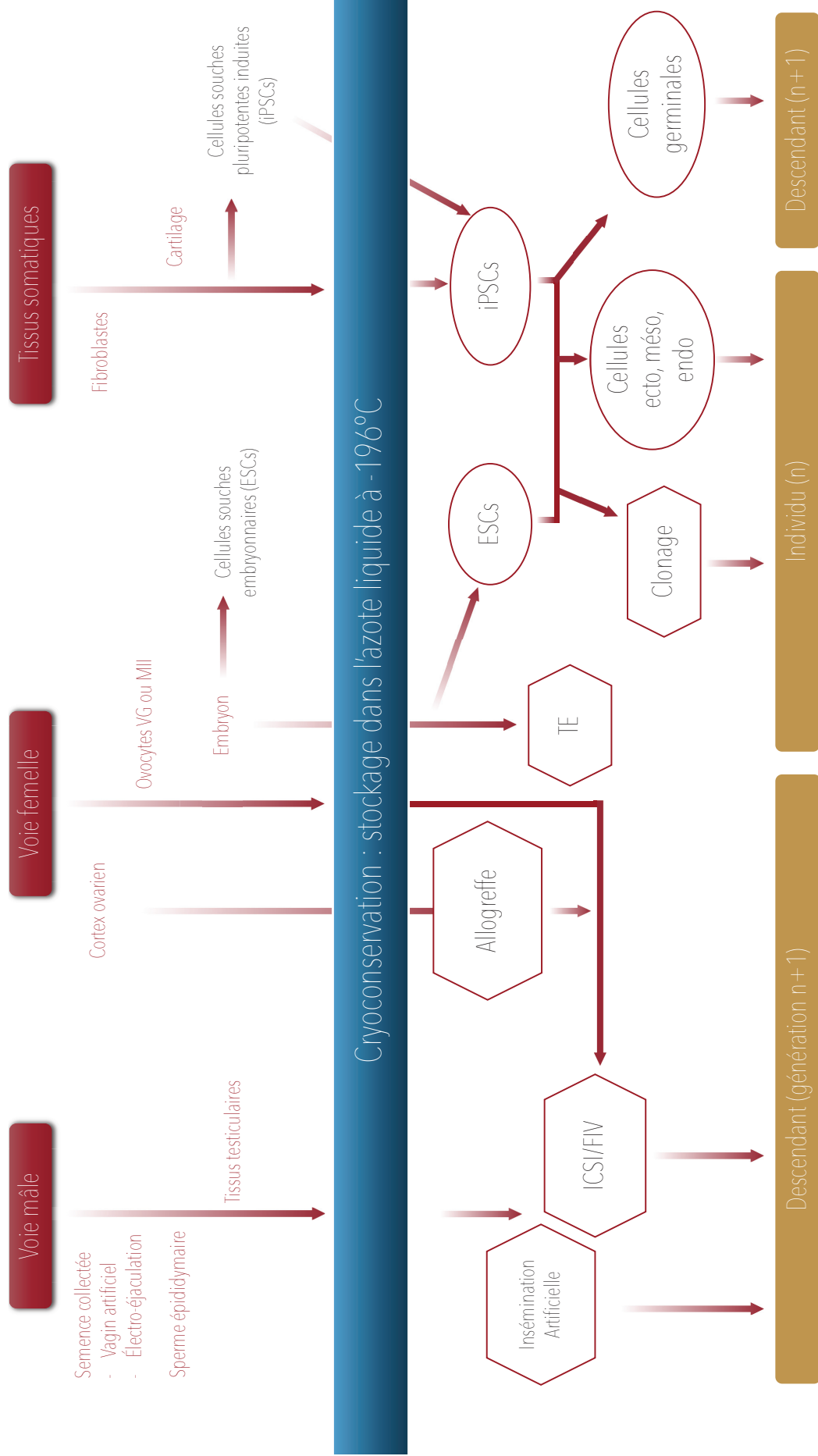


Figure 1. Schématisation des différentes voies possibles pour conserver une espèce ou un individu (d'après [4]).

Enfin, les **tissus somatiques** tels que les fragments de peau ou de cartilage peuvent permettre la dérivation de cellules somatiques qui donneront des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) après reprogrammation. Suite à leur cryoconservation, ces cellules peuvent servir au clonage pour créer un même individu que celui collecté. Elles peuvent aussi être transformées en cellules germinales (spermatozoïde, ovocyte) pour créer des descendants ou coloniser un embryon receveur pour créer des individus chimériques et des descendants à la seconde génération. Des cellules ectodermiques (cellules de la peau), mésodermiques (cellules de l'appareil respiratoire, cellules musculaires, etc.) ou des cellules endodermiques (cellules de l'appareil digestif) peuvent également être formées suite à la différenciation de cellules iPSC.

Ces différentes techniques de biotechnologies de la reproduction sont donc aujourd'hui accessibles pour les différentes espèces. Néanmoins, la question de la **standardisation de la cryoconservation de ces ressources** reste posée. En effet, la plupart des ressources biologiques est congelée dans des milieux contenant des **produits d'origine animale (POA)** et des **cryoprotecteurs**. Les POA peuvent représenter un **frein aux échanges internationaux** notamment dû aux **risques sanitaires et de variabilité** qu'ils présentent. Les cryoprotecteurs sont, quant à eux, des molécules indispensables pour la congélation mais ils représentent un **risque élevé de génotoxicité**.

Un milieu synthétique chimiquement défini, fabriqué en France, le STEMALPHA.CRYO3® (Stem Alpha, France), que nous appellerons **CRYO3** tout au long de ce manuscrit, est un candidat potentiel pour remplacer les POA dans les milieux de congélation des ressources biologiques. En effet, ce produit a été breveté initialement pour la conservation de cellules hématopoïétiques humaines en remplacement des sérums traditionnellement utilisés. Ce produit a été caractérisé et utilisé avec succès pour la congélation d'embryons produits *in vitro* de bovins et d'embryons de lapins [5].

C'est donc dans ce **contexte d'amélioration des garanties sanitaires** et des solutions cryoprotectrices que s'inscrit ma thèse. L'objectif de celle-ci est de **substituer les POA** par un **milieu synthétique et chimiquement défini**, le CRYO3, **sur plusieurs modèles cellulaires** (sperme, embryons, cellules souches

pluripotentes) issus de différentes **espèces domestiques** (ovin, bovin, lapin) en **congélation lente, rapide ou en vitrification**. J'ai collaboré étroitement avec Mme Magda Guedes Teixeira sur son travail de thèse : la **vitrification d'embryons de lapin** (Annexe 2). Cependant, je me suis principalement focalisée sur deux types cellulaires :

- la congélation rapide de **spermatozoïdes** bovins et ovins ;
- la congélation lente de **cellules souches pluripotentes** de lapin.

Afin de répondre à ces objectifs, j'ai développé deux approches complémentaires en cryobiologie :

- une **approche biologique** avec l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des cellules après décongélation ;
- une **approche thermodynamique** avec la caractérisation des milieux de congélation et des cinétiques de refroidissement.

Dans un premier temps, l'**étude bibliographique** permettra de présenter le **contexte scientifique** de la cryobiologie et plus précisément la cryoconservation du sperme et des cellules souches pluripotentes, ainsi que leurs spécificités respectives. Dans un second temps, l'**étude expérimentale**, présentée sous forme de **quatre articles scientifiques**, permettra de répondre aux objectifs de ce travail : évaluer le milieu CRYO3 sur deux nouveaux modèles cellulaires, les spermatozoïdes et les cellules souches pluripotentes. Enfin, nous **discuterons de nos résultats** et des **perspectives d'application** qu'ils permettent d'entrevoir.

Étude bibliographique

Dans un premier chapitre, les **principes de base de la cryobiologie** et **l'intérêt d'une approche physique** en cryoconservation seront présentés. Ensuite, un chapitre consacré aux **cellules spermatiques** ainsi que les spécificités de leur cryoconservation sera évoqué. Enfin, nous aborderons les **cellules souches pluripotentes** et les particularités de leur cryoconservation.

Principes de cryobiologie

La cryobiologie de cellules germinales et somatiques a été pendant plusieurs années basée sur des **protocoles empiriques**. Les premiers essais de congélation [6] ont permis toutefois de définir les critères essentiels, parfois suffisants, pour la congélation d'une cellule : la perméabilité grâce à des solutions contenant des **agents cryoprotecteurs**, la **cinétique de refroidissement lente**, la stockage entre **-80°C et -196°C** et le **réchauffement rapide**.

Cette partie permet, dans un premier temps, de présenter les **fondamentaux de la cryoconservation** ainsi que les **dommages induits** par cette procédure. Dans un second temps, les **risques liés aux agents de protection** (cryoprotecteurs et POA) utilisés dans les solutions de cryoconservation seront évoqués. Afin de mieux comprendre les mécanismes de cryobiologie, l'analyse des propriétés thermodynamiques des solutions de congélation peut être une approche intéressante. Parmi les différentes techniques, nous introduirons le principe de la **calorimétrie différentielle à balayage** ainsi ses **applications** en cryobiologie de cellules germinales et cellules souches pluripotentes (PSC).

1. Définitions

L'objectif de la **cryoconservation** est **l'arrêt du métabolisme cellulaire de manière réversible** tout en préservant l'intégrité des membranes. L'eau étant présente de manière importante dans tout type de cellule, la transition liquide-solide de l'eau dans les biomatériaux est un phénomène qui doit être maîtrisé en cryoconservation [7]. En effet, cette transition à la phase solide représente une augmentation du volume de 9 % [8]. Pour éviter un changement abrupt de volume, une **cinétique optimale** ainsi que la **présence de cryoprotecteurs** sont essentielles.

1.1. Cristallisation, nucléation et surfusion

Les principes de la **cristallisation** et de la **nucléation** ont été passés en revue par Meryman ainsi que Karlsson et Toner [9,10]. Rapidement, dans ce paragraphe, nous introduirons ces termes. À partir de $-0,6^{\circ}\text{C}$, l'eau à l'état liquide et dans des conditions isotoniques devient instable et passe à l'état solide formant la glace [10]. Un cristal de glace est un tétraèdre formé par une molécule d'eau centrale liée à quatre molécules d'eau grâce à des liaisons hydrogène. Afin qu'un cristal de glace se forme, un événement « nucléant » est requis. L'induction de la **cristallisation** nécessite donc des **noyaux de nucléation**. En effet, à 0°C l'eau ne se solidifie pas spontanément. Entre 0°C et la température à laquelle la cristallisation a lieu (plus basse que 0°C pour des solutions biologiques), l'état de l'eau est instable : c'est **l'état de surfusion**. Dans cet état de surfusion, la glace se forme de manière chaotique avec la **présence de petits cristaux** et un risque de formation de cristaux intracellulaires [10]. C'est donc seulement grâce à un événement nucléant que l'eau passe d'un état liquide à un état solide. La formation des premiers cristaux de glace entraîne une remontée en température jusqu'au point de congélation par le biais d'une libération d'énergie. Il existe deux types de nucléation. La **nucléation hétérogène** en milieu biologique est la plus courante et la **nucléation homogène** se produit qu'en présence d'eau pure. Dans le cas de la **nucléation hétérogène**, le noyau de nucléation est une **impureté** [11]. Ainsi, plus le noyau de nucléation est petit, plus la température de cristallisation est basse. La **nucléation homogène** quant à elle est provoquée à -40°C . À cette température, il suffit d'un noyau de nucléation de la taille d'un nanomètre, correspondant à un **groupe de molécule d'eau**, pour que la cristallisation soit induite spontanément. Pour les deux types de nucléation, la présence de soluté (sels, sucres) diminue la température de nucléation [9].

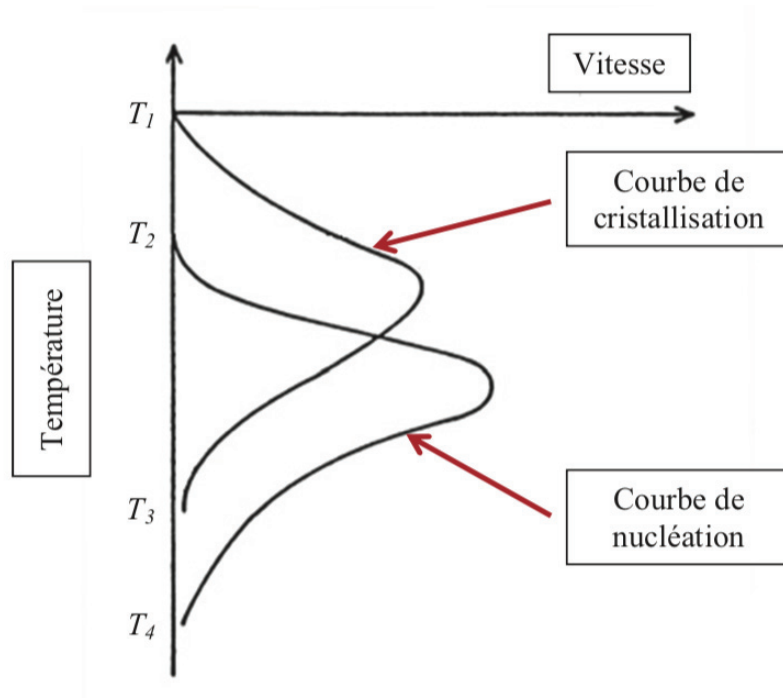


Figure 2. Schéma représentant les vitesses de nucléation et les vitesses de croissance de cristaux en fonction de la température (d'après [5,8]).

La **croissance des cristaux** dépend de la **température**, de l'**état de surfusion**, de la **vitesse de refroidissement** et de la **viscosité** de la solution [9,10]. Plus la solution est visqueuse, plus la diffusion des cristaux et donc leur croissance, est inhibée. De plus, plus la température diminue, plus la solution devient visqueuse. Ainsi, un refroidissement rapide va entraîner la formation de nombreux cristaux de petite taille alors qu'un refroidissement lent va provoquer peu de cristaux mais de grande taille [9]. Cette propriété est importante car lors du refroidissement, la cristallisation (croissance des cristaux) va apparaître en premier, suivie de la nucléation (apparition de cristaux) (Figure 2). À l'inverse, au réchauffement, c'est la vitesse de nucléation qui augmente, suivie de la vitesse de cristallisation (Figure 2) [8]. Ainsi, lors du réchauffement, le nombre de cristaux sera plus important qu'au refroidissement : c'est ce qu'on appelle la **re-cristallisation**. Pour éviter ce phénomène, la **cinétique de réchauffement doit être plus élevée que la cinétique de refroidissement**. Il est donc essentiel de déterminer les cinétiques de refroidissement et de réchauffement optimales.

1.2. Le refroidissement et le réchauffement : intérêt de cinétiques optimales

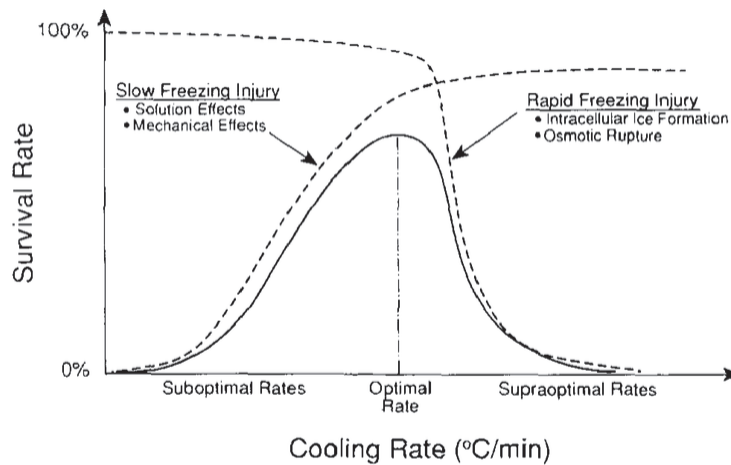


Figure 3. Taux de survie et dommages d'une cellule après décongélation en fonction de la cinétique de refroidissement [10].

- - - Dommages induits

___ Taux de survie en fonction de la cinétique de refroidissement

L'évolution du taux de survie en fonction de la vitesse de refroidissement peut être schématisée par une courbe en cloche (Figure 3, Figure 4). Lors du refroidissement, la formation de cristaux de glace dans le milieu extracellulaire va augmenter la concentration des solutés à l'extérieur des cellules. Afin de maintenir le potentiel chimique de l'eau intracellulaire en équilibre avec celui de l'eau extracellulaire, la cellule va faire sortir de l'eau. Ainsi, la cellule se déshydrate et la formation de cristaux de glace intracellulaires n'est plus possible (Figure 4, b). Si la cellule se déshydrate de manière trop importante, du fait notamment d'une forte concentration des solutés et d'un refroidissement trop lent ($<5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), la cellule subit **l'effet mécanique** par **pression sur ses membranes**. Un deuxième phénomène lié à cette pression mécanique est « **l'effet solution** » au cours duquel la cellule va subir des modifications biochimiques, dues notamment à la **déstabilisation des membranes** exposées à un environnement extracellulaire hypertonique (Figure 4, a).

Néanmoins, si la vitesse de refroidissement est trop rapide ($>100^{\circ}\text{C}/\text{min}$), la cellule n'a pas le temps de se déshydrater pour maintenir l'équilibre et l'eau résiduelle dans la cellule va cristalliser. Cette **cristallisation intracellulaire** entraîne des dommages au sein des organites et des membranes cellulaires, des **phénomènes létaux** pour la cellule (Figure 4, c) [7,12,13].

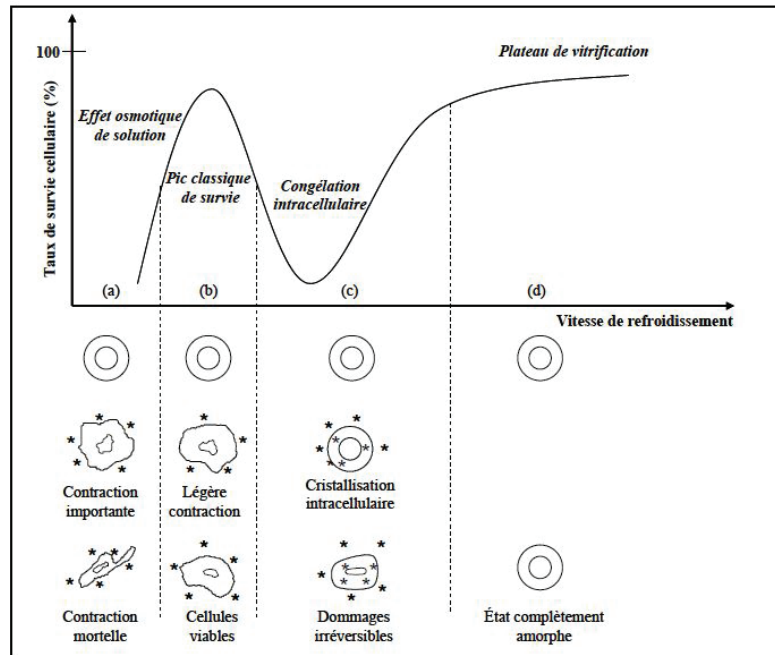


Figure 4. Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement [14].

Il existe donc une cinétique optimale pour chaque type de cellule qui permet d'éviter d'une part les dommages liés à un refroidissement trop lent (effet solution et effet mécanique) et d'autre part les dommages liés à un refroidissement trop rapide (cristallisation intracellulaire).

1.2.1. Cinétique de refroidissement

La cinétique de refroidissement est une composante essentielle de la cryoconservation et va varier selon le type de cellule conservé. En effet, il existe quatre types de refroidissement : la vitrification, la congélation ultra-rapide, la congélation rapide et la congélation lente.

1.2.1.1. La vitrification et la congélation ultra-rapide

La **vitrification** est un processus particulier où aucune formation de cristaux de glace n'est observée (Figure 4, d) [14]. En effet, la vitesse de refroidissement liée à la vitrification est tellement grande que l'eau contenue dans le milieu extracellulaire et intracellulaire n'a pas le temps de se transformer en glace. L'eau se trouve dans un **état amorphe stable** : l'**état vitreux**. Cet état doit être conservé jusqu'au réchauffement pour éviter une dévitrification, c'est-à-dire une recristallisation pendant le réchauffement [15]. La vitrification nécessite néanmoins des **concentrations très**

élevées en cryoprotecteurs (voir partie 1.3), permettant notamment l'augmentation de la viscosité du milieu extracellulaire. Ces cryoprotecteurs sont souvent ajoutés dans la solution de congélation à hauteur de 30 %, voire 40 %. La vitrification est aujourd'hui la méthode de choix pour la conservation des embryons et ovocytes [16].

On parle de **congélation ultra-rapide** lorsque les cellules sont congelées à des vitesses de refroidissement généralement supérieures à 400°C/min (comme la vitrification) avec un **risque de dévitrification** (présence de cristaux de glace lors du réchauffement, Figure 4, c). En effet, il est parfois difficile d'atteindre la cinétique de réchauffement critique (vitesse au-delà desquelles la formation de glace est évitée). Plusieurs raisons peuvent expliquer cela : (i) la vitesse de réchauffement n'est pas assez rapide, (ii) la concentration en solutés notamment en cryoprotecteurs n'est pas suffisante, et (iii) les cellules n'ont pas été suffisamment exposées à la solution cryoprotectrice [17,18]. Dès lors qu'il existe des cristaux de glace, on ne peut plus parler de vitrification. Beaucoup d'études néanmoins utilisent abusivement le terme de vitrification alors que rien ne peut le démontrer scientifiquement (absence de cinétique critique calculée, ou de cinétique de refroidissement estimée). Aujourd'hui, la communauté scientifique est plus attentive à ces questionnements.

1.2.1.2. La congélation rapide

Au-dessus de 5 à 30°C/min, on parle de **congélation rapide** (Figure 4, b). Ce type de refroidissement est plutôt adaptée aux spermatozoïdes [19]. La congélation rapide peut être réalisée soit dans un congélateur programmable, soit dans des vapeurs d'azote (échantillons placés à une hauteur définie au-dessus de l'azote liquide permettant d'effectuer une cinétique entre 10°C/min et 100°C/min) [20].

1.2.1.3. La congélation lente

En dessous de 5°C/min, la **congélation** est dite **lente**. C'est une technique qui a été développée en premier lieu pour les embryons [21], puis pour les PSC [22,23]. Elle est le plus souvent réalisée grâce à des congélateurs programmables permettant des cinétiques variant de 0,1°C/min à 45°C/min). Une solution moins coûteuse est l'exemple d'enceintes contenant de l'isopropanol et permettant d'obtenir une cinétique de 1°C/min. Le refroidissement étant lent, la surfusion peut être importante avec une croissance des cristaux hétérogène et chaotique. Pour éviter ce

phénomène, une **induction contrôlée de la nucléation** est parfois nécessaire : c'est ce qu'on appelle le **seeding**. Au-dessus de la température critique de nucléation (ou plutôt la température de fin de fusion T_m ; environ -7°C pour les embryons), un matériel froid (tige métallique ou coton trempé dans l'azote liquide) est placé sur la paillette ou le cryotube, ce qui diminue la température et induit la nucléation et ainsi la cristallisation [24,25]. Cette étape est inutile pour les spermatozoïdes congelés dans de petits volumes (0,25 ml ou 0,5 ml) [26]. En effet, il est démontré que la tête des spermatozoïdes est emprisonnée dans une phase vitreuse lors de la congélation (Figure 5) et n'est donc pas sujette aux dommages liés à une croissance de cristaux chaotique [20]. Mais l'effet du *seeding* sur les spermatozoïdes peut varier selon les espèces [27]. Au contraire, le *seeding* est réalisé de manière systématique pour les embryons [24,25] et de manière plus ponctuelle pour les PSC [22,23].

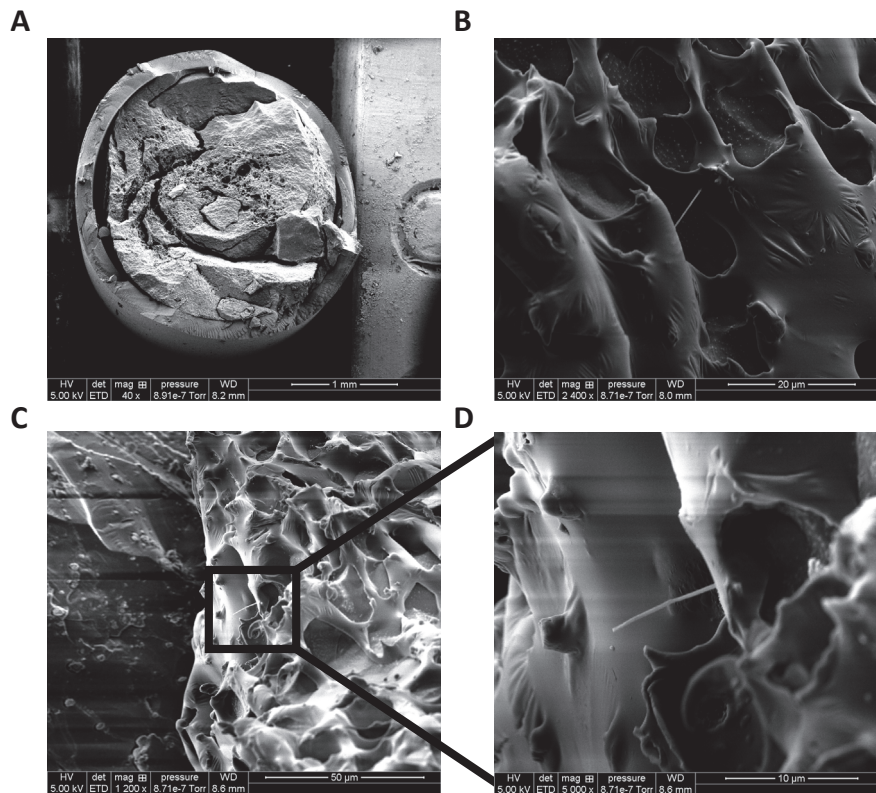


Figure 5. Images par cryomicroscopie de l'intérieur d'une paillette (0,25 ml) fracturée, contenant des spermatozoïdes, congelée à une cinétique de refroidissement rapide (environ $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

A. Vue intérieure d'une paillette de 0,25 ml, fracturée dans l'azote liquide et observée à -196°C . Après réchauffement de l'échantillon sous vide, les espaces « vides » observés sont normalement occupés par des cristaux de glace ; les travées vitreuses, sont quant à elles visibles. Les flagelles sont donc observables car nous faisons l'hypothèse qu'ils sont emprisonnés dans les zones cristallines, alors que les têtes des spermatozoïdes sont protégées dans la zone vitreuse. B, C, D. Aperçu d'un flagelle contenu dans un cristal de glace. (UPSP ICE, données non publiées)

1.2.2. Le réchauffement : une étape critique

Le **réchauffement** ou la **décongélation** des cellules est une autre étape importante de la cryoconservation. Lorsque des cellules présentent des cristaux intracellulaires (donc congelées à une cinétique de refroidissement élevée), seulement certaines vont survivre suite à un réchauffement rapide. En effet, les cristaux intracellulaires de petite taille vont, au cours d'un réchauffement lent, s'agglomérer et former de plus gros cristaux. Cette recristallisation est particulièrement néfaste. Au contraire, lors d'une congélation lente, il est préférable d'effectuer un réchauffement lent [28]. La survie des cellules est donc non seulement liée à la cinétique de refroidissement mais également à la cinétique de réchauffement. De même, dans le cas d'une cinétique de congélation non appropriée, la survie des cellules peut être améliorée par un réchauffement adéquat (Figure 6). En effet, Mazur [12] explique que si une cellule est congelée moins vite que la cinétique optimum, un réchauffement lent va améliorer sa survie. Si au contraire, une congélation plus rapide que l'optimum a été appliquée, il vaut mieux la réchauffer rapidement.

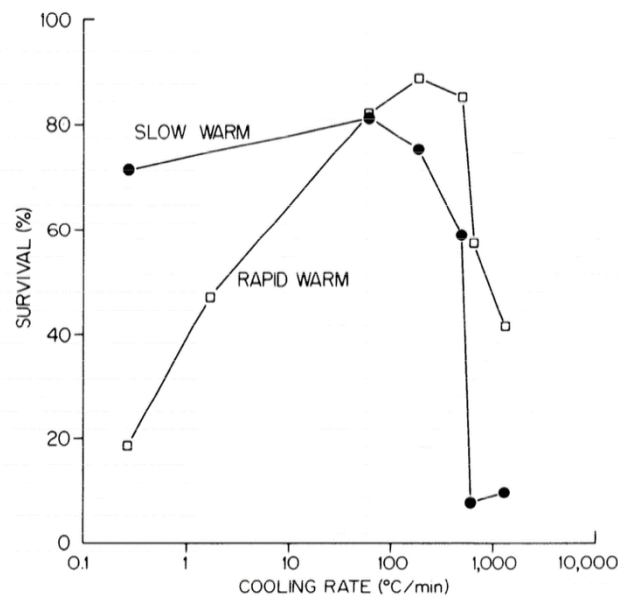


Figure 6. Taux de survie de globules rouges humains, congelés à différentes cinétiques de refroidissement et réchauffés lentement ou rapidement [28].

Ainsi la mise en place d'un protocole de congélation dépend de la vitesse de refroidissement et donc du type de refroidissement (lent, rapide, vitrification) mais aussi et surtout de la vitesse de réchauffement, qui peut être l'étape la plus sensible.

1.3. Les cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants

Un **cryoprotecteur** peut être défini comme un **additif qui permet de meilleurs taux de survie des cellules après décongélation par rapport à un milieu exempt de cryoprotecteur** [29]. Plus précisément, la formation de cristaux de glace est limitée grâce à la présence de ce dernier.

Deux types de cryoprotecteurs existent : les **cryoprotecteurs pénétrants** ou internes qui ont la **capacité d'entrer dans la cellule** à travers la membrane plasmique et les **cryoprotecteurs non pénétrants** ou externes qui sont **incapables d'entrer** dans le cytoplasme des cellules.

1.3.1. Les cryoprotecteurs pénétrants

Les **cryoprotecteurs pénétrants** sont des **molécules ioniques à faible masse moléculaire**. Ces molécules ont une grande solubilité dans l'eau à faible température et permettent de limiter la formation de cristaux et les dommages causés par l'effet solution [15,30]. Il est important de noter que ces cryoprotecteurs protègent donc mieux la cellule en cas de refroidissement lent (effet solution), qu'en cas de refroidissement rapide qui n'évite pas la formation de cristaux intracellulaires [12].

Les cryoprotecteurs pénétrants, en exerçant une force osmotique sur la cellule, **favorisent la déshydratation de la cellule**, et donc **diminuent l'eau intracellulaire disponible** pour former des cristaux de glace. La cristallisation intracellulaire ainsi que le stress osmotique lié à la déshydratation de la cellule sont donc limités. En effet, les cryoprotecteurs entrent dans la cellule pour remplacer l'eau sortie lors de la déshydratation et diminuent ainsi la température de cristallisation en agissant sur les milieux intra- et extracellulaire [31,32]. De plus, les cryoprotecteurs sont caractérisés par un grand volume moléculaire, c'est-à-dire qu'ils **vont occuper un plus grand volume intracellulaire** que les sels présents dans la cellule. Ainsi, le rétrécissement de la cellule, dû à la sortie d'eau transformée en cristaux extracellulaires, va être observé à une plus basse température [11].

Comme dit précédemment, plus la viscosité augmente, plus la croissance des cristaux diminue. À forte concentration, les cryoprotecteurs augmentent la viscosité intra- et extracellulaire et donc limitent largement la nucléation et la croissance des cristaux. De plus, les cryoprotecteurs, en formant des liaisons hydrogènes avec les

molécules d'eau, peuvent masquer les sites de nucléation et donc retarder la cristallisation [29].

Par ailleurs, lors de la descente en température, la part d'eau non congelée diminue à cause de la conversion d'eau en glace, augmentant ainsi la concentration en solutés, principalement des sels. La présence d'un cryoprotecteur pénétrant permet de réduire la concentration en sels dans la part d'eau résiduelle non congelée à une température donnée [28]. En effet, les cryoprotecteurs agissent comme des solvants pour les sels et cela en fonction de la quantité d'eau non congelée, mais de façon indépendante de la composition en solutés [28,33]. Cette propriété colligative permet donc de réduire les dommages causés par l'effet de solution.

Après le glycérol, premier cryoprotecteur utilisé en 1949 [34], d'autres cryoprotecteurs ont pu être utilisés dans différents protocoles de congélation comme le diméthyl-sulfoxyde (DMSO), l'éthylène glycol (EG), le polyéthylène glycol (PEG) ou les amides. L'avantage du DMSO et de l'EG est leur capacité à pénétrer rapidement dans les cellules, contrairement au glycérol qui pénètre lentement mais qui est moins toxique. En effet, malgré les propriétés protectrices de ces molécules, leur toxicité peut être importante quand elles sont utilisées à forte concentration. Cette toxicité dépend du cryoprotecteur, du type de cellule, de l'espèce étudiée, de la température, mais aussi du temps de contact [33]. Les **dommages causés par les cryoprotecteurs** au niveau de la cellule sont de l'ordre **osmotique et chimique** à cause d'une déshydratation. En effet, les cellules varient en volume plusieurs fois lors du processus de congélation et de décongélation. D'abord, un rétrécissement de la cellule est visible à la sortie de l'eau intracellulaire puis celle-ci « regonfle » avec la pénétration des cryoprotecteurs. Ce phénomène est inversé au moment de la décongélation lors des dilutions dans des solutions hypotoniques [9]. La toxicité peut être réduite en diminuant la concentration du cryoprotecteur, le temps d'exposition et la température de contact entre le cryoprotecteur et la cellule [10]. L'addition en plusieurs étapes des cryoprotecteurs peut également diminuer leur toxicité [10]. Le type de cryoprotecteur et sa concentration optimale peuvent aussi dépendre du type de dilueur de base utilisé (hepes, tris-hydroxyméthyl-aminométhane [tris]) [35]. Les cryoprotecteurs peuvent également entraîner des effets indésirables chez le patient (lors de transfusion d'un produit congelé-décongelé) et des effets mutagènes. Ce type de toxicité est discuté dans le paragraphe 3.1.

Ainsi, après l'équilibre parfait entre la protection et la toxicité de ces cryoprotecteurs, reste encore à approfondir pour chaque type de cellule, la cinétique de congélation et le type de cryoprotecteurs.

1.3.2. Les cryoprotecteurs non pénétrants

Les **cryoprotecteurs non pénétrants**, molécules solubles dans l'eau, sont généralement des **saccharides ou des macro-molécules** (ficoll, dextran) qui ne peuvent pas traverser les membranes plasmiques des cellules. Ces saccharides ont la particularité **d'agir seulement sur le milieu extracellulaire** et d'avoir un effet osmotique plus restreint que les cryoprotecteurs pénétrants [9].

Il est avantageux d'utiliser des cryoprotecteurs non pénétrants, en combinaison ou non avec des cryoprotecteurs pénétrants, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, leur présence extracellulaire permet la déshydratation de la cellule et une plus faible probabilité de cristallisation intracellulaire en exerçant une pression osmotique [36,37]. Le contact avec les cryoprotecteurs pénétrants et leur potentielle toxicité sont ainsi restreints. De plus, lors de la décongélation, ils agissent comme un **tampon osmotique** en évitant l'entrée d'une part importante d'eau dans la cellule et donc l'éclatement de celle-ci. Ces sucres peuvent également interagir avec les phospholipides de la membrane plasmique des cellules, ce qui augmente notamment le taux de survie des spermatozoïdes [36]. En particulier, le tréhalose augmente la fluidité de la membrane des spermatozoïdes de bouc, lui conférant une meilleure résistance au processus de congélation-décongélation [38]. Quant aux PSC, le tréhalose a également permis d'améliorer les taux de récupération après décongélation [39–41]. Il est en effet connu que les **sucres en général stabilisent les membranes plasmiques** mais également les protéines intracellulaires [42]. Enfin, les sucres peuvent jouer le rôle de substituant aux cryoprotecteurs pénétrants, notamment dans les milieux de vitrification [43].

En résumé, la température de cristallisation ayant lieu à plus basse température que 0°C pour des solutions biologiques, il est important d'induire une cristallisation manuelle (*seeding*) pour certaines cellules (embryons ou PSC), enclines à la cristallisation chaotique et congelées lentement. Les spermatozoïdes

étant des cellules petites et pré-déshydratées, ces cellules vont être emprisonnées dans une phase vitreuse lors d'une congélation rapide : le *seeding* n'est donc pas nécessaire. Les cryoprotecteurs sont des molécules qui permettent de remplacer l'eau intracellulaire et en périphérie des cellules, prévenant celles-ci des dommages liés à la formation de glace.

2. Dommages cellulaires liés à la congélation

Les dommages cellulaires sont d'origine multiple : biochimique, mécanique, génétique, etc. Ces dommages sont provoqués par différents phénomènes liés à la congélation (Tableau 1).

Tableau 1. Principaux changements lors de la congélation entraînant de possibles conséquences sur la structure biologique (d'après [44]).

Facteurs physiques	Modifications de la pression osmotique Force mécanique des cristaux de glace Tension électrique entre les cristaux Augmentation de la pression hydrostatique
Facteurs chimiques	Redistribution des composants ioniques Changement de pH Transition de phase des biopolymères Transformation redox Effets spécifiques (toxiques) et non spécifiques des cryoprotecteurs Radicaux libres

Les **principaux dommages** relatés sont liés au **froid**, à la **présence de glace**, à la **déshydratation** (pression osmotique) et à la **toxicité des cryoprotecteurs**. Dans cette partie seront présentés de manière concise les dommages liés au froid, à la cristallisation et à la pression osmotique. La toxicité des cryoprotecteurs sera décrite dans la partie 3.

2.1. Les dommages liés au froid

Les **dommages liés au froid**, appelés *chilling injury*, provoquent généralement des **lésions au niveau de la membrane plasmique en absence de glace**. Ils peuvent être séparés en deux types de dommage [15] :

- les effets indésirables dus à l'**exposition** des cellules à **des températures basses** en dessous d'un certain seuil : le ***cold injury*** ;
- les effets indésirables dus à une **cinétique de refroidissement trop élevée** : le ***cold shock***.

Ces deux termes sont souvent confondus. En effet, certains auteurs font la distinction terminologique entre *cold injury* et *cold shock* alors que d'autres utilisent le terme ***cold shock*** pour tous les dommages. En français également, nous présentons les dommages liés au froid (températures basses et cinétique trop élevée) grâce au terme « **choc thermique** ».

Le ***cold injury*** a lieu pendant des refroidissements lents et est plus limité lors de refroidissements rapides. Il provoque un changement dans la composition des phospholipides membranaires et dépend notamment du ratio cholestérol/phospholipides des membranes des cellules. Il a été mis en évidence que ce dommage était lié à la **transition de phase des lipides des membranes cellulaires** [45]. En effet, le ratio cholestérol/phospholipides joue un rôle prédominant dans la fluidité des membranes, car le cholestérol module celle-ci en interagissant avec les chaînes des acyles gras des phospholipides [46]. Plus il y a de cholestérol, plus la membrane a une structure stable sur de grandes variations de température. La membrane des spermatozoïdes et des cellules constituant le plasma séminal du lapin est composée d'un haut ratio cholestérol/phospholipides (0,88), comme celle du sperme humain (0,99) [47]. Ainsi, ce haut ratio permet une plus grande résistance des membranes à l'exposition au froid. Par ailleurs, les intervalles de température de cette transition de phase varient selon les espèces [45]. En effet, chez le lapin par exemple, la membrane présente également un faible ratio d'acides gras polyinsaturés/acides gras saturés. Un plus grand pourcentage d'acides gras saturés résulte en une structure de membrane plus rigide [47]. Ces caractéristiques montrent que la semence de lapin peut supporter de plus grandes variations de température et donc est moins sensible au stress thermique et au refroidissement [30]. Cependant, les membranes doivent être fluides et non rigides pour supporter des variations de température [48]. Une étude montre d'ailleurs que l'efflux de cholestérol des spermatozoïdes de boucs, un événement se produisant avant la réaction acrosomique, augmente la fluidité de certains domaines lipidiques de la membrane [49].

Quant au **cold shock**, la **cause** est plutôt **mécanique** et ce type de dommage est accéléré par une cinétique de refroidissement élevée. Lors de la descente en température, la cellule se contracte et donc diminue la surface de sa membrane. Comme vu précédemment, si le refroidissement est suffisamment lent, la cellule a le temps de libérer l'eau. Grâce à la pression hydrostatique, le phénomène de contraction de la membrane est ainsi compensé par la sortie d'eau. Mais si la descente en température est trop rapide, la cellule n'a pas le temps de libérer l'eau et subit la contraction cellulaire dans le même temps : il y a donc **rupture de la membrane**. Ce type de dommage est donc dépendant d'une part de la perméabilité et d'autre part de la cinétique de refroidissement. Il est important de noter que les spermatozoïdes sont sensibles à ce type de dommage car ils ne présentent ni plis, ni microvillosités, pouvant constituer un excès de membrane lors de la contraction cellulaire [15].

2.2. Dommages liés à la cristallisation

Chez les spermatozoïdes, la cristallisation intracellulaire n'a pas pu être mise en évidence [20,50–52]. En effet, en testant une gamme très large de cinétique (1°C/min à 3000°C/min), Morris et al. [19] ont démontré qu'une vitrification avait lieu dans le compartiment intracellulaire du spermatozoïde. Néanmoins, si la glace intracellulaire n'explique pas la mortalité des spermatozoïdes lors de la congélation, c'est un risque de **re-cristallisation** lors du réchauffement qui pourrait l'expliquer [19]. Lors d'un réchauffement jusqu'à -40°C, les auteurs ont démontré que le compartiment intracellulaire était encore à l'état vitreux bien que le compartiment extracellulaire soit à l'état liquide et donc sujet à une re-cristallisation. C'est cette phase de réchauffement qui induit un **dommage aux membranes des spermatozoïdes**.

A l'inverse, la **cristallisation intracellulaire** est un phénomène qui peut toucher les embryons ou les PSC. Cette cristallisation intracellulaire peut varier en fonction de la **composition des cryoprotecteurs**, la **cinétique de refroidissement** et de **réchauffement**, ainsi que la **température de nucléation** [53]. Heng et al. [54] ont montré que les cellules adhérentes étaient également plus vulnérables à la congélation que les cellules en suspension. En effet, cette vulnérabilité des PSC congelées en amas, est liée à la propagation cellule-cellule de la cristallisation

intracellulaire [23]. À travers les **jonctions communicantes** (*gap junctions*), essentielle à la prolifération des cellules [55], la cristallisation intracellulaire peut se propager vers les cellules voisines [56].

2.3. Pression osmotique

Les dommages liés à la pression osmotique varient en fonction de deux facteurs :

- l'augmentation des concentrations en solutés : **l'effet solution** ;
- les **différences de concentrations en cryoprotecteur** entre les environnements intra- et extracellulaire.

Comme vu précédemment, **l'effet solution**, lié à la croissance cristalline dans le milieu extracellulaire, va induire une augmentation de la concentration des solutés à l'extérieur de la cellule. Cet équilibre osmotique induit une sortie de l'eau intracellulaire de la cellule vers le milieu extracellulaire : **la cellule se déshydrate** alors jusqu'à un seuil pour lequel le dommage est irréversible [10].

Les différences de concentration en cryoprotecteurs entre les milieux intra- et extracellulaire peuvent avoir un effet dommageable sur la cellule. Ce dommage peut apparaître au moment de l'addition des cryoprotecteurs, avant la congélation et aussi pendant/après le réchauffement au moment de la sortie des cryoprotecteurs [9]. En fait, l'ajout des cryoprotecteurs va induire deux phénomènes consécutifs :

- d'abord, la sortie d'eau de la cellule due à un environnement hypertonique (équilibre osmotique) ;
- puis, une entrée des cryoprotecteurs dans la cellule due à leur perméabilité inférieure à celle de l'eau [57].

À l'inverse, après congélation – décongélation, la cellule se retrouve dans un milieu hypotonique (dilution des spermatozoïdes ou réchauffement des PSC par ajout du milieu de culture) et va donc d'abord faire entrer de l'eau puis faire sortir les cryoprotecteurs. Le **refroidissement** ainsi que le **réchauffement** induisent alors chacun **deux fois un changement du volume de la cellule**. Ces changements de volume peuvent alors être dommageables s'ils sont effectués de manière trop brutale. C'est pourquoi certains protocoles de congélation incluent l'ajout des

cryoprotecteurs en plusieurs étapes et à température basse (environ 4°C) afin que les échanges s'effectuent plus lentement [58].

En résumé, les principaux dommages dus à la congélation sont liés au froid (*cold shock* et *cold injury*), à la cristallisation intracellulaire particulièrement pour les embryons et les PSC, à la re-cristallisation liée au réchauffement notamment pour les spermatozoïdes, ainsi qu'à la pression osmotique. Au-delà du risque de mortalité des cellules dû à ces dommages, il existe également des altérations du génome qui sont souvent peu étudiées. Dans la prochaine partie, nous étudierons les risques liés aux cryoprotecteurs et aux POA.

3. Risques liés à l'utilisation de cryoprotecteurs et de produits d'origine animale lors de la congélation

3.1. Risques liés à l'utilisation de cryoprotecteurs pénétrants

Les cryoprotecteurs permettent de protéger la cellule lors de la congélation. Néanmoins ils peuvent être toxiques à partir d'une certaine concentration. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur deux effets néfastes des cryoprotecteurs :

- les **effets sur le génome** ;
- les **effets cliniques**.

3.1.1. Effets sur le génome

Depuis plusieurs années, les chercheurs s'intéressent aux **effets à long terme** de la cryoconservation et plus particulièrement des cryoprotecteurs sur les cellules de reproduction et les PSC. La structure de l'ADN est connue pour être stable. Cependant, il a été mis en évidence que des changements constants pouvaient avoir lieu et que la stabilité de l'ADN était limitée [59]. Cette facilité de modifications pose ainsi la question : est-ce que la cryoconservation et plus particulièrement les cryoprotecteurs ont un effet sur la structure de l'ADN des cellules préservées ?

Aye et al. [60] ont étudié la **génotoxicité** du DMSO, de l'EG et le PEG sur la vitrification d'ovocytes (utilisation de cryoprotecteurs à haute concentration,

supérieure à 40 % v/v). Ils ont pu mettre en évidence que l'EG et le PEG ont une tendance à **induire des dommages génétiques** *in vitro* sur les cellules. A l'inverse, la génotoxicité du DMSO n'a pas été observée. Cependant, Nelson et Johnson [61] ont montré que le DMSO provoquait des changements de conformation de l'ADN et de la chromatine, ainsi que des **changements de méthylation de l'ADN**. L'EG semble induire la conversion de la chromatine de la forme B à la forme C [61] ainsi qu'une augmentation de l'hyperchromicité et l'ellipticité [62]. Le PEG, quant à lui, entraîne une **augmentation de la méthylation de l'ADN** lors de la vitrification d'ovocytes [63]. Le glycérol est connu pour être le cryoprotecteur le moins toxique mais une étude a mis en évidence des changements de conformation de l'ADN, une déstabilisation et la diminution de la température de fusion [64].

Par ailleurs, Kopeika et al. [44] soulèvent la question de l'absence d'études à long terme de l'effet de la cryoconservation sur le génome des embryons et de sperme humain. Les rares publications décrivent souvent des études rétrospectives ou de « *case reports* », ne présentant pas les différents protocoles de congélation utilisés. Par ailleurs, la caractéristique principale évaluée dans ces études est la réussite de conception avec le taux d'enfant vivant. Chez l'Homme, aucune étude ne porte sur d'éventuelles anomalies génétiques chez des enfants nés d'ICSI ou d'embryons/sperme congelés. Chez la souris, une étude [65] a mis en évidence des anomalies épigénétiques et comportementales chez des souris adultes issues d'ICSI avec du sperme frais ou congelé sans cryoprotecteur. **Des différences d'expression de gènes et de méthylations** ont également été montrées dans des embryons congelés [66–70] ou seulement manipulés [71]. Ces méthylations peuvent induire des troubles de l'empreinte génétique à l'origine de syndrome tel que le syndrome de Beckwith-Wiedemann ou le syndrome d'Angelman [72]. Les causes de ces altérations sont difficiles à étudier car les techniques de biotechnologies de la reproduction comportent de nombreuses étapes.

3.1.2. Effets cliniques

Au-delà des effets toxiques de certains cryoprotecteurs, le DMSO souvent utilisé pour la préservation de sang ou de cellules souches adultes, peut induire **des effets secondaires**. En effet, dans le cadre de transfusion de cellules hématopoïétiques ou de cellules souches adultes, la présence de DMSO entraîne

des **maux de têtes**, des **nausées** ou des **diarrhées** chez les patients [73–76]. Ces effets secondaires peuvent être plus graves. Des études portant sur des transfusions de cellules de moelle osseuse ou de PBPC (Peripheral Blood Progenitor Cells ; cellules souches hématopoïétiques circulantes) ont mis en évidence des **arrêts respiratoires et/ou cardiaques**, mettant en doute l'utilisation du DMSO [77,78]. Pour éviter ces effets secondaires, certains laboratoires éliminent le DMSO en rinçant les cellules avant la transfusion pour diminuer la toxicité du DMSO. Cependant, la méthode la plus efficace consiste à diminuer la concentration en DMSO lors de la congélation de cellules prévues pour être transfusées [79].

Le glycérol quoique moins toxique peut provoquer, à plus haute concentration, des effets indésirables comparables à ceux du DMSO, tels que des nausées, des vomissements et des maux de têtes [80,81].

3.1.3. Substituants possibles aux cryoprotecteurs actuels

Les substituants possibles aux cryoprotecteurs habituellement utilisés peuvent être des **cryoprotecteurs non pénétrants** tels que le tréhalose qui est un sucre non toxique [38–41]. Des **polymères** tels que le dextran, le chitosane ou les hydrogels montrent des **capacités de substitution prometteuses**. Deux études récentes sur des cellules souches ou des fibroblastes ont montré la possibilité de s'affranchir des cryoprotecteurs en utilisant des hydrogels ou du dextran. L'équipe de Anne Pellé (Université Paris 13) aurait réussi à congeler des fibroblastes (Balb/c 3T3) en absence de cryoprotecteurs grâce à l'action d'hydrogel (communication personnelle, Pereira et al., 2018). De même, des cellules hématopoïétiques congelées avec du pentaisomaltose (une sous-fraction du Dextran I) ont montré les mêmes capacités fonctionnelles (après greffe sur souris immunodéficientes) que des cellules congelées dans le cryoprotecteur traditionnel, le DMSO [82].

3.2. Risques liés à l'utilisation des produits d'origine animale

L'utilisation de **POA** est paradoxale comme pour les cryoprotecteurs. En effet, ces molécules permettent **d'améliorer la viabilité post-décongélation**, mais elles présentent des risques cette fois-ci **sanitaires**, en plus de la **variabilité** qu'elles peuvent induire. Par ailleurs, dans un contexte sociétal sensibilisé au bien-être animal et au respect des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement), continuer à

utiliser des produits d'origine animale (notamment du sérum obtenu par ponction intracardiaque chez le fœtus) sera à proscrire dans les années à venir.

3.2.1. Risques sanitaires

Malgré les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) concernant les procédures de collecte, de conservation et de transfert du sperme et des embryons [83], il existe un réel **risque de contamination** des ressources biologiques. Ce risque se matérialise soit **par contact direct avec l'azote** (cas des échantillons qui doivent être vitrifiés en contact avec l'azote), soit par les composants des milieux de congélation (**POA**).

Certaines bactéries et certains virus sont capables de résister à des températures jusqu'à -196°C [84,85]. En 1995, une étude de cas a montré que des patients ont été atteints d'hépatite B, suite à des greffes de moelle osseuse contaminée par une poche de sang qui avait fui [86]. Plusieurs études montrent que l'azote peut contenir des virus non enveloppés à l'état actif [87], ou des microorganismes [88,89]. Bielanski et al. [89] mettent en effet en évidence la présence de 32 bactéries et un champignon dans les échantillons (semences ou embryons) ou dans l'azote liquide. Une revue [90] fait l'état de plusieurs études observant des pathogènes présents dans du sperme humain et résistants à la congélation. C'est le cas de plusieurs bactéries [91,92], du Chlamydia [93,94] et de levures [91]. D'autres études sur le sperme de taureau ont également montré la présence de bactéries dans la semence congelée [95,96], ainsi que la résistance de bactéries aux antibiotiques présents dans les milieux de congélation [97]. En effet, ils ont observé que la tylosine, la lyncomycine, la pénicilline et la streptomycine avaient une faible efficacité (90 % de résistance observée) sur les 24 types de bactéries identifiées dans les semences.

Afin de diminuer les risques, il est ainsi conseillé d'utiliser des paillettes fermées par soudure (utilisées dans les sérothèques humaines), plutôt que par des poudres de scellement. Par ailleurs, Clarke [98] a recommandé de conserver les échantillons dans les vapeurs d'azote plutôt que dans l'azote liquide, pour diminuer les risques de contamination par des maladies transmissibles. Au-delà des précautions à prendre pour le matériel et les procédures de collecte et de transfert, c'est également lors de

l'utilisation de composants d'origine animale dans les milieux de conservation, que des contaminations peuvent avoir lieu.

Pour la congélation des PSC, comme pour les embryons, **l'albumine de sérum bovin** (*Bovine Serum Albumin* – BSA), le **sérum de veau foetal** aussi appelé sérum foetal bovin (*Fœtal Bovin Serum* – FBS aussi appelé *Fœtal Calf Serum* – FCS) ou **l'albumine de sérum humain** (*Human Serum Albumin* – HSA) sont des composants très utilisés pour la culture cellulaire ainsi que pour la congélation [22,23]. Ces produits peuvent être contaminés par divers pathogènes tels que des virus, des levures et même des prions [99]. Il est donc conseillé d'utiliser des sérums ayant été irradiés avec des rayons gamma [100]. Cependant, cette irradiation ne permet pas d'éliminer tous les pathogènes [101,102].

Bousseau et al. [103] ont pu mettre en évidence le risque de contamination via le **jaune d'œuf** et le **lait**. En effet, grâce à une analyse quantitative et une analyse qualitative, ils ont observé une contamination par des mycoplasmes et des bactéries dans deux dilueurs contenant du jaune d'œuf (Triladyl®, Minitüb, Allemagne) ou du lait et du jaune d'œuf (Laiciphos, IMV Technologies, France). À l'inverse, une absence totale de contamination était observée pour le milieu avec des lécithines de soja. Par ailleurs, de nos jours, la peur d'introduire des maladies exotiques du fait des échanges commerciaux internationaux, ou de l'utilisation de produits issus de l'œuf ou du lait notamment, est omniprésente.

Ces produits, même s'ils sont commercialisés pour la plupart avec la mention « *specific pathogen free* » peuvent présenter un **statut sanitaire variable** ainsi qu'une composition ne permettant pas d'assurer la **reproductibilité des résultats**.

3.2.2. Variabilité des produits

En plus du risque sanitaire, les POA tendent à être remplacés à cause de la grande **variabilité de leur composition**.

Kim et al. [104] montre en effet que selon les lots de FBS utilisés, la croissance des cellules souches mésenchymateuses (MSC) peut être inhibée ou au contraire stimulée. Ces variabilités sont le plus souvent liées aux **facteurs de croissance** présents dans les **sérums**. Les laboratoires sont souvent habitués à cette variabilité et ont l'habitude de vérifier les lots de sérum avant d'en acheter un en particulier pour

des études à long terme et ce afin d'éviter les variations observées entre les différentes expérimentations. Bruyère et al. [105,106] ont montré les variations existantes entre différents lots de FBS et de BSA par une approche thermodynamique. En effet, à l'aide de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC), ils ont pu observer que la température de fin de fusion ne présentait pas de grande variabilité pour des solutions contenant de la BSA et du FBS comparé à une solution contenant du CRYO3. Par contre, la variation d'enthalpie de cristallisation a montré une forte variabilité pour la solution contenant de la BSA comparée à celles comportant du FBS ou du CRYO3 [105]. Une seconde étude [106] a permis de comparer plusieurs lots de FBS. Elle est en adéquation avec les résultats de Kim et al. [104] qui montrent que la température de fin de fusion et la variation d'enthalpie de cristallisation varient de manière importante entre les différents lots et au sein du même lot et ce avec des valeurs aberrantes. Le **FBS** a donc un **impact sur la façon dont la solution va cristalliser**.

Le **jaune d'œuf** et le **lait** sont des composants de moins en moins utilisés pour la cryoconservation des spermatozoïdes pour de multiples raisons. Il est évident que les jaunes d'œuf de poules élevées en plein air ou élevées en batterie ne présenteront **pas la même composition biochimique**. De même, le **type de lait** (demi-écrémé ou entier par exemple) et sa provenance peuvent faire varier les résultats post-décongélation. Des auteurs ont également étudié l'effet de jaunes d'œufs provenant de poules, de dindes, de canards ou encore de pigeons sur les semences bovine et ovine [107–109]. Toutes les études ont pu montrer des différences significatives pour les taux de viabilité après décongélation. Ces produits ont une composition biochimique variable, ce qui rend les résultats de cryoconservation de semence variables, et cela en plus des variabilités déjà existantes et liées à l'individu, à l'éjaculat, à l'environnement, etc. De plus, la présence de jaune d'œuf et/ou de lait rend **difficile l'évaluation de la semence**, notamment sa standardisation, à cause de la présence de granules lipidiques ou de caséines de lait [110]. Cette difficulté de visibilité des spermatozoïdes est due à la viscosité de ces produits et la présence de débris liés aux protéines du jaune d'œuf. Enfin, les interactions entre les différents composants et l'impact sur la semence sont encore mal connues et difficilement évaluables. Ainsi, certaines études montrent qu'une **altération**

fonctionnelle ou protéomique du spermatozoïde peut être engendrée par la présence de POA dans les milieux de congélation [111,112].

Ce sont pour ces différentes raisons que depuis déjà plus de 20 ans, les scientifiques cherchent à remplacer les POA dans les milieux de congélation, sans parvenir à les substituer de façon efficace.

3.2.3. Substituants possibles aux produits d'origine animale

Il existe aujourd'hui des substituants intéressants et prometteurs pour remplacer le jaune d'œuf ou le sérum pour la congélation des spermatozoïdes et des PSC. Ce sont : (i) soit des macromolécules à haut poids moléculaire pour remplacer les sérums, (ii) soit des phospholipides d'origine végétale (lécithine de soja) ou synthétique (liposomes) pour remplacer le jaune d'œuf et/ou le lait. Ces différents substituants seront décrits dans les parties décrivant respectivement les deux types cellulaires étudiés.

Le **STEMALPHA.CRYO3®** (Référence 5617, Stem Alpha, France), que l'on appellera **CRYO3** tout au long de l'étude est un milieu de préservation synthétique, chimiquement défini. Ce milieu sera le principal composant testé dans les solutions de congélation de l'étude expérimentale de cette thèse. Ce produit est dénué de sérum, de protéines ou de dextran. Il est produit selon les bonnes pratiques de fabrication (cGMP-annexe1). CRYO3 est composé d'acide hyaluronique synthétique de haut poids moléculaire ($> 10^6$ D), de glucose, de carbohydrates, d'acides aminés, de sels minéraux, de vitamines, d'esters d'acides gras et de tampons. Dans le cadre d'applications cliniques humaines, ce produit a été initialement breveté pour remplacer les sérums dans les milieux de congélation et de préservation de cellules hématopoïétiques [113–116]. Récemment, notre équipe a démontré l'intérêt d'utiliser le CRYO3 pour la congélation d'embryons de lapine [106] et de vache [105]. En effet, aucune différence significative n'a été observée entre le CRYO3 et le FBS pour le taux de survie embryonnaire *in vitro* chez le lapin. Ce taux était même meilleur avec le CRYO3 pour les embryons bovins. Par ailleurs, après transfert embryonnaire, nous avons pu mettre en évidence une supériorité du CRYO3 par rapport au FBS pour la viabilité des embryons *in vivo* chez la lapine.

En se basant sur la qualité de fabrication du CRYO3 et les résultats prometteurs sur les embryons, il nous est apparu intéressant de savoir si ce produit pouvait également être un substituant aux sérums pour les PSC et au jaune d'œuf ou au lait pour les spermatozoïdes.

En résumé, malgré des études montrant un risque de génotoxicité et des effets secondaires connus de certains cryoprotecteurs, les laboratoires continuent d'utiliser les cryoprotecteurs dans leurs protocoles de congélation. De même, les laboratoires de production de semence en France préfèrent utiliser des milieux contenant du jaune d'œuf, plutôt que des liposomes (Communication personnelle, Auriva-Elevage et IMV Technologies, 2018). La maîtrise totale du milieu physico-chimique des solutions de congélation est indispensable pour la reproductibilité des protocoles. Dans notre étude expérimentale, nous avons choisi **d'utiliser le CRYO3** pour sa stabilité physico-chimique, sa garantie sanitaire et son efficacité à remplacer les sérums dans la conservation des cellules hématopoïétiques et des embryons.

4. La calorimétrie différentielle à balayage

Au-delà de l'approche biochimique et biologique, l'approche physique dans la recherche en cryobiologie est devenue essentielle afin de caractériser plus précisément les solutions cryoprotectrices. Développée dans les années 60, la calorimétrie différentielle à balayage (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC) permet de mesurer les propriétés thermodynamiques de transitions, notamment les transitions thermiques au sein de macromolécules (lipides, protéines, liposomes) [117–119]. En cryobiologie, cet outil permet notamment de caractériser des solutions cryoprotectrices [120], de déterminer les cinétiques de refroidissement optimales [121] et d'étudier la formation de la glace intracellulaire, en étudiant les transitions de phase à basse température [122].

Dans cette partie, nous aborderons rapidement le principe de la calorimétrie à balayage ainsi que les paramètres thermodynamiques qui peuvent être étudiés grâce à cet outil. Enfin, nous verrons quelques exemples d'applications de la DSC dans le domaine de la cryobiologie appliquée aux cellules germinales et aux cellules souches pluripotentes.

4.1. Principe de la calorimétrie différentielle à balayage

Il existe deux types de **DSC** : la DSC **par compensation de puissance** et la DSC **par flux de chaleur**. Dans cette partie, nous présenterons le fonctionnement de la DSC par compensation de puissance, car c'est le seul type de DSC adapté aux mesures que nous souhaitons analyser (DSC Diamond, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Ce type de DSC présente en effet l'avantage de mesurer directement la quantité de chaleur échangée, ce qui permet d'obtenir des mesures précises. Le DSC par flux de chaleur, à l'inverse, est moins précis car il est nécessaire de passer par des équations complexes de conversion de transfert de chaleur qui ne sont pas toujours comparables.

4.1.1. Fonctionnement du DSC par compensation de puissance

Le **principe** de la **DSC** par compensation de puissance est de **maintenir**, pendant une descente ou une remontée en température, une **température égale entre deux cellules de mesure** : une cellule contenant l'échantillon et une cellule de référence. Les échanges de chaleur mesurés entre ces deux cellules permettent de définir les transitions de phase. L'échantillon correspond à un faible volume (environ 4 μ l dans le cas de notre étude) de la solution de congélation à tester par exemple.

Le DSC est composé d'une tête de mesure (enceinte adiabatique), elle-même composée de deux fours contenant chacun l'échantillon et la référence (Figure 7, b). Cette tête de mesure est placée dans une enceinte refroidie en permanence par de l'azote liquide (Figure 7, a). De l'hélium gazeux, entourant les fours, va assurer une bonne homogénéisation du refroidissement de ces derniers (Figure 8). La DSC – Diamond permet de travailler à des cinétiques comprises entre 0,1°C/min et 300°C/min.

Un thermocouple (capteur de température) et une résistance de chauffe sont placés sous chaque four afin d'adapter la température des fours de manière individuelle. Comme dit précédemment, le but de ce type de DSC est la conservation d'une même température entre les deux fours, **quelles que soient les transitions de phase**. Ainsi, quand une transition de phase survient au sein de l'échantillon, les résistances vont « compenser » et fournir des puissances différentes afin de conserver une même température entre les deux fours [123].

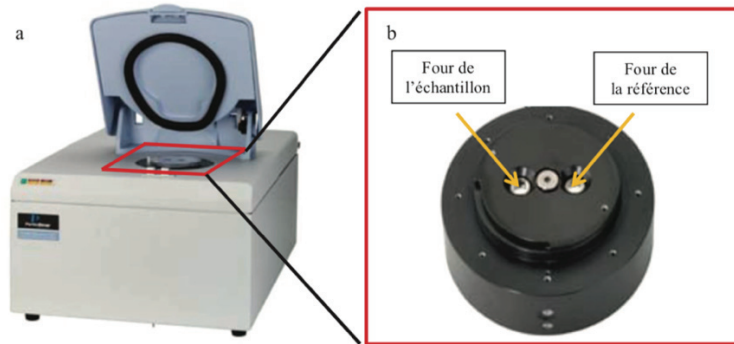


Figure 7. Photo du DSC - Diamond (a) et de la tête de mesure (b) (Manuel d'utilisation du DSC Diamond).

C'est cette **différence de puissance** qui fait la particularité des DSC par compensation de puissance et qui permet de **définir les transitions de phase**. En effet, l'échantillon subissant une transition de phase va dégager ou absorber de l'énergie. Cela va être compensé par un ajout ou une soustraction d'une quantité d'énergie équivalente dans la résistance de chauffe placée sous le four de l'échantillon.

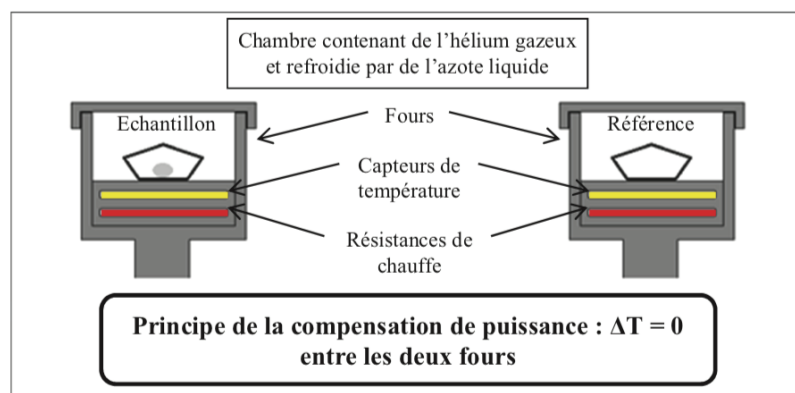


Figure 8. Schéma de la tête de mesure [5].

L'appareil permet de produire un **thermogramme** et d'obtenir différentes **grandeurs thermodynamiques**. La différence de puissance ou flux de Chaleur, exprimée en milliWatt, en fonction de la température est matérialisée sur le thermogramme de la figure 9.

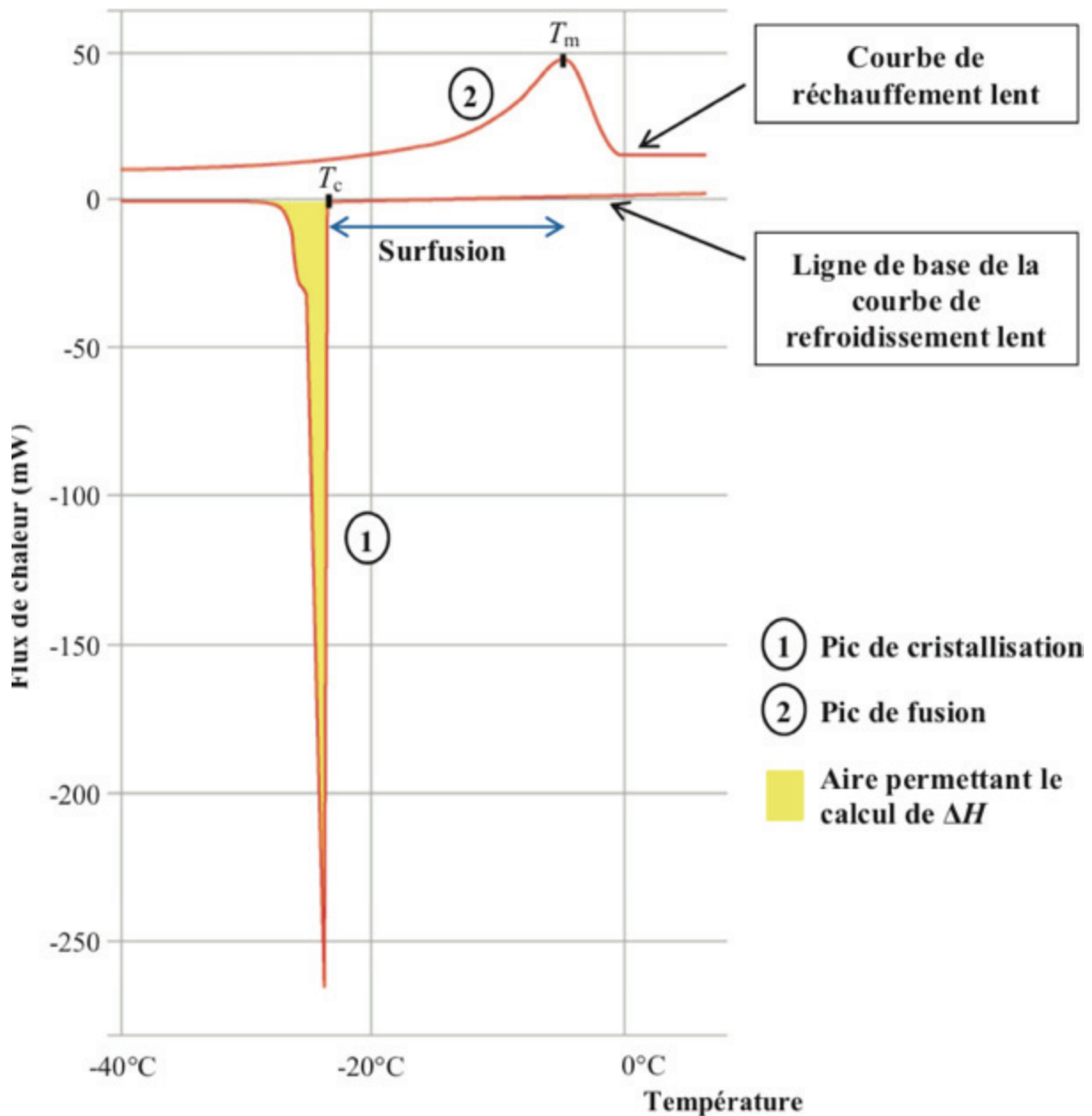


Figure 9. Exemple d'analyse d'un thermogramme [5].

Au début de la descente en température, l'échantillon reste stable et ne subit pas de transition de phase : les deux courbes représentant les deux cellules (échantillon et référence) se superposent et sont égales à 0 (car la différence de puissance est nulle). C'est ce qu'on appelle la ligne de base. Dans notre cas, les courbes ne se superposent pas tout à fait car il y a toujours des variations légères entre les deux fours. Quand l'échantillon subit une transition de phase, il va libérer (ou absorber) de la chaleur dans le cas d'une cristallisation (ou d'une fusion). Les résistances vont alors compenser et une différence de puissance pourra être observée sur le diagramme par un pic. Lorsque l'échantillon est refroidi, il se forme une **réaction exothermique** (libération d'énergie – **cristallisation**). La résistance sous le four de l'échantillon va alors diminuer : la **différence** est donc **négative** et le pic est dirigé vers le bas. À l'inverse, quand l'échantillon est réchauffé, nous pouvons observer une **réaction endothermique** (absorption d'énergie – **fusion de la glace**). La résistance sous le four de l'échantillon augmente : la **différence** est **positive** et le pic est dirigé vers le haut. Notons que les réactions ne sont pas isothermes ; en effet, la cristallisation survient plus brutalement que la fusion, d'où un pic plus étroit.

4.1.2. Paramètres thermodynamiques étudiés

Au laboratoire, nous étudions trois principaux paramètres (Figure 9) :

- la **température de cristallisation** (T_c) :

T_c est rarement utilisée pour comparer différentes solutions de congélation car c'est une mesure **très variable et dépendante des expérimentations**. En effet, comme vu précédemment, la cristallisation dépend des sites de nucléation, pouvant être induit par des impuretés. La composition des solutions de congélation pouvant être très complexe, il est difficile de comparer des T_c entre elles.

- la **variation d'enthalpie de cristallisation** (ΔH), proportionnelle à la quantité de glace cristallisée :

ΔH est une mesure exprimée en Joules par grammes et est caractérisée par **l'aire entre la courbe du pic et la ligne de base**. Elle peut être calculée lors d'un refroidissement lent. Elle représente la **quantité d'énergie libérée**, c'est-à-dire la **quantité de glace formée**. Cette grandeur thermodynamique permet de calculer la **chaleur maximale de cristallisation** Q_{max} suivant l'équation ci-dessous :

$$Q_{max} (\%) = \Delta H / \Delta H_{eau} \times 100$$

Cette chaleur maximale de cristallisation Q_{max} correspond approximativement à la quantité de glace cristallisée au sein de la solution, si et seulement si de la glace se forme (cas d'un refroidissement lent). Cette valeur varie en fonction des composants de la solution de congélation et est donc une grandeur comparable.

- la **température de fin de fusion** (T_m), c'est-à-dire au moment de la fusion du dernier cristal de glace :

T_m peut être égale à la température de congélation à l'équilibre quand il n'y a pas de phénomène de surfusion, ce qui est très rare. En effet, la plupart des solutions de congélation ne sont pas à l'équilibre thermodynamique, c'est-à-dire que la réaction n'est pas réversible : la glace se forme à une température plus basse que la température à l'équilibre [124]. On dit alors que T_m est la température en dessous de laquelle la cristallisation peut survenir à l'équilibre. La présence de cryoprotecteur permet d'abaisser cette température. T_m , comme pour ΔH et Q_{max} , **varie en fonction**

de la composition des solutions et est donc une grandeur comparable et intéressante à étudier.

4.2. Applications de la calorimétrie différentielle à balayage en cryobiologie

La DSC présente de nombreuses applications pratiques en cryobiologie, notamment l'étude des cristallisations intra- et extracellulaire pour des cellules et des organismes, ou la compréhension des mécanismes de résistance naturelle au froid de certains animaux. Ici, nous nous concentrerons sur la caractérisation des solutions et la prédiction de cinétiques optimales grâce à la DSC.

4.2.1. Caractérisation de solutions

La DSC permet de caractériser des solutions et d'étudier leur comportement thermodynamique. Peu d'études néanmoins font appel à cette technique pour caractériser des solutions de congélation spécifiques à un type cellulaire [105,106,120,125,126]. Dans notre équipe, des solutions de congélation de sperme de lapin et d'embryons de vache et de lapine ont ainsi été analysées [105,106,120]. Salvetti et al. [120] ont ainsi observé que la présence d'antibiotique dans les solutions de congélation avait un effet sur Q_{\max} et T_c . Ils ont aussi remarqué que les antibiotiques (pénicilline G et streptomycine) favorisaient une cristallisation dans deux des trois solutions de congélation testées. En effet, une plus grande quantité de glace, à une température plus élevée, a été observée dans les solutions avec antibiotiques comparées à celles sans antibiotiques. En étudiant des solutions simples (eau + cryoprotecteur, avec ou sans antibiotiques), la tendance s'inverse, prouvant que les solutions de congélation sont très complexes. Bruyère et al. [105,106] ont quant à eux observé lors d'études de T_m et de ΔH , que des solutions contenant du FBS ou de la BSA étaient très variables au niveau thermodynamique. Globalement, les propriétés thermodynamiques des solutions étaient similaires, sauf pour une solution de congélation d'embryons bovins composée de BSA qui présentait un ΔH plus faible que les autres solutions contenant du CRYO3 et du FBS. Par ailleurs, dans l'une des études, plusieurs lots de FBS ont montré une grande variabilité pour les valeurs de T_m et de ΔH .

D'autres auteurs ont inclus des données de DSC dans leurs études de congélation de cellules souches pluripotentes afin de savoir notamment **si la vitrification avait bien eu lieu**. Ces auteurs s'intéressaient principalement à la forme des courbes des thermogrammes pour vérifier l'existence possible d'une vitrification avec les solutions testées. Nishigaki et al. [127] ont ainsi montré qu'une cinétique de 150°C/min permet la vitrification des solutions utilisées : les thermogrammes n'indiquaient aucune cristallisation (aucun pic n'est dirigé vers le bas) sauf pour une solution. De la même façon, Ota et al. [128] ont observé qu'avec les solutions testées, il existait bien une phase vitreuse aux environs de -120°C quand la cinétique de refroidissement était de 30°C/min. Cependant, à l'aide de thermocouples, ils ont montré que la cinétique de refroidissement calculée était de 270°C/min et celle du réchauffement était de 2500°C/min. Ils ont ainsi conclu à une vitrification de leurs cellules. Cependant, ces courbes correspondaient à une vitrification d'un volume faible (10 µl déposé dans le four de la DSC [128]), donc difficilement comparable à une vitrification dans un cryotube avec un volume de 200 µl.

La DSC devient donc un outil intéressant pour la caractérisation de solutions de congélation de cellules biologiques, même si elle est encore peu utilisée dans les publications scientifiques en biologie.

4.2.2. Prédiction de cinétiques optimales

Il est intéressant de noter un ensemble de publications d'une équipe américaine sur la prédiction de cinétiques de refroidissement optimales pour la congélation de différents types cellulaires provenant de différentes espèces grâce à l'utilisation de la DSC.

Le **principe de la modélisation d'une cinétique optimale** est **l'estimation** de la **perméabilité membranaire** et du **transport de l'eau**, ainsi que du **risque de formation de glace intracellulaire** [121]. En effet, comme vu précédemment, lors d'un refroidissement lent, la cellule a le temps de se déshydrater suffisamment et le *seeding* permet de finaliser cette déshydratation par la sortie d'eau vers le milieu extracellulaire. Mais si le refroidissement est trop rapide, la déshydratation de la cellule n'est pas suffisante et entraîne le risque de formation de cristaux intracellulaires. Par conséquent, l'équipe américaine définit **la vitesse optimale**

comme la vitesse en dessous de laquelle il n'y a pas de risque de formation de cristaux de glace intracellulaires [129].

La possibilité d'objectiver l'interaction entre le milieu de congélation et la cinétique de refroidissement est intéressante. Par exemple pour la semence équine, cette même équipe a pu déterminer la meilleure cinétique de refroidissement pour chaque milieu étudié (environ 30°C/min et 60°C/min pour un milieu commercial et un milieu à base d'EDTA et de lactose, respectivement) [121]. Grâce à ces prédictions, l'absence de formation de cristaux de glace intracellulaires est supposée. Par ailleurs, les viabilités associées à des cinétiques comprises entre 20 et 80°C/min sont comme attendu constantes. Ces résultats empiriques sont donc en adéquation avec leur prédiction. Cette méthode de modélisation a été également utilisée pour le sperme humain [130], murin [129], de rhesus [131], canin [132], porc [133] et de différents poissons [134–137]. Ce type d'analyse a également été utilisé sur des tissus ovariens de mammifères [138]. Cette méthode est intéressante pour rendre la cryoconservation de ressources biologiques moins variable et plus standardisée.

En résumé, la DSC en permettant la détermination de T_m et ΔH , s'avère essentielle pour la caractérisation des solutions de congélation et la prédiction des cinétiques optimales dans les projets de conservation de cellule.

En conclusion, les cellules (spermatozoïdes ou cellules souches pluripotentes), subissent **d'importants dommages** durant une procédure de congélation. Ces dommages peuvent être limités, d'une part grâce à **l'ajout de cryoprotecteurs** pénétrants et/ou non pénétrants, et d'autre part grâce à un **protocole de refroidissement adéquat** (lent, rapide ou vitrification). Aujourd'hui, les **altérations que l'utilisation des cryoprotecteurs** à forte concentration peut entraîner au niveau moléculaire (altérations métaboliques, épigénétiques, etc.) font également débat. Enfin, les **produits d'origine animale**, trop souvent utilisés dans certains laboratoires et coopératives agricoles, devraient être remplacés par des produits synthétiques, afin de **limiter les risques de contamination** et la **variabilité** liée à la nature de ces produits. Cela permettrait également **d'anticiper une évolution de la réglementation des biobanques**. Afin d'améliorer ces protocoles de congélation, une **approche physique**, grâce à la DSC, est complémentaire à l'approche biologique (viabilité, fonctionnalité des cellules).

Dans les deux prochains chapitres, nous présenterons l'approche biologique en cryoconservation, pour les deux types cellulaires étudiés ici : les spermatozoïdes et les cellules souches pluripotentes.

Les spermatozoïdes

1. Caractéristiques fonctionnelles des spermatozoïdes

La survie et le fonctionnement d'un spermatozoïde repose sur l'**intégrité physique et/ou fonctionnelle** d'un certain nombre d'éléments :

- des **mitochondries fonctionnelles** et un **flagelle intact** permettant sa mobilité ;
- un **acrosome intact** permettant la capacitation et la réaction acrosomique de se produire au bon moment ;
- des **récepteurs**, essentiels pour la fixation du spermatozoïde à la zone pellucide de l'ovocyte;
- une **membrane plasmique intacte** pour la fusion avec celle de l'ovocyte ;
- un **noyau indemne** pour permettre un développement embryonnaire normal.

Ces composants vont donc subir des changements dès la sortie du sperme de l'appareil génital mâle jusqu'à l'entrée dans l'appareil génital femelle. Il est donc important d'évaluer tous ces composants pour le bon fonctionnement du métabolisme du spermatozoïde avant insémination ou avant congélation. **L'évaluation de la semence et sa standardisation** sont primordiales tant pour les centres de production de semence, que pour les cryobanques. Les échantillons de semence doivent faire l'objet d'une évaluation avant et après conservation afin de stocker les ressources de qualité. Pour permettre l'évaluation objective de certains paramètres de qualité des spermatozoïdes, des outils comme la cytométrie en flux et l'analyse automatisée du sperme (*Computer-Assisted Sperm Analysis – CASA*) sont aujourd'hui utilisés en routine. La semence est également évaluée pour répondre aux nouvelles normes et certifications de qualité imposées dans les laboratoires. Ce chapitre permet de faire la liste des différentes méthodes d'évaluation des principales caractéristiques fonctionnelles du spermatozoïde.

1.1. Mobilité des spermatozoïdes

Dans tous les laboratoires qui évaluent la semence, la **mobilité** est le premier paramètre estimé au-delà du volume et de la couleur de l'éjaculat. La mobilité peut être évaluée subjectivement **sous microscope**, ou grâce au **système CASA** qui permet **d'automatiser le calcul des trajectoires des spermatozoïdes** et de leur **vitesse**.

1.1.1. Mobilité subjective

La mesure de la mobilité, faite au microscope sur platine chauffée à 37°C, permet d'avoir une idée de la capacité de la semence à remonter le long du tractus génital de la femelle jusqu'au lieu de fécondation. La mobilité massale se distingue de la mobilité individuelle [139]. La **mobilité massale**, mobilité générale de la semence, peut être caractérisée selon l'échelle de Petitjean (1965) [140,141], à partir d'une goutte de semence pure déposée sur lame. Ce sont alors des **vagues plus ou moins rapides** qui vont être observées. La **mobilité individuelle**, à partir d'une goutte de semence diluée sur lame, permet de **discerner différents types de déplacement des spermatozoïdes** selon leur trajectoire et/ou leur rapidité. Celle-ci se note selon l'échelle d'Andrieu (1974) [140]. Ces deux techniques sont encore très utilisées dans les laboratoires comme premier niveau d'évaluation et de sélection d'un éjaculat.

Cet examen n'est pas forcément prédictif de la fertilité du mâle. En effet, des spermatozoïdes mobiles peuvent avoir des membranes lésées ou un métabolisme dysfonctionnel. Cependant, pour la semence de bélier, une étude récente a montré que la mobilité massale permettait de prédire la fertilité des mâles chez le bélier [141]. Bien que l'estimation de la mobilité soit un paramètre robuste pour un même opérateur, cet examen est subjectif et peut varier d'un opérateur à un autre [142,143]. Une **mesure automatisée** permet alors une **standardisation de l'évaluation de la mobilité** du sperme.

1.1.2. Mobilité objective définie par une analyse automatisée

L'analyse **automatisée des mouvements** par le **CASA** correspond à une **analyse assistée par ordinateur de la cinétique des spermatozoïdes**. Ce système permet d'étudier la mobilité, la trajectoire d'une cinquantaine de spermatozoïdes simultanément, la standardisation et l'assurance de distinguer les semences de

qualité destinées au marché des inséminations artificielles. Pour autant, ce système ne peut garantir la prédiction de la fertilité ne serait-ce que pour des raisons liées à des interactions biologiques.

- FONCTIONNEMENT GENERAL D'UN SYSTEME CASA

L'objectif principal de ce système, développé pour la première fois en 1974, est la **mesure objective de la vitesse** et de la **proportion de spermatozoïdes montrant une mobilité progressive**, en éliminant les biais liés aux différents techniciens [144].

Le principe est simple : une caméra est couplée à un microscope. Un ordinateur avec un logiciel spécifique est connecté à la caméra et au microscope pour l'analyse de la semence. La formation d'une image est réalisée en contraste de phase afin de mieux visualiser la tête des spermatozoïdes à partir de laquelle la trajectoire est mesurée. Avant l'analyse, certaines valeurs constantes doivent être entrées dans le logiciel : taille minimum et maximum à prendre en compte, pour éviter de compter des débris comme des spermatozoïdes immobiles. Enfin, le logiciel calcule les coordonnées en X et Y du centre de gravité des spermatozoïdes [142].

- PARAMETRES DE MOBILITE ETUDIES

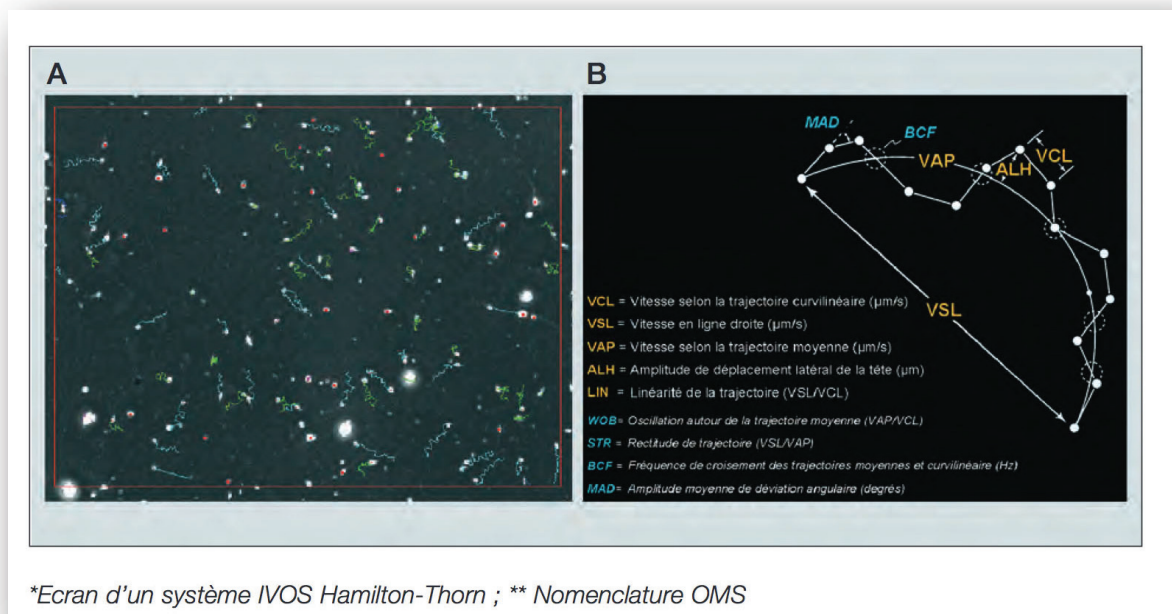


Figure 10. Exemple d'un champ de spermatozoïdes humains pris en photographie par un système CASA (A *) et définition des paramètres de vitesse et de trajectoire étudiés (B **) [142].

Cet analyseur prend en quelques minutes de nombreuses mesures de la trajectoire des spermatozoïdes et de leurs caractéristiques cinématiques. Les caractéristiques principales sont les suivantes (Figure 10) :

- le pourcentage de spermatozoïdes mobiles ;
- le pourcentage de mobilité progressive ;
- la vitesse selon la trajectoire moyenne, exprimée en $\mu\text{m/s}$ (*Average Path Velocity – VAP*) ;
- l'amplitude de déplacements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement, exprimée en μm (*Amplitude of Lateral Heat Displacement – ALH*) ;
- la vitesse moyenne de déplacement linéaire (*Straight-Line Velocity – VSL*), exprimée en $\mu\text{m/s}$;
- la vitesse curviligne (*Curvilinear Velocity – VCL*), qui est la vitesse calculée sur la distance totale parcourue, exprimée en $\mu\text{m/s}$;
- la linéarité de la trajectoire (*Linearity – LIN*) correspondant au rapport VSL/VCL ;
- la fréquence des rythmes de croisement des trajectoires (*Beat Cross Frequency – BCF*), exprimée en Hertz;
- la rectitude de trajectoire (*Straightness – STR*) correspondant au rapport VSL/VAP ;
- l'oscillation autour de la trajectoire moyenne (*Wobble – WOB*) correspondant au rapport VAP/VCL .

Ce puissant outil a un rôle important dans la standardisation de l'évaluation de la qualité de la semence grâce à **l'estimation simultanée de différents paramètres de la mobilité**. De plus, les changements subtils de certains paramètres peuvent être détectés sur le CASA contrairement à l'évaluation traditionnelle subjective au microscope. En effet, il est impossible d'évaluer à l'œil nu de manière quantitative des paramètres tels que des vitesses et des trajectoires [142]. Les biais liés aux évaluations microscopiques manuelles sont alors minimisés avec ce genre de système [145,146]. De plus, cet appareil permet d'évaluer un plus grand nombre de spermatozoïdes et donc de diminuer le risque d'erreur. Enfin, le CASA permet une évaluation objective et une comparaison entre les résultats des différents articles présents dans la littérature.

1.2. Viabilité ou intégrité membranaire

La **viabilité** est l'un des premiers critères qui est utile de caractériser, car elle peut être **directement liée à la fonction de fécondation d'un ovocyte**. La viabilité d'un

spermatozoïde est un terme imprécis car la différence entre une cellule morte et une cellule vivante n'est pas bien déterminée. Cependant, un **spermatozoïde viable** peut être défini comme une cellule avec une membrane plasmique intacte. L'intégrité de la membrane est un facteur important car la membrane joue un grand rôle dans sa capacité à interagir avec l'environnement. Une lésion membranaire entraîne la perte des éléments essentiels au bon fonctionnement des spermatozoïdes [147]. Bien que la membrane plasmique entoure complètement le spermatozoïde, cette membrane est composée de différents compartiments : la membrane externe de l'acrosome, la membrane qui entoure la tête du spermatozoïde et la membrane qui entoure la pièce intermédiaire et le reste du flagelle. Souvent, les tests associés à la viabilité ne ciblent qu'une partie de cette membrane.

Afin d'évaluer l'intégrité membranaire, deux types de tests existent :

- des **tests de coloration** et d'osmolarité sur lames qui sont utilisés depuis plus d'une trentaine d'année car ils sont simples, robustes et peu coûteux ;
- des **sondes de fluorescence** ou marquage cellulaire qui se sont développés depuis quelques années et qui permettent une analyse rapide, précise et objective à l'aide d'un cytomètre en flux.

1.2.1. Tests de coloration et d'osmolarité sur lames

Plusieurs tests simples peuvent être utilisés, c'est le cas des tests de coloration tels que le test d'exclusion au bleu de trypan ou le test de coloration éosine-nigrosine, mais aussi le test hypo-osmotique.

Le **test d'exclusion au bleu de trypan** permet de distinguer les cellules viables en numération cellulaire. Les cellules mortes, n'ayant pas de barrière cytoplasmique active, laissent pénétrer certains types de colorants tels que le bleu de trypan. Les cellules vivantes sont non colorées tandis que les **cellules mortes sont bleues**. Ce test peut donc être utilisé pour mesurer le taux de viabilité des spermatozoïdes dans un éjaculat.

Le **test de coloration éosine-nigrosine** permet de vérifier **l'intégrité de la membrane de la tête des spermatozoïdes**. Les colorants vont pénétrer dans les cellules aux membranes lésées. Un frottis est réalisé après le mélange de la semence diluée dans l'éosine-nigrosine. Le frottis est observé au microscope : les

spermatozoïdes colorés en rose sont comptabilisés parmi les morts tandis que les spermatozoïdes vivants sont blancs [148].

Le **test hypo-osmotique** ou « *hypo-osmotic swelling test* » (HOST), plus communément appelé le test HOS, permet d'évaluer l'**intégrité de la membrane de la pièce principale** [149], en utilisant une solution hypo-osmotique (entre 50 et 150 mOsmol selon les espèces [150]). En effet, les spermatozoïdes, se trouvant dans une solution hypo-osmotique, permettent l'entrée de molécules d'eau à travers leur membrane plasmique afin d'équilibrer leurs concentrations intra- et extracellulaire. Les cellules vont alors accumuler un volume d'eau important et leur membrane va se gonfler. Cela signifie que leur métabolisme fonctionne correctement. C'est d'ailleurs le flagelle qui est le plus sensible à ce phénomène [151]. Les spermatozoïdes présentant des **modifications du flagelle** (enroulés et/ou gonflés) correspondent aux spermatozoïdes « normaux » et donc vivants. Au contraire, les spermatozoïdes ne présentant aucune modification du flagelle sont considérés comme « anormaux » et morts. Ainsi, ce test permet non seulement d'observer une altération de la membrane comme les tests de coloration, mais également le bon fonctionnement du transport de molécules à travers celle-ci et ainsi le bon fonctionnement de l'activité métabolique du spermatozoïde [152].

1.2.2. Fluorescence par cytométrie en flux ou sur lames

1.2.2.1. Intégrité de la membrane plasmique

La combinaison des marqueurs **iodure de propidium (IP)/SYBR-14** (Kit de viabilité du sperme LIVE/DEAD™, Invitrogen™, France) est la plus couramment utilisée pour analyser la viabilité des spermatozoïdes. L'IP (fluorescence rouge) pénètre passivement dans les spermatozoïdes morts, à membranes plasmiques endommagées. Le fluorochrome SYBR-14 est un marqueur perméable traversant toutes les cellules et présentant une fluorescence verte [147,153]. Les cellules vivantes empêchent la pénétration du marqueur IP et présentent donc une fluorescence verte grâce au SYBR-14. Les cellules mortes ont une fluorescence rouge grâce à leur plus grande affinité pour l'IP. Cette double coloration est basée sur des intercallants de l'ADN et marquent donc **uniquement** la tête du spermatozoïde. Ce marquage ne permet donc de détecter une **altération membranaire qu'au niveau de la tête** et non au niveau de la pièce intermédiaire avec

les mitochondries, ou au niveau du flagelle [152]. Par ailleurs, il a l'avantage de permettre la caractérisation d'une troisième population de spermatozoïdes qualifiés de « **moribonds** ». Cette dernière population présente une fluorescence orange résultant d'un double marquage par le IP et le SYBR-14. Les spermatozoïdes moribonds sont donc **considérés** comme **dégradés**. Ce double marquage IP/SYBR-14 permet donc d'améliorer la précision de la population vivante estimée.

1.2.2.2. Perméabilité et stabilité de la membrane

La perméabilité et la stabilité de la membrane plasmique sont deux fonctionnalités très liées qui permettent d'évaluer la capacité du spermatozoïde à subir des changements biophysiques durant la cryoconservation.

Le triple marquage **SNARFTM-1/YO-PROTM-1/Ethidium Homodimer-1** (InvitrogenTM, États-Unis) a été développé pour évaluer la **perméabilité membranaire**. La sonde YO-PROTM-1 permet de détecter la perméabilité membranaire prématurée. Les trois marqueurs sont très facilement distinguables en cytométrie en flux. Par ailleurs, **l'annexine V** permet de suivre **l'externalisation des phosphatidylserine** de la membrane. Ces phosphatidylserines étant localisées en surface interne de la bicouche lipidique de la membrane, leurs externalisations sont détectables de manière plus précoce, comparé à la sonde IP. Cependant, le double marquage **annexine V/IP** surestime la sous-population non marquée à cause de la présence de débris et de particules de jaune d'œuf dans les semences cryoconservés. Dans ce cas-là, le triple marquage SNARFTM-1/YO-PROTM-1/Ethidium Homodimer-1 est préféré pour les semences congelées.

1.3. Intégrité de l'acrosome

L'acrosome, structure protégée par une membrane, entoure la partie antérieure du noyau du spermatozoïde. Son intégrité est essentielle dans la **fonction de fécondation lors de la pénétration de la zone pellucide de l'ovocyte** [154]. Le marqueur le plus couramment utilisé est une lectine végétale appelée **PSA** (*Pisum sativum Agglutinin*) et identifiée par des agents fluorescents. Cette lectine se lie au **mannose** et **galactose** de la **matrice de l'acrosome**. La PSA ne pouvant pénétrer un acrosome à membrane intacte, les spermatozoïdes endommagés vont alors présenter une fluorescence verte.

La **PNA** (*Arachis hypogaea* Agglutinin), sonde d'origine végétale à fonctionnement similaire, se différencie de la PSA car elle est **plus spécifique**. En effet, la PNA ne se fixe qu'aux protéines de la membrane de l'acrosome. Ainsi, lors de l'évaluation de semences décongelées, en présence de jaune d'œuf, la PNA est un marqueur favorisé car **plus fiable** [155].

Une **triple coloration (SYBR-14, PNA couplée à la phycoerythrine et à l'IP)** commence à être utilisée. Cette méthode efficace permet d'évaluer la viabilité combinée à l'intégrité de l'acrosome [156].

1.4. Statut mitochondrial

Les **mitochondries**, localisées dans la **pièce intermédiaire du spermatozoïde** permettent la **production d'énergie sous forme d'ATP** afin de maintenir le métabolisme. Les sondes permettant d'évaluer le statut mitochondrial ont la particularité d'être transportées activement par la chaîne respiratoire des mitochondries. Ainsi, plus la chaîne respiratoire est active, plus la sonde est accumulée dans les mitochondries.

La **Rhodamine 123**, composant cationique, s'accumule dans les mitochondries qui sont alors vertes fluorescentes. Cette sonde a l'inconvénient de ne pas discriminer les différents taux d'activité mitochondriale et donc d'avoir une **faible sensibilité** aux variations du potentiel transmembranaire mitochondrial [157]. En effet, cette sonde différencie seulement les mitochondries actives des mitochondries non actives [152].

Le **5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazolylcarbocyanine iodure (JC-1, Invitrogen™, États-Unis)**, quant à lui, permet la distinction des spermatozoïdes à **différents taux d'activité mitochondriale**. Cette molécule sous forme de monomères traverse la membrane plasmique par voie passive afin d'émettre une fluorescence au sein du cytoplasme : les mitochondries à faibles activités émettent alors une fluorescence verte détectable à 530 nm. Grâce au potentiel transmembranaire, les monomères forment des agrégats qui s'accumulent dans la matrice mitochondriale : les mitochondries hautement fonctionnelles accumulent beaucoup plus de JC-1 et émettent donc une fluorescence orange. Cette sonde n'est pas utilisée en combinaison avec d'autres marqueurs car elle possède deux couleurs de fluorescence (vert et orange) [152,158].

Le statut mitochondrial est un outil d'évaluation intéressant car la mobilité dépend de cette activité selon certaines études. En effet, Martinez-Pastor et al. [159] ont montré que les semences très mobiles correspondaient aux semences qui ont l'activité mitochondriale le plus soutenue. Néanmoins, la corrélation n'était significative que pour les mobilités totales et progressives et non pour les vitesses de déplacement (soit les paramètres tels que VCL, VSL, etc.). Bien que la mobilité reste une caractéristique difficile à interpréter car elle est liée à beaucoup de facteurs, Kasai et al. [160] ont montré une corrélation entre le marquage JC-1 et les paramètres de mobilité de la semence. Le statut mitochondrial est donc un paramètre fiable, rapide à définir et semble être prédictif de la mobilité.

1.5. Évaluation de l'intégrité de la chromatine

Pendant la spermiogénèse, la chromatine va subir une condensation, au cours de laquelle les histones de l'ADN vont être remplacées par des protamines avec la formation de ponts covalents disulfures. Ce phénomène est renforcé lors de la maturation dans l'épididyme. **L'évaluation de l'intégrité de l'ADN** est essentielle pour le bon fonctionnement du **développement embryonnaire**. Bien que l'ADN des spermatozoïdes soit **stable et condensé**, des anomalies de la chromatine peuvent exister. La fragmentation de l'ADN peut être évaluée selon différents marquages.

Un test très couramment utilisé en reproduction assistée et dénommé « **TUNEL** » (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling) permet d'analyser **la rupture des brins contenant des nucléotides modifiés**. Ces nucléotides peuvent être détectés par microscopie à fluorescence [161] ou par cytométrie en flux [162]. Le **Sperm Chromatin Structure Assay® (SCSA®)** est une technique permettant **d'évaluer la stabilité de la chromatine**. La semence est incubée avec de l'acridine orange, après traitement acide [163]. L'ADN simple brin, dénaturé, émet une fluorescence orange et l'ADN double brin présente une fluorescence verte. Cette technique est rapide et facile à mettre en œuvre. Le paramètre évalué par le SCSA® est l'index de fragmentation de l'ADN, c'est à dire le pourcentage de spermatozoïdes susceptibles de subir une dénaturation *in situ*. Ainsi, la réelle proportion de spermatozoïdes présentant un ADN endommagé n'est pas mesurée. Par ailleurs, ce test permet de caractériser une troisième sous-population à forte fluorescence verte. Cette sous-population de spermatozoïde ayant donc un ADN

beaucoup plus condensé est considérée comme étant immature. Pour conclure, ce test est largement utilisé en analyse de la semence animale fraîche ou congelée pour les espèces domestiques [164]. Le **TUNEL** présente l'avantage d'identifier spécifiquement la quantité d'ADN endommagé. Ainsi, c'est un système d'évaluation **plus sensible** que le SCSA® pour prédire l'infertilité [165].

1.6. Évaluation fonctionnelle : capacitation, apoptose et stress oxydatif

1.6.1. Capacitation

La **capacitation** est un phénomène induit dans l'oviducte où les spermatozoïdes subissent des **changements structuraux**, tels qu'une augmentation de la fluidité de la membrane (modifications des lipides), une entrée de calcium dans le flagelle et la région périnucléaire, la phosphorylation des résidus protéiques, etc. Ce phénomène complexe et encore peu défini est donc difficile à analyser [166].

L'un des tests qui permet de distinguer un spermatozoïde capacité, d'un spermatozoïde non-capacité, est le **chlore de tétracycline**, un antibiotique fluorescent. Ce marquage, difficile à utiliser en routine et dont le mécanisme est méconnu, détecte **l'accumulation de Ca²⁺ dans la membrane plasmique** [167,168]. Un état précoce de la capacitation peut être déterminé par certains marqueurs. Le double marquage **Merocyanine 540/YO-PRO-1TM** analyse **différents degrés de troubles des lipides**. La fluorescence de la Merocyanine 540 augmente lorsque les phospholipides de la membrane plasmique deviennent perturbés par la présence du bicarbonate. La **dislocation des phospholipides de la membrane plasmique**, indiquant donc des changements de l'intégrité de la membrane lors de la capacitation, peut être analysée par **l'annexine V**. Néanmoins, il semblerait que l'Annexine V associée à la Merocyanine 540 indiquent une dégénération précoce de la membrane et non le début de la capacitation [167]. Malgré la puissance de la cytométrie en flux, la capacitation reste un élément difficile à étudier car elle est encore inexpliquée.

1.6.2. Apoptose

L'**apoptose**, ou mort programmée de la cellule, provoque la **destruction d'une cellule sans libérer de substances nocives pour les cellules saines**. C'est un **phénomène naturel** qui permet de maintenir la santé d'un organisme grâce à la suppression de cellules vieilles et inutiles.

La cryoconservation peut provoquer des dommages aux spermatozoïdes tels que l'apoptose. Le **changement de perméabilité de la membrane** du spermatozoïde peut être considéré comme l'un des événements majeurs de cette manifestation biologique. Ainsi, des marqueurs peuvent détecter et prévoir une future apoptose même si celle-ci ne se produit pas toujours. La **combinaison Annexine V/PI** permet de distinguer quatre sous-populations de spermatozoïde : les vivants, les vivants avec des signes d'apoptose prématurée, les morts apoptotiques et les cellules nécrotiques tardives. Le **kit APO-BrdU™** (Invitrogen™, États-Unis), utilisé pour le test TUNEL (détection de la fragmentation de l'ADN), permet de manière plus efficace de détecter l'apoptose que la combinaison annexine V/PI même si les cellules nécrotiques ne sont pas distinguées. Ces deux types de marquages se différencient par le stade de l'apoptose qu'ils détectent : le TUNEL analyse des **changements précoces d'apoptose** alors que l'Annexine V/PI caractérisent des **changements plutôt tardifs** [167].

1.6.3. Stress oxydatif et peroxydation des lipides

Le **stress oxydatif** représente la **balance entre la production de dérivés réactifs de l'oxygène** également appelé des **radicaux oxygénés libres** (*reactive oxygen species* – ROS) et celle des antioxydants. Un certain taux de ROS est nécessaire pour l'activation de différents processus tels que la capacitation, la réaction acrosomique ou la fusion oocyte-spermatozoïde. Néanmoins, quand ce taux augmente par rapport à la quantité d'antioxydant, des effets néfastes peuvent atteindre la cellule et donc augmenter le taux d'infertilité [169]. Les ROS peuvent induire le phénomène de peroxydation des lipides [170].

Le **2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA)**, une sonde non spécifique, permet d'évaluer le **taux de ROS intracellulaire** [171,172]. Le **dihydroéthidium** est, quant à lui, une sonde spécifique **détectant l'anion**

superoxyde. Le kit **MitoSOX™** (Invitrogen™, États-Unis) permet de **détecter le superoxyde mitochondrial** dans les populations de spermatozoïdes vivants. Ces sondes analysent le **taux de peroxydation des lipides** mais ne montrent pas l'endroit où ce phénomène se produit. Ainsi des sondes plus spécifiques et plus précises ont été développées : **BODIPY™** (Invitrogen™, États-Unis) et 5-IAF (5-iodoacetamido-fluorescein, Invitrogen™, États-Unis). BODIPY™ a en effet une sensibilité de fluorescence plus importante [173,174].

1.7. Prédiction de la fertilité et évaluation *in vivo*

Ces différents outils permettent de caractériser la semence, cellule par cellule, en un nombre plus ou moins important selon l'outil. Le développement des sondes et l'amélioration des outils d'évaluation de la mobilité permettent d'**assurer une analyse des cellules de plus en plus précise et complète**. Néanmoins, en reproduction animale, il est **difficile de prédire la fertilité** d'un mâle à partir d'un éjaculat. En effet, il existe d'abord une grande disparité au sein même d'un éjaculat [175] et ensuite, la différence inter-éjaculat d'un même mâle peut également être importante. Différentes études portent sur la prédiction de la fertilité utilisant des paramètres de la qualité de la semence évalués *in vitro* chez l'étalon [176], le taureau [177] ou encore le bélier [141,178,179]. Sellem et al. [177] ont réalisé une étude à grande échelle (153 éjaculats de 19 taureaux, analysés au CASA et en cytométrie en flux), permettant de déterminer les paramètres prédictifs de la fertilité. Les modèles mathématiques identifiés combinant les deux outils (CASA et cytométrie en flux), permettent d'expliquer 24 à 40 % de la fertilité, ce qui reste un taux plutôt bas compte-tenu du nombre important de paramètres inclus dans les modèles. Il est donc difficile d'affirmer que les données collectées au CASA, en cytométrie en flux ou autres tests, pourraient prédire la fertilité (taux de gestation, taux de mise bas et taille des portées). En effet, beaucoup de facteurs entrent en jeu lors de l'insémination artificielle. L'environnement du tractus génital de la femelle, dans lequel les spermatozoïdes vont évoluer, peut influencer des événements tels que la capacitation, l'hyper-activation en modifiant l'expression des caractéristiques des spermatozoïdes. Et ces changements ne sont pas uniformes pour un même échantillon de semence. De plus, à ces facteurs, s'ajoutent les facteurs

environnementaux, les conditions d'élevage, la technique d'insémination, la biologie de la femelle, la lignée ou le cheptel.

En ce qui concerne les corrélations entre données en cytométrie en flux et fertilité, peu d'études scientifiques parviennent à démontrer une corrélation de manière répétable et pour toutes les espèces. En effet, O'Meara et al. [180] ont été dans l'incapacité de montrer une relation entre la fertilité des mâles (pourcentage de brebis diagnostiquée gravide) et les tests *in vitro* après décongélation de la semence. Ainsi, la viabilité et le statut acrosomique (IP/SYBR-14/PNA-PE), de même que le statut de capacitation et la stabilité de la membrane plasmique (YO-PRO™-1 et merocyanine 540) n'ont montré aucun lien avec la fertilité. Une autre étude sur la semence ovine [181] n'a montré aucun lien entre les paramètres mesurés en cytométrie (viabilité à l'aide de YO-PRO™-1/IP, potentiel mitochondrial transmembranaire avec JC-1 et la réaction acrosomique grâce à l'IP/FITC-PNA) et la fertilité. Même si certaines études montrent que certains paramètres cytométriques peuvent prédire la fertilité [182,183], la répétabilité et la précision de ces corrélations ne sont pas totalement vérifiées.

Malgré des outils et des tests *in vitro* de plus en plus précis pour évaluer la qualité de la semence, ces derniers ne peuvent pas reproduire les phénomènes complexes qui régissent la biologie d'un organisme vivant. Ainsi **l'évaluation *in vivo*** reste le **meilleur moyen d'observer l'effet d'un traitement sur la fertilité**, même si cela reste coûteux en temps, en matériel biologique et en animaux. Ces tests *in vitro* permettent ainsi d'évaluer le taux de gestation ou le taux de mise bas (pourcentage de femelles diagnostiquées gravides ou qui ont mis bas) et enfin la prolificité (nombre de nouveau-nés par portée) qui est un paramètre particulièrement intéressant pour les éleveurs.

La multiplicité des outils et marqueurs disponibles pour caractériser la fonctionnalité des spermatozoïdes est résumée dans le tableau 2. La **standardisation** des critères d'évaluation de la semence demeure nécessaire pour pouvoir comparer les différents protocoles publiés dans la littérature.

Tableau 2. Résumé des principaux moyens d'évaluation de la qualité d'un éjaculat.

Fonctionnalité	Paramètres étudiés	Techniques d'évaluation
Mobilité	Mouvement de spermatozoïdes (vitesse et trajectoire) et pourcentage de spermatozoïdes mobiles	CASA
Capacité de fécondation	Intégrité de la membrane Intégrité de l'acrosome	IP/SYBR-14 ou HOST PNA ou PSA
Production énergétique	Activité mitochondriale	JC-1 ou Rhodamine 123
Condensation chromatine	Index de fragmentation de l'ADN	SCSA®
Fertilité	Taux de gestation, taux de mise bas, prolificité	IA

2. Spécificités de la congélation des spermatozoïdes

Le spermatozoïde se distingue par sa très haute différenciation et sa structure spécifique, tant au niveau de sa membrane que de son activité métabolique qui est réalisée principalement hors du noyau. Par ailleurs, comparé à d'autres types cellulaires, son état de pré-déshydratation est également singulier.

D'une espèce à l'autre, il existe une grande disparité dans la structure des spermatozoïdes (différence biochimique des membranes avec plus ou moins de cholestérol, différentes morphologies) rendant difficile l'extrapolation des résultats. La résistance à la congélation des spermatozoïdes varie également d'un individu à l'autre, indépendamment de la qualité de l'éjaculat avant congélation [184,185]. Ce phénomène est encore mal connu, mais certaines études ont observé un lien entre l'expression de protéines spécifiques du plasma séminal et la « congélabilité » ainsi que la fertilité [186–188]. Enfin, Au-delà de cette variabilité individuelle, il existe de grandes différences d'un éjaculat à l'autre. Au sein même d'un éjaculat, il a été montré qu'il existe des sous-populations de spermatozoïde montrant des différences

significatives en terme de physiologie ou de comportement, avant et/ou après la congélation [175].

Lors de la congélation, le spermatozoïde va **subir plusieurs changements physiologiques** pouvant amener à son **dysfonctionnement irréversible** lors de sa décongélation (Figure 11). Des stress physiques et chimiques lors de la congélation vont en effet engendrer des altérations au niveau de la surface du spermatozoïde. Ces différents stress et dommages causés peuvent être atténués grâce à des protocoles de refroidissement et des milieux de congélation adaptés.

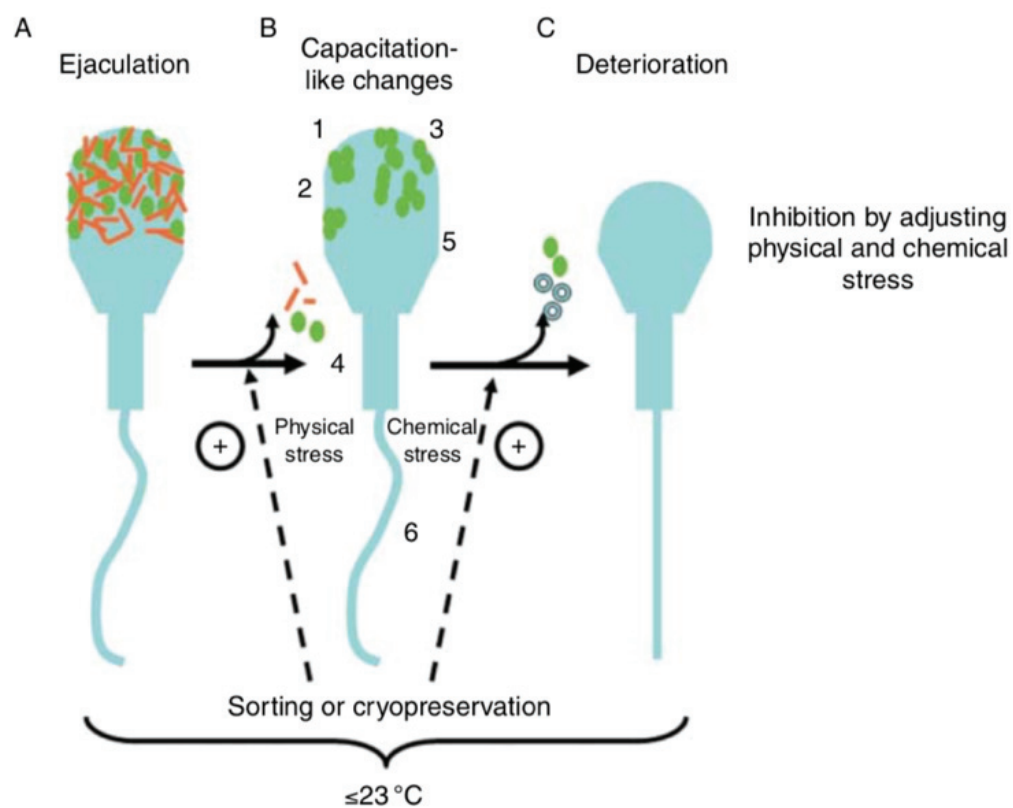


Figure 11. Changements morphologiques du spermatozoïde dus à des stress physiques et/ou chimiques suite à la cryoconservation [154].

Un stress physique va entraîner une capacitation précoce avec un efflux de la membrane des glycoprotéines du plasma séminal (points verts) et de facteurs de décapacitation (points oranges) qui sont utiles à la liaison ovocyte – spermatozoïde (B). Un stress chimique, tel que des changements de température, de tampon et de pression, va engendrer, entre autres, la transition de phase des lipides de la membrane (2), une perte de l'acrosome (3), la production excessive de ROS liée à une peroxydation des lipides (4), des dommages de l'ADN (5), ainsi qu'une phosphorylation de tyrosine qui inhibe l'hyperactivation du flagelle (6). Ces phénomènes ont pour conséquence (C) une détérioration globale du spermatozoïde avec un efflux des protéines et vésicules (points verts et cercles bleus) de la surface de la membrane.

Dans cette partie, dans un premier temps, nous présenterons les principales cinétiques de refroidissement appliquées au sperme. Dans un second temps, nous

décrivons les milieux de congélation couramment utilisés permettant d'éviter au maximum les dommages relatés ci-dessus.

2.1. Cinétiques de refroidissement et de réchauffement

Depuis 1964, les paillettes Cassou (dites « *french straws* » dans la littérature) en plastique de 0,25 ml ou de 0,5 ml (IMV Technologies, L'Aigle, France) sont la référence en matière de contenant pour la congélation de sperme. Le sperme peut être également congelé sous forme de billes de faible volume (*pellets*) ou dans des paillettes ou cryotubes de plus large volume. Les cinétiques de refroidissement et de réchauffement étudiées dans cette partie concernent uniquement des paillettes de 0,25 ml ou 0,5 ml.

2.1.1. Refroidissement

Vishawanath et Shannon [111] estiment que les cinétiques optimales de refroidissement sont comprises entre **80 et 120°C/min**. Mais on constate que les cinétiques rencontrées dans la littérature varient plutôt entre **20 et 100°C/min**, toutes espèces de mammifère confondues. Devireddy et al. [121] confirment ce constat par une viabilité constante obtenue avec des cinétiques comprises entre 20 et 130°C/min pour le sperme équin. La **congélation du sperme** est donc considérée comme relativement **rapide**. Néanmoins, une étape avant la congélation est essentielle pour le sperme : c'est **l'équilibration à 4°C** pendant 45 minutes à 24h. Cette équilibration permet d'une part une **déshydratation suffisante** du spermatozoïde et d'autre part **l'entrée possible des cryoprotecteurs pénétrants** (glycérol le plus souvent chez les mammifères [189]) dans la cellule **de manière lente**. Des études ont même montré qu'une équilibration écourtée n'avait pas forcément un impact sur la qualité de la semence *in vitro*, mais diminuait le taux de mise bas et la prolificité chez le lapin [190].

La technique la moins coûteuse consiste à effectuer une congélation **dans les vapeurs d'azote** à l'aide d'un bac en polystyrène. La cinétique est liée à **la hauteur de l'azote** par rapport aux échantillons. Les paillettes sont placées sur un rack statique dans les vapeurs d'azote (- 70°C à - 150°C) à une hauteur déterminée (de 20 cm à 2 cm) au-dessus de la surface de l'azote liquide. La cinétique de refroidissement dépend alors de la distance de l'azote par rapport aux échantillons.

Cette technique est d'ailleurs privilégiée pour le sperme ovin car les moyens financiers sont plus faibles chez cette espèce par rapport aux bovins ou aux équins [191–194]. Cette technique présente des inconvénients car elle est moins standardisée et contrôlée qu'avec l'utilisation d'un congélateur programmable qui applique toujours la même cinétique. Cependant, elle présente l'avantage d'une constance inter-paillettes car ces dernières sont placées à la même hauteur, contrairement aux congélateurs programmables à larges volumes [111]. En effet, si les paillettes ne sont pas placées à la même hauteur, un gradient de température peut être observé entre les échantillons. Pour contourner cette difficulté, les vapeurs d'azote sont brassées dans les **congélateurs programmables**. La cinétique est donc contrôlée grâce à la **modulation du brassage et la quantité d'azote insufflée** dans l'enceinte. C'est le cas dans de nombreuses études chez le bovin [195–201] et dans de nombreux laboratoires de génétique car c'est une méthode certes coûteuse en équipement, mais qui est standardisable et répétable. Ces congélateurs programmables ont souvent un programme associé à la congélation de sperme. Ce programme applique une cinétique lente d'environ 5°C/min de 4°C jusqu'à la température de nucléation et/ou de cristallisation qui se produit entre -9°C à -12°C, puis une cinétique de 40-50°C/min jusqu'à -140°C. Les paillettes sont ensuite plongées dans l'azote liquide.

2.1.2. Réchauffement

Le réchauffement est une autre étape délicate car les spermatozoïdes traversent une seconde fois la plage de températures néfastes pour leur survie [192]. Un **réchauffement rapide** (et plus rapide que la vitesse de refroidissement) est bien entendu **à privilégier**. La littérature montre des taux de viabilité optimaux quand les paillettes sont plongées dans un bain-marie entre 37°C et 40°C pendant 30 secondes à 1 minute, voire jusqu'à 75°C [192]. Muiño et al. [197] n'ont pas observé de différence significative entre 35°C (40 secondes), 50°C (15 secondes) et 75°C (5 secondes) sur les paramètres *in vitro* de la qualité du sperme de taureau (environ 60 % de spermatozoïdes progressifs). Les cinétiques de réchauffement sont d'ailleurs rarement calculées ou étudiées. Hernández et al. [202] ont identifié des cinétiques de réchauffement de l'ordre de 1200°C/min pour une plongée des paillettes à 37°C pendant 20 secondes et de 1800°C/min pour une plongée à 70°C pendant 8 secondes.

2.2. Milieux couramment utilisés pour la cryoconservation de la semence

L'objectif du milieu de congélation est de **protéger les membranes et les différents éléments qui composent le spermatozoïde** jusqu'à l'insémination artificielle [203]. Le spermatozoïde va subir des changements métaboliques au cours de la congélation et présente certaines particularités face à celle-ci. En effet, chaque composant d'un spermatozoïde (membrane, mitochondries, noyau, etc.) est important pour les phénomènes de la capacitation et de la réaction acrosomique. La capacitation est le premier phénomène indispensable qui permet d'induire la réaction acrosomique et donc la pénétration de l'ovocyte. Elle implique de nombreux changements au niveau moléculaire notamment le changement de la composition des lipides membranaires. La réaction acrosomique correspond à la fusion de la membrane plasmique avec la membrane extérieure de l'acrosome, suivie de l'exposition de la membrane interne de l'acrosome et de ses antigènes. Ainsi, le milieu de congélation doit protéger chacun des composants afin de permettre l'aboutissement de ces phénomènes physiologiques après décongélation dans le tractus génital femelle.

Généralement, les milieux de congélation de la semence contiennent un **tampon** tris pour stabiliser le pH [154], des **sucres** comme source d'énergie (fructose ou glucose), un **cryoprotecteur pénétrant** (glycérol principalement), un **cryoprotecteur non pénétrant** sous forme de sucre (tréhalose, saccharose) ou des produits d'origine animale ou végétale (jaune d'œuf, lait ou lécithine de soja), des sels et des antibiotiques.

Les principaux milieux sur le marché sont commercialisés par les deux leaders internationaux en biotechnologies de la reproduction vétérinaire : IMV Technologies (France) et Minitüb (Allemagne). Ces milieux et leurs compositions sont présentés en Annexe 3. Il existe une réelle dynamique de la part de ces industries à échanger des milieux contenant des POA pour des milieux mieux définis, contenant notamment des lécithines de soja ou des liposomes. Ainsi, les milieux de congélation décrits dans la littérature scientifique font souvent l'objet d'un développement industriel. L'utilisation de produits commerciaux, pour la standardisation de protocoles de cryoconservation, présente deux avantages : la disponibilité et la qualité constante

des produits [204]. Pour ces raisons, les milieux commerciaux font aujourd'hui référence dans la littérature scientifique.

Dans cette partie, vont être détaillés les principaux composants des milieux de congélation de sperme, ainsi que l'ajout de phospholipides indispensable à l'amélioration de la viabilité post-décongélation et l'ajout d'additifs.

2.2.1. Dilution

La dilution de la semence peut être effectuée en une fois ou plusieurs fois à différentes températures (température ambiante, 35°C, ou 4°C). Colas [205] préconise une dilution de la semence en deux fois afin d'ajouter la fraction avec le cryoprotecteur (glycérol, environ 4 – 6 %) à 4°C. Selon ses travaux, la toxicité du cryoprotecteur est diminuée à 4°C. Par ailleurs, l'ajout du milieu hyper-osmotique (avec le cryoprotecteur) en plusieurs étapes permet d'atténuer le stress osmotique que peuvent subir les spermatozoïdes [206]. Dans la plupart des stations génétiques comportant des laboratoires de production de semence, la semence est diluée à 30-35°C après collecte, en une seule fois pour plus de praticité. Il a en effet été mis en évidence qu'il n'y avait pas de différence entre l'ajout de diluant en une fois ou en plusieurs fois, à 4°C ou à 35°C [192].

La concentration en spermatozoïdes varie entre 5 et 100 millions de spermatozoïdes par dose (paillettes de 0,25 ml ou de 0,5 ml). Cette différence est liée à l'espèce. Chez les bovins, la concentration est d'environ 20 millions/paillette de 0,25 ml. En effet, pour cette espèce, la viabilité post-décongélation des spermatozoïdes reste élevée et les techniques d'inséminations transcervicales sont très développées afin d'assurer la diffusion génétique des géniteurs sélectionnés dans les élevages. A l'inverse, chez les ovins, le passage du col de l'utérus est difficile chez la brebis, ce qui oblige à congeler les spermatozoïdes à plus haute concentration, environ 100 millions/paillettes de 0,25 ml.

2.2.2. Les cryoprotecteurs

Le glycérol est l'un des cryoprotecteurs les plus couramment utilisés [111,189,192]. Son utilisation n'est cependant pas universelle car le DMSO est classiquement utilisé pour la congélation de sperme de lapin, par exemple [35]. Pour autant, dans le cadre de notre travail, nous nous focalisons sur les espèces bovine et

ovine. Le glycérol est ajouté à hauteur d'environ 7 % pour les bovins (de 2,5 % à 9 % [111]) et environ 5 % pour les ovins (de 2 % à 6 % [207,208]). En effet, le glycérol à des concentrations plus élevées et selon les espèces, peut être toxique pour la cellule (toxicités chimique et osmotique) [209,210]. Le tréhalose, en complémentarité avec le glycérol, s'est montré efficace pour le sperme de bélier [211–215] et de taureau [216–218].

2.2.3. Les composantes d'origines animale et végétale

2.2.3.1. Le jaune d'œuf et le lait

En 1940 [219], le **jaune d'œuf** a été montré comme un composant essentiel des milieux de congélation pour la préservation des spermatozoïdes. Ce composé est donc devenu l'élément de référence, d'abord pour la congélation de sperme bovin, puis pour toutes les espèces de mammifères. Malgré les inconvénients liés au jaune d'œuf et au lait évoqués précédemment (risques sanitaires et composition variable), encore beaucoup de laboratoires utilisent ces composés, soit sous leur forme brute (œufs achetés dans le commerce), soit sous forme industrialisée (IMV Technologies, Minitüb, entre autres).

Plusieurs hypothèses ont pu être proposées pour expliquer la protection que pouvaient apporter le jaune d'œuf et le lait. Les **lipoprotéines à faible densité** (LDL – Low-density lipoprotein) et les **micelles de caséines** seraient les **composants** du jaune d'œuf et du lait **responsables de cette protection** [220,221]. En effet, des études montrent que l'ajout de LDL dans le milieu de congélation est même plus efficace que le jaune d'œuf entier [222–224]. La première hypothèse de cet effet protecteur est une **stabilisation des membranes** par les LDL, mais elle n'a jamais été démontrée [221,225]. Pendant longtemps, il a semblé que les LDL **formaient une couche protectrice**, un « *coating* » (manteau) autour du spermatozoïde [226], ou qu'ils **remplaçaient les LDL perdus/endommagés** de la membrane des spermatozoïdes lors de la congélation [227]. Une équipe canadienne a proposé une autre hypothèse : les LDL ou les protéines du lait (micelles de caséines) **entraient en compétition avec les protéines du plasma séminal** bovin [228,229]. Ainsi plutôt que de se lier à la membrane des spermatozoïdes, les protéines du plasma séminal se lieraient aux LDL (Figure 12). Autrement dit, les **LDL et caséines séquestraient les protéines du plasma séminal** [230].

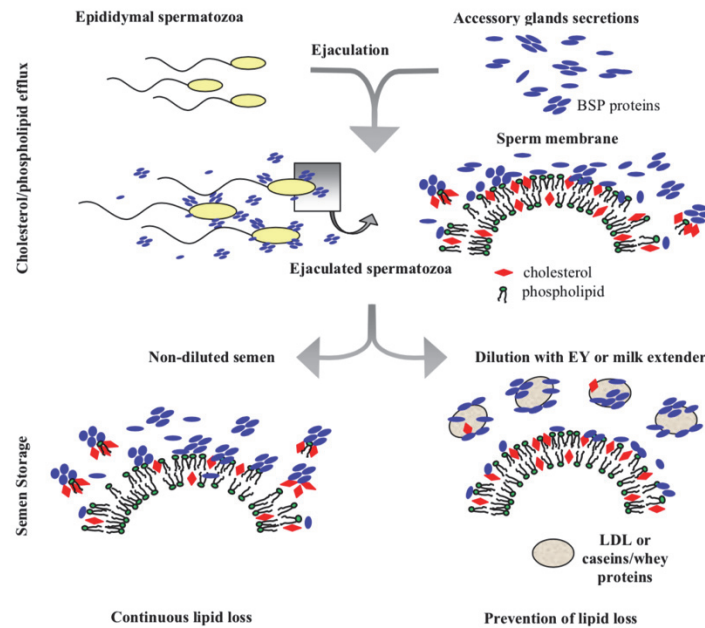


Figure 12. Hypothèse expliquant l'effet protecteur du jaune d'oeuf ou du lait [221].

Les protéines du plasma séminal (BSP = *Binder of Sperm* et non *Bovine Sperm Protein*) ont d'abord été découvertes dans le plasma séminal bovin. Ces protéines sont principalement sécrétées par les vésicules séminales mais certaines BSP sont sécrétées par l'épididyme [229,231]. Elles sont composées généralement (Figure 13) d'un segment N-terminal, variable en longueur, suivi de deux tandems arrangés de fibronectine de type 2 (Fn2) caractéristiques, des domaines de respectivement 38 et 42 résidus liés à 7 résidus d'acides aminés (Linker), et enfin d'un segment C-terminal, variable en longueur [232].

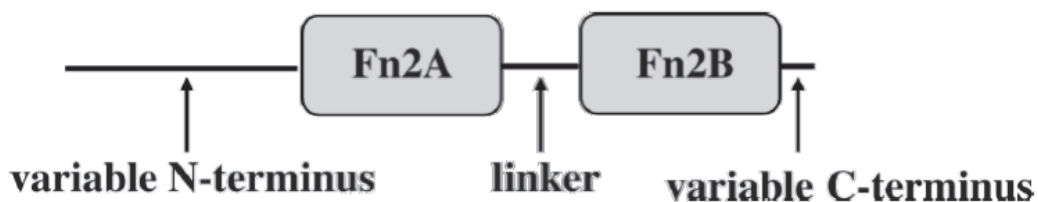


Figure 13. Structure des protéines BSP de bovins [232].

Les BSP dans des conditions *in vivo* ont pour rôle le **maintien de la mobilité** et de la **viabilité des spermatozoïdes**, ainsi que la **régulation du volume cellulaire**. Les BSP ont un rôle important dans le processus de la **capacitation**. En effet, les BSP vont permettre d'induire un **premier efflux de phospholipides** et de **cholestérol** de la membrane du spermatozoïde. Les BSP vont ensuite interagir avec des lipoprotéines à haute densité et les glycoaminoglycanes présents dans le tractus génital de la

femelle, permettant d'induire un **deuxième efflux de cholestérol**. Ces étapes sont essentielles à la fertilité du spermatozoïde [232].

Cependant, lors de la manipulation des spermatozoïdes *in vitro*, ces derniers sont en présence constante des BSP. Ces BSP vont alors induire un **efflux continu** de phospholipides et de cholestérol de la membrane des spermatozoïdes. Ce phénomène va ainsi entraîner une capacitation précoce qui rend le spermatozoïde **plus sensible à la congélation et aux chocs thermiques**. Cet effet toxique est **immédiat et persiste même après lavage de la semence** [233]. L'effet des BSP est donc néfaste seulement quand elles ont un contact prolongé avec les spermatozoïdes de taureaux, donc dans le cas où ces derniers sont manipulés.

Cette hypothèse (séquestration des BSP par le jaune d'oeuf et le lait) est **spécifique aux spermatozoïdes de taureaux**. En effet, des études sur le bélier contredisent l'effet toxique des BSP. Au contraire, les BSP **chez le bélier**, auraient un **effet protecteur** lors de la congélation. Plus particulièrement, les BSP1 et BSP5 permettraient d'annuler les dommages liés au choc thermique en induisant une structure membranaire rétablie et meilleure viabilité après incubation à 5°C [234] ou à la congélation [235,236]. Les différences observées entre le taureau et le bélier sont probablement dues aux ratios phospholipides/cholestérol qui sont spécifiques à chaque espèce [236,237]. Une étude récente a même démontré une différence entre les deux types de protéines (BSP1 et BSP5). Les BSP1 chez le bélier agiraient comme les BSP chez le taureau, en augmentant l'efflux de cholestérol et l'induction précoce de réaction acrosomique, tandis que les BSP5 n'auraient **pas d'effets négatifs** sur la semence ovine [238].

Grâce à ces études et à la compréhension de la composition du jaune d'oeuf [224,239], des alternatives ont été proposées : la lécithine de soja et les liposomes, vecteur de phospholipides.

2.2.3.2. Les lécithines de soja et les liposomes

La lécithine de soja ou les liposomes sont devenus une alternative aux POA dans les biotechnologies de la reproduction.

Le taux de phospholipides dans le soja ne correspond qu'à 1 – 3 %. La phosphatidylcholine est la principale source avec un taux de 35%, suivie de la

phosphatidyléthanolamine à hauteur de 25 %. Le terme de lécithine correspond à la **fraction entière de phospholipides de soja** [203]. La lécithine de soja est peu soluble dans l'eau, ce qui peut entraîner une instabilité des solutions basées sur celle-ci. Selon le taux d'hydratation et la température, les lécithines de soja peuvent être sous différentes formes : micelles, feuilles en bicouche, liposomes multilamellaires, etc. Grâce à cette propriété, la lécithine de soja a été utilisée dans les milieux de congélation de sperme comme substituant aux POA.

De nombreuses études ont montré que les lécithines de soja étaient **tout aussi efficaces** que le jaune d'œuf ou le lait. En effet, chez le bélier, Gil et al. [240,241] n'ont observé aucune différence entre BIOXcell® (IMV Technologies) et le milieu témoin contenant du lait pour la mobilité subjective et l'intégrité membranaire (environ 40 % post-décongélation) ainsi que la fertilité (environ 27 % en taux de gestation après IA transcervicale). D'autres études utilisant différents milieux contenant de la lécithine de soja chez le bélier ainsi que chez le taureau sont en concordance avec ces résultats [103,193,242–246]. Même si Del valle et al. [247] ont mis en évidence une altération de l'activité mitochondriale due à la présence de la lécithine, ces mêmes auteurs montrent une efficacité de cette dernière pour la congélation de sperme de bélier [248]. Néanmoins, une étude portant sur la conservation à 4°C du sperme de taureau a mis en évidence la supériorité des milieux commerciaux à base de jaune d'œuf (Optidyl® pour IMV Technologies et Triladyl® pour Minitüb) par rapport aux milieux commerciaux contenant de la lécithine de soja (BIOXcell® pour IMV Technologies, France ; et AndroMed® pour Minitüb, Allemagne) [199]. Thun et al [249] confirment ces résultats en cryoconservation en mettant en évidence la supériorité d'un milieu préparé en laboratoire à base de tris et jaune d'œuf sur le sperme de taureau *in vitro*. Cependant, aucune différence significative n'est observée pour les taux de non retours des chaleurs à 90 jours.

Les liposomes sont des **vésicules lipidiques** élaborées en laboratoire, de taille déterminée. Ils sont donc composés de **bichouche(s) lipidique(s) et d'un compartiment aqueux en leur centre** [224]. Ces liposomes sont beaucoup utilisés en médecine comme vecteur de substance active pharmaceutique. Des milieux commerciaux contenant des liposomes vecteurs de phospholipide sont depuis quelques années utilisés pour remplacer les POA. Une étude a montré l'efficacité de

liposomes préparé en laboratoire pour la cryoconservation de sperme de taureau [250]. En effet, des liposomes constitués de phosphatidylcholine insaturée, en combinaison avec des lipides négativement chargés, permettent d'obtenir des taux de mobilité progressive de 52 % (vs. 59 % pour un milieu à base de jaune d'œuf). Chez le buffle, une étude montre que les paramètres *in vitro* (mobilité, intégrité de la membrane et de l'acrosome) de la semence sont améliorés grâce au milieu de congélation OPTIXcell® (IMV Technologies, France) comparé à un milieu tris-jaune d'œuf [251]. Chez le taureau, Lima-Verde et al. [246] ne montrent aucune différence significative entre AndroMed® (lécithine de soja) et OPTIXcell® pour la mobilité et le taux de non-retours (environ 60 %).

Les deux types d'alternatives (lécithines de soja ou liposomes contenant des phospholipides) se montrent efficaces face aux milieux à base de POA. Néanmoins, ces milieux peuvent présenter certains inconvénients, certes minimes par rapport aux risques sanitaires. Les lécithines de soja biosynthétisées peuvent présenter des variabilités selon l'origine et le mode d'extraction (variabilité similaire au jaune d'œuf et au lait) et les liposomes sont thermodynamiquement instables [252]. Ces derniers risquent en effet de fusionner au cours du temps et donc ne plus présenter leurs caractéristiques initiales.

2.2.3.3. Particularité de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane, présent dans les matrices extracellulaires et dans de nombreux tissus et fluides [253]. L'acide hyaluronique, contrairement à l'héparine, ne contient pas de protéines actives et peut donc être considéré comme un polysaccharide [254], pouvant ainsi être synthétisé [255].

L'acide hyaluronique a d'abord été découvert comme étant un potentiel substitut aux POA dans les milieux de culture d'embryons [254,256]. Joly et al. [257] ont testé l'acide hyaluronique comme substituant à la BSA pour la congélation d'embryons ovins. Aucune différence n'a été observée entre les deux milieux de congélation sur le taux de développement *in vitro* des embryons. Cependant, les auteurs ont observé que les embryons étaient plus difficiles à manipuler car ils adhéraient aux boîtes de pétri et aux micromanipulateurs.

L'acide hyaluronique pourrait **réguler le métabolisme du spermatozoïde** et serait **impliqué dans le processus de la capacitation** [258]. Ajouté après décongélation dans le sperme humain, l'acide hyaluronique permet d'améliorer le taux de viabilité [259]. Néanmoins, l'incorporation d'acide hyaluronique au milieu de congélation n'améliore pas la qualité après décongélation chez l'homme [259], chez le porc [260], chez le bélier [213] ou chez le taureau [201].

2.2.4. Les additifs

Aujourd'hui, plusieurs stratégies existent pour améliorer la qualité de la semence après décongélation. Parmi les différents additifs possibles, nous parlerons ici de l'ajout du plasma séminal, du cholestérol et des antioxydants.

2.2.4.1. Plasma séminal

Après la découverte des BSP [261] et des protéines, présentes dans le plasma séminal, marqueurs de fertilité [188,262,263], nous pouvons mieux comprendre pour quelles raisons il serait utile d'ajouter des protéines du plasma séminal dans les milieux de congélation du sperme. Avant ces découvertes, des études ont déjà montré **l'efficacité de l'ajout du plasma séminal** sur la qualité de la semence [264], avant et/ou après la congélation, plus particulièrement chez le bélier [265]. Néanmoins, les différentes études sont **contradictoires** et l'effet réel du plasma séminal sur la qualité de la semence est encore discuté. En effet, certaines études chez le bélier montrent un effet significatif et positif du plasma séminal [175,265,266] alors que d'autres études le réfutent [267,268]. Ces disparités entre les études peuvent être expliquées par différents facteurs de variabilité :

- la saison [269,270];
- la méthode de collecte [175];
- la variabilité inter- et intra-mâles de la composition du plasma séminal [271];
- la fraction utilisée du plasma séminal (entière ou non) [235,266,272].

Tous ces facteurs font varier l'effet du plasma séminal sur la qualité de la semence. Afin d'éviter ces facteurs de variations, certains auteurs ont essayé d'étudier seulement l'effet de la **fraction des protéines du plasma séminal qui se lie** à la membrane des spermatozoïdes [235]. Cependant, il n'est pas certain que cette

fraction soit suffisante pour avoir les mêmes effets protecteurs que le plasma séminal total sur la semence [266]. Cet additif reste limitant si le plasma séminal total est utilisé car cela représente toujours un risque sanitaire. Néanmoins, l'extraction de protéines spécifiques qui seraient responsables de la protection apportée au spermatozoïde pourrait être une alternative.

2.2.4.2. Cholestérol

Il y a quelques années, les études se sont concentrées sur une stratégie : **changer la composition en cholestérol des membranes** des spermatozoïdes afin d'améliorer les taux de fertilité. Lors de la congélation, les phospholipides de la membrane vont passer **d'un état liquide à un état cristallin** [273]. Mais chaque sorte de lipides subit ce changement d'état à une température donnée. De ce fait, la membrane composée de plusieurs types de lipides va subir le changement d'état **sur une grande variation de température**. Comme vu précédemment, les spermatozoïdes ayant une meilleure résistance au choc thermique sont ceux qui contiennent le plus haut ratio cholestérol/phospholipides. Ce taux est très important car il **détermine la fluidité et la stabilité de la membrane** à basses températures [274]. L'intérêt d'incorporer du cholestérol dans le milieu de congélation a été évalué [275]. Cependant, le cholestérol étant une molécule hydrophobe, il est compliqué de le solubiliser. Ainsi, il peut être intéressant d'ajouter des cyclodextrines qui ont une affinité pour des stérols libres. L'ajout de cyclodextrines couplé à du cholestérol permet non seulement d'augmenter le taux de cholestérol dans les membranes des spermatozoïdes mais également d'améliorer la mobilité et l'intégrité de la membrane du sperme après décongélation [274,276,277].

2.2.4.3. Antioxydants

La **production incontrôlée de radicaux libres** est souvent associée à une **manipulation de la semence** (centrifugation, dilution, cryoconservation, etc.) et à l'exposition de la semence à la lumière et à l'oxygène. Cette production peut causer de graves dommages au niveau de la membrane et de l'ADN. Par ailleurs, si le spermatozoïde garde toutes ses fonctionnalités dans le cas d'un stress oxydatif faible, le risque de mutations des dommages causés à l'ADN peut expliquer des fausses couches ou des pathologies chez le nourrisson [278]. Ainsi, de nombreuses études ont porté sur **l'ajout d'antioxydants** (Vitamines, herbes, etc.) dans les milieux

de congélation montrant une amélioration de la qualité de la semence *in vitro* et *in vivo* [279–281]. Néanmoins, l'ajout d'antioxydants ne fait pas l'unanimité parmi les scientifiques. Un certain niveau de ROS est essentiel à la capacitation du spermatozoïde avant la fécondation. Or, l'ajout d'antioxydants sans connaître le niveau présent, peut provoquer l'effet contraire désiré : c'est ce qu'appelle Henkel [170] le « paradoxe antioxydant ». C'est pourquoi dans notre laboratoire, nous n'utilisons jamais d'antioxydants dans les milieux de congélation.

Pour résumer, la littérature scientifique regorge de protocoles différents pour la congélation de spermatozoïdes. Il existe des différences entre espèces mais de manière générale, le **sperme est congelé rapidement** (entre 25°C et 80°C/min). Cette cinétique est obtenue dans les vapeurs d'azote et peut être contrôlée à l'aide d'un congélateur programmable. L'utilisation d'un **tampon tris** et du **glycérol** comme cryoprotecteur constitue le **milieu de base** pour la congélation de sperme. La présence lipoprotéines (POA) ou des phospholipides (lécithines de soja, liposomes) contribue à améliorer le rôle protecteur bien que le mécanisme soit encore débattu.

En conclusion, le spermatozoïde est une cellule simple en apparence mais qui reste singulière tant au point de vue fonctionnel que métabolique. Il existe à l'heure actuelle beaucoup de méthodes de caractérisation des spermatozoïdes. Cependant, la **fertilité d'un éjaculat** ne peut être évaluée **qu'après IA** car les paramètres évalués *in vitro* et les paramètres de fertilité sur le terrain sont faiblement corrélés. La physiologie du spermatozoïde lui permet de subir des cinétiques de refroidissement et des pressions osmotiques plus élevées que pour les embryons ou les PSC. Les protocoles de congélation proviennent le plus couramment d'études empiriques. De nombreux milieux commerciaux sans produits d'origine animale sont largement utilisés, mais l'effet de l'acide hyaluronique sur le sperme pendant la congélation a été **peu étudié** et **fera l'objet de notre questionnement** expérimental.

Les cellules souches pluripotentes

Avant d'expliquer la congélation des PSC et l'intérêt du modèle lapin pour le développement de lignées pluripotentes et les spécificités liées à celles-ci, nous **définirons d'abord la pluripotence** ainsi que les **différents stades de pluripotence** observés selon l'origine et l'espèce des cellules.

1. La pluripotence

1.1. Définitions générales

1.1.1. Le développement embryonnaire précoce

Au début du développement embryonnaire précoce (Figure 14) (correspondant à la période de la fécondation jusqu'à la compaction), c'est-à-dire jusqu'au stade morula, les cellules de l'embryon sont **totipotentes**. Ces cellules permettent de former les **tissus embryonnaires** (futur fœtus, sac vitellin et endoderme extra-embryonnaire pariétal) et les **tissus extra-embryonnaires ou annexes embryonnaires** (placenta).

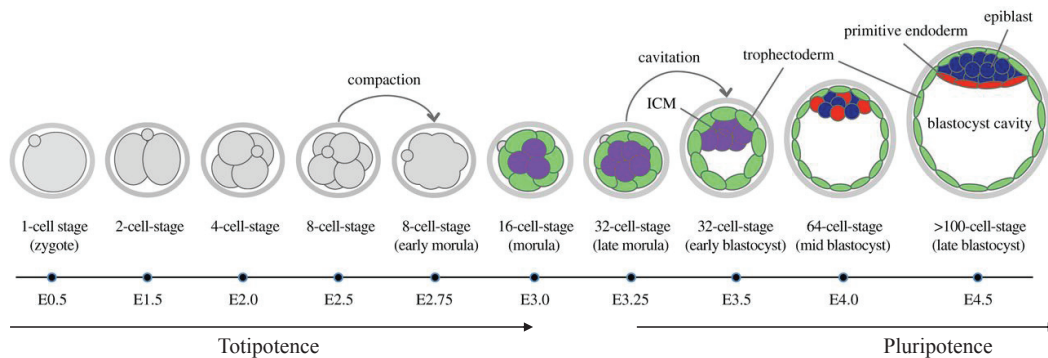


Figure 14. Développement embryonnaire précoce chez la souris [282].

EX correspond au nombre de jours post-coïtum

Au stade morula (stade 16 cellules), les cellules vont alors se spécialiser pour former soit le trophectoderme (TE) pour les cellules localisées en périphérie de la morula, soit la masse cellulaire interne (ICM, *Intern Cell Mass*) pour les cellules localisées à l'intérieur, en formant un blastocyste [283]. Au stade du blastocyste, il y a une nouvelle ségrégation des cellules de l'ICM qui vont former soit l'épiblaste, soit l'hypoblaste appelé également l'endoderme primitif. Le trophectoderme permet de générer le placenta, alors que l'hypoblaste forme le sac vitellin et l'endoderme extra-

embryonnaire pariétal. C'est donc l'épiblaste qui va **permettre la formation du futur fœtus**. Seules les cellules de l'ICM puis de l'épiblaste sont alors **pluripotentes**, c'est-à-dire **capables de produire tous les lignages d'un organisme adulte**, y compris la lignée germinale (Figure 14). Au moment de la gastrulation, il y a la mise en place des **trois feuillets embryonnaires**, c'est-à-dire une différenciation des cellules de l'épiblaste en :

- endoderme qui formera par la suite les organes/tissus du tube digestif et les glandes annexes (exemple : le pancréas) ;
- mésoderme qui formera le système sanguin et le squelette ;
- ectoderme qui formera le système nerveux et la peau.

Durant le développement de l'embryon, la **pluripotence** des cellules de l'ICM n'est que **transitoire** et **ne dure que quelques heures** après la gastrulation [284,285]. Une fois la mise en place des trois feuillets embryonnaires, les cellules sont dites multipotentes car elles peuvent **générer différents types cellulaires** mais seulement au sein d'une catégorie cellulaire. Par exemple, au sein de l'ectoderme, les cellules pourront former des neurones, ou des tissus de la peau, mais jamais des cellules sanguines, qui appartiennent aux cellules du mésoderme. Au cours du développement embryonnaire, puis de la vie adulte, les cellules deviennent ensuite unipotentes, ne pouvant former **qu'un seul type cellulaire**. Ces cellules souches multipotentes et unipotentes sont également appelées cellules souches adultes car elles sont déjà engagées dans un lignage et sont souvent en quiescence. Elles se divisent de manière asymétrique et selon les besoins de l'organisme pour la préservation de l'homéostasie tissulaire.

1.1.2. Les cellules souches pluripotentes

Chez la souris, on peut obtenir *in vitro* deux types de cellules souches dites pluripotentes : des cellules souches embryonnaires (ESC, *Embryonic Stem Cells*) quand des cellules sont dérivées de l'épiblaste du blastocyste précoce et des cellules souches de l'épiblaste (EpiSC, *Epiblast Stem Cells*) quand des cellules sont dérivées de l'épiblaste tardif de l'embryon post-implantatoire. On peut produire également les cellules souches pluripotentes induites (iPSC, *induced Pluripotent Stem Cells*), par reprogrammation de cellules somatiques issues de tissus de cellules adultes (sang, peau, etc.). En effet, la surexpression des facteurs de transcription Oct4, Sox2, Klf4

et c-Myc dans des cellules adultes différenciées permet de rétablir l'état de pluripotence des cellules embryonnaires [286]. Toutes ces cellules sont dites « cellules souches pluripotentes » (PSC, *Pluripotent Stem Cells*). Il est important de souligner que les PSC sont capturées dans des états de pluripotence différents selon leur origine (ICM, épiblaste tardif, reprogrammation) et selon l'espèce étudiée. La pluripotence n'étant que transitoire durant le développement embryonnaire précoce, les PSC peuvent être **maintenues de manière indéfinie** en **laboratoire** grâce à des conditions de culture *in vitro* définis et très stringentes, que nous verrons par la suite.

Ces PSC présentent deux propriétés fondamentales :

- l'auto-renouvellement : chaque cellule se divise en deux cellules filles similaires, de manière indéfinie ;
- la pluripotence, c'est-à-dire la capacité à générer les trois feuillets embryonnaires : comme pour le cas des cellules de l'ICM ; Cette propriété peut être mise en évidence par la capacité à générer des tératomes ou des corps embryoides (EB, *Embryoid Bodies*) [287]:
 - quand des PSC sont injectées dans des testicules ou capsules rénales de souris immunodéprimées, les PSC vont former des tumeurs appelées tératomes composées de cellules issues des trois feuillets embryonnaires ;
 - les PSC peuvent former des amas qui, soumis à une agitation continue, vont proliférer sans adhérer et, en se différenciant comme les cellules de l'ICM lors du développement embryonnaire précoce, vont former des structures tridimensionnelles composées de cellules endodermiques, ectodermiques et mésodermiques, appelés EB.

Nous verrons dans les parties suivantes quelles sont les autres particularités des cellules souches pluripotentes et leurs différences selon leur origine et l'espèce étudiée.

1.2. Les marqueurs de la pluripotence et de la fonctionnalité des cellules souches pluripotentes

La souris étant la première espèce pour laquelle des PSC ont été dérivées [288], cette espèce est la **référence** pour **décrire la pluripotence**. Paradoxalement, c'est aussi l'espèce qui se distingue le plus des autres espèces au niveau des caractéristiques de pluripotence. Dans cette partie, vont donc être présentés les différents marqueurs de la pluripotence, basés sur les cellules souches embryonnaires de souris (mESC).

Les mESC représentent aujourd'hui la « vraie » pluripotence, appelée pluripotence naïve car elle correspond à la pluripotence des cellules de l'ICM de l'embryon précoce. De manière plus appliquée, on parle de pluripotence naïve car les **mESC sont capables de coloniser un embryon** au stade blastocyste et de **former des chimères** (voir partie 1.2.4). Des PSC sont dites « naïves » si elles présentent les mêmes caractéristiques que les cellules de l'épiblaste du blastocyste péri-implantatoire, c'est-à-dire au moment de la ségrégation de l'ICM en épiblaste et hypoblaste (Figure 14) [289].

1.2.1. Le noyau de pluripotence et le maintien de l'auto-renouvellement

Le maintien de l'auto-renouvellement des PSC est possible grâce à un réseau de gènes et de voies de signalisation moléculaires complexes. Ce réseau de gènes comprend un noyau de pluripotence composé de **Oct4, Sox2 et Nanog**, qui est exprimé dans toutes les cellules souches pluripotentes. Ce noyau de pluripotence est **essentiel pour le maintien de l'auto-renouvellement** des PSC et pour éviter leur différenciation [290]. Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4), également appelé POU5F1, est un **facteur central de la pluripotence**, exprimé lors du développement précoce, dans les cellules de l'ICM et de l'épiblaste, entre autres [291]. Sox2 (SRY-related HMG-box gene 2) exprime un facteur de transcription permettant d'activer Oct4 [292]. Nanog, exprimé dans les cellules de l'ICM et essentiel dans la ségrégation de ces dernières en épiblaste, est activé par Oct4 et Sox2. Ce noyau est donc une **boucle de contrôle positive** permettant de soutenir la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules. Ce noyau est également soutenu grâce à **sept autres facteurs de transcription** tels que Klf2, Klf4, Tfcp2L1, Esrrb, Gbx2, Tbx3 et Sal4, formant le noyau de pluripotence étendu.

Au niveau pratique, les mESC sont maintenues à l'état naïf en culture grâce la présence de **Leukemia Inhibitory Factor** (LIF) et de **sérum** (FBS). Le LIF permet d'**activer le noyau de pluripotence**, tandis que le FBS **inhibe la différenciation** des cellules par la voie des TGF/Smad. Le noyau de pluripotence est soutenu grâce à trois principales voies de signalisation (Figure 15) :

- la voie LIF – Gp130 – Janus Kinase 2 (JAK2) – *Signal Transducer and Activator 3* (STAT3) activée par le LIF qui soutient directement l'expression des gènes du noyau de pluripotence étendu [293] ;
- la voie LIF – Gp130 – SHP2 qui a un double rôle en induisant la différenciation des cellules par le biais de la cascade de signalisation Ras/MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) – cette voie peut être inhibée par un inhibiteur *Mitogen-activated-Extracellular Regulated Kinases* (MEK) [294] – mais également en soutenant l'expression de Nanog et Essrb, et plus largement le noyau de pluripotence étendu via l'activation de voie Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (Pi3K) [295,296];
- la voie Wingless Integration Site (WNT) active dont l'activité peut être renforcée par l'utilisation d'un inhibiteur de la *Glycogen Synthase Kinase 3* (GSK3 β) [297].

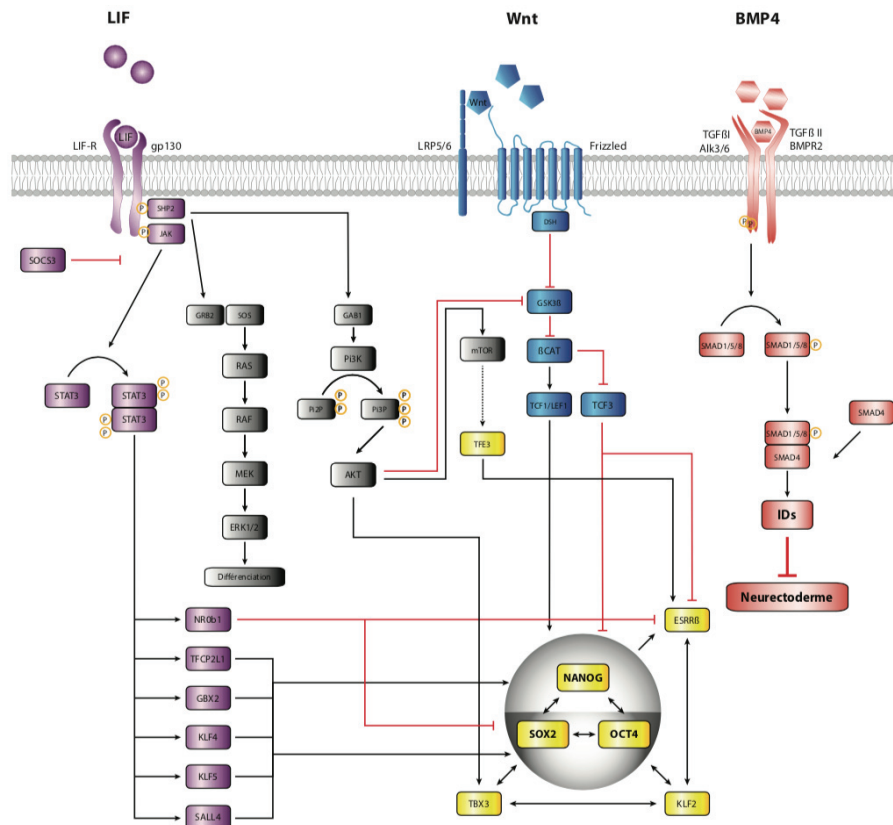


Figure 15. Les différentes voies de signalisation permettant le maintien de l'auto-renouvellement des mESC [298].

Le noyau de pluripotence est indiqué par le cercle gris et les encadrés jaunes. Les voies de signalisation LIF/Stat3, MAPK et Pi3K, Wnt et BMP4/Smad sont respectivement décrits en violet, gris, bleu et rouge.

Le FBS étant un produit variable, il peut être remplacé par le *Bone Morphogenetic Protein 4* (BMP4) permettant d'inhiber la voie MAPK et donc éviter la différenciation des cellules en neurectoderme (Figure 15) [299,300]. C'est ainsi que s'est développé de nouvelles conditions de culture, en évitant des cellules nourricières et le FBS : un milieu basal N2B27 sans sérum appelé 2i/LIF [301]. Ce milieu est composé des inhibiteurs MEK (PD0325901) et GSK3β (CHIR99021). Un milieu 3i/LIF comporte en plus un inhibiteur FGFRi (SU5302) qui a la particularité d'induire un contrôle négatif sur la voie FGF/Ras/MAPK. Ces deux milieux sans sérum permettent de cultiver les mESC dans un état dit « fondamental » car **non soumis à des facteurs de croissance externes**. Les cellules à l'état fondamental sont alors **moins hétérogènes** en termes d'expression des facteurs de transcription du noyau de pluripotence étendu.

1.2.2. Caractéristiques morphologiques

Les mESC ont la particularité de former des colonies très serrées et en forme de dômes. Leur rapport nucléo-cytoplasmique est élevé [302], ce qui peut être expliqué par leur prolifération rapide (12-16h). Ce cycle cellulaire particulier présente une phase G1 raccourcie avec une absence de point de contrôle des dommages de l'ADN en G1 [303]. Ces cellules peuvent être cultivées plusieurs mois sans anomalies génétiques ou chromosomiques. Elles n'atteignent donc pas de sénescence réplivative. Les mESC ont également un fort taux de clonogénicité (proche de 100 %) et supportent très bien la dissociation enzymatique par la trypsine ainsi que l'ensemencement en cellules dissociées.

1.2.3. Caractéristiques moléculaires

Au niveau moléculaire, la pluripotence peut être définie par la dépendance des cellules à la voie LIF/gp130/Stat3. Elles ont également une forte activité de phosphatase alcaline. Des marqueurs de surface leur sont spécifiques tels que *Stage-Specific Embryonic Antigen 1* (SSEA1) et la molécule d'adhésion *E-Cadherin* [304]. Les mESC présentent un caryotype normal et donc sont stables génétiquement. Les cellules possèdent deux chromosomes X actifs (XaXa) à l'état indifférencié (contre une inactivation d'un chromosome X à l'état différencié des cellules) [305]. Enfin, leur profil épigénétique est également particulier de part un génome hypo-méthylé [306].

1.2.4. Caractéristiques fonctionnelles

Au-delà des marqueurs moléculaires, la pluripotence des cellules peut être vérifiée *in vitro* et *in vivo*. Comme vu précédemment, les PSC doivent être capables *in vitro* de former des Eb permettant ainsi de générer les trois feuilletts embryonnaires, propriété fondamentale de la pluripotence. Également, après l'injection de PSC dans des capsules rénales ou testicules de souris immunodéprimées, les PSC sont capables *in vivo* de former des tératomes [304]. Le test ultime de la pluripotence est la capacité de coloniser un blastocyste et de générer des chimères somatiques et germinales [307,308]. En effet, suite à l'injection de PSC dans un embryon (stade 8 cellules au stade blastocyste), les cellules sont

capables de participer au développement embryonnaire. C'est le cas pour des cellules à l'état naïf ou fondamental de rongeurs (souris et rat) [301,309]. Enfin, un individu peut être formé entièrement grâce à des mESC par complémentation tétraploïde : les mESC diploïdes sont fusionnées avec un embryon rendu tétraploïde par irradiation. Les cellules tétraploïdes vont permettre le développement des tissus extra-embryonnaires (sac vitellin et placenta), mais le foetus généré sera uniquement dérivé des mESC diploïdes [310,311]. Cette fonctionnalité permet ainsi de confirmer la pluripotence naïve des cellules.

1.3. Différence d'état de pluripotence liée à l'origine

Nous avons pu voir que les cellules pouvaient être dans un état naïf ou fondamental. D'autres états de pluripotence ont pu être décrits dans la littérature. Ces états sont liés à l'origine des cellules (blastocyste précoce ou épiblaste tardif post-implantatoire) ou à l'espèce étudiée. Dans cette partie, nous présenterons brièvement les différences de caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des différents types de cellules souches pluripotentes.

Comme vu précédemment, des EpiSC peuvent être obtenues à partir de l'épiblaste tardif post-implantatoire (E6-E8) de souris. Ces cellules souches pluripotentes se distinguent des mESC par leur état de pluripotence qui est dit « amorcé ». C'est un stade où les cellules se rapprochent de la différenciation mais gardent certaines caractéristiques de pluripotence [312]. En effet, parmi les similitudes avec les mESC, nous pouvons citer la capacité à former les trois feuillets embryonnaires et à générer des EB ainsi que des tératomes, propriétés fondamentales des PSC. Ces cellules peuvent également coloniser un embryon au stade E6-E7 et ainsi participer au développement embryonnaire post-implantatoire [313]. Cependant, les EpiSC ont plusieurs caractéristiques qui diffèrent des mESC qui sont à l'état naïf (Tableau 3). En effet, les EpiSC forment des colonies plates en monocouches. Ce sont des cellules qui ont un faible taux de clonogénicité (1 à 4 % des cellules uniques forment une colonie) et qui doivent être repiquées manuellement car elles ne supportent pas la dissociation enzymatique par la trypsine [314]. Ces cellules n'ont pas d'activité phosphatase alcaline ni un deuxième chromosome X actif. Les marqueurs de surface exprimés par les EpiSC sont SSEA3, SSEA4 ainsi que la N-Cadherine [315]. La voie de signalisation principale dont

dépend les EpiSC est la voie FGF2/Activine. En effet, les cellules sont maintenues en auto-renouvellement grâce à du **Knock Out Serum Replacement** (KOSR), du **FGF2** (ou bFGF) et de **l'Activine A**.

Tableau 3. Caractéristiques des mESC, EpiSC et hESC

Caractéristiques	Souris		Humain
	mESC	EpiSC	hESC
Stade embryonnaire	E4.0-E4.5 Blastocyste précoce	E6-E8 Blastocyste tardif	E5-E7 Blastocyste précoce
Forme des colonies	Colonies en dômes	Colonies plates	Colonies plates
Taux de clonogénicité	~100 %	Faible	Faible
Dissociation	Enzymatique - Trypsine	Repiquage manuel	Repiquage manuel
Activité phosphatase alcaline	Oui	Non	Oui
2^{ème} Chromosome X	Actif	Inactif	Dépendant des conditions de culture et des lignées
Voie de signalisation	LIF/gp130/Stat 3	FGF2 + Activine	FGF2 + Activine
Noyau de pluripotence	Étendu	Restreint	Restreint
Colonisation blastocyttaire	Oui	Non	X

Cette voie permet d'activer la voie des MAPK, afin d'éviter une différenciation en neurectoderme, ainsi que la voie des SMAD. Par ailleurs, bien que le maintien de la pluripotence des EpiSC soit bien dû aux facteurs Oct4, Sox2 et Nanog, leur **noyau de pluripotence reste restreint**. les voies FGF2 et Activine A ne permettent pas l'activation des autres facteurs de transcription qui permettent l'activation forte et stable du noyau de pluripotence des mESC [312]. Ces caractéristiques rendent ainsi

les EpiSC moins stables en culture et plus sujettes à des altérations caryotypiques [316].

Comme pour les EpiSC de souris, les cellules souches pluripotentes de primates (pPSC), d'origine humaine (hPSC) ou de primate non humain (PNH - nhpPSC), que ce soit les cellules souches embryonnaires (hESC ou nhpESC) ou les cellules souches pluripotentes induites (hiPSC ou nhpiPSC) sont capturées à un état amorcé (Tableau 3) [317–319]. Cette différence est surprenante puisque les hPSC sont bien dérivées des cellules de l'ICM du blastocyste précoce (E5-E7 chez l'homme). Malgré cela, leurs caractéristiques moléculaires et fonctionnelles sont similaires à celles des EpiSC et leur transcriptome similaire à celui des blastocystes tardifs post-implantatoires dans les cas des PNH [320]. En effet, les pPSC forment également des colonies plates de cellules bien distinctes et ne supportent pas la dissociation enzymatique. Ces cellules expriment aussi les marqueurs de surface tels que SSEA3 et SSEA4 [321]. Par ailleurs, l'inactivation du 2nd chromosome X dépend *a priori* des conditions de culture et des lignées [322]. Elles ont une activité de phosphatase alcaline. Le maintien de leur auto-renouvellement est possible grâce aux voies de signalisation de FGF2/Activine et WNT [323]. Étant des cellules souches pluripotentes, les pPSC sont capables de se différencier dans les trois feuillets embryonnaires et former des EB et des tératomes [324]. Bien évidemment, il n'est pas possible de vérifier si les hPSC peuvent coloniser un embryon, dues aux questions éthiques que cela peut poser.

En résumé, on peut distinguer la totipotence de la pluripotence par la capacité de générer les annexes embryonnaires. La pluripotence apparaît au stade blastocyste après la ségrégation de l'ICM en épiblaste et hypoblaste. Les PSC s'auto-renouvellent, peuvent se différencier dans les trois feuillets embryonnaires et générer des EB et des tératomes. La pluripotence comporte différents états progressifs (de l'état fondamental à l'état amorcé) présentant ainsi des caractéristiques variables selon l'espèce et l'origine des cellules.

2. Le modèle lapin

2.1. Intérêt du modèle lapin

Le lapin représente le 3^{ème} animal de laboratoire en Union Européenne, bien qu'il soit encore peu utilisé comparé à la souris et au rat [325,326]. Le lapin peut être un **bon modèle d'étude** pour plusieurs raisons. C'est un animal qui a la même distance phylogénétique que la souris par rapport à l'homme mais qui a des séquences de gènes plus proches de celles des gènes de l'homme [325,327]. Il présente en plus par rapport aux rongeurs, une physiologie et un développement embryonnaire bien plus comparables à ceux des primates. Le lapin peut donc être utilisé comme modèle d'étude de **maladies humaines** [328,329] et plus particulièrement de la **reproduction et de la placentation humaines** [325,326,330]. En pratique, le lapin reste un animal de petite taille, très prolifique et possédant un intervalle générationnel court et donc qui présente un coût d'élevage peu important comparé au mini-porc.

Concernant notre sujet d'étude, une seule lapine peut produire en moyenne une trentaine d'embryons après superovulation et jusqu'à une centaine de manière plus exceptionnelle. Cette capacité de production permet donc de répondre aux 3R (« Réduction, Réutilisation et Raffinement », Directive UE 2010/63 et décret français 2013/118 [331]) et ainsi de réduire le nombre d'animaux d'expérimentation. Par ailleurs, le lapin a une gestation courte de 31 jours. L'ovulation chez la lapine est provoquée par l'accouplement : le suivi du développement embryonnaire est donc précis. Enfin, contrairement aux primates, le lapin permet de vérifier facilement *in vivo* la pluripotence des cellules souches grâce des protocoles de colonisation blastocytaire et de production de chimères. Au-delà de ces aspects, le lapin présente l'avantage de **partager des similitudes avec l'homme** en termes de **développement embryonnaire** et par répercussion en termes de **cellules souches pluripotentes**.

2.1.1. Similitudes avec l'homme pour le développement embryonnaire

Jusqu'au stade blastocyste, le lapin présente un développement embryonnaire précoce similaire à l'homme et la souris (Figure 16). Après la gastrulation, l'embryon de lapin se développe, comme chez l'homme, **sous forme d'un disque plat**,

contrairement à celui de la souris qui est un ovo-cylindre [332]. L'activation de génome embryonnaire, comme chez l'homme, est plus tardive et progressive que chez la souris et est complète au stade au stade 16 cellules [333,334]. Enfin, l'implantation s'effectue plus tardivement que chez les autres mammifères et après le début de la gastrulation (E6.75) [335].

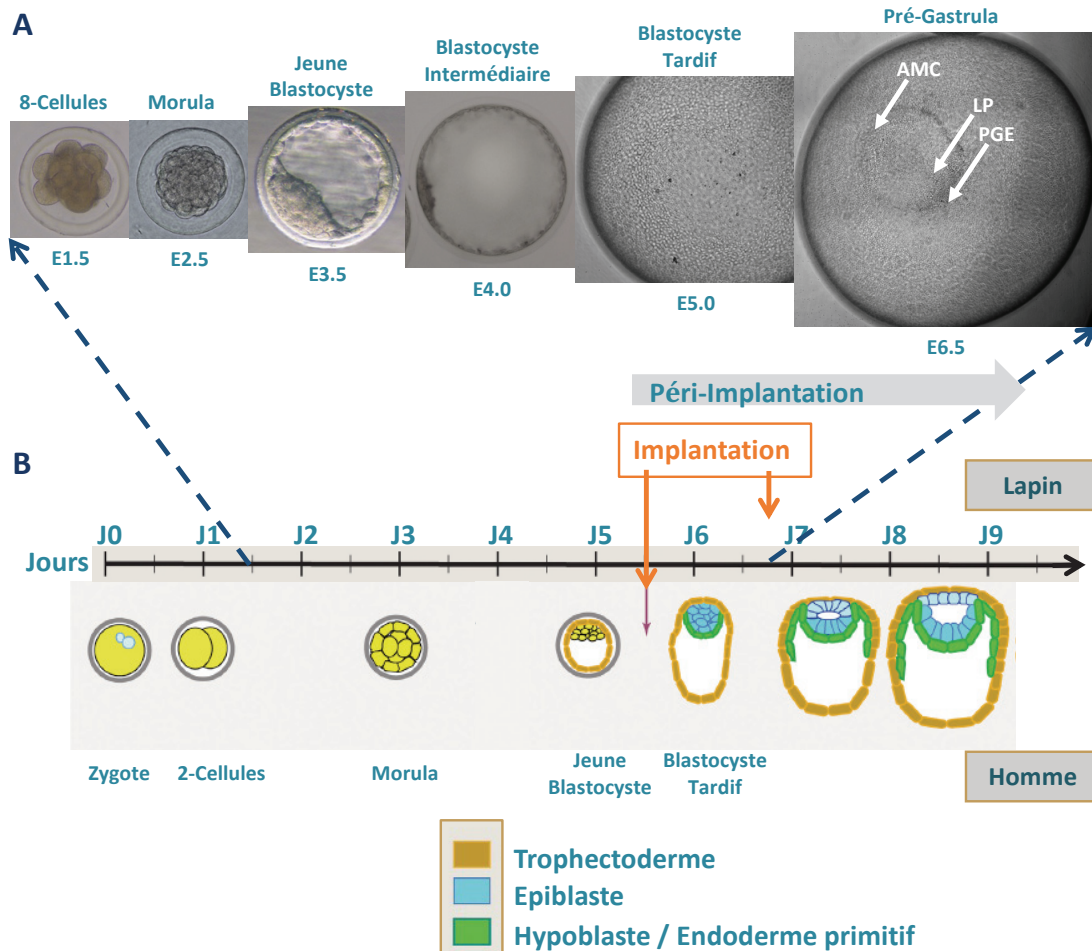


Figure 16. Développement embryonnaire chez le lapin et sa correspondance avec celui de l'homme [289].

A: Développement embryonnaire du lapin. B: Développement embryonnaire de l'homme. Le lapin présente l'avantage de débiter la gastrulation avant l'implantation. DE = Disque Embryonnaire. AMC = Anterior Marginal Crescent. PMC = Posterior Gastrula Extension. LP = Ligne Primitive.

2.1.2. Similitudes avec l'homme pour les cellules souches pluripotentes

Comme pour les hPSC, nhPSC ainsi que les EpiSC, les cellules souches pluripotentes de lapin (rbPSC) sont à l'état amorcé. Que les cellules soient d'origine

embryonnaire (rbESC) ou reprogrammées (rbiPSC), elles forment des **colonies plates** et sont **dépendantes des voies** FGF2/Activine. De plus, de même que pour l'homme, les cellules de l'ICM et du TE expriment jusqu'au stade blastocyste le gène Oct4 [336,337].

Les autres caractéristiques des rbPSC, dont certaines communes avec les cellules des hPSC car dépendantes de leur état de pluripotence amorcé, sont décrites dans la prochaine partie.

2.2. Particularité des cellules souches pluripotentes de lapin

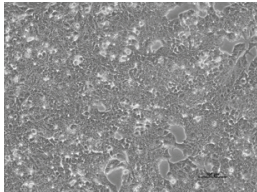
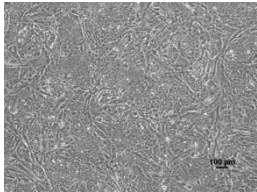
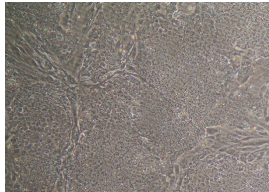
Au-delà des similitudes avec leurs équivalents humains, les cellules souches pluripotentes de lapin présentent certaines spécificités. Comme chez les primates et les rongeurs, les rbESC sont **issues des cellules de l'ICM de blastocystes précoces** (E3.5-E4.0) (Figure 16). Les rbiPSC ont pu être reprogrammées à partir de cellules somatiques en reprenant le protocole de l'équipe japonaise [286], à savoir la **surexpression des gènes humains OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC** [338–340].

Les rbPSC forment donc des colonies plates en monocouches de cellules bien distinctes (Tableau 4). Elles ont une forte activité phosphatase alcaline. Elles peuvent être **dissociées enzymatiquement** à l'aide d'acutase (rbESC) ou de trypsine (rbiPSC, mais leur **taux de clonogénicité reste faible** pour les rbESC et **intermédiaire** pour les rbiPSC par rapport à celui des mESC.

Le noyau de pluripotence comporte bien Oct4, Sox2 et Nanog [339,341,342]. Il a été démontré que les rbPSC regroupent des **populations hétérogènes** au sein des colonies [339]. Ainsi, les rbPSC peuvent exprimer SSEA1 mais également SSEA3 et SSEA4 [338,339,341,342].

La culture des rbPSC s'effectue sur des cellules nourricières, en présence de **KOSR** et de **FGF2**. En effet, comme vu précédemment et comme les hPSC, les rbPSC sont dépendantes des voies FGF2/Activine [339,343]. Le LIF n'est pas, par conséquent, indispensable à l'auto-renouvellement des rbPSC mais la littérature décrit également l'intervention des voies de signalisation PI3K, MAPK et WNT [344,345].

Tableau 4. Caractéristiques des mESC et rbPSC (lignées du laboratoire)

Caractéristiques	Souris		Lapin
	mESC	rbESC (AKSF/AKSL)	rbiPSC (B19)
Morphologie			
Stade embryonnaire	E4.0-E4.5	E3.5-E4	X
Forme des colonies	Colonies en dômes	Colonies plates	Colonies plates
Taux de clonogénicité	~100 %	Faible	Intermédiaire
Dissociation	Enzymatique - Trypsine	Enzymatique - Accutase	Enzymatique - Trypsine
Activité phosphatase alcaline	Oui	Oui	Oui
2 ^{ème} Chromosome X	Actif	Plutôt inactif	Plutôt inactif
Voie de signalisation	LIF/gp130/Stat3	FGF2/Activine	FGF2/Activine
Noyau de pluripotence	Étendu	Restreint	Restreint
Colonisation blastocyttaire	Oui	Non	Très faible

Enfin, les rbPSC sont capables de **se différencier dans les trois feuillets embryonnaires**, notamment *in vitro* dans les EB et *in vivo* dans les tératomes [338,341,342,346]. Osteil et al. [339], ainsi que Honda et al. [341,347], n'ont pas réussi à mettre en évidence une capacité des rbESC à coloniser un blastocyste de manière importante (que quelques cellules colonisant le blastocyste). Deux études font état de la génération de chimères chez le lapin avec des rbiPSC mais de façon peu efficace. La première étude ne représente l'obtention que de **0,5 % de chimère**

(1 chimère sur 198 embryons injectés) [348]. La seconde étude, qui provient de notre équipe [349], a permis d'obtenir **3 % de fœtus chimériques** mais avec un **taux de chimérisme très faible** (estimé inférieur à 1/1000).

En résumé, le lapin est un **bon modèle d'étude** de la reproduction humaine et ainsi l'étude de la pluripotence. En effet, cette espèce présente l'avantage de **partager des similitudes avec l'homme** pour le développement embryonnaire et fœtal. Les cellules souches pluripotentes de lapin, comme pour l'homme, sont capturées dans un état de pluripotence amorcées et sont **dépendantes des voies de signalisation FGF2/Activine**. Ces cellules peuvent se développer en EB et tératomes mais **participent difficilement au développement embryonnaire** après injection dans un blastocyste receveur.

3. Spécificités de la congélation des cellules souches pluripotentes

Afin de pouvoir exploiter les cellules souches à des fins thérapeutiques, leur **conservation** est **essentielle**, notamment pour les biobanques [350]. Par ailleurs, la culture cellulaire à long-terme de cellules souches pluripotentes peut modifier leurs caractéristiques initiales et notamment leur intégrité caryotypique en accumulant des mutations chromosomiques [351]. Ainsi, les laboratoires ont **intérêt à sauvegarder** leurs **lignées cellulaires** durant les passages précoces, selon un protocole de congélation optimal.

Contrairement aux spermatozoïdes, c'est la **congélation lente** (environ 1°C/min), associée à une solution de congélation composée de **sérum et de 10 % de DMSO**, qui est utilisée en routine pour conserver les cellules souches adultes (hématopoïétiques, mésenchymateuses, etc.). C'est sur l'exemple de ces dernières que les PSC ont été congelées dans les mêmes conditions. Les mESC tout d'abord ont pu être congelées dans ces conditions permettant d'obtenir **des taux de viabilité de 90 %** [22,23]. Cependant, pour les PSC de primates, les taux de survie restent faibles et les taux de différenciation sont élevés, après décongélation [352]. La congélation des PSC entraîne en effet des dommages notamment d'ordre structurel. Les PSC sont organisées en colonies, fortement associées en cellules adhérentes

grâce à des jonctions communicantes serrées et à l'adhésion à une matrice extracellulaire de type matrigel. La dissociation unicellulaire nécessaire à la cryoconservation induit alors une **déstabilisation des adhésions cellule-cellule et cellule-matrice**, entraînant la **production de ROS** ainsi que **l'apoptose des cellules**. Pour empêcher ces dommages, le milieu de congélation doit pouvoir protéger les cellules contre la cristallisation et la recristallisation pendant et après la congélation – décongélation, tout en permettant de maintenir un taux de survie cellulaire suffisant. Enfin, les cellules doivent pouvoir proliférer rapidement et maintenir leur état de pluripotence après cryoconservation et remise en culture.

Le remplacement du DMSO ainsi que des produits d'origine animale, sans compromettre le taux de survie, est un enjeu pour la cryoconservation des PSC. En parallèle, congeler ces cellules précieuses doit pouvoir être **réalisé de manière simple et à large échelle**. Dans cette partie, nous présenterons les différents milieux de congélation testés sur les PSC, ainsi que les cinétiques de refroidissement utilisées. Il est important de noter qu'à ce jour, aucune étude spécifique à la cryoconservation de PSC de lapin n'a été publiée. Ainsi, cette partie présente l'état de l'art de la cryoconservation des PSC de rongeurs et de primates humain et non humain essentiellement.

3.1. Milieux utilisés pour la cryoconservation des cellules souches pluripotentes

Traditionnellement, les PSC et plus largement les cellules maintenues en culture (cellules lymphoïdes, MSC, etc.) sont congelées dans un milieu simple, composé de **90 % de sérum** (FBS pour les PSC) et de **10 % de DMSO** [352–356]. Dans certaines publications, le milieu de congélation est composé du milieu de culture (DMEM par exemple), lui-même contenant du FBS, supplémenté de 10 % de DMSO [353,355,357–361]. Chez le lapin, une seule étude mentionne la méthode employée pour congeler des cellules souches embryonnaires : un milieu composé de **10 % de DMSO dans du sérum de nouveau-né bovin** (*new born calf serum*, **NCS**) [342]. Mais depuis quelques années, les chercheurs ont pris conscience de la nécessité de congeler les cellules souches pluripotentes dans un milieu standardisé et non toxique [41,353]. En effet, d'une part, les solutions composées au laboratoire sont à proscrire (car dépendant des opérateurs, risque de non traçabilité, non stérilité) et d'autre part,

le FBS est un POA, comportant donc un risque de contamination et de variabilité [106]. Par ailleurs, certains cryoprotecteurs tel que le DMSO, utilisés à forte concentration peuvent être toxiques pour les cellules [362–364] et peuvent provoquer des effets secondaires chez les patients si les cellules sont utilisées à des fins cliniques [73–76]. Dans ce paragraphe, nous évoquerons les différents milieux de congélation qui ont été développés pour :

- améliorer les taux de survie après décongélation par l'ajout d'additifs ;
- diminuer la toxicité des cryoprotecteurs en trouvant une alternative à la formule « 10 % de DMSO » ;
- remplacer les produits d'origine animale par des milieux synthétiques, chimiquement défini ou « xeno-free ».

3.1.1. Additifs pour améliorer les taux de survie

Comme décrit précédemment, les ESC sont dérivées de la masse cellulaire interne de l'embryon pré-implantatoire alors que les iPSC sont générées à partir de fibroblastes grâce à leur reprogrammation via la transduction de facteurs de transcription. Ces cellules peuvent présenter des caractéristiques similaires inter-espèces pour la prolifération, les marqueurs de surface, l'expression des gènes, l'activité enzymatique ou la formation de tératomes. Néanmoins, les PSC de primates (humains ou non humains) ou de lapin sont beaucoup moins faciles à manipuler comparées aux PSC murines, qui sont quant à elles insensibles à la dissociation en cellules dissociées et sont dépendantes de la voie LIF. Les PSC de primates et de lapin se développent en **larges colonies plates** contrairement aux PSC murines qui se développent en plus petites colonies en forme de dômes. C'est cette différence qui explique que les **PSC non murines sont plus sensibles à la dissociation**. La dissociation est une procédure habituelle en culture cellulaire pour différents types de manipulations telles que les passages, la congélation, le tri des cellules, etc. Cependant, chez les PSC de primates en particulier, cette procédure entraîne l'apoptose des cellules et une mort cellulaire massive.

Afin de diminuer le risque d'apoptose lié à la dissociation, les PSC sont préférentiellement **séparées en « amas »** (« *clumps* » en anglais), c'est-à-dire en petits agrégats. La dissociation de ces cellules est alors mécanique et non chimique (utilisation de trypsine, collagénase ou accutase). Notons cependant que la

dissociation des PSC de lapin est chimique, comme chez la souris. Ainsi, les PSC primates peuvent être congelées sous trois différentes formes : en agrégats (« *Clumps*»), en cellules adhérentes (« *adherent cells* ») ou en cellules dissociées ou dites en suspension. Les deux premières méthodes sont moins efficaces et risquent par ailleurs de ne **pas être reproductibles** à cause de la **taille hétérogène des amas**. La dernière méthode en cellules dissociées a permis **d'augmenter les taux de viabilité**, grâce notamment à **l'ajout de protéines** dans le milieu de congélation et de décongélation. Par ailleurs, la cryoconservation étant liée à la production de ROS, **l'ajout d'antioxydants** est nécessaire afin de limiter les dommages liés aux radicaux libres. Enfin, d'autres composants peuvent être ajoutés dans le milieu de congélation pour améliorer la cryoconservation des PSC.

Dans ce paragraphe, nous aborderons les additifs des milieux de congélation pouvant améliorer les taux de survie.

3.1.1.1. Inhibiteurs ROCK pour la congélation en cellules dissociées

La cryoconservation des PSC en cellules dissociées provoque l'apoptose des cellules, et plus précisément une anoïkose ainsi qu'un **désordre de l'adhésion cellulaire**. Il a été montré chez les hPSC notamment, que ces différents phénomènes peuvent être atténués **grâce à l'ajout d'inhibiteurs ROCK** dans les milieux de congélation [365].

Les inhibiteurs ROCK, tels que Y-27632, HA-1077 (Fasudil) ou encore Pinacidil [366], sont des inhibiteurs de la protéine kinase Rho (ROCK pour 'RhO-associated Coiled coil protein Kinase'). Cette protéine kinase ROCK **régule le développement** et la **prolifération cellulaires**, **l'adhésion**, le **métabolisme** et **l'apoptose** par l'intermédiaire du contrôle de la contraction cellulaire et de l'assemblage du cytosquelette d'actine [367]. ROCK active ainsi la cascade de signalisation des caspases et l'apoptose cellulaire [368].

Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer le mécanisme d'action des inhibiteurs ROCK. Selon Ichikawa [369], l'apoptose cellulaire lors de la cryoconservation est principalement induite par l'activation de la caspase-3, elle-même activée par les caspases-8 et -10. Ces caspases-8 et -10 sont activées suite à la sur-régulation des voies du facteur de croissance (TGF)-beta et de l'interleukine

(IL)-1beta ainsi que de leur récepteur ACVR1C et IL-1R, provoquée par la cryoconservation. L'inhibiteur Y-27632 **inactiverait alors les caspases** et donc **diminuerait l'apparition d'apoptose cellulaire** chez les hESC après cryoconservation [369]. D'autres inhibiteurs de l'apoptose, tels que l'inhibiteur caspase Z-VAS-VMK et l'inhibiteur p53 pifithrin- μ (en association avec Y-27632) ont permis de réduire l'apoptose chez les hPSC [370,371].

Plusieurs études montrent que les cellules subissent plus précisément une anoïkose, un sous-type d'apoptose, **entraînant une perte ou un déséquilibre au niveau de l'adhésion entre les cellules** ou entre les cellules et la matrice extracellulaire [372–374]. La famille des Bcl-2, la caspase-3 et la voie de Fas sont connues pour être impliqués dans la cascade d'évènements cellulaire menant à l'anoïkose [375]. Pour éviter l'anoïkose, il faut donc protéger les jonctions entre cellules et l'adhésion des cellules à l'ECM. Les inhibiteurs ROCK n'agiraient donc pas directement sur les voies de l'apoptose ou l'anoïkose. Ils **amélioreraient les interactions cellule-cellule**, par la **modulation des cadhérines et des jonctions communicantes**. De plus, ils **augmenteraient les propriétés d'adhésion des cellules** en les rendant moins sensibles à leur environnement **leur permettant de s'agréger** [372]. En effet, il a été démontré que la perte d'adhésion des cellules, régulée par l'E-cadhérine, active la cascade de signalisation ROCK/myosine, entraînant ainsi une hyperactivation de la myosine, et donc l'apoptose [22,374].

Plusieurs études ont montré l'efficacité de l'inhibiteur ROCK Y-27632, à hauteur de 10 μ M, **sur la survie de hESC et hiPSC** congelées en cellules dissociées. Pour ces études, la congélation lente, en boîte Nalgène ou au congélateur programmable, a été utilisée. Martin-Ibañez et al. [358] ont observé une augmentation de la viabilité des hESC (50 % en présence de Y-27632 vs. 30 % en absence de Y-27632) lorsque l'inhibiteur ROCK Y-27632 est **ajouté non seulement dans le milieu de congélation** (composé de DMEM modifié et 10 % DMSO) mais **également dans le milieu de culture après décongélation**. Mollamohammadi et al. [355] ont réussi à obtenir 90 % de viabilité après ajout de l'inhibiteur Y-27632 dans le milieu de congélation (90 % FBS et 10 % DMSO) ainsi que dans le milieu de culture. Pour ces deux études, les cellules congelées avec l'inhibiteur ont présenté après décongélation un caryotype normal, l'expression de marqueurs de surface de pluripotence, une activité phosphatase alcaline ainsi que la formation de corps embryoides avec une

différenciation en couches des feuillettes embryonnaires. Enfin, l'ajout de l'inhibiteur peut également améliorer les taux de récupération de hESC et de hiPSC (quatre fois plus de colonies et colonies plus grandes) quand il est **uniquement ajouté après décongélation** dans le milieu de culture [361].

Un autre inhibiteur, le Pinacidil (N-cyano-N'-4-pyridinyl-N''-(1,2,2-triméthylpropyl) guanidine monohydrate), semble avoir les mêmes caractéristiques que l'inhibiteur Y-27632. Le Pinacidil est un vasodilatateur utilisé pour le traitement de l'hypertension. Barbaric et al. [366] ont pu montrer que cette molécule a les **mêmes effets sur les taux de survie des hESC après congélation – décongélation que l'inhibiteur Y-27632** habituellement utilisé. En effet, ce dernier ayant un coût plus élevé, le Pinacidil peut être une alternative pour améliorer la cryoconservation des hPSC.

Ces inhibiteurs peuvent être intéressants lorsque les **cellules doivent être congelées en cellules dissociées** plutôt qu'en amas ou agrégats de cellules, car ils **augmentent l'efficacité de la formation de colonie**. Néanmoins, ces inhibiteurs n'ont été testés que pour la congélation des PSC humaines. Chez le lapin, cette molécule permet d'améliorer la culture cellulaire de cellules souches/progénitrices limbiques [376]. Dans notre laboratoire, cette molécule a été testée sur des cellules souches pluripotentes de lapin (données non publiées). Après deux jours de traitement à l'inhibiteur, une augmentation significative de la croissance des cellules a été observée mais suite à ces deux jours de traitement, **les cellules meurent** (même si l'inhibiteur n'est ajouté qu'au moment des passages). Enfin, l'utilisation de cet inhibiteur peut modifier les caractéristiques des cellules après décongélation [127].

3.1.1.2. Antioxydants

La surproduction de ROS induite par la cryoconservation est largement décrite dans la littérature autant pour le règne animal (cellules germinales, PSC, etc.) [371,377,378] que pour le règne végétal [379]. En effet, dans le cas des cellules des mammifères, des ROS tels que H_2O_2 , l'anion super oxyde ou le radical hydroxyle, sont produits en réponse à des stimuli extérieurs. Si le niveau intracellulaire de ROS dépasse le niveau de capacité antioxydante de la cellule, alors cette dernière entre en apoptose. Xu et al., [371] ont observé que la cryoconservation provoque une cascade de changements osmotiques, métaboliques et structuraux de la cellule. Les

cellules sont alors **plus exposées au stress oxydatif**, ce qui **induit** une perte de cytochrome C des mitochondries inter-membranaires et donc une **apoptose**.

Des « piègeurs » de radicaux libres, les antioxydants, sont donc nécessaires pour protéger les cellules d'un stress oxydatif précoce. Pour la culture des PSC, un antioxydant est largement utilisé dans les milieux de culture : le β -mercaptoéthanol. Cependant, afin de contrebalancer la production supplémentaire de ROS induite par la congélation, certains auteurs ont testé l'ajout de différents antioxydants au sein des milieux de congélation. L'ajout de 100 μ M de **glutathione** dans le milieu de congélation (milieu DMEM, 10 % DMSO, 10 % EG, 10 % FBS) ainsi que dans le milieu de décongélation permet de réduire significativement le niveau de ROS et d'améliorer la viabilité de mESC [380]. De même, le **mannitol**, ainsi que la **vitamine E** (ou Trolox, son analogue) ont des **propriétés anti-oxydantes pouvant améliorer l'efficacité de cryoconservation** [22].

3.1.1.3. Autres additifs

D'autres additifs peuvent être utilisés pour améliorer la cryoconservation des PSC. En effet, la ϵ -poly-L-lysine est une protéine ayant des propriétés « **antifreeze** » permettant de **diminuer le risque de cristallisation**. Elle a pu être utilisée comme alternative au cryoprotecteur DMSO pour congeler des cellules souches mésenchymateuses de rat [381]. Également, une protéine dérivée du ver à soie, la séricine, en association avec du maltose, peut être utilisée comme un **substitut aux produits d'origine animale** [382]. Dans cette étude, la protéine a permis d'augmenter la capacité d'adhésion des hépatocytes humains. En effet, le milieu de congélation composé de DMEM supplémenté de 10 % de DMSO, 1 % de séricine et 0,1 mol/L de maltose, a permis d'obtenir 42 % de viabilité (vs. 29 % sans séricine et maltose) et 51 % de capacité d'attachement des cellules (vs. 20 % sans séricine et maltose) [382].

3.1.2. Alternatives à la formule 10 % de DMSO

Le DMSO est le cryoprotecteur le plus utilisé pour la congélation de PSC. Malgré cela, le DMSO est connu pour sa **toxicité**, qui dépend du temps, de la température et de la concentration. Cette toxicité touche non seulement la cellule mais également des patients dans le cadre de l'utilisation de cellules

hématopoïétiques décongelées et transférées par exemple. Dans ce cas, des **résidus de DMSO** peuvent entraîner des **effets indésirables** tels que des maux de têtes, des nausées ou des diarrhées [73,75,76,383]. Iwatani et al. [362] ont montré que le DMSO peut également entraîner des **modifications épigénétiques** au sein de corps embryoïdes de souris. De plus, une **différenciation** [384] et une **diminution de la production du gène de pluripotence Oct4** [363] sont des phénomènes observés lors de l'utilisation du DMSO dans le milieu de congélation. Une solution à l'élimination du DMSO est le lavage des cellules avant transfusion [23]. Une étude a même montré que des cellules PBPC (*Peripheral Blood Progenitor Cells* ; cellules souche/progénitrices hématopoïétiques) pouvaient être congelées dans 5 % de DMSO au lieu des 10% couramment utilisés, diminuant ainsi de moitié la concentration en cryoprotecteur [385]. Par conséquent, plusieurs études proposent des alternatives à l'utilisation du DMSO ou à sa concentration couramment utilisée de 10 %.

L'utilisation d'autres cryoprotecteurs que le DMSO, la combinaison du DMSO avec d'autres cryoprotecteurs ou directement la diminution en DMSO dans les milieux de congélation représentent des **alternatives** à l'utilisation de la formule « 10 % DMSO » dans les protocoles de cryoconservation de PSC.

Katkov et al. [364] ont observé que l'EG était moins toxique mais tout aussi efficace que le DMSO pour la congélation de hiPSC. En effet, en expérimentant deux méthodes de congélation (cellules en « *clumps* » ou cellules dissociées) l'EG a permis d'obtenir le meilleur taux de récupération (environ 17 % et 50 % respectivement). De plus, grâce à un protocole d'ajout du milieu de congélation par étapes, le taux de récupération atteint 63 %. Une autre équipe [127,386] a testé la **combinaison de l'EG** (40 %) et **du PEG** (10 %) lors de la vitrification de hESC et hiPSC dans une solution sans produits d'origine animale (milieu de congélation composé de DMEM/F12, de KOSR et d'Euro Collins, produit à base de dextran et de sels). Ils ont pu obtenir 23 % de taux de récupération pour les hESC et environ 30 % de taux de récupération pour les hiPSC vs. 0,4 % (hESC) et 18 – 19 % (hiPSC) avec du DMSO. Néanmoins, leur première étude sur les hESC est à considérer avec précaution, car la vitrification a été réalisée avec une solution « contrôle » de congélation classique, c'est-à-dire avec seulement 10 % de DMSO [386]. Il est donc évident d'observer un faible taux de survie car la vitrification avec une concentration

faible en cryoprotecteur ainsi que l'utilisation d'un seul cryoprotecteur sont forcément délétères pour les cellules. Leur deuxième étude sur les hiPSC cependant a permis la comparaison de solutions semblables : une solution commerciale « contrôle » composée de 14 % de DMSO et de 22 % de PEG et une solution composée de 40 % d'EG et 10 % PEG [127]. Malgré une différence non significative entre les deux milieux de congélation, il est ainsi possible de conclure à l'efficacité de l'EG et du PEG en remplacement du DMSO.

D'autres études portent sur l'ajout de polyampholytes, plus précisément la 3-poly-L-lysine, dans un milieu de vitrification ou de congélation [387]. En effet, ce composant, ayant des propriétés similaires aux protéines « *anti-freeze* » [381,388] a été utilisé en remplacement du DMSO sur des fibroblastes de souris (provenant de tissu adipeux) et des cellules mésenchymateuses de moelle osseuse de rat [381] et en combinaison avec de l'EG et du saccharose pour des hiPSC [389] et des hESC [128]. Ces dernières ont été vitrifiées dans des solutions composées de 6.5 M EG, 0.7 M saccharose et 10 % poly-L-lysine carboxylées, en absence de sérums, dans du milieu de culture DMEM/F12. Matsumura et al. [387] montrent que la poly-L-lysine permet une inhibition de la re-cristallisation, en comparaison avec d'autres cryoprotecteurs ou composants (BSA, PEG, acide polyacrylique), et ce en utilisant une platine *cryostage* Linkam. Cette solution de vitrification permet alors d'obtenir des taux de récupération de 45 % environ chez les hiPSC et de maintenir leur état de pluripotence après dévitrification [389]. Ota et al. [128] ont également testé ce milieu chez les hESC. Malgré un faible taux d'attachement des colonies (4 et 15 colonies après un et deux jours de culture), ce milieu reste meilleur qu'un milieu composé de 2 M DMSO, 1 M d'acétamide et 3 M PEG (0.5 et 7.5 colonies après un et deux jours de culture). De plus, leur état de pluripotence est maintenu.

Certains auteurs ont testé le tréhalose comme cryoprotecteur, en complément du DMSO [39,40]. Le tréhalose étant un cryoprotecteur non pénétrant, Ji et al. [39] ont exposé des hESC au tréhalose pendant 24h ou 48h (35 mM de tréhalose dans du milieu conditionné avec du bFGF (CM/F+), avant de les congeler en cellules adhérentes sur Matrigel dans le milieu de congélation (10 % de DMSO, FBS, CM/F+). Ils ont pu observer une augmentation du nombre de colonies adhérentes dès 24h d'exposition au tréhalose, quand le milieu de congélation est composé de plus de 50% de FBS. Cependant, dans cette étude, le tréhalose ne rentre pas

directement dans la composition du milieu de congélation et n'agit donc peut-être pas sur les hESC lors de la descente en température. Wu et al. [40] ont quant à eux utilisé le tréhalose dans le milieu de congélation. Les hESC ont été congelées (congélation lente 1°C/min) en « *clumps* » dans un milieu comprenant 90 % KOSR, 10 % DMSO et 0,2 mol/L de tréhalose. Ils ont pu observer un taux de récupération de 37 % vs. 15 % avec la méthode conventionnelle (sans tréhalose). De plus, en ajoutant du tréhalose en quantité décroissante dans le milieu de décongélation (d'abord 0,2 mol/L, centrifugation puis 0,1 mol/L, puis milieu standard après 24h), le taux de récupération atteint 48 %. Ces deux études montrent ainsi l'effet bénéfique du tréhalose comme cryoprotecteur non pénétrant, en combinaison avec le DMSO.

D'autres études ont d'ailleurs pu montrer qu'une diminution en DMSO pouvait être utilisée en association avec d'autres cryoprotecteurs, cette fois-ci pénétrants : c'est le cas du PEG et de l'EG. En effet, Xu et al. [390] ont testé la combinaison 7,5 % de DMSO + 2,5 % de PEG dans le milieu de congélation pour hESC avec présence ou non de l'inhibiteur ROCK. Ils ont pu observer une amélioration significative en taux de récupération avec cette combinaison en présence ou non de l'inhibiteur. Ce taux est augmenté quand l'inhibiteur ROCK ainsi que l'inhibiteur p54 sont ajoutés dans le milieu de culture après décongélation. Par ailleurs, la production de l'anion super oxyde (marquage au Dihydroéthidine) est nettement diminuée avec cette combinaison, en comparaison avec 10 % de DMSO. Cependant, dans le cas de mESC, la congélation lente dans un milieu synthétique comprenant 8 % de PEG et 2 % de DMSO ne permet d'obtenir que 25 % de viabilité [353]. Dans une autre étude, le DMSO peut être diminué jusqu'à 5 % si l'EG est ajouté à une concentration de 10 % [391]. En effet, la combinaison DMEM/F12 + 50 % FBS + 5 % DMSO + 10 % EG permet d'obtenir un taux de survie de 30 % vs. 1 % avec 10% de DMSO seul, 11 % avec 5 % de DMSO seul et 4,7 % avec 5 % de DMSO et 5 % d'EG. De plus, après décongélation, les hESC, congelées dans cette condition optimale, ont pu maintenir leurs caractéristiques de pluripotence (activité phosphatase alcaline, marqueurs de pluripotence, formation de corps embryoïdes). Par ailleurs, Baran et Ware [357] ont montré que les taux de survie sont meilleurs quand des ESC de Macaque rhésus sont congelés dans 5% de DMSO et 5 % d'EG (77 %), ou 10 % de DMSO (90 %). Les rhESC congelées dans 10 % ou 20 % d'EG présentent des taux de survie plus faibles avec respectivement 60 % et 39 %. L'ajout de l'EG ou du PEG

permet ainsi de diminuer la concentration en DMSO dans les milieux de congélation des PSC de primates (humain et rhesus).

Nous pouvons nous demander alors si une diminution en DMSO sans autres cryoprotecteurs peut permettre d'obtenir des taux de survie satisfaisants. Nous avons pu voir que **5 % DMSO** améliorait les taux de survie (11 %), comparé à 10 % de DMSO mais qu'avec la **combinaison de 5 % de DMSO et 10 % d'EG**, ce taux atteignait 30 % [391]. Sart et al. [353] ont essayé de diminuer la **concentration en DMSO jusqu'à 2 %** dans un milieu sans sérums. Ils ont observé que le taux de survie des mESC est comparable entre les concentrations 2 %, 5 % et 10 % de DMSO, après décongélation. De plus, aucune différence significative n'est observée entre ces conditions et le milieu conventionnel (90 % FBS + 10 % DMSO). Néanmoins, après deux jours de culture, la viabilité chute pour les conditions 2 % et 5 % de DMSO. Dans le même sens, le taux de croissance diminue avec la concentration en DMSO. Enfin, Lin et al. [360] ont testé trois méthodes de congélation et trois concentrations de DMSO sur des hESC. Ils ont conclu, grâce aux taux d'attachement (nombre de colonies positives à la phosphatase alcaline après sept jours, divisé par le nombre total de colonies après décongélation), que l'utilisation de **7,5 % de DMSO** est la méthode optimale. Les hESC, décongelées le premier jour avec l'inhibiteur ROCK, ont pu exprimer les gènes de pluripotence, se différencier dans les trois feuillets embryonnaires et maintenir un caryotype normal.

La congélation de PSC ne s'effectue donc pas forcément dans 10 % de DMSO. Il est essentiel d'établir quel type de cryoprotecteur est le moins toxique pour les PSC à température ambiante (lors de la dilution) et le plus efficace lors de la descente en température.

3.1.3. Remplacement des produits d'origine animale

3.1.3.1. Produits d'origine animale utilisés pour les PSC : les sérums

Il existe différents types de sérums et les plus utilisés pour la congélation de PSC sont :

- le **sérum bovin fœtal** (*foetal bovine serum*, FBS), également appelé le sérum de veau fœtal (*foetal calf serum*, FCS), collecté sur des vaches gestantes ;
- le **sérum de nouveau-né bovin** (*new born calf serum*, NCS), collecté sur des veaux de moins de 14 jours ;
- l'**albumine de sérum bovin** (*bovine serum albumin*, BSA), extrait du sérum bovin (protéine du plasma prédominante chez les mammifères) ;
- l'albumine de sérum humain (*human serum albumin*, HSA).

Les sérums sont composés principalement de facteurs de croissance, d'hormones, de carbohydrates, d'acides aminés, de protéines (telles que l'albumine) et de vitamines [392,393]. La présence de sérum dans le milieu de culture et/ou le milieu de congélation permet **d'améliorer la prolifération cellulaire**, le **taux de viabilité après congélation-décongélation** [394], **l'auto-renouvellement des PSC** et la **régulation du pH** [395].

Les sérums d'origine animale ainsi que d'origine humaine sont **variables selon les fournisseurs et même selon les lots d'un même fournisseur**, ce qui a pour conséquence des résultats variables après décongélation, en plus de la variabilité liée à l'échantillon. De plus, les risques de contamination sont importants notamment pour les applications cliniques en médecine régénérative. Ainsi, afin d'améliorer la qualité des échantillons cryoconservés et afin de réduire les coûts (dus aux sérums en eux-mêmes mais également liés aux pertes de la qualité des échantillons), **l'utilisation de sérum est à proscrire**.

3.1.3.2. Milieux dits « synthétiques » ou « xeno-free »

La plupart des milieux synthétiques, dits « chimiquement définis » ou « *xeno-free* », sont des **milieux commerciaux**, présents sur le marché mondial pour la conservation de cellules souches (adultes, mésenchymateuses, etc.). Certains

milieux sont utilisés comme milieu de culture (le cryoprotecteur est ajouté extemporanément), d'autres sont prêts à l'emploi (le cryoprotecteur est inclus dans le milieu) ou les deux versions sont proposées par le fabricant. Parmi les milieux commerciaux, nous pouvons citer CryoStor® (BioLife Solutions, États-Unis) et plus particulièrement CryoStor® CS10 contenant 10 % de DMSO, STEM-CELLBANKER® (amsbio, États-Unis), EuroCollins (Fresenius AG, Allemagne), HypoThermosol™ FRS (BioLife Solutions, États-Unis), mFre-SR™ (STEMCELL Technologies, Canada), TeSR-E8 (STEMCELL Technologies, Canada), StemCell Keep™ et DAP (Bioverde, Japon) (Tableau 5).

Afin d'éviter des contaminations zoonotiques, le sérum humain et l'albumine de sérum humain ont permis de substituer les sérums d'origine animale. En effet, Richards et al. [354] ont comparé plusieurs méthodes de vitrification (paillettes d'embryons fermées vs. Open Pulled Straw [OPS], stockage dans azote liquide vs. vapeurs d'azote) et plusieurs sérums (FBS ou HSA). Toutes les conditions ont permis d'obtenir entre 75 et 88 % de survie, avec plus de 50 % de cellules indifférenciées. La vitrification dans des solutions contenant de la HSA est ainsi possible. Cependant, **l'utilisation des sérums humains reste onéreuse** et elle engendre surtout un **risque non négligeable de transmission de pathogènes humains**.

Tableau 5. Milieux synthétiques commerciaux utilisés pour la congélation de cellules souches pluripotentes (comme milieu de base ou milieu prêt à l'emploi).

Nom commercial	Fournisseur	Composition	Références
CryoStor® CS10	BioLife Solutions	Dextran-40, saccharose, mannitol, glutathione 10 % DMSO	[353,396]
TeSR-E8	STEMCELL Technologies	Non divulguée, 10 % DMSO à ajouter en extemporané	[397]
STEM-CELLBANKER®	amsbio	Solution tampon phosphate, polymère de haut poids moléculaire (non divulgué), glucose, 10 % de DMSO	[398,399]
EuroCollins	Fresenius AG	34,95 g/l dextrose, 7,3 g/l K ₂ HPO ₄ , 2,04 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,12 g/l KCl, and 0,84 g/l NaHCO ₃	[127,386]
HypoThermosol™ FRS	BioLife Solutions	Sucrose, mannitol, 6 % dextran-40, Glutathione, Trolox, adenosine, HEPES, ions (Mg ²⁺ , Cl ⁻ , K ⁺ , etc.), Lactobionate	[353]
StemCell Keep™	Bioverde	Carboxylated 3-poly-L-lysine, 6,5 M éthylène glycol, 0,7 M saccharose	[128]
DAP	Bioverde	2 M DMSO, 1 M acétamide, 3 M PEG	[128,400]

Sart et al. [353] ont pu comparer **deux milieux synthétiques** (HypoThermosol FRS [HTS-FRS] vs. CryoStor® CS10) et **plusieurs concentrations de DMSO** pour la congélation de mESC. Les chercheurs ont d'abord testé différentes concentrations (2 %, 5 % et 10 %) de DMSO dans la solution HTS-FRS. Aucune différence significative n'est observée pour la viabilité entre les concentrations de DMSO (environ 90 % de viabilité) et la solution témoin (FBS+10% DMSO). Cependant, après deux jours, la viabilité chute à 40 % et 10 % pour les concentrations 5 % et 2 % de DMSO respectivement. Dans le même sens, le taux de croissance au passage P1 diminue avec la réduction de la concentration de DMSO. Ainsi, d'après cette étude, il est possible de **remplacer** le FBS **par le HTS-FRS** mais il est indispensable d'ajouter 10 % de DMSO. Ils ont également pu montrer qu'une congélation lente dans HTS-FRS et dans CryoStor®, tous deux contenant 10 % de DMSO, permettait d'obtenir 88 % de viabilité après décongélation. Le milieu CryoStor® est également utilisé avec succès pour la cryoconservation de cellules autres que pluripotentes, telles que des cardiomyocytes générées à partir de hESC

[401]. Le milieu STEM-CELLBANKER a également permis d'obtenir de bons taux de viabilité après décongélation pour des hESC, hiPSC [398] et miPSC [399]. STEMCELL-BANKER est une solution tampon phosphate intégrant un **polymère de haut poids moléculaire** (non divulgué), du glucose et **10 % de DMSO**. La viabilité post-décongélation atteint 90 % pour les hESC et hiPSC (stockées dans l'azote liquide) vs. 50 % avec du sérum et 40 % pour les mESC (stockées à -80°C).

Li and Chen [397] proposent un protocole de congélation lente de hESC avec un milieu « *xeno-free* » TeSR-E8™ dont la composition est non divulguée auquel doit être ajouté **10 % DMSO final**. C'est un milieu qui permet normalement de maintenir les cellules en culture. Le fabricant conseille de congeler les cellules maintenues en TeSR-E8™, dans le CryoStor® (cellules congelées sous forme d'agrégats : en *clumps* ») ou le milieu mFre-SR™ (sous forme de cellules dissociées). Enfin, comme vu précédemment, Nishigaki et al. [127,386] ont pu vitrifier des hESC et hiPSC dans un milieu dit « synthétique » composé de EuroCollins (à base de dextran et de sels) permettant d'obtenir environ 25 % de taux de récupération. Un nouveau milieu de vitrification (StemCell Keep™, Bioverde) est intéressant pour congeler les cellules souches adultes et depuis quelques années a fait ses preuves sur les hPSC [128,389]. Ce milieu comporte de la poly-L-lysine, qui semble avoir les mêmes propriétés que les protéines *anti-freeze* [381]. Ce milieu a également la particularité de n'être composé **ni de DMSO, ni de sérum**. Malgré des taux d'attachements faibles, les hESC [128] et hiPSC [389] ont pu maintenir leur état de pluripotence après vitrification (formation des trois feuilletts embryonnaires, caryotype normal et expression des gènes de pluripotence).

Ainsi, les milieux commerciaux présentent l'avantage d'être **stériles, testés en endotoxines, par lot** dans le cas des BFP (Bonnes Pratiques de Fabrication) ou GMP (Good Methods of Production) [23,204]. De plus, certains de ces milieux commerciaux ont une composition en sels et sucres similaires aux valeurs physiologiques et donc peuvent être **utilisés dans le cadre de thérapies cellulaires**, d'un **point de vue réglementaire**. Les milieux CryoStor® et HypoThermosol® HTS-FRS ont fait l'objet d'une **étude préclinique** prouvant leur innocuité (aucune mortalité liée aux milieux, ni prise de poids sur 7 jours et organes normaux après autopsie) lors de leur injection en intraveineuse chez des souris [402]. Certains de ces milieux

commerciaux sont alors de **bons candidats** pour garantir l'assurance de la qualité des biobanques.

Cependant, des inconvénients peuvent subsister concernant ces produits. En effet, la plupart des milieux de congélation dits synthétiques sur le marché sont à utilisation *in vitro* ou « **Recherche et Développement** » **uniquement**. C'est le cas par exemple de HTS-FRS dont l'utilisation en clinique est proscrite. En effet, c'est un produit qui n'est pas utilisé en Europe dans les cryobanques de cellules souches à but de thérapie cellulaire car sa concentration en potassium est 10 fois plus importante que la valeur physiologique. Par ailleurs, la composition partiellement connue ou totalement non divulguée d'un produit commercial peut entraîner un risque quant à son utilisation clinique par exemple. En effet, les produits commerciaux cités ci-dessus garantissent qu'ils sont synthétiques. Néanmoins, la plupart (CryoStor®, HTS-FRS, etc.) contiennent des composants qui peuvent avoir une composition non strictement chimiquement définie (dextran ou source de vitamine E). Il est ainsi important de déterminer le type d'utilisation des cellules après cryoconservation en considérant le prix, la sécurité mais aussi la praticité des milieux et des systèmes de refroidissement.

3.2. Cinétiques de refroidissement

Comme vu précédemment, les PSC humaines et de primates non humains peuvent être congelées sous trois formes : en *clumps*, en cellules adhérentes ou en cellules dissociées. Ces cellules ont en effet la particularité de ne pas supporter la dissociation chimique et sont donc difficilement congelables en cellules dissociées. Dans notre cas, les PSC murines et cunicoles pouvant être dissociées chimiquement, nous évoquerons principalement les méthodes de congélation impliquant des cellules dissociées.

Deux principales méthodes de refroidissement sont décrites dans la littérature : la vitrification et la congélation lente. La vitrification a été une alternative face aux mauvais résultats résultant de la congélation lente des PSC humaines et de primates non humains. En effet, la vitrification a permis de conserver les **hPSC sous forme de clumpset** donc cette méthode ne nécessite pas forcément la dissociation chimique, étape néfaste pour ces cellules. Cependant, nous verrons que la congélation lente reste un bon outil pour les PSC.

3.2.1. Vitrification

La vitrification ayant fait ses preuves sur les embryons [403–405], cette méthode a été adoptée pour conserver les PSC (principalement les PSC humaines et de primates non humains), permettant ainsi de diminuer les dommages causés.

3.2.1.1. Les méthodes de vitrification

Différentes méthodes de vitrification sont décrites dans la littérature. Ces méthodes sont reprises des procédures de vitrification des embryons et des ovocytes de mammifères, employant des contenants tels que les **Open Pulled Straw** (OPS – méthode standard, [406,407]) ou les **paillettes soudées** [408,409] et les **paillettes coupées insérées dans une autre paillette d'embryon** [410]. Certaines études ont réalisé des vitrifications de PSC **dans des cryotubes** [127,128,386,389,411]. Enfin, d'autres méthodes ont été développées spécialement pour les PSC humaines (« *bulk vitrification* », [412,413]). Les principaux résultats des différentes méthodes de vitrification sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 – Principaux résultats en vitrification chez les PSC.

Type cellulaire	Méthode de vitrification	Etat cellulaire	Solution de vitrification	Taux de récupération	Références
hESC	OPS	<i>Clumps</i>	20 % DMSO, 20 % EG, saccharose dans du DMEM et 20% FBS	80 – 100 % <i>clumps</i>	[352,359,414]
hESC	Paillette soudée	<i>Clumps</i>	20 % DMSO, 20 % EG, saccharose, HSA	75 – 88 %	[354]
Cynomolgus ESC	200 µl – cryotube plongé dans LN2	Cellules dissociées	2 M DMSO, 1 M acétamide, 3 M PEG dans milieu de culture	7 %	[400]
hESC	Bulk	<i>Clumps</i>	20 % DMSO, 20 % EG, saccharose, SR	95 – 99 %	[412,413]
hESC - hiPSC	200 µl – cryotube plongé dans LN2	Cellules dissociées	40 % EG, 10 % PEG, Euro-Collins	20 – 30 %	[127,386]
hiPSC	200 µl – cryotube plongé dans LN2	<i>Clumps</i>	6.5 M EG, 0.75 M saccharose dans DMEM/F12	47 %	[389]
hESC	Lamelle Thermanox™ plongée dans LN2	Adhérentes	20 % DMSO, 20 % EG, 300 mM saccharose dans milieu de culture	89 %	[415]
hESC	200 µl – cryotube plongé dans LN2	<i>Clumps</i>	StemCell Keep™	15 colonies recovered after two days	[128]

Bulk : système de vitrification par tamis cellulaire ; *Clumps* : agrégat, colonies de cellules ; DMEM : *Dulbecco's modified eagle medium* ; DMSO: dimethyl sulfoxide; EG: éthylène glycol; FBS: *fœtal bovine serum*; hESC: *human embryonic stem cell*; hiPSC : *human induced pluripotent stem cell*; HSA : *human serum albumin*; OPS : *Open-Pulled Straw* ; PEG: polyéthylène glycol ; SR : *serum replacement*.

La vitrification est généralement réalisée en plongeant les cellules (PSC, ovocytes, embryons, etc.) dans des **bains successifs** de concentration croissante en **cryoprotecteurs**. Le temps d'exposition des cellules dans le dernier bain est faible (30 secondes à 60 secondes) et dû notamment à la toxicité des cryoprotecteurs présents en concentration élevée. Les cellules sont ainsi suspendues dans le dernier bain, dans un volume très faible (environ 20 µL – solution finale contenant 20 % DMSO, 20 % EG et 0,5 mol/L saccharose) puis plongées dans l'azote liquide afin de les vitrifier, c'est-à-dire de permettre l'absence de cristaux de glace. En reprenant ainsi les protocoles de vitrification des embryons et ovocytes humains [406], le **taux de survie** des PSC humaines est **amélioré** par rapport aux méthodes de congélation lente. En effet, quels que soient la méthode de vitrification utilisée (OPS, paillette dans paillette, cryotubes) et l'état cellulaire (*clumps* ou cellules dissociées), les auteurs montrent des taux de récupération de 70 – 89 % en vitrification contre 20 – 50 % en congélation lente [128,352,354,359,389,414]. Néanmoins, deux études montrent des taux de récupération qui chutent à 20 % (hESC) et 30 % (hiPSC) quand les cellules sont vitrifiées en cellules dissociées dans des cryotubes [127,386]. Ce faible taux est sûrement lié à deux facteurs :

- l'utilisation de la dissociation chimique qui cause des dommages connus aux hPSC ;
- et la re-suspension des cellules dans un volume de 200 µL, trop important pour permettre une réelle vitrification.

Cependant, pour ce dernier point, les études vitrifiant des cellules dissociées dans un volume de 200 µL observent, grâce à l'utilisation du DSC, qu'il existe bien une vitrification et un réchauffement adéquat (absence de re-cristallisation) avec les solutions de vitrification utilisées [127,128].

Afin d'éviter une re-cristallisation, la cinétique de réchauffement doit être élevée. Les cellules sont donc plongées directement de l'azote liquide dans du milieu de culture, contenant du saccharose, pré-chauffé (sur plaque chauffante) à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées dans des bains de concentration décroissante en saccharose (0,2 mol/L puis 0,1 mol/L et enfin sans saccharose) afin d'éviter un choc osmotique.

La vitrification semble alors une **alternative intéressante** à la congélation lente. Cependant, cette méthode de refroidissement en l'absence de cristaux présente plusieurs limites. Tout d'abord, la vitrification reste une méthode **difficile à maîtriser**, présentant ainsi des résultats variables et dépendants des opérateurs [416,417]. Également, les solutions utilisées sont très concentrées en cryoprotecteurs (supérieur à 40 % v/v) rendant cette **technique toxique** pour les cellules. C'est pourquoi les cellules doivent être plongées dans ces solutions pendant moins d'une minute. A cause de ce temps d'incubation très court, la vitrification est une technique délicate et **difficile à standardiser**. De plus, la conservation à long terme des cellules dans des volumes faibles augmente le **risque de réchauffement involontaire** lors de manipulations des échantillons dans les cuves d'azote liquide [418]. Par ailleurs, **l'application industrielle** de cette méthode est **difficile** à mettre en place car elle ne permet pas la production et la conservation de PSC en larges volumes (pour les bio-banques et bioréacteurs par exemple). Enfin et surtout, la vitrification pose un réel **problème sanitaire** lié à l'exposition directe des cellules avec l'azote liquide.

3.2.1.2. Les innovations proposées pour contrer les limites de la vitrification

Dans cette partie vont être présentées des solutions décrites dans la littérature, afin de résoudre les deux principales limites de la vitrification :

- l'impossibilité d'utilisation à grande échelle ;
- Le risque de contamination liée à l'exposition directe des cellules avec l'azote liquide.

- IMPOSSIBILITE D'UTILISATION A GRANDE ECHELLE

A l'heure actuelle, la vitrification des PSC n'est utilisée que dans les laboratoires car c'est une **méthode sensible** qui est **chronophage, dépendante des opérateurs** et donc **variable**. Il existe en effet beaucoup de facteurs de risque :

- le faible volume vitrifié peut jouer sur les cinétiques de refroidissement ;
- le temps très court et donc variable (quelques secondes) d'exposition des cellules aux cryoprotecteurs ;
- la méthode en elle-même de vitrification qui demande de l'expérience et une réelle expertise.

Ainsi, certains chercheurs ont tenté de résoudre ces problèmes en améliorant les protocoles de vitrification. Li et al. [412,413] ont réussi à vitrifier de plus grandes quantités de *clumps* en une fois grâce à leur méthode de « *Bulk Vitrification* » (BV). Le principe est de passer les *clumps* en suspension à travers un *tamis cellulaire* en nylon de 70 μM . Les *clumps* inférieurs à 70 μm sont ainsi éliminés et donc exclus de la vitrification. Le tamis est ensuite plongé dans des boîtes de pétri contenant les deux bains successifs de solutions de vitrification (1^{er} bain : 10 % DMSO, 10 % EG ; 2^{ème} bain : 20 % DMSO, 20 % EG et 0,5 mol/L saccharose) pendant 60 secondes et 25 secondes respectivement et enfin dans l'azote liquide. Ce type de stockage permet de vitrifier *136 clumps en même temps* et par tamis vs. 5 – 20 *clumps/OPS* pour les méthodes OPS. Grâce à la méthode BV, un taux de survie de 94,3 % est atteint. Aucune différence significative n'est observée entre la méthode BV et la méthode standard de vitrification OPS. En 2011, les auteurs [413] améliorent leur protocole en plaçant directement le tamis au-dessus d'un *cryotube* permettant ainsi une *facilité de stockage des échantillons*.

Deux autres études portent sur la vitrification des PSC en cellules adhérentes. En effet, en ajoutant un volume faible d'une solution de vitrification mais suffisant pour recouvrir les cellules, Heng et al. [419] proposent d'utiliser des *plaques de culture détachables*, méthode basée sur les travaux de Ji et al. [39]. Beier et al. [415] obtiennent des taux de survie de 89 % (vs. 51 % pour la congélation lente) après vitrification de hESC sur des lamelles ThermanoxTM (NuncTM) modifiées. Leur protocole diffère néanmoins légèrement des autres protocoles de vitrification : les cellules sont plongées dans un premier bain (10 % DMSO, 10 % EG) pendant 60 secondes puis dans le second pendant 5 secondes seulement (20 % DMSO, 20 % EG, 300 mM saccharose) puis transférées dans les vapeurs d'azote (stockage à -130°C).

Une autre méthode pour vitrifier une plus grande quantité de cellules est *l'utilisation de cryotubes* (vitrification dans un *volume de 200 μL* vs. 1 ml en congélation lente). En effet, pour des applications cliniques, il est plus pratique d'utiliser des échantillons à plus larges volumes. C'est le cas des études de Fujioka et al. [400] et Ota et al. [128] sur des hESC. Malgré des études aux DSC pour montrer que les solutions utilisées permettent une vitrification adéquate, nous pouvons nous demander si ce n'est pas plutôt de la congélation ultra-rapide plutôt

que de la vitrification. Il semble en effet étonnant d'obtenir une cinétique de réchauffement de 2500°C/min avec un cryotube de 200 µL, même si le cryotube est plongé dans un milieu pré-chauffé (dont la température d'ailleurs n'est pas indiquée).

Même si ces méthodes permettent de vitrifier une plus grande quantité de PSC en même temps, il reste **impossible de les automatiser** et de les **industrialiser**. De plus, ces méthodes ne permettent pas de résoudre le problème de contamination liée à l'exposition directe des échantillons à l'azote liquide.

- **RISQUE DE CONTAMINATION DANS L'AZOTE LIQUIDE**

La transmission de pathogènes via l'azote liquide est très bien documentée [84]. Malgré la possibilité de stériliser l'azote liquide, il apparaît nécessaire d'utiliser des méthodes de stockage à long terme qui soient d'une qualité sanitaire irréprochable. Les solutions peuvent être diverses :

- utilisation de paillettes « fermées », similaires aux paillettes utilisées pour les spermatozoïdes [127,354] ;
- utilisation de cryotubes [127,128,386,387,389] ;
- utilisation de la méthode de vitrification « surface solide » [420,421].

La méthode des paillettes fermées (paillettes de 0,25 ml qui sont soudées à l'extrémité) est intéressante car autorisée par l'agence d'alimentation et de médicament américain (US Food and Drug Administration). Cette méthode permet d'atteindre les mêmes taux de survie que la méthode standard OPS (20 µL) [354]. Cependant, il reste toujours un risque de contamination sur les surfaces du dispositif ; c'est donc la méthode de la paillette insérée dans une paillette d'embryon qui paraît la plus sécurisée. Néanmoins, vu qu'il y a plus de surface, la **vitesse de refroidissement** risque de n'être pas **suffisamment élevée** pour atteindre la vitrification [422].

Une autre approche est l'utilisation des cryotubes [127], comme précédemment décrite. Cependant, malgré une mesure de leur cinétique de refroidissement à 150°C/min et les mesures du DSC montrant qu'ils atteignent une vitrification à cette cinétique, nous pouvons considérer qu'ils réalisent une congélation rapide, plutôt qu'une vitrification.

Une dernière solution est la méthode de la surface solide de vitrification. Le principe est de poser les cellules sur un bloc en acier, lui-même plongé de moitié dans l'azote liquide. Le bloc est alors à -196°C mais les cellules ne sont pas en contact direct avec l'azote liquide [420,421]. Cette technique est **commercialisée** et est largement utilisée pour la vitrification des embryons et des ovocytes de mammifères (Cryologic Pty. Ltd, Victoria, Australia).

Pour conclure, la vitrification reste un bon outil pour les laboratoires mais ne peut en aucun cas remplacer la congélation lente, pour une application en routine dans les biobanques. Il est donc important d'améliorer les protocoles de congélation lente.

3.2.2. Congélation lente

Suite aux différentes limites de la vitrification, plusieurs études ont porté sur l'optimisation de la congélation lente des PSC (Tableau 7). Pour atteindre une cinétique de refroidissement d'environ $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, descente en température optimale (Xu et al., 2012) pour la plupart des cellules souches, deux outils peuvent être utilisés :

- une enceinte contenant de l'isopropanol, par exemple « Mr Frosty™ » (Nalgène®). En plaçant cette enceinte dans un congélateur -80°C , la **cinétique de refroidissement** dans des tubes de 1 à 2 ml est **d'environ $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$** . Les échantillons sont ensuite plongés dans l'azote liquide.
- le congélateur programmable effectuant différentes cinétiques de refroidissement variant de **$0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à $45^{\circ}\text{C}/\text{min}$** .

Selon les laboratoires et si la congélation est réalisée sur le terrain, la première méthode (enceinte à placer dans un congélateur -80°C) peut être une alternative efficace au congélateur programmable. C'est le cas d'une étude où les auteurs ont souhaité développer un protocole de congélation pratique et simple pour les hESC [391], sans congélateur programmable (coûteux et pas toujours disponible dans les laboratoires). Un total de 100 *clumps* par cryotube de 2 ml ont été congelés grâce à une enceinte à isopropanol effectuant une cinétique de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ placée dans un congélateur -80°C . Les auteurs ont observé un taux de survie maximal de 30 % après décongélation à 37°C avec une solution composée de 50 % de FBS, 10 % EG

et 5 % DMSO. Par ailleurs, Ji et al. [39] n'ont observé aucune différence significative pour la congélation de cellules adhérentes dans des cryotubes de 1 ml, entre une enceinte à isopropanol et un congélateur programmable.

Tableau 7. Principaux résultats des différentes méthodes de congélation lente pour les PSC.

Type cellulaire	Méthode de congélation	État cellulaire	Solution de congélation	Taux de récupération	Références
hESC	Cryotube – Enceinte isopropanol puis congélateur programmable (1°C/min)	Adhérente	FBS, DMSO dans du milieu de culture	80 %	[39]
hESC	Cryotube – Enceinte isopropanol	<i>Clumps</i>	50 % de FBS, 10 % EG et 5 % DMSO	30 %	[391]
hESC	Paillette IMV – <i>Seeding</i> à -10°C – Congélateur programmable (1°C/min)	Cellules dissociées	25 % FBS, 10 % DMSO dans DMEM	80 %	[423]
rhESC	Paillette – <i>Seeding</i> à -10°C – Congélateur programmable (1°C/min)	<i>Clumps</i>	10 % DMSO dans DMEM supplémenté	90 – 98 %	[357]
hESC	Paillette – <i>Seeding</i> à -10°C – Congélateur programmable (0.5°C/min)	<i>Clumps</i>	10 % DMSO, 30 % FBS dans du DMEM	6 colonies sur 11 après 5 jours	[424]
hESC	Enceinte à isopropanol	<i>Clumps</i>	DMSO dans du milieu de culture	15 – 68 % (selon lignées)	[425]
hESC	Enceinte à isopropanol	<i>Clumps</i> sur micro-support	10 % DMSO, 30 % FBS dans du milieu de culture	Ratio de 1,5 (normalisées sur le nombre de cellules congelées)	[426]

hESC	Enceinte à isopropanol	Cellules dissociées puis <i>clumps</i> sur cassette	10 % DMSO, FBS	Ratio de 195 (normalisées sur le nombre de cellules congelées)	[427]
hESC	Paillette – Seeding à -7°C – Congélateur programmable (2°C/min)	<i>Clumps</i>	10 % DMSO dans du milieu de culture	53 %	[359]
hESC	Congélateur programmable ou Enceinte à isopropanol	<i>Clumps</i>	10 % DMSO dans du SR (par étapes)	~40 %	[428]
hESC	Microencapsulation et microsupport – Enceinte à isopropanol	<i>Clumps</i>	10 % DMSO dans du KOSR	71 %	[429]

Clumps : agrégats/colonies de cellules ; DMEM : *Dulbecco's modified eagle medium* ; DMSO : dimethyl sulfoxide ; EG : éthylène glycol ; FBS : *fetal bovine serum* ; hESC : *human embryonic stem cell* ; hiPSC : *human induced pluripotent stem cell* ; HSA : *human serum albumin* ; PEG : polyéthylène glycol ; rhESC : rhesus monkey ESC ; SR : *serum replacement*.

L'enceinte à isopropanol est **peu coûteuse en temps**, en **matériel** et en **azote**. Cependant, la cinétique n'est pas contrôlée dans ce type d'enceinte, ce qui pose un **risque de variabilité**. Il est donc nécessaire de congeler les PSC dans un congélateur programmable. L'état de l'art montre en effet une majorité d'articles proposant des protocoles en cinétique contrôlée, à l'aide d'un congélateur programmable [22,23].

En plus d'une cinétique contrôlée, le « *seeding* » permet d'induire et donc de **contrôler la cristallisation** lors de la descente en température. En se basant sur les travaux réalisés sur les embryons, plusieurs études ont porté sur l'effet du *seeding* avec différents protocoles proposés. En effectuant un ***seeding* à -10°C** sur des hESC (paillettes 0,25 ml, dans 10 % DMSO), tout en appliquant une **cinétique inférieure à 1°C/min**, Ware et al. [423] obtiennent 80 % de viabilité (décongélation à 22°C dans un bain-marie). Ce taux ne peut être obtenu que grâce à l'action de la cristallisation induite par *seeding*. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution car la décongélation est effectuée 5 minutes après que les paillettes soient plongées dans l'azote liquide et le test de viabilité n'est effectué qu'après trois jours de culture. Des résultats similaires ont été observés quand une **cinétique de 0,5°C/min** est appliquée, avec un ***seeding* à -10°C** [424]. Une note technique [357] a été publiée sur la congélation de rhESC en cluster. Le ***seeding* à -10°C** et une **cinétique de 1°C/min** permettent d'augmenter le taux de survie des cellules de 22 % (méthode sans *seeding*) à 90 % (solution de congélation contenant 10 % DMSO). Quant aux données de Li et al. [359], la cinétique de refroidissement appliquée à des hESC (congelées en paillettes de 0,25 ml, en *clumps*) est de **2°C/min jusqu'à -7°C**, température à laquelle le *seeding* est effectué. Les paillettes sont équilibrées pendant 10 minutes à cette température puis les cellules sont congelées à **0,3°C/min** de -7°C jusqu'à -36°C et **-20°C/min** jusqu'à -95°C. Avec cette méthode, les auteurs obtiennent 55 % de taux de récupération vs. 5 % en méthode conventionnelle (congélation en enceinte à isopropanol avec une solution contenant 10 % DMSO) et 95 % en vitrification en OPS.

Certains auteurs ont étudié l'effet de l'**addition des cryoprotecteurs** en plusieurs étapes (comparables aux bains successifs réalisés en vitrification ou en congélation lente des embryons). Valbuena et al. [425] ont en effet testé l'addition du DMSO en 4 étapes (1 ; 1,2 ; 1,5 et 2 mol/L) dans un milieu sans produits d'origine animale, pour la congélation lente de hESC (50-60 colonies/cryotube). Après dissociation mécanique ou enzymatique, les cellules sont centrifugées et re-suspendues dans 300 μ L de milieu hESC. Ensuite, 75 μ L de 1mol/L DMSO est ajouté et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Le même processus est effectué pour les 3 concentrations croissantes de DMSO (75 μ L à 1,2 mol/L DMSO ; 150 μ L à 1,5 mol/L DMSO et enfin 600 μ L à 2 mol/L). Un volume final de 1,2 ml est ainsi obtenu et transféré dans des cryotubes, qui sont placés dans un congélateur programmable à 4°C jusqu'à ce que le thermocouple indique 4°C au sein de l'échantillon. Une descente en température à **1°C/min est réalisée jusqu'à -10°C** où le *seeding* est effectué. Puis, jusqu'à -70°C, une **cinétique de 5°C/min** est appliquée. Cette méthode permet d'obtenir 41 % de taux de survie vs. 68 % quand une enceinte à isopropanol est utilisée. Dans cette étude, l'enceinte à isopropanol est donc plus efficace qu'une congélation contrôlée. Une étude similaire [428] montre qu'une congélation lente contrôlée de hESC (deux lignées) en deux étapes (5 % DMSO puis 10 % DMSO, dans du KOSR) permet d'améliorer les taux de survie (51 % et 32 %), comparés à une congélation en une étape (19 % et 14 %). Également, la méthode en deux étapes est meilleure en enceinte à (42 %) par rapport à la méthode en une étape (8 % et 4 %). Dans le cas de la congélation contrôlée, la cinétique de refroidissement est **de 1°C/min** jusqu'à -80°C et un ***seeding est réalisé à -7°C***. Dans ces deux précédentes études, les différentes lignées réagissent de manière très hétérogène à la congélation et il paraît nécessaire d'être prudent quant à la comparaison entre publications utilisant des lignées plus ou moins sensibles à la cryoconservation.

Dans le cas des PSC de primates, d'autres protocoles ont été élaborés pour la congélation en cellules adhérentes, permettant d'obtenir de meilleurs résultats qu'en cellules en suspension [39,426,427,429].

Ainsi, comme pour la congélation des embryons, la congélation lente est une méthode efficace pour les PSC si une induction de la cristallisation (*seeding*) est effectuée. Les résultats selon le type de congélation (contrôlée ou à -80°C) sont néanmoins différents en fonction des études et des lignées cellulaires.

Pour synthétiser, la cryoconservation de cellules souches pluripotentes est très **largement documentée chez les primates** et **essentiellement** chez l'homme. Les premières études en congélation lente sont décourageantes car elles sont basées sur des techniques employées pour la congélation de cellules souches adultes et cellules souches pluripotentes murines. La vitrification est une technique qui a permis d'augmenter les taux de récupération mais reste un outil à utiliser en laboratoire et qui ne peut être automatisé sur une ligne de production. La congélation lente reste donc la **méthode de référence** dans le monde, tout en étant la moins coûteuse (avec l'utilisation des enceintes à isopropanol). En travaillant sur les milieux de congélation, cette technique a ainsi permis d'obtenir des taux de viabilité acceptables de l'ordre de 50 %.

Pour ce type cellulaire, deux questionnements peuvent être soulevés lors de la caractérisation des cellules après congélation :

- l'effet « dilué » de la méthode de congélation lié à la **caractérisation** des cellules **plusieurs jours** après la décongélation ;
- l'impact de la congélation sur le « **destin cellulaire** » des cellules différenciées ; critère non évalué dans les études.

En effet, non seulement le taux de viabilité post-décongélation est important mais il faut aussi que ces cellules puissent adhérer à leur substrat, proliférer et maintenir leur état de pluripotence de manière homogène, après plusieurs jours de culture. Ainsi, il reste **difficile** de **comparer les différents protocoles** entre les études. D'une part, les lignées peuvent être très différentes (en termes de morphologie, de prolifération, de technique de dissociation, etc.) et d'autre part, la caractérisation de l'état de pluripotence de ces cellules est réalisée plusieurs jours après la décongélation : l'effet de la cryoconservation est donc en quelque sorte dilué [23].

Par ailleurs, toutes les études concentrent leur travail sur la **capacité des cellules à maintenir leur état de pluripotence** (marqueurs de pluripotence, caryotype normal, différenciation dans les trois feuillets embryonnaires, etc.). Cependant, aucune d'entre elles n'observe la **proportion des cellules à se différencier dans un lignage** plutôt qu'un autre [22]. En effet, dans le but de produire des cardiomyocytes

dérivés de hESC, il a été observé que le potentiel de différenciation des cellules est très variable selon les échantillons [430]. La **cryoconservation** pourrait alors exercer une pression sélective sur les cellules, influençant alors leur type de différenciation, autrement dit leur « destin cellulaire ». Il est bien entendu crucial d'évaluer la viabilité, ainsi que les marqueurs de pluripotence après décongélation. Cependant, il serait intéressant de comprendre et d'analyser le destin cellulaire des cellules qui se différencient après congélation-décongélation.

En conclusion, les cellules souches pluripotentes sont très différentes selon les espèces et doivent donc être considérées comme un modèle cellulaire distinct. Le modèle lapin étant intéressant aux vus de ses similitudes avec l'homme notamment en termes de développement embryonnaire, il paraît donc essentiel d'établir un protocole de congélation standardisé pour les rbPSC. En effet, à notre connaissance, aucune étude sur la cryoconservation de rbPSC n'a été relatée. C'est ce que nous verrons dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

Étude Expérimentale

L'utilisation de produits synthétiques et définis permet de diminuer le risque sanitaire et le risque de variabilité dûs à la composition du milieu de congélation. L'acide hyaluronique, présent dans les matrices extracellulaires et de nombreux tissus (notamment l'oviducte) [253,431,432], fait l'objet de plusieurs études pour la congélation d'embryons [257,395,433,434]. L'acide hyaluronique représente une **piste prometteuse** pour la congélation de sperme et de cellules souches pluripotentes mais **fait l'objet de trop peu d'études**. Depuis 2012, notre équipe a pu démontrer l'efficacité du CRYO3 en tant que substitut aux sérums pour la congélation d'embryon de vache produits *in vitro* et d'embryons de lapines [105,106]. Dans la continuité de cette expertise, nous nous sommes demandés si le CRYO3 pouvait remplacer le jaune d'œuf et le lait ou le sérum, présents dans les milieux de congélation de sperme ou de cellules souches pluripotentes. Dans cette étude, nous répondons à l'objectif suivant :

Substituer les POA par un milieu synthétique, le CRYO3, sur deux nouveaux modèles cellulaires :

- les spermatozoïdes ;
- les cellules souches pluripotentes.

Pour répondre à cet objectif, **quatre articles** dont un publié sont présentés dans cette étude expérimentale (Figure 17, Tableau 8).

Le modèle bovin est l'un des modèles choisis pour les spermatozoïdes car il représente une **espèce économique majeure** au niveau international pour laquelle les outils en biotechnologies de la reproduction sont indispensables à l'amélioration génétique. Par ailleurs, le modèle ovin est également étudié car la production et la distribution de paillettes ovines en France **n'est réalisée qu'avec du sperme frais**, ce qui limite les échanges internationaux de matériels biologiques.

À ce jour, aucune étude n'a porté sur la cryoconservation de cellules souches pluripotentes de lapin. C'est une espèce proche de l'homme au niveau de l'embryogénèse précoce et des PSC, elle représente ainsi un **bon modèle pour la mise au point des techniques de thérapie cellulaire humaine**. Étant donné qu'aucune donnée n'est disponible sur cette espèce, nous avons décidé d'inclure comme contrôle positif, l'espèce souris considérée comme le modèle de référence des PSC.

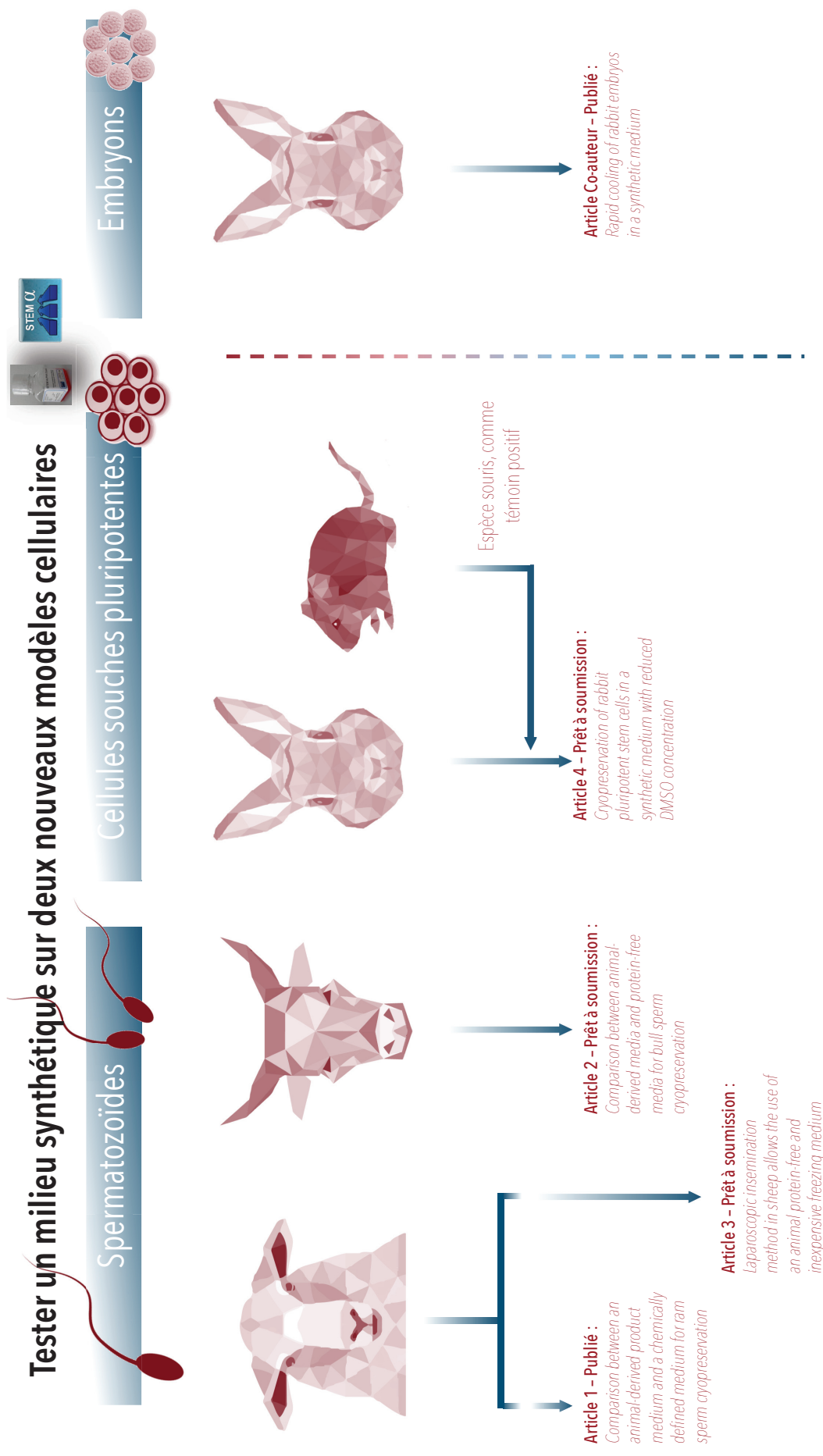


Figure 17. Présentation des articles par types cellulaires et espèces étudiés.

Tableau 8. Récapitulatif des travaux réalisés

Type cellulaire	Objectif	Race	Expérimentations	Analyse en DSC	Nombre animaux	Valorisation
Les spermatozoïdes	Tester le CRYO3	Ovin	2 milieux de congélation comparés	Non	9 béliers (1éjaculat/bélier) 195 brebis	1 article publié
		Bovin	6 milieux de congélation comparés	Oui	4 taureaux (4 éjaculats/taureau)	1 article en cours de soumission
	Optimiser la congélation du sperme de bélier	Ovin	2 cinétiques et 3 milieux de congélation comparés	Oui	6 béliers (4 éjaculats/bélier) 75 brebis	1 article en cours de soumission
Les cellules souches pluripotentes	Tester le CRYO3	Lapin (Souris en contrôle)	3 milieux de congélation comparés	Oui	3 réplicats	1 article soumis
Embryons (Annexe 2)	Tester le CRYO3 en vitrification	Lapin	3 milieux de vitrifications comparés	Non	84 lapines 1540 embryons	1 article publié

Chapitre 1 : Les spermatozoïdes

1. Étude d'un nouveau milieu synthétique pour la congélation du sperme ovin et bovin

La structure des cellules spermatiques variant d'une espèce à une autre, nous avons donc réalisé deux études préliminaires en testant le CRYO3 sur le sperme de bélier et le sperme de taureau.

Dans les centres de collecte de sperme et d'inséminations ovins en France, la technique de Colas [205] est toujours utilisée. Nous avons donc créé notre milieu synthétique en se basant sur cette technique qui implique une dilution en deux étapes et une congélation dans les vapeurs d'azote (environ 20°C/min). À l'inverse, dans les centres de collecte de sperme bovin en France, les techniciens utilisent un milieu commercial, l'Optidyl® contenant du jaune d'œuf ionisé, ou l'OPTIXcell® contenant des liposomes, à diluer en une seule étape et à congeler dans un congélateur programmable (courbe de congélation pour l'espèce bovine, environ 40°C/min).

Nous avons formulé l'hypothèse que le CRYO3 pourrait remplacer le jaune d'œuf et/ou le lait, habituellement utilisés dans les milieux de congélation. Pour le sperme ovin, une étude *in vitro* (éjaculats de neuf béliers charollais) et une étude *in vivo* (insémination de 195 brebis) ont été effectuées pour comparer le milieu de Colas [205] à celui contenant du CRYO3. Pour le sperme bovin, une étude *in vitro* (16 éjaculats de quatre taureaux montbéliards) a été réalisée en comparant les milieux commerciaux français disponibles (Optidyl®, l'OPTIXcell® et le BIOXcell®), à des milieux fabriqués au laboratoire sur une base tris – glycérol additionné de jaune d'œuf, de CRYO3, ou sans ajout (témoin négatif). En parallèle, une étude calorimétrique a permis de caractériser les propriétés thermodynamiques des solutions cryoprotectrices.

1.1. Publication n°1 –

Comparison between an animal-derived product medium and a synthetic medium for ram sperm cryopreservation

Article publié le 16/10/2018 dans *Biopreservation and cryobanking*
DOI : <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0067>

Aujourd'hui, les produits d'origine animale sont largement utilisés dans les milieux de congélation de sperme du fait de leurs propriétés cryoprotectrices. À cause des risques sanitaires qu'ils peuvent engendrer, ces produits ont tendance à être substitués. STEMALPHA.CRYO3® (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) appelé "CRYO3" est un milieu de préservation chimiquement défini, couramment utilisé en France pour congeler les tissus et cellules souches hématopoïétiques humaines. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet d'un milieu composé de CRYO3 sur des paramètres de qualité des spermatozoïdes évalués *in vitro* et *in vivo* lors de la congélation de sperme ovin. Le sperme de neuf béliers Charolais a été collecté avec un vagin artificiel, puis séparé et congelé dans deux milieux de congélation : un milieu composé de CRYO3 et un milieu témoin contenant du jaune d'œuf (10 %) et du lait (45 %). L'intégrité membranaire (Iodure de Propidium (IP)/SYBR-14 et calcéine AM/Ethidium Homodimer-1), l'intégrité de l'acrosome (FITC-PNA/IP) et le potentiel transmembranaire mitochondrial (JC-1) ont été évalués par cytométrie en flux à l'aide des marqueurs fluorescents cités. De plus, l'intégrité membranaire fonctionnelle et les paramètres de motilité des spermatozoïdes ont été évalués respectivement par le test hypo-osmotique et par un système d'analyse automatisée du sperme (CASA). Le taux de gestation, la prolificité et le gain moyen quotidien des agneaux ont été étudiés après insémination par laparoscopie de 195 brebis. Le milieu témoin a montré des résultats *in vitro* significativement plus élevés par rapport au milieu composé de CRYO3, excepté pour la linéarité et la rectitude de trajectoire des spermatozoïdes (paramètres de motilité). Néanmoins, les essais fonctionnels *in vivo* n'ont montré aucune différence significative entre le milieu témoin et le milieu contenant du CRYO3, pour le taux de gestation (72,2 % vs. 67,3 %), la prolificité et le gain moyen quotidien des agneaux. Cette étude préliminaire montre que le CRYO3 ne peut pas remplacer le jaune d'œuf et le lait dans le milieu de congélation, notamment à des fins commerciales

nationales. Cependant, comme les inséminations par laparoscopie permettent un taux de gestation de 67,3 %, le milieu synthétique reste une option pour les échanges internationaux et le stockage à long-terme de la diversité génétique chez l'espèce ovine.

1

2

3

4 Comparison between an animal-derived product medium and a chemically
5 defined medium for ram sperm cryopreservation

6 Lucie Gavin-Plagne^{1¶*}, Loris Commin^{1¶}, Pierre Bruyère¹, Samuel Buff¹, Thierry Joly^{1,2}

7 ¹ UPSP ICE 2016.A104, VetAgro Sup, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France

8 ² UPSP ICE 2016.A104, ISARA-Lyon, Université de Lyon, Lyon, France

9 * Corresponding author

10 Telephone : +33 676 675 790

11 Fax : +33 478 876 788

12 E-mail: lucie.gavin-plagne@vetagro-sup.fr (LGP)

13 VetAgro Sup

14 1 avenue bourgelat

15 69280, Marcy l'étoile

16 France

17

18 [¶] These authors contributed equally to this work.

19 Funding : This work was supported by CRB-Anim [ANR-INBS11-0003].

20 Running head : Ram sperm freezing in a synthetic medium

21 Manuscript Keywords : semen freezing; ram sperm; protein-free, animal-derived products; pregnancy

22 rate; hyaluronic acid

23 Abstract

24 Animal-derived products are widely used in sperm cryopreservation for their cryoprotective
25 properties. These components, however, tend to be replaced because of sanitary risks.
26 STEMALPHA.CRYO3 (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) called "CRYO3" is
27 a chemically defined preservation medium currently used for freezing human tissue and adult stem
28 cells. The aim of this study was to evaluate the effect of a CRYO3-based medium on ram sperm
29 freezing regarding *in vitro* parameters and *in vivo* fertility. Semen from nine Charolais rams was
30 collected using an artificial vagina, then split and frozen using two media: a CRYO3-based medium or
31 a control medium containing egg yolk (10 %) and milk (45 %). Sperm membrane integrity (PI/SYBR-
32 14 and Calcein AM/Ethidium Homodimer-1), acrosome integrity (FITC-PNA/PI) and mitochondrial
33 membrane potential (JC-1) were assessed using flow cytometry, while functional membrane integrity
34 was assessed using a hypo-osmotic swelling test and motility parameters, evaluated by computer-
35 assisted sperm analysis. Pregnancy rates, prolificacy and the average daily weight gain of lambs
36 (DWG) were evaluated after performing 195 laparoscopic inseminations. The control medium showed
37 significantly higher results than CRYO-based medium for all *in vitro* parameters, except for linearity
38 and straightness (motions parameters). Conversely, field trials showed no significant difference
39 between the control medium and the CRYO3-based medium for pregnancy rates (72.2 % and 67.9 %,
40 respectively), prolificacy (1.8 and 1.6, respectively) and the DWG (0.34 kg/day and 0.35 kg/day,
41 respectively). This preliminary study showed that CRYO3 cannot replace egg yolk and milk in
42 freezing extenders for commercial purposes. However, as laparoscopic inseminations allowed a 67 %
43 pregnancy rate, CRYO3-based medium remains an option for international transport or long-term
44 storage of genetic diversity.

45 **Introduction**

46 Animal-derived products (egg yolk, milk) have long been used to preserve frozen sperm in many
47 species [1], especially rams [2,3]. Since 1939 [4], egg yolk has been routinely added to the sperm
48 freezing media in order to minimize cryoinjuries. Indeed, egg yolk provides protection against cold
49 shock [4,5] and has a protective effect on the plasma membrane [2]. Milk, as skimmed milk or whole
50 milk, has also been used as a component of freezing media [2]. Milk as well as egg yolk seem to
51 reduce the deleterious effects of the freezing process on sperm [6–8]. Indeed, caseins micelles, major
52 proteins of milk, are believed to protect the sperm by reducing the binding of Binder of Sperm (BSP)
53 proteins to sperm and then lipid loss [9,10]. With egg yolk, low-density lipoproteins (LDL) are known
54 to be responsible for sperm protection during cryopreservation [9,10]. Lusignan et al. [10]
55 demonstrated that BSP proteins in seminal plasma bind with LDL of egg yolk instead of the choline
56 phospholipid proteins of the sperm membrane. These findings show that the components of milk and
57 egg yolk, sequestering BSP proteins, improve sperm cryo survival by decreasing lipid efflux from the
58 sperm membrane [7].

59 Nevertheless, the use of animal-derived products presents numerous drawbacks. Indeed, the first major
60 problem of using egg yolk and milk is the sanitary risk. Potential risks of contamination by pathogenic
61 agents have been reported by Bousseau et al. [11]. Moreover, the egg yolk biochemical composition
62 varies depending of the source and then could give heterogeneous results. Likewise, the presence of
63 debris and the greater viscosity of these components render standardising microscopy assessment of
64 frozen thawed semen more difficult [12]. Additionally, egg yolk provides aromatic amino acids and
65 therefore contributes to the production of reactive oxygen species by dead spermatozoa to the
66 detriment of live spermatozoa [6,13]. Finally, because of the international trade in milk and egg
67 products, there is a risk to introduce exotic diseases via semen media containing egg yolk and milk.

68 Today, alternatives to animal-derived products for sperm freezing are available. Indeed, soya lecithin
69 and liposome-based media have been used extensively in many species to replace media containing
70 animal proteins [3,11,12,14–17]. Their protective effect could be called into question, however,

71 because of their unstable composition and variable properties [18]. In French ovine insemination
72 centers, sperm is cryopreserved according to Colas [19], a conventional freezing procedure using egg
73 yolk and milk in extenders. For these reasons, in order to overcome new biobanking regulations in the
74 coming years, it might be necessary to cryopreserve semen in a stable, synthetic and chemically
75 defined medium. STEMALPHA.CRYO3 (Ref 5617, Stem Alpha) called “CRYO3” is a good
76 manufacturing practices (cGMP) serum-free, protein-free and dextran-free solution. CRYO3 is
77 composed of high molecular weight synthetic hyaluronic acid (HA), glucose, carbohydrates, amino
78 acids, mineral salts, vitamins, fatty acids esters and buffers (personal communication from Daniel
79 Licari, March 2018). It was initially designed for clinical applications, in order to replacing serum in
80 somatic and human adult stem cells freezing medium [20–23]. Recently, it has been found that
81 CRYO3 could be a potential additive to cryopreserve reproductive cells. Indeed, CRYO3 can be used
82 for rabbit [24] and bovine embryo cryopreservation [25]. No significant difference was found for the
83 rabbit embryo *in vitro* survival rate between CRYO3 and foetal calf serum (FCS). However, CRYO3
84 was found to be better for bovine embryos. Moreover, they observed better *in vivo* embryo viability,
85 after embryo transfers when CRYO3 was used compared to FCS in the rabbit. Despite good
86 performance of soya lecithin and liposomes on sperm quality, the objective of this study was to avoid
87 all forms of derived (plant or animal origin), or unstable and variable products. The aim of the present
88 study was to evaluate the effect of a chemically defined cryopreservation medium (CRYO3-based
89 medium) on ram sperm regarding *in vitro* parameters and *in vivo* fertility.

90 **Materials and Methods**

91 The design of this veterinary clinical study was approved by the animal research ethics committee of
92 VetAgro Sup. All animal procedures conformed to the European Regulations (Regulation (EU)
93 2016/1012 related to zootechnical and genealogical conditions for the breeding, trade in and entry into
94 the Union of purebred breeding animals, hybrid breeding pigs and the germinal products thereof).
95 Unless specified otherwise, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-
96 Fallavier, France).

97 Semen collection

98 Sexually mature Charolais rams (n = 9; three to five years old) with proven fertility were used for this
99 study. The rams were kept in a semen collection and storage centre (INSEM OVIN, agreement No.
100 FRCO871, Limoges, France) under uniform conditions. All males were housed in groups of 4 to 6
101 rams. They were fed with straw and hay and had free access to water. Animals were maintained under
102 natural light and were subjected to semen collection once a day from Monday to Friday during
103 breeding season. For the study, rams were subjected to semen collection once in the morning with an
104 artificial vagina during the breeding season. Briefly, the artificial vagina was filled with warm water at
105 a temperature (approximately 37°C) that mimics the natural condition of the female tract. A teaser ewe
106 was presented to the ram and semen was recovered in a graduated glass tube attached to the artificial
107 vagina. Directly after collection, the volume, concentration (ACCUREAD photometer, IMV
108 Technologies, L'Aigle, France) and subjective motility (10× negative phase contrast objective) of each
109 ejaculate (one per animal) were evaluated. The volume and the concentration of ejaculates varied
110 between 0.6 and 1.3 mL and 1.9 and 3.3×10^9 spermatozoa/mL (spz/mL), respectively. Only
111 ejaculates that presented a white colour and a visual motility higher than 70 % were used and held at
112 37°C in a water bath before dilution and freezing procedure.

113 Semen freezing

114 Each ejaculate (n = 9) was split into two equal aliquots that were cryopreserved in a CRYO3-based
115 medium composed of a chemically defined product, CRYO3 (pH = 6.8-7.6; osmolarity = 305-390
116 mOsm; viscosity = 1-7 cps) or in medium containing egg yolk and milk (control medium). Each
117 sample was processed using a two-step dilution procedure currently used in French ovine insemination
118 centers according to Colas [19]. Each freezing medium (CRYO3-based medium and control medium)
119 were then composed of two extenders. . Briefly, the first step consisted of diluting semen at 30°C in a
120 glycerol-free medium at a concentration of 800×10^6 spz/mL. For the control medium, the first
121 extender was composed of lactose (102.96 g/L) 20 % (v:v) hen egg yolk and gentamicin (Gibco,
122 10 mg/mL) in sterile water. For the CRYO3-based medium, the first extender of the first step

123 contained 20 % (v:v) CRYO3 in a Tris buffer supplemented with citric acid, glucose (TCG) and
124 antibiotics (tris-hydroxymethyl-aminomethane, 30.26 g/L; citric acid, 17 g/L; glucose, 12.5 g/L; mix
125 of sodium benzylpenicillinate 200 UI/mL, procaine benzylpenicillinate 300 UI/mL and
126 dihydrostreptomycine, 0.5 mg/L; pH = 7.0).

127 After equilibration of the diluted semen at 4°C for 90 min, the second step was performed at 4°C. A
128 second extender (equilibrated at 4°C) containing glycerol was added in two steps 20 min apart at a
129 final ratio of 1:1 to obtain a final concentration of 400×10^6 spz/mL. For the control medium, the
130 second extender contained 90 % (w:v) of milk powder diluted in sterile water (Regilait, 40 g/L of
131 semi-skimmed milk), 10 % (v:v) glycerol and gentamicin (Gibco, 10 mg/mL); pH was adjusted to 6.8.
132 For the CRYO3-based medium, the second extender was composed of 20 % (v:v) CRYO3, 0.2 M of
133 trehalose and 10 % (v:v) glycerol in TCG (pH = 7.0). The diluted sperm samples were cooled for two
134 hours at 4°C.

135 After equilibration, sperm was loaded into 0.25 mL French straws (IMV Technologies, L'Aigle,
136 France). Straws were then suspended horizontally in liquid nitrogen vapour 20 cm above the liquid
137 nitrogen surface (between -50°C and -70°C) for eight minutes before being plunged into liquid
138 nitrogen. Straws were stored for at least two weeks in liquid nitrogen prior to thawing for assessment
139 or for artificial inseminations.

140 Thawing was performed by submerging the straws in a water bath at 37°C for 30 seconds before *in*
141 *vitro* sperm evaluation and insemination.

142 **Sperm evaluation after thawing**

143 Post-thawed semen was diluted in a Tris-citrate buffer supplemented with fructose (TCF; tris-
144 hydroxymethyl-aminomethane: 27 g/L, citric acid: 14 g/L, fructose: 10 g/L; pH = 7.24;
145 osmolarity = 294 mOsmol) in order to obtain 100×10^6 spz/mL for assessment.

146

147

148 Flow cytometry analyses

149 Semen was evaluated by flow cytometry to assess the plasma membrane integrity (fresh and frozen-
150 thawed samples), the acrosome integrity and the mitochondrial membrane potential. For all samples,
151 the sperm population was identified (FSC/SSC dot plots) and 10,000 events among the sperm
152 population were analysed at a low rate (200 cells/s). Analyses were performed using Flowsight Amnis
153 (Emd Millipore, Seattle, WA) equipped with blue-green (488 nm, 60 mW), red (642 nm, 100 mW)
154 and side scatter (SSC; 785 nm, 12 mW) solid-state lasers. The Flowsight is equipped with a
155 quantitative imaging upgrade that includes a 488-nm laserpower doubler and increased image
156 resolution (40× magnification). This innovative device, the Flowsight Amnis, allowed the visualisation
157 of each event acquired via a classical microscope objective. It permitted us to gate precisely the sperm
158 population and thus to eliminate debris and other cell particles, leading to an accurate analysis of the
159 sample. Post-acquisition analyses were performed on Amnis IDEAS software (Millipore-Amnis;
160 version 6.2).

161 Plasma membrane integrity was evaluated with a Live/Dead Sperm Viability Kit (Invitrogen, Eugene,
162 OR, USA) using propidium iodide (PI) and SYBR-14 staining. Intact spermatozoa appeared green in
163 SYBR-14, whereas membrane-damaged spermatozoa were stained in red by PI. For each sample,
164 10 µL of semen (100×10^6 spz/mL) were incubated with SYBR-14 (working concentration 45 nM)
165 and PI (working concentration 11 µM) in a TCF extender (5 min, 37°C). Sperm membrane integrity
166 was assessed with a 488-nm excitation laser and a 530 ± 30 nm bandpass emission filter for SYBR-14
167 and 650 ± 13 nm bandpass emission filter for PI. The percentages of intact (SYBR-14 +) and
168 membrane-damaged (PI +) spermatozoa were determined.

169 A second evaluation of the plasma membrane integrity was carried out with a calcein AM and an
170 ethidium homodimer-1 probes (C/EH) (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Briefly, for each sample,
171 10 µL of semen (100×10^6 spz/mL) were incubated with Calcein AM (working concentration 2 µM)
172 and ethidium homodimer (working concentration 4 µM) in TCF extender (15 min, 37°C). Sperm
173 membrane integrity was assessed with a 488-nm excitation laser and a 530 ± 30 nm bandpass emission
174 filter for Calcein AM and 650 ± 13 nm bandpass emission filter for ethidium homodimer-1. The

175 percentages of intact (Calcein AM +) and membrane-damaged (Ethidium homodimer-1 +)
176 spermatozoa were determined.

177 Acrosome integrity was assessed using FITC-PNA (1 mg/mL, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-
178 Fallavier, France). For each sample, 10 µL of semen (100×10^6 spz/mL) were incubated with FITC-
179 PNA (working concentration 10 µg/mL) in TCF extender (15 min, 37°C). Propidium iodide (working
180 concentration 11 µM) was added 5 minutes before the end of the incubation. Fluorescence was
181 collected with 488 nm excitation laser, a 530 ± 30 nm bandpass emission filter for FITC-PNA and a
182 650 ± 13 nm bandpass emission filter for PI. The percentages of cells with intact acrosome
183 (PI - / FITC-PNA -) were recorded.

184 High mitochondrial membrane potential was assessed using the lipophilic cation JC-1 (1,5 mM,
185 Invitrogen, Life Technologies, Eugen, OR, USA). For each sample, 10 µL of semen
186 (100×10^6 spz/mL) were incubated with JC-1 (working concentration 0.75 mM) in TCF extender
187 (15 min, 37°C). Fluorescence was collected with a 488-nm excitation laser, a 530 ± 30 nm bandpass
188 emission filter and 610 ± 30 nm bandpass emission filter. The percentages of cells with high
189 mitochondrial membrane potential (hMMP) staining in orange and with low mitochondrial membrane
190 potential (green stained cells) were recorded.

191 **Hypo-osmotic swelling test (HOST)**

192 The functional integrity of sperm membrane can be evaluated with the hypo-osmotic swelling test, as
193 described by Jeyendran et al.[26]. Briefly, 10 µL of semen at a concentration of 100×10^6 sperm/mL
194 were diluted in 100 µL of a hypo-osmotic solution (100 mOsmol; 4.9 g/L citrate sodium, 9 g/L
195 fructose). A smear test was performed after 30 min of incubation at 37°C. A total of 200 spermatozoa
196 were observed under a phase-contrast microscope at magnification 400×. Spermatozoa with functional
197 membranes appeared with swollen and curved tails. The percentage of functional membrane integrity
198 was calculated as the following equation:

$$199 \quad \text{Functional membrane integrity} = \frac{\text{Number of spz with swollen and curved tails}}{200 \text{ spz counted}} \times 100$$

200 Motion characteristics

201 The post-thaw motility of the semen of the nine rams was evaluated using Sperm Class Analyser
202 software (SCA2013, Microptic S.L; Barcelona, Spain) with a 10× negative phase contrast objective.
203 Each semen sample was diluted to a concentration of 20×10^6 spz/mL. Briefly, a 5 μ L sample of the
204 diluted semen was loaded in a pre-warmed analysis chamber with a depth of 20 μ M (Leja Products,
205 Nieuw-Vennep, The Netherlands). For each sample, 10 fields were analysed and percentages of motile
206 (VAP > 10 μ m/s) and progressively motile (STR index > 80%) spermatozoa, amplitude of lateral head
207 displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), curvilinear velocity (VCL), straight line velocity
208 (VSL), average path velocity (VAP), linearity (LIN=VSL/VCL), wobble (WOB=VAP/VCL) and
209 straightness (STR=VSL/VAP) were recorded. The camera setting was 50 frames/s.

210 Artificial insemination

211 Multiparous Charolais ewes (n = 195) housed on free pasture were used for laparoscopic insemination.
212 Ewes were synchronised with an intravaginal fluorogestone acetate sponge (20 mg, Chronogest, MSD
213 Animal Health, Angers, France) for 14 days. Fifty-eight hours before artificial insemination (AI), the
214 sponges were removed and animals were given an intramuscular injection of 500 – 600 IU of eCG
215 (MSD Animal Health, Angers, France). Each ewe received one dose (one straw) of frozen-thawed
216 semen. Briefly, the inseminating pipette was introduced into the lumen of each uterine horn. The straw
217 was equally deposited (0.125 mL of frozen–thawed semen containing approximately 100×10^6 sperm
218 in each horn (50×10^6 sperm/horn). Ewes were randomly assigned to the control group (n = 97 ewes
219 inseminated with the control medium) and the CRYO3 group (n = 98 ewes inseminated with the
220 CRYO3-based medium). Frozen straws from the nine rams were randomly assigned to ewes and
221 equally distributed for AI (approximately 20 to 21 ewes inseminated per ram). AI procedures were
222 performed by a certified operator (CIA L’Aigle, agreement No. 263 related to ovine species, L’Aigle,
223 France). Also, animal welfare during and after laparoscopic procedures was of specific concern.
224 Pregnancy rate, prolificacy rate and average daily weight gain of lambs were determined as the
225 following equations:

$$226 \quad \text{Pregnancy rate} = \frac{\text{Number of gravid ewes}}{\text{Total number of inseminated ewes}} \times 100$$

$$227 \quad \text{Prolificacy rate} = \frac{\text{Mean number of lambs}}{\text{Delivered ewes}}$$

$$228 \quad \text{Average daily weight gain of lambs} = \frac{\text{Weight at 70 days} - \text{Weight at 30 days}}{40 \text{ days}}$$

229 **Statistical analysis**

230 Statistical analyses were performed using R software [27]. The results were presented as the means \pm
 231 standard deviation. The percentage of membrane integrities (IP/SYBR-14 and calcein/ethidium),
 232 percentage of acrosome integrity, percentage of hMMP, percentage of functional membrane integrity
 233 (HOST) and sperm motility parameters were compared using a Wilcoxon test. The average daily
 234 weight gains of lambs exhibited a Gaussian distribution and were compared using a paired t-test. The
 235 Chi-square test was used to compare pregnancy rates. Prolificacy rates (assumed to follow a Poisson
 236 distribution) were compared using generalised linear model including the freezing medium as a fixed
 237 effect. The correlation between *in vitro* parameters and reproductive performance was analysed using
 238 a generalised linear model procedure. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically
 239 significant.

240 **Results**

241 Before freezing, the percentage of membrane integrity (IP/SYBR-14) was 75.7 ± 9.0 %. After
 242 thawing, the percentage of membrane integrity decreased radically for both media (Table 1).
 243 Significant differences were observed between media for all flow cytometry parameters (Table 1).
 244 A significant difference between the control and CRYO3-based media was found after performing a
 245 hypo-osmotic swelling test ($p < 0.05$). The control medium exhibited higher quality of spermatozoa in
 246 terms of functional membrane integrity compared to the CRYO3-based medium ($39.9 \% \pm 8.7$ and
 247 $16.9 \% \pm 9.1$ respectively).

248 Significant differences between the control and CRYO3-based media were observed for the
249 percentage of progressive and total motility, VSL, VCL, VAP, WOB, ALH and BCF. These
250 parameters were lower for the CRYO3-based medium compared to the control medium (Table 2). No
251 significant difference was found between the control and CRYO3-based media for LIN and STR.
252 The reproductive parameters are shown in Table 3. No difference was found between the control and
253 CRYO3-based media for pregnancy rate, prolificacy or average daily weight gain of lambs ($p > 0.05$).
254 No significant correlation between *in vitro* parameters (from flow cytometry, HOST and CASA) and
255 reproductive parameters (pregnancy rate, prolificacy) was found.

256 Discussion

257 Semen cryopreservation has been developed in numerous mammalian species and is widely used in
258 farm animal breeding, particularly in bovine [28]. Ram semen cryopreservation remains difficult,
259 however, as reflected by the low fertility rates after artificial insemination observed in this species [2].
260 This study was performed to investigate the effect of a chemically defined sperm cryopreservation
261 medium on *in vitro* parameters and *in vivo* fertility in ovine species.
262 For this study, we showed that all *in vitro* parameters (by flow cytometry, HOST, CASA), except for
263 LIN and STR, yielded better results for the control medium compared to the CRYO3-based medium.
264 After laparoscopic inseminations on 195 ewes, however, no significant difference was found between
265 media for the pregnancy rate, the prolificacy and the average daily weight gain of lambs.
266 In the present study, egg yolk and milk seemed to protect spermatozoa better than the tested medium
267 with regard to *in vitro* results. Membrane integrity, acrosome integrity, hMMP and progressive
268 motility of sperm cryopreserved in control medium were three times more higher compared to the
269 CRYO3-based medium. Indeed, egg yolk and milk are used in cryopreservation media as a source of
270 lipoproteins, which are known to protect sperm cells from cold shock mainly by maintaining
271 membrane phospholipid integrity [29]. Numerous authors have suggested that LDL could be
272 responsible for the resistance of sperm during cold shock and for the improvement of motility [30–32].
273 Soy lecithin, a vegetal phospholipid, is known to replace egg yolk [33] and has been studied in many

274 experiments involving ram semen cryopreservation, as reported earlier [15,33,34]. Indeed, semen
275 quality (progressive motility, functional membrane integrity, acrosome integrity, mitochondrial
276 activity) was comparable or even better (25 %, 56 %, 85 %, 56 %, respectively) when cryopreserved
277 with soy lecithin than in presence of egg yolk (21 %, 50 %, 76 %, approximately 54 %, respectively)
278 [33]. In our study, we tested a synthetic product composed of hyaluronic acid (HA). Several studies
279 used HA as an antioxidant supplement in sperm freezing media [35–37], or as a cryoprotectant [38].
280 HA is known to compose the extracellular matrix and to be present in several tissue and fluids [39].
281 More specifically, it seems that HA could regulate sperm metabolism and could be involved in sperm
282 capacitation process [40]. HA supplementation after thawing human sperm has been shown to be
283 beneficial [41]. However, the addition of HA in the freezing medium does not improve sperm quality
284 in human [41] nor ram [36], as observed in our study. Our *in vitro* results (especially the sperm
285 motility) are different from some previous studies [42,43] but consistent with others [33,34,44–46].
286 These discrepancies could be explained by the low freezing rate method (20 cm above liquid
287 nitrogen). Furthermore, the significant difference observed for *in vitro* results between our two media
288 can also, in part, be explained by the differences in the composition of antibiotics. Indeed, Salvetti et
289 al. [47] showed that antibiotics in rabbit sperm extenders can change the temperature of crystallisation
290 and the quantity of ice formed during the freezing step. Therefore, even if HA from CRYO3 does not
291 enough mimic the surfactant properties brought by phospholipids in vegetal or animal-derived
292 product, we should be careful since composition of media in terms of antibiotics are different.

293 Despite the obvious differences observed between control and CRYO3-based media, some parameters
294 such as LIN and STR were not statistically different for the control and CRYO3-based media. The
295 non-significant differences in LIN and STR could have explained the *in vivo* results. Indeed, Hirano et
296 al. [48] reported that VSL and ALH were correlated with *in vitro* fertilisation results for human sperm.
297 Similarly, Lavara et al. [49] found a negative correlation for LIN and kindling rate with rabbit sperm,
298 whereas Larsen et al. [50] found a significant effect of STR on the fertility rate with human sperm. A
299 positive correlation between BCF and fertility has also been reported in human and ovine sperm
300 [50,51]. In the present study, however, no relationship between CASA parameters and *in vivo* results

301 was found. Similarly, Holden et al. [52] did not observe a correlation between *in vitro* sperm
302 parameters (viability or total motility and pregnancy rates) when non-sorted bull sperm was evaluated.
303 It appears that motility or viability parameters are considered as compensable traits of semen for
304 fertility, as they depend on the number rather than the rate of spermatozoa affected [43,44,52,53].
305 Despite poor *in vitro* results, laparoscopic insemination could allow a high pregnancy rate with
306 CRYO3-based medium (67 % vs. 72 % for egg yolk and milk-based medium, $p > 0.05$). The number
307 of spermatozoa per dose and the pregnancy rate associated were similar to other studies using
308 laparoscopic inseminations [54–56]. Our *in vivo* results were even better compared to other studies
309 using fresh or frozen-thawed ram semen [57,58]. In stallions, a freezing medium was not optimal
310 based on *in vitro* analyses but was better after insemination compared to the control medium with egg
311 yolk [59]. Authors made the assumption that after cryopreservation, it is possible that only a small
312 subpopulation of spermatozoa that is still sufficient for fertilising the egg was preserved in the medium
313 tested. Consequently, this optimal but small subpopulation of sperm has not been highlighted by the
314 laboratory examination of sperm quality. Indeed, we assume that CRYO3-based medium via its main
315 component (hyaluronic acid) might select the “strongest spermatozoa” and eliminate the less resistant
316 during cryopreservation. Recently, it was shown that it is therefore important to identify and compare
317 sperm subpopulations using a clustering analysis because of the heterogeneity of a single ejaculate
318 [60]. Thus, in the present study, CRYO3 failed to protect ram spermatozoa whilst it appeared to be a
319 good substitute to serum-based media in rabbit and bovine embryo freezing.

320 **Conclusion**

321 This preliminary study showed that CRYO3 cannot replace egg yolk and milk in commercially
322 available freezing extenders. Indeed, this product was established to replace serum for somatic and
323 stem cells cryopreservation. However, since laparoscopic insemination has allowed to recover a
324 pregnancy rate of 67 %, CRYO3-based medium remains an option in some instances. The use of
325 CRYO3 may be appropriate to overcome the forthcoming regulatory requirements in the international
326 trade of semen from animals of high genetic value. It could also be considered for the long-term

327 storage of rams resources in sheep cryobanking programs. Adjustments of the freezing procedure and
328 must nevertheless be studied to improve the *in vitro* viability of spermatozoa.

329 **Acknowledgements**

330 We would like to thank INSEM OVIN for providing the semen, CIA l'Aigle for inseminating the ewes
331 and Stem Alpha for providing CRYO3. We thank Jérôme Roumier and Marine Armand for their help
332 in the fieldwork, and Vincent Payet for his kind support in the statistical methods.

333 This work was supported by a grant from the French national network of biological centres for animal
334 resources CRB-Anim [ANR-INBS11-0003] (https://www.crbanim.fr/crb-anim_eng/).

335 **Author Disclosure Statement**

336 The authors have no competing financial interests.

337 **References**

- 338 1. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;62:3–22.
- 339 2. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;62:77–111.
- 340 3. Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Fertility
341 of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination.
342 *Theriogenology.* 2003;59:1157–70.
- 343 4. Phillips PH. Preservation of Bull Semen. *J Biol Chem.* 1939;130:415–415.
- 344 5. Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R, Andersen Berg K. Effect of different extenders and
345 storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology.* 2002;57:823–
346 36.
- 347 6. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod*
348 *Sci.* 2000;62:23–53.
- 349 7. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm
350 protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev.* 2006;73:1338–44.
- 351 8. Therrien A, Manjunath P, Lafleur M. Chemical and physical requirements for lipid extraction
352 by bovine binder of sperm BSP1. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828:543–51.
- 353 9. Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. Milk Caseins Decrease the Binding of the
354 Major Bovine Seminal Plasma Proteins to Sperm and Prevent Lipid Loss from the Sperm
355 Membrane During Sperm Storage. *Biol Reprod.* 2007;77:120–6.
- 356 10. Lusignan M-F, Bergeron A, Lafleur M, Manjunath P. The Major Proteins of Bovine
357 Seminal Plasma Interact with Caseins and Whey Proteins of Milk Extender. *Biol Reprod.*
358 2011;85:457–64.
- 359 11. Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M.
360 Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo
361 fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents.
362 *Theriogenology.* 1998;50:699–706.
- 363 12. Aires VA, Hinsch K-D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E.
364 In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for
365 cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology.* 2003;60:269–79.
- 366 13. Shannon P, Curson B. Kinetics of the aromatic l-amino acid oxidase from dead bovine
367 spermatozoa and the effect of catalase on fertility of diluted bovine semen stored at 5°C and
368 ambient temperatures. *J Reprod Fertil.* 1982;64:463–7.
- 369 14. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender,
370 temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen.
371 *Theriogenology.* 2003;59:1241–55.
- 372 15. Sharafi M, Zhandi M, Akbari Sharif A. Supplementation of soybean lecithin-based semen
373 extender by antioxidants: complementary flow cytometric study on post-thawed ram
374 spermatozoa. *Cell Tissue Bank.* 2015;16:261–9.
- 375 16. Nishijima K, Kitajima S, Koshimoto C, Morimoto M, Watanabe T, Fan J, et al. Motility
376 and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk.
377 *Theriogenology.* 2015;84:1172–5.

- 378 17. Ansari MS, Rakha BA, Akhter S, Ashiq M. OPTIXcell improves the postthaw quality and
379 fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*. 2016;85:528–32.
- 380 18. Lasic DD. On the thermodynamic stability of liposomes. *J Colloid Interface Sci*.
381 1990;140:302–4.
- 382 19. Colas G. Effect of initial freezing temperature addition of glycerol and dilution on the
383 survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Soc Reprod Fertil*. 1975;277–85.
- 384 20. Jurga M, Forraz N, Basford C, Atzeni G, Trevelyan AJ, Habibollah S, et al. Neurogenic
385 Properties and a Clinical Relevance of Multipotent Stem Cells Derived from Cord Blood
386 Samples Stored in the Biobanks. *Stem Cells Dev*. 2012;21:923–36.
- 387 21. Sarnowska A, Jablonska A, Jurga M, Dainiak M, Strojek L, Drela K, et al. Encapsulation
388 of Mesenchymal Stem Cells by Bioscaffolds Protects Cell Survival and Attenuates
389 Neuroinflammatory Reaction in Injured Brain Tissue after Transplantation. *Cell Transplant*.
390 2013;22:67–82.
- 391 22. Mueller AA, Forraz N, Gueven S, Atzeni G, Degoul O, Pagnon-Minot A, et al. Osteoblastic
392 Differentiation of Wharton Jelly Biopsy Specimens and Their Mesenchymal Stromal Cells after
393 Serum-Free Culture: *Plast Reconstr Surg*. 2014;134:59e-69e.
- 394 23. Ducret M, Fabre H, Farges J-C, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, et al. Production of
395 Human Dental Pulp Cells with a Medicinal Manufacturing Approach. *J Endod*. 2015;41:1492–
396 9.
- 397 24. Bruyère P, Baudot A, Joly T, Commin L, Pillet E, Guérin P, et al. A Chemically Defined
398 Medium for Rabbit Embryo Cryopreservation. *PLOS ONE*. 2013;8:e71547.
- 399 25. Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G, Buff S. Improved
400 cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing
401 medium. *Theriogenology*. 2012;78:1294–302.
- 402 26. Jeyendran RS, Ven HHV der, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of
403 an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to
404 other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984;70:219–28.
- 405 27. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing
406 [Internet]. Vienna, Austria; 2011 [cited 2017 Jul 12]. Available from: <http://www.R-project.org>
- 407 28. Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen:
408 Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim Reprod Sci*. 2016;172:1–9.
- 409 29. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins
410 extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull
411 semen. *Theriogenology*. 2002;57:1695–706.
- 412 30. Evans RJ, Bauer DH, Bandemer SL, Vaghefi SB, Flegal CJ. Structure of egg yolk very low
413 density lipoprotein. Polydispersity of the very low density lipoprotein and the role of
414 lipovitellenin in the structure. *Arch Biochem Biophys*. 1973;154:493–500.
- 415 31. Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during
416 freezing. *J Anim Sci*. 1974;39:1144–9.
- 417 32. Quinn PJ, Chow PYW, White IG. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa
418 from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil*. 1980;60:403–7.
- 419 33. Emamverdi M, Zhandi M, Zare Shahneh A, Sharafi M, Akbari-Sharif A. Optimization of
420 Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin-Based Extender.

- 421 *Reprod Domest Anim.* 2013;48:899–904.
- 422 34. Najafi A, Najafi M, Zanganeh Z, Sharafi M, Martinez-Pastor F, Adeldust H.
423 Cryopreservation of Ram Semen in Extenders Containing Soybean Lecithin as Cryoprotectant
424 and Hyaluronic Acid as Antioxidant. *Reprod Domest Anim.* 2014;49:934–40.
- 425 35. Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Effect of hyaluronan
426 supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after
427 cryopreservation. *Theriogenology.* 2004;61:63–70.
- 428 36. Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose,
429 taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters
430 after freeze–thawing process. *Theriogenology.* 2007;67:1060–7.
- 431 37. Bucak MN, Sarözkan S, Tuncer PB, Ulutaş PA, Akçadağ Hİ. Effect of antioxidants on
432 microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat
433 semen following cryopreservation. *Small Rumin Res.* 2009;81:90–5.
- 434 38. Qian L, Yu S, Zhou Y. Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm.
435 *Int J Biol Macromol.* 2016;87:287–9.
- 436 39. Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Atikuzzaman M, Vicente-Carrillo A, Rubér M, Alvarez-
437 Rodriguez M. The ubiquitous hyaluronan: Functionally implicated in the oviduct?
438 *Theriogenology.* 2016;86:182–6.
- 439 40. Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Capacitation
440 status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-
441 complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int J Androl.* 2002;25:84–93.
- 442 41. Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases
443 the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum Reprod.*
444 1997;12:1949–54.
- 445 42. Gil J, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of centrifugation and different
446 extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology.* 2000;54:93–108.
- 447 43. Gil J, Rodriguez-Irazoqui M, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of
448 centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical
449 insemination. *Theriogenology.* 2002;57:1781–92.
- 450 44. Martins KR, Gheller SSM, Ferreira CER, Goularte KL, Corcini CD, Mondadori RG, et al.
451 Post-thawing quality of ram spermatozoa is impaired by inclusion of boar seminal plasma in
452 the freezing extender. *Small Rumin Res.* 2016;144:229–33.
- 453 45. Fang Y, Zhong R, Zhang X, Zhang J, Zhou D. Boar seminal plasma inhibits cryo-
454 capacitation of frozen-thawed ram sperm and improves fertility following intracervical
455 insemination. *Theriogenology.* 2018;105:84–9.
- 456 46. Masoudi R, Sharafi M, Zare Shahneh A, Towhidi A, Kohram H, Zhandi M, et al. Effect of
457 dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean
458 lecithin– and egg yolk–based extenders. *Theriogenology.* 2016;86:1583–8.
- 459 47. Salvetti P, Joly T, Baudot A. Effect of antibiotics on thermodynamic properties of freezing
460 media in rabbit species: A first calorimetric approach. *Cryobiology.* 2006;53:268–75.
- 461 48. Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, et al.
462 Relationships Between Sperm Motility Characteristics Assessed by the Computer-Aided Sperm
463 Analysis (CASA) and Fertilization Rates In Vitro. *J Assist Reprod Genet.* 2001;18:215–20.

- 464 49. Lavara R, Mocé E, Lavara F, Viudes de Castro MP, Vicente JS. Do parameters of seminal
465 quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*.
466 2005;64:1130–41.
- 467 50. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjøllund NH, et al. Computer-assisted
468 semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Hum*
469 *Reprod*. 2000;15:1562–7.
- 470 51. Del Olmo E, Bisbal A, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Ramon M, Jimenez-Rabadan
471 P, et al. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim Reprod*
472 *Sci*. 2013;138:102–9.
- 473 52. Holden SA, Fernandez-Fuertes B, Murphy C, Whelan H, O’Gorman A, Brennan L, et al.
474 Relationship between in vitro sperm functional assessments, seminal plasma composition, and
475 field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen. *Theriogenology*.
476 2017;87:221–8.
- 477 53. Saacke RG, Dalton JC, Nadir S, Nebel RL, Bame JH. Relationship of seminal traits and
478 insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci*. 2000;60–61:663–
479 77.
- 480 54. King ME, McKelvey WAC, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJA, et al.
481 Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed
482 semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*. 2004;62:1236–44.
- 483 55. Fair S, Hanrahan JP, O’Meara CM, Duffy P, Rizos D, Wade M, et al. Differences between
484 Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number
485 after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*. 2005;63:1995–2005.
- 486 56. Khalifa T, Lymberopoulos A, Theodosiadou E. Association of soybean-based extenders
487 with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-blind parallel group
488 design. *Theriogenology*. 2013;79:517–27.
- 489 57. Richardson L, Hanrahan JP, Donovan A, Martí JI, Fair S, Evans ACO, et al. Effect of site
490 of deposition on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. *Anim Reprod*
491 *Sci*. 2012;131:160–4.
- 492 58. Casali R, Pinczak A, Cuadro F, Guillen-Muñoz JM, Mezzalana A, Menchaca A. Semen
493 deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination
494 (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*. 2017;103:30–5.
- 495 59. Pillet E. Mise au point d’un milieu pour la cryopréservation de la semence équine et
496 mécanismes de cryoprotection impliqués [Thèse de doctorat]. [2008-....., France]: Agrocampus
497 Ouest; 2009.
- 498 60. Ledesma A, Zalazar L, Fernández-Alegre E, Hozbor F, Cesari A, Martínez-Pastor F.
499 Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved
500 semen of rams with lesser fertility. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 11];
501 Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432017301860>
- 502
- 503
- 504

505 **Table 1** Effect of the freezing medium on the plasma membrane integrity, the acrosome integrity and
506 the high mitochondrial membrane potential of thawed semen.

Flow Cytometry parameters	Control medium	CRYO3-based medium
Plasma membrane integrity (IP/SYBR-14) (%)	15.9 ± 4.2 ^a	4.2 ± 1.8 ^b
Plasma membrane integrity (C/EH) (%)	20.7 ± 6.4 ^a	7.7 ± 4.7 ^b
Acrosome integrity (%)	20.2 ± 4.8 ^a	7.1 ± 3.5 ^b
High mitochondrial membrane potential (%)	18.5 ± 4.3 ^a	5.1 ± 3.0 ^b

507 Results are presented as the means ± standard deviation.

508 ^{a, b} Values within a row with different superscripts differ significantly at P < 0.05.

509

510 **Table 2** Effect of the freezing medium on sperm motility after thawing.

Motion characteristics	Control medium	CRYO3-based medium
Progressive (%)	24.3 ± 5.1 ^a	8.4 ± 3.0 ^b
Motile (%)	45.0 ± 5.7 ^a	23.5 ± 5.3 ^b
VCL (µm ² /s)	118.2 ± 13.1 ^a	66.7 ± 12.4 ^b
VSL (µm ² /s)	41.9 ± 6.4 ^a	25.1 ± 6.4 ^b
VAP (µm ² /s)	61.9 ± 6.4 ^a	34.3 ± 7.1 ^b
LIN (%)	29.7 ± 3.0 ^a	26.1 ± 3.6 ^a
STR (%)	59.3 ± 4.1 ^a	57.8 ± 3.5 ^a
WOB (%)	48.8 ± 3.0 ^a	42.9 ± 4.0 ^b
ALH (µm)	2.8 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.3 ^b
BCF (Hz)	12.04 ± 1.7 ^a	8.2 ± 2.0 ^b

511 VCL = curvilinear velocity; VSL = straight line velocity; VAP = average path velocity; LIN = VSL/VCL
512 (linearity); STR = VSL/VAP (straightness); WOB = VAP/VCL (wobble); ALH = amplitude of lateral head
513 displacement; BCF = beat cross frequency.

514 Results are presented as the means ± standard deviation.

515 ^{a, b} Values within a row with different superscripts differ significantly at P < 0.05.

516 **Table 3** Effect of the freezing medium on *in vivo* results after artificial insemination with thawed ram
 517 sperm.

Medium	Pregnancy rate (%)	Prolificacy (number of lamb(s)/ewe)	Average daily weight gain of lambs (kg/day)
Control medium (n = 97)	72.2 ± 0.4	1.8 ± 0.8	0.34 ± 0.1
CRYO3-based medium (n = 98)	67.3 ± 0.5	1.6 ± 0.6	0.35 ± 0.1
<i>p-value</i>	0.51	0.65	0.55

518 Results are presented as the means ± standard deviation.

519

1.2. Publication n°2 –

Comparison between animal-derived media and protein-free media for bull sperm cryopreservation

Article prêt à soumettre à *Theriogenology*

Les produits d'origine animale sont largement utilisés dans les milieux de congélation de sperme. En raison des risques sanitaires qu'ils peuvent engendrer, ces produits ont aujourd'hui tendance à être substitués. STEMALPHA.CRYO3® (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) appelé "CRYO3" est un milieu de préservation chimiquement défini, couramment utilisé en France pour congeler les tissus et cellules souches hématopoïétiques humaines. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet sur les paramètres *in vitro* d'un milieu composé de CRYO3 utilisés pour la conservation à 4°C et la congélation de sperme bovin. Le sperme de quatre taureaux Montbéliard a été collecté à quatre reprises à l'aide d'un vagin artificiel, puis séparé et congelé dans six milieux de congélation différents : trois milieux commerciaux (Optidyl®, OPTIXcell®, BIOXcell®) et trois milieux sur une base tris – glycérol additionné de jaune d'œuf, de CRYO3, ou sans ajout (témoin négatif). L'intégrité membranaire (Iodide de Propidium/SYBR-14), l'intégrité de l'acrosome (FITC-PNA/IP) et le potentiel transmembranaire mitochondrial (JC-1) ont été évalués par cytométrie en flux, tandis que l'intégrité membranaire fonctionnelle a été évaluée à l'aide d'un test hypo-osmotique ; les paramètres de motilité ont été objectivés par un système d'analyse automatisée du sperme (CASA). La calorimétrie différentielle à balayage a permis de caractériser les propriétés thermodynamiques des milieux de congélation utilisés. Pour la plupart des paramètres étudiés *in vitro*, le milieu OPTIXcell® s'est avéré le meilleur. Le témoin négatif et le milieu contenant du CRYO3 ont présenté les plus faibles taux de viabilité après équilibration à 4°C et décongélation. Cette étude montre que le produit testé (CRYO3) ne permet pas de substituer le jaune d'œuf dans les milieux de congélation de sperme bovin.

Comparison between animal-derived media and protein-free media for bull sperm cryopreservation

Lucie Gavin-Plagne^{1*}, Marine Berthiller², Anne Baudot³, Pierre Bodranghien², Gérard Louis³, Samuel Buff¹, Thierry Joly^{1,4}

¹ UPSP ICE 2016.A104, VetAgro Sup, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France

² Station de monte, Auriva-Élevage, Brindas, France

³ INSERM U1148, Université Paris Descartes, Paris, France

⁴ UPSP ICE 2011-03-101, ISARA-Lyon, Université de Lyon, Lyon, France

* Corresponding author

Telephone : +33 676 675 790

Fax : +33 478 876 788

E-mail: lucie.gavin-plagne@vetagro-sup.fr (LGP)

VetAgro Sup

1 avenue bourgelat

69280, Marcy l'étoile

France

Funding : This work was supported by CRB-Anim [ANR-INBS11-0003].

Abstract

Animal-derived products are widely used in sperm cryopreservation for their cryoprotective properties. These components, however, require to be replaced because of sanitary risks. STEMALPHA.CRYO3 (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) called "CRYO3" is a chemically defined preservation medium currently used for freezing human tissue and adult stem cells. The aim of this study was to evaluate the effect of a CRYO3-based medium on *in vitro* parameters of the liquid storage at 4°C and the freezing of bull sperm. Sperm from four *Montbéliard* bulls was collected four times using an artificial vagina, then split and frozen using six media: a positive control medium containing egg yolk (20 %), a negative control medium composed only of a Tris buffer and glycerol, a CRYO3-based medium and three commercial media (Optidyl®, OPTIXcell®, BIOXcell®). Sperm membrane integrity (PI/SYBR-14), acrosome integrity (FITC-PNA/PI) and mitochondrial membrane potential (JC-1) were assessed using flow cytometry, while functional membrane integrity was assessed using a hypo-osmotic swelling test and motion characteristics, evaluated by computer-assisted sperm analysis. A thermodynamic approach allowed us to characterize the media using Differential Scanning Calorimetry (DSC). OPTIXcell® showed mostly significantly higher results for all *in vitro* parameters with the CRYO-based medium and the negative control medium showing the lowest. Moreover, the study of the freezing media behaviour using DSC showed that the positive control was the only medium which did not achieve its maximum crystallisation quantity. Moreover, OPTIXcell was more thermodynamically instable compared to CRYO3-based medium. This study showed that the product, CRYO3, cannot replace egg yolk in freezing extenders. Thus, OPTIXcell® containing liposomes seemed to be an appropriate medium for cryopreserving Montbéliard bull sperm.

Introduction

Animal-derived products (egg yolk, milk) have long been used to preserve frozen sperm in many species [1], especially bulls [2]. Since 1939 [3], egg yolk has been routinely added to the sperm freezing media for minimising cryoinjuries. Indeed, egg yolk provides protection against cold shock [3,4] and has a protective effect on the plasma membrane [5]. Indeed, low-density lipoproteins (LDL) are known to be responsible for sperm protection during cryopreservation [6,7]. LDL are believed to protect the sperm by reducing the binding of Binder of Sperm (BSP)

proteins to sperm and then lipid loss [6,7]. Lusignan et al. [7] demonstrated that BSP proteins in seminal plasma bind with LDL of egg yolk instead of the choline phospholipid proteins of the sperm membrane. These findings show that the components of milk and egg yolk, sequestering BSP proteins, improve sperm cryo survival by decreasing lipid efflux from the sperm membrane [8].

Nevertheless, the use of animal-derived products presents numerous drawbacks. The first major concern of using egg yolk or milk is the sanitary risk [9]. Moreover, the biochemical composition of egg yolk is extremely variable, which leads to variable results. Likewise, the presence of debris and the greater viscosity of these components render standardising microscopy assessment of frozen thawed semen more difficult [10]. Additionally, egg yolk provides aromatic amino acids and therefore contributes to the production of reactive oxygen species to the detriment of live spermatozoa [2,11]. Also, spreading exotic disease through international transport is an emerging concern.

Today, alternatives to animal-derived products for sperm freezing are available. Indeed, soya lecithin and liposome-based media have been used extensively in many species to replace media containing animal proteins [9,10,12–16], despite of their unstable and variable properties [17]. In French bovine insemination centers, sperm is cryopreserved using a controlled-rate freezer and a commercial medium containing egg yolk, Optidyl® (IMV Technologies, France). Using such media is acceptable within a short-term commercial strategy. However, it sounds necessary to develop the use of stable, synthetic and chemically defined medium in biobank to overcome any update of the regulations by the future. STEMALPHA.CRYO3 (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) called "CRYO3" is a patented serum-free, protein-free and dextran-free medium (manufactured according to good manufacturing practices [cGMP-annex 1] in compliance with 2001/83/EC). CRYO3 is composed of synthetic hyaluronic acid of high molecular weight ($> 10^6$ D), glucose, carbohydrates, amino acids, mineral salts, vitamins, fatty acids esters and buffers. It was initially designed for clinical applications, in order to replace serum in somatic and human adult stem cells freezing medium [18–21]. More recently, it has been shown as a potential medium to cryopreserve reproductive cells (ie. rabbit [22,23] and bovine [24] embryos , ram sperm [Gavin-Plagne et al., 2018 ; *In Press*]).

Despite good performance of soya lecithin and liposomes on sperm quality, the objective of this study was to avoid all forms of derived (plant or animal origin), or unstable and variable products. The aim of the present study was to evaluate **the effect of a chemically defined**

cryopreservation medium (CRYO3-based medium) on *in vitro* parameters of **bull sperm**. The evaluation of CRYO3 as a potential substitute to serum was performed using two approaches: a thermodynamic approach using Differential Scanning Calorimetry and a biological approach using bovine sperm freezing.

Materials and Methods

Experimental design

The experimental design is summarized in Figure 1. Sixteen ejaculates (4 bulls, four replicates) were assessed *in vitro* before and after freeze-thaw procedure (flow cytometry, CASA and HOS test). Moreover, diluted sperm was evaluated after 3h of equilibration at 4°C, in order to evaluate the toxicity of the media before the freezing procedure (CASA and HOS test).

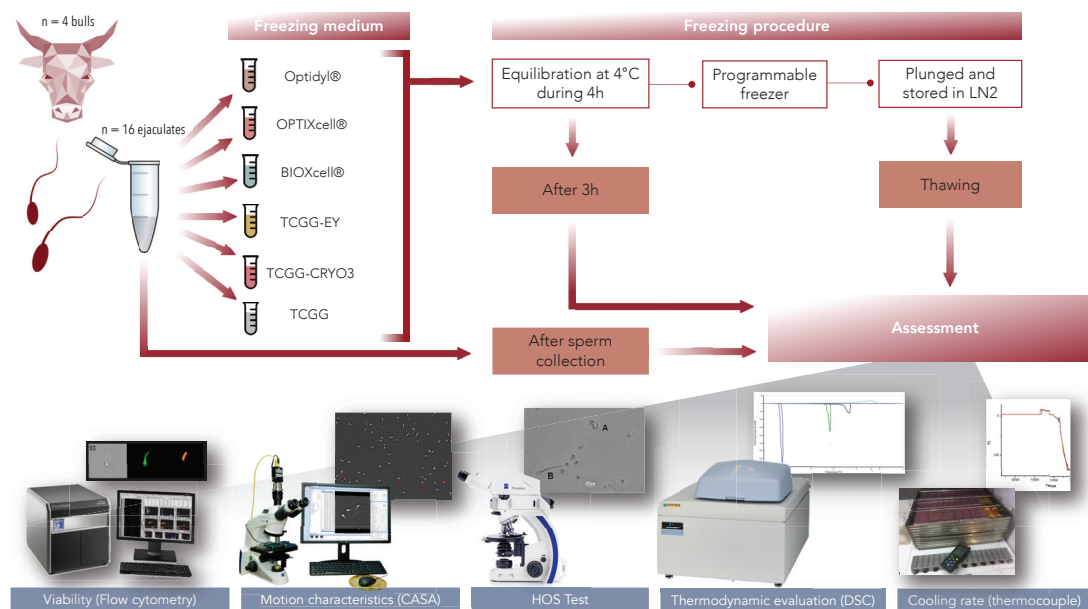


Figure 1. Experimental design of the study.

Bull sperm was frozen either in a control medium (TCGG-EY) made at the laboratory, containing egg yolk; or in Optidyl® (IMV Technologies, L'Aigle, France) containing egg yolk or in OPTIXcell (IMV Technologies, L'Aigle, France) containing liposomes or BIOXcell (IMV Technologies, L'Aigle, France) containing soya lecithin or in a CRYO3-based medium, called "TCGG-CRYO3", or in a negative control, called "TCGG", consisting of a Tris buffer and glycerol. After collection, sperm was assessed by flow cytometry, CASA and HOS Test, while equilibrated sperm at 4°C during 3h was assessed by CASA and HOS Test. Frozen-thawed sperm quality was evaluated by flow cytometry, CASA and HOS Test. Freezing media were thermodynamically characterized using a Differential Scanning Calorimeter. CASA: Computer-Assisted Sperm analysis; DSC: differential scanning calorimeter; LN2: Liquid Nitrogen.

Semen collection

Sexually mature Montbeliard bulls (n = 4 bulls; two to nine years old) with proven fertility were used four times for this study. The bulls were housed in a breed society managing bovine species (Auriva-Elevage, Brindas, France) under uniform conditions. Animals were maintained under natural light and were subjected to semen collection twice a week (Monday and Wednesday or Tuesday and Thursday). For the study, bulls were subjected to semen collection twice in the morning with an artificial vagina. Directly after collection, the volume, concentration and motility (IVOS II™ Animal, Hamilton Thorne, United States) of each ejaculate were evaluated. Only ejaculates that presented a white colour and a visual motility higher than 70 % were used and held at 37°C in a water bath before dilution and freezing procedure.

Semen freezing

Each ejaculate (n = 16) was split into six equal aliquots that were cryopreserved in three commercial media and three media made at the laboratory (Table 1):

- OPTIDYL® (IMV Technologies, L'Aigle, France) containing egg yolk ;
- OPTIXcell® (IMV Technologies, L'Aigle, France) containing liposomes ;
- BIOXcell® (IMV Technologies, L'Aigle, France) containing soya lecithin ;
- a medium containing a Tris buffer supplemented with citric acid and glucose (TCG; Tris-hydroxymethyl-aminomethane: 32.7 g/L, citric acid: 18.5 g/L, glucose: 8.7 g/L; pH = 6.8; osmolarity = 294 mOsmol) and glycerol only (TCGG), as negative control;
- a CRYO3-based medium (TCGG-CRYO3) composed of the same base medium (TCGG) and a chemically defined product, 20 % (v/v) CRYO3 (pH = 6.8-7.6; osmolarity = 305-390 mOsm; viscosity = 1-7 cps);
- a medium containing TCGG and 20 % (v/v) of egg yolk (TCGG-EY), as positive control.

The pH (at room temperature and at 37°C) and the osmolality (VAPRO® Vapor Pressure Osmometer 5600, Wescor, Logan, USA) of each medium is presented in Table 2.

Table 1. Composition of freezing media.

Freezing medium	Base medium	Glycerol	Main additive (v/v)
Optidyl®			20 % ionized egg yolk
OPTIXcell®	Carbohydrates, buffers, antibiotics	Around 6.4 and 7 %	Liposomes
BIOXcell®			Soya lecithin
TCGG-EY	TCG	7 %	20 % egg yolk
TCGG-CRYO3	TCG	7 %	20 % CRYO3
TCGG	TCG	7 %	-

Table 2. Chemical property of the freezing media.

	pH at room temperature	pH at 37°C	Osmolality
Optidyl	6.82 ± 0.03	6.68 ± 0.02	1392.75 ± 13.05
OPTIXcell	6.73 ± 0.01	6.56 ± 0.02	1441.33 ± 61.58
BIOXcell	6.95 ± 0.01	6.85 ± 0.02	1310.50 ± 74.74
TCGG-EY	6.78 ± 0.01	6.66 ± 0.02	1640.75 ± 27.42
TCGG-CRYO3	6.99 ± 0.05	6.84 ± 0.03	1500.25 ± 33.28
TCGG	6.91 ± 0.03	6.73 ± 0.02	1455.75 ± 15.26

Results are presented as the means ± standard deviation of 4 measures from 4 different preparation.

Sperm was first diluted 1:1 with the freezing medium and put at 37°C during at least 10 minutes. Sperm samples were then diluted in the freezing medium to obtain a final sperm concentration of 80×10^6 spermatozoa/mL. The diluted sperm samples were cooled during four hours at 4°C. After equilibration, sperm was loaded into 0.25 mL French straws (IMV Technologies, L'Aigle, France) using an automatic straw filling machine placed in a 4°C chamber. Straws were then frozen in a controlled-rate freezer (DigitCool 5300, IMV Technologies, L'Aigle, France) using a bull sperm freezing curve (5°C/min from 4°C down to -10°C, 40°C/min from -10°C down to -100°C and 20°C/min until -140°C, before being plunged into liquid nitrogen). The cooling rate was calculated using a type T thermocouple (TC Direct, Dardilly, France) inserted in a separate straw containing cells and freezing medium. The approximate cooling rate in the linear part of the freezing curves was 32 °C/min. Straws were stored in liquid nitrogen for at least one week prior to assessment.

Thawing was performed by submerging the straws in a water bath at 37°C for 30 seconds. Two straws corresponding to the same experimental condition were thawed and pooled before assessment, in order to reduce inter-straw variation.

Sperm evaluation after thawing

Post-thawed semen was diluted in the TCF buffer in order to obtain 100×10^6 spz/mL for assessment.

Flow cytometry analyses

Semen was evaluated by flow cytometry to assess the plasma membrane integrity (fresh and frozen-thawed samples), the acrosome integrity and the mitochondrial membrane potential. For all samples, the sperm population was identified (FSC/SSC dot plots) and 10,000 events among the sperm population were analysed at a low rate (200 cells/s). Analyses were performed using Flowsight Amnis (Emd Millipore, Seattle, WA) equipped with blue-green ($\lambda = 488$ nm, 60 mW), red ($\lambda = 642$ nm, 100 mW) and side scatter (SSC; $\lambda = 785$ nm, 12 mW) solid-state lasers. The Flowsight is equipped with a quantitative imaging upgrade that includes a 488-nm laserpower doubler and increased image resolution (40 \times magnification). It allowed the visualisation of each event acquired via a classical microscope objective. It permitted us to gate precisely the sperm population, and thus to eliminate debris and other cell particles, leading to an accurate analysis of the sample. Post-acquisition analyses were performed on Amnis IDEAS software (Millipore-Amnis; version 6.2).

Plasma membrane integrity was evaluated with a Live/Dead Sperm Viability Kit (Invitrogen, Eugene, OR, USA) using propidium iodide (PI) and SYBR-14 staining. Intact spermatozoa appeared green in SYBR-14, whereas membrane-damaged spermatozoa were stained in red by PI. For each sample, 10 μ L of semen (100×10^6 spz/mL) were incubated with SYBR-14 (working concentration 45 nM) and PI (working concentration 11 μ M) in a TCF extender (5 min, 37°C). Sperm membrane integrity was assessed with a 488-nm excitation laser and a 530 ± 30 nm bandpass emission filter for SYBR-14 and 650 ± 13 nm bandpass emission filter for PI. The percentages of intact (SYBR-14 +) and membrane-damaged (PI +) spermatozoa were determined.

Acrosome integrity was assessed using FITC-PNA (1 mg/mL, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). For each sample, 10 μ L of semen (100×10^6 spz/mL) were incubated with FITC-PNA (working concentration 10 μ g/mL) in TCF extender (15 min, 37°C). Propidium iodide (working concentration 11 μ M) was added 5 minutes before the end of the incubation. Fluorescence was collected with a 488 nm excitation laser, a 530 ± 30 nm bandpass emission

filter for FITC-PNA and a 650 ± 13 nm bandpass emission filter for PI. The percentages of cells with intact acrosome (PI - / FITC-PNA -) were recorded.

High mitochondrial membrane potential was assessed using the lipophilic cation JC-1 (1,5 mM, Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, USA). For each sample, 10 μ L of semen (100×10^6 spz/mL) were incubated with JC-1 (working concentration 0.75 mM) in TCF extender (15 min, 37°C). Fluorescence was collected with a 488-nm excitation laser, a 530 ± 30 nm bandpass emission filter and 610 ± 30 nm bandpass emission filter. The percentages of cells with high mitochondrial membrane potential (hMMP) staining in orange and with low mitochondrial membrane potential (green stained cells) were recorded.

Hypo-osmotic swelling test (HOST)

The functional integrity of sperm membrane can be evaluated with the hypo-osmotic swelling test, as described by Jeyendran et al. [25]. HOS test was performed for evaluating sperm after sperm collection, after an equilibration at 4°C and after freezing-thawing. Briefly, 10 μ L of semen at a concentration of 100×10^6 sperm/mL were diluted in 100 μ L of a hypo-osmotic solution (100 mOsmol; 4.9 g/L citrate sodium, 9 g/L fructose). A smear test was performed after 30 min of incubation at 37°C. A total of 100 spermatozoa were observed under a phase-contrast microscope at magnification 400 \times . Spermatozoa with functional membranes appeared with swollen and curved tails. The percentage of functional membrane integrity was calculated as the following equation:

$$\text{Functional membrane integrity (\%)} = \frac{\text{Number of spz with swollen and curved tails}}{100 \text{ spz counted}} \times 100$$

Motion characteristics

The post-thaw motility of the semen of the nine rams was evaluated using Sperm Class Analyser software (SCA2013, Microptic S.L; Barcelona, Spain) with a 10 \times negative phase contrast objective. Each semen sample was diluted to a concentration of 20×10^6 spz/mL. Briefly, a 5 μ L sample of the diluted semen was loaded in a pre-warmed analysis chamber with a depth of 20 μ M (Leja Products, Nieuw-Vennep, The Netherlands). For each sample, 10 fields were analysed and percentages of motile (VAP > 10 μ m/s) and progressively motile (STR index > 80%) spermatozoa, amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity

($LIN=VSL/VCL$), wobble ($WOB=VAP/VCL$) and straightness ($STR=VSL/VAP$) were recorded. The camera setting was 50 frames/s.

Thermodynamic properties of the media

The phase transitions of the freezing media were characterized using a power compensation DSC (Diamond DSC, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) equipped with a liquid nitrogen cooling accessory (Cryofill) and the Pyris software (11.11.1 version). The accuracy provided in the technical specifications of this DSC is $\pm 0.11^\circ\text{C}$ for temperature and $\pm 1.10\%$ for energy. The DSC was calibrated for temperature and energy at $+2.5^\circ\text{C}/\text{min}$ with two standards: the ice melting of pure bi-osmosed water (0°C ; 333.40 J/g) and the crystallographic transition of cyclohexane in its solid state (-87.06°C ; 79.58 J/g), for a high data range of 720 mW. The validity of the calibration was verified regularly using tests on pure bi-osmosed water and cyclohexane, and the maximal error of reproducibility obtained with these pure standards was $\pm 0.36^\circ\text{C}$ (temperature) and $\pm 0.62\%$ (energy). Experiments were conducted using standard hermetically sealed aluminium pans (Ref. 0219–0062, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) designed for volatile samples. The pans were previously cleaned following the standard procedure provided by Perkin-Elmer. During the experiment, the cryopreservation media were stored less than 2 weeks at 4°C in Eppendorf tube previously cleaned and sterilized to remove any impurities that could interfere with the thermodynamic measures. Three replicate measurements were taken for each solution. Before testing, each solution was stored at room temperature for approximately 30 min. The solution was then gently mixed through a series of 5 capsizing. The solution was then loaded in aluminum pans ($20\ \mu\text{L}$) using a micropipette to limit the variations in weight between the samples. The aluminum pans were first weighed without cryopreservation solution on a high sensibility scale balance (XS105 DualRange, Metler Toledo, France) and were then weighed after the loading of the cryopreservation solution in order to measure the sample mass. The weights were determined with a resolution of $10^{-5}\ \text{g}$. The samples weight was 3.70 ± 0.38 (mean \pm standard deviation, $n = 6$). Three cycles of cooling and warming between 10°C and -150°C were applied to each sample to determine the melting temperature (T_m , in degree celcius [$^\circ\text{C}$]) and the crystallization enthalpy variation (ΔH , in Joules per gram [J/g]). An empty oven baseline of the DSC, systematically subtracted from the sample thermograms, was regularly recorded with care, using the same protocol in temperature variations T_m is the temperature under which crystallization can occur, and ΔH allows the quantification of crystallized ice in the solution (Joules per gram, J/g). We determined ΔH_{max} which represents the maximum crystallization

quantity that can develop in each medium, and $\Delta H_{50^\circ\text{C}/\text{min}}$ which represents the crystallization quantity at a cooling rate of $50^\circ\text{C}/\text{min}$. A rapid cooling ($100^\circ\text{C}/\text{min}$) was followed by a slow warming ($2.5^\circ\text{C}/\text{min}$) to measure T_m . T_m was defined at the top of the main melting peak. A slow cooling ($2.5^\circ\text{C}/\text{min}$) was followed by a rapid warming ($20^\circ\text{C}/\text{min}$) to determine ΔH_{max} . For determining $\Delta H_{50^\circ\text{C}/\text{min}}$, a rapid cooling of $50^\circ\text{C}/\text{min}$ and a rapid warming ($20^\circ\text{C}/\text{min}$) was applied. ΔH was measured by evaluating the area encompassed between the peak of crystallization and the baseline. The areas were calculated using a sigmoid curve baseline.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software [26]. The results were presented as mean \pm standard deviation. The percentage of membrane integrity, percentage of acrosome integrity, percentage of hMMP, percentage of functional membrane integrity (HOST) and motion parameters were analysed using a mixed model including the medium (six media), the storage (sperm equilibrated at 4°C or frozen-thawed) and their interaction as fixed effects. The bull was considered as a random effect. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Thermodynamic values were analysed using descriptive statistics.

Results

Sperm quality before equilibration and freezing-thawing

Fresh sperm exhibited an average progressive motility of $76.2 \pm 8.9 \%$, total motility of $85.8 \pm 5.3 \%$, functional membrane integrity of $74.1 \pm 13.0 \%$, membrane integrity of $57.4 \pm 12.8 \%$, acrosome integrity of $59.9 \pm 11.6 \%$ and high mitochondrial membrane potential of $59.4 \pm 12.8 \%$ (Figure 2). The concentration and motion characteristics per bull are presented in Table 3. More variability within a bull was observed for flow cytometry parameters compared to progressive and total motility (Figure 2).

Table 3. Concentration and motion characteristics of fresh sperm per bull.

	Bull 1	Bull 2	Bull 3	Bull 4	Mean
Concentration (.10 ⁹ /mL)	0.9 ± 0.1	1.6 ± 0.5	1.8 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.4
VCL (µm ² /s)	129.4 ± 0.6	161.1 ± 25.8	166.0 ± 24.0	141.5 ± 5.0	149.5 ± 23.9
VSL (µm ² /s)	70.0 ± 8.0	81.2 ± 14.0	89.9 ± 17.0	80.3 ± 6.7	80.3 ± 13.1
VAP (µm ² /s)	83.2 ± 9.5	96.7 ± 11.4	99.4 ± 7.5	87.4 ± 7.6	91.7 ± 10.6
LIN (%)	49.4 ± 2.1	54.8 ± 18.4	57.3 ± 14.7	60.9 ± 16.5	55.6 ± 13.6
STR (%)	75.2 ± 2.5	67.7 ± 11.4	69.2 ± 16.1	74.8 ± 12.4	71.7 ± 11.0
WOB (%)	62.7 ± 2.8	62.9 ± 6.8	64.3 ± 6.8	63.9 ± 2.7	63.4 ± 4.7
ALH (µm)	2.6 ± 0.6	3.4 ± 1.0	3.4 ± 1.0	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.8
BCF (Hz)	19.4 ± 1.3	18.8 ± 3.0	20.3 ± 4.0	21.5 ± 0.9	20.0 ± 2.6

VCL = curvilinear velocity; VSL = straight line velocity; VAP = average path velocity; LIN = VSL/VCL (linearity); STR = VSL/VAP (straightness); WOB = VAP/VCL (wobble); ALH = amplitude of lateral head displacement; BCF = beat cross frequency. Results are presented as the means ± standard deviation.

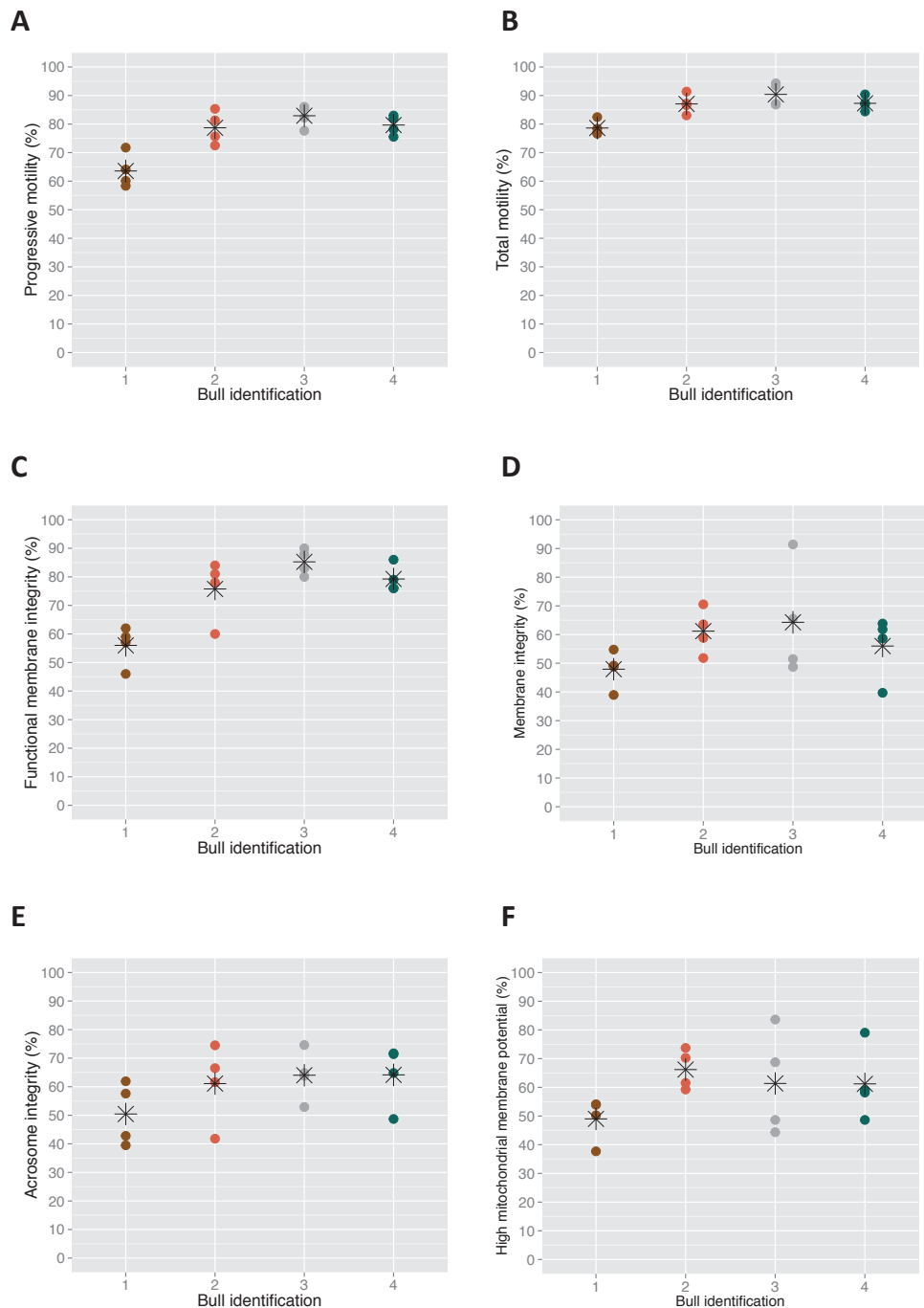


Figure 2. Main *in vitro* sperm parameters per bull before freezing.

(A) Progressive motility – average progressive motility was $76.2 \pm 8.9\%$; (B) Total motility – average total motility was $85.8 \pm 5.3\%$, (C) Functional membrane integrity (HOS test) – average functional membrane integrity was $74.1 \pm 13.0\%$, (D) Membrane integrity – average membrane integrity was $57.4 \pm 12.8\%$, (E) Acrosome integrity – average acrosome integrity was $59.9 \pm 11.6\%$, (F) High mitochondrial membrane potential – average hMMP was $59.4 \pm 12.8\%$.

The symbol * within the graphs corresponds to the mean of 4 ejaculates from one bull.

Sperm quality depending on the medium and the storage

Differences between equilibrated and frozen-thawed sperm for progressive motility, total motility and functional membrane integrity are shown in Figure 3. Other *in vitro* parameters are shown in Table 4 and Table 5 for equilibrated and frozen-thawed sperm, respectively.

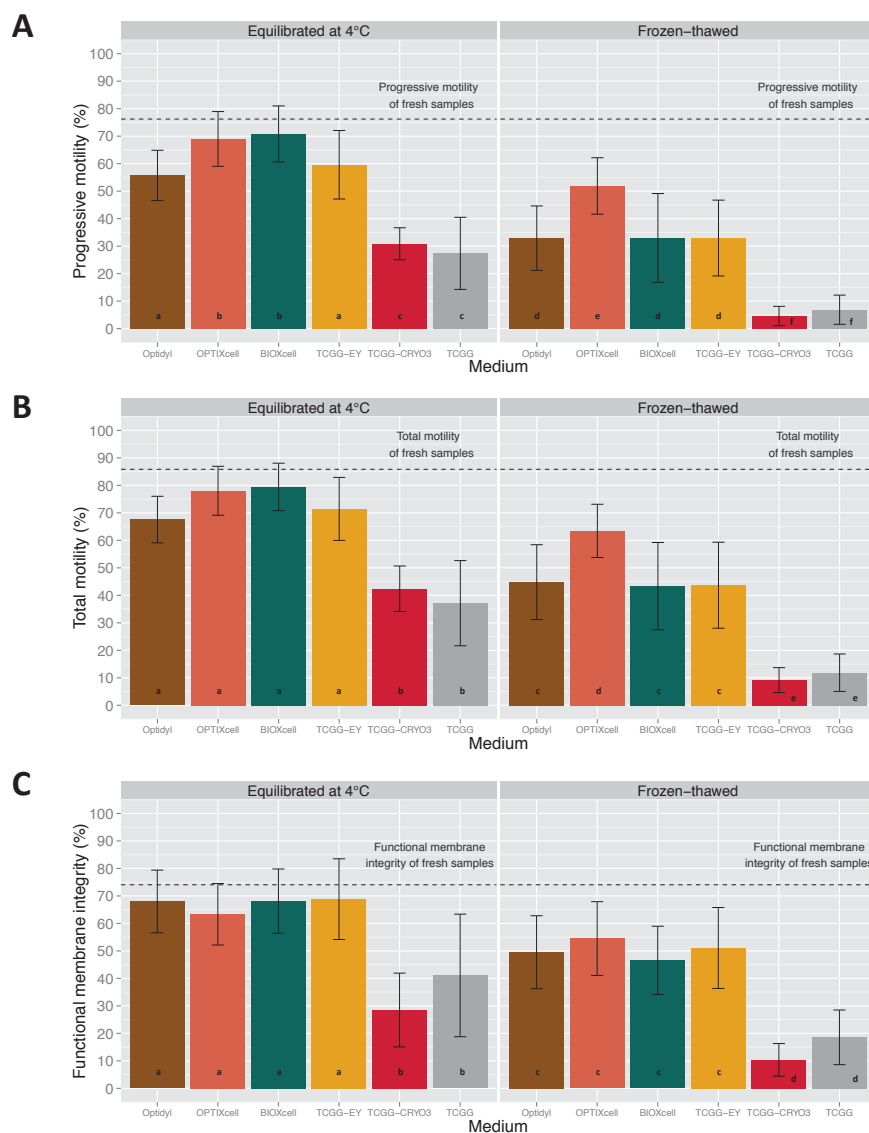


Figure 3. Differences between equilibrated and frozen-thawed sperm depending on the medium.

(A) Progressive motility, (B) Total motility, (C) Functional membrane integrity (HOS test).

Results are presented as the means ± standard deviation of 16 ejaculates from four bulls.

a,b,c,d,e,f Values within a graph with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$.

Table 4. Motion characteristics of sperm equilibrated at 4°C during 3h.

	Optidyl	OPTIXcell	BIOXcell	TCGG-EY	TCGG-CRYO3	TCGG
VCL (µm/s)	119.5 ± 16.4 ^a	147.5 ± 15.7 ^b	146.9 ± 18.0 ^b	98.5 ± 21.5 ^c	96.0 ± 16.3 ^c	84.5 ± 13.7 ^c
VSL (µm/s)	72.6 ± 8.4 ^a	82.0 ± 10.9 ^b	85.0 ± 10.6 ^b	59.2 ± 12.9 ^c	49.3 ± 9.2 ^{cd}	43.1 ± 5.6 ^d
VAP (µm/s)	83.7 ± 8.4 ^a	100.0 ± 9.6 ^b	100.6 ± 10.3 ^b	73.0 ± 14.3 ^a	60.8 ± 9.7 ^c	55.9 ± 6.8 ^c
LIN (%)	56.4 ± 5.2 ^a	53.9 ± 6.4 ^a	54.8 ± 5.4 ^a	58.3 ± 6.8 ^a	45.3 ± 6.4 ^b	46.5 ± 8.5 ^b
STR (%)	78.6 ± 4.9 ^a	76.6 ± 6.8 ^{ab}	78.4 ± 5.0 ^a	75.4 ± 5.1 ^{ab}	71.2 ± 3.8 ^{bc}	67.9 ± 4.7 ^c
WOB (%)	68.6 ± 3.7 ^{ab}	67.5 ± 3.2 ^b	67.3 ± 3.6 ^b	74.3 ± 7.3 ^a	60.3 ± 6.7 ^c	64.4 ± 9.6 ^{bc}
ALH (µm)	2.2 ± 0.4 ^a	2.9 ± 0.5 ^b	2.8 ± 0.5 ^b	1.9 ± 0.4 ^a	2.3 ± 0.4 ^a	1.9 ± 0.4 ^a
BCF (Hz)	19.6 ± 2.6 ^a	19.3 ± 2.1 ^a	20.6 ± 2.2 ^a	15.8 ± 3.2 ^b	14.3 ± 2.1 ^{bc}	12.5 ± 1.2 ^c

Table 5. Flow cytometry parameters and motion characteristics of frozen-thawed sperm.

	Optidyl	OPTIXcell	BIOXcell	TCGG-EY	TCGG-CRYO3	TCGG
Membrane integrity	24.5 ± 10.5 ^a	36.8 ± 10.2 ^b	23.8 ± 10.9 ^a	23.4 ± 10.7 ^a	5.9 ± 3.0 ^c	9.1 ± 6.0 ^c
hMMP	28.6 ± 11.9 ^a	79.6 ± 11.7 ^b	13.50 ± 6.6 ^c	27.7 ± 10.4 ^a	7.0 ± 3.0 ^c	9.4 ± 5.1 ^c
Acrosome integrity	36.5 ± 12.5 ^a	42.5 ± 8.1 ^a	24.6 ± 8.9 ^b	27.1 ± 10.0 ^b	7.8 ± 2.8 ^c	10.7 ± 6.0 ^c
VCL (µm/s)	110.6 ± 12.2 ^a	140.5 ± 12.6 ^b	109.3 ± 26.1 ^a	106.4 ± 16.4 ^a	61.7 ± 24.0 ^c	64.2 ± 15.4 ^c
VSL (µm/s)	56.2 ± 9.1 ^a	68.1 ± 8.3 ^a	59.8 ± 19.4 ^a	53.8 ± 8.9 ^a	24.5 ± 13.9 ^b	24.1 ± 8.6 ^b
VAP (µm/s)	68.2 ± 8.7 ^a	84.9 ± 7.4 ^b	70.5 ± 20.9 ^a	66.7 ± 9.6 ^a	35.0 ± 16.0 ^c	35.2 ± 10.9 ^c
LIN (%)	43.0 ± 5.1 ^{ab}	44.0 ± 5.8 ^b	45.9 ± 8.2 ^{ab}	44.1 ± 4.6 ^a	29.9 ± 10.0 ^c	30.9 ± 7.5 ^c
STR (%)	70.2 ± 4.1 ^a	71.2 ± 4.9 ^a	72.9 ± 5.3 ^a	69.5 ± 3.0 ^a	57.7 ± 11.0 ^b	58.5 ± 6.1 ^b
WOB (%)	57.8 ± 3.6 ^a	58.5 ± 3.9 ^a	59.4 ± 7.4 ^a	59.7 ± 3.7 ^a	48.7 ± 8.5 ^b	49.0 ± 8.2 ^b
ALH (µm)	2.6 ± 0.3 ^a	3.3 ± 0.4 ^b	2.4 ± 0.5 ^a	2.5 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.5 ^c	1.7 ± 0.3 ^c
BCF (Hz)	15.4 ± 2.0 ^a	15.7 ± 2.4 ^a	16.1 ± 3.0 ^a	14.2 ± 1.9 ^a	7.6 ± 3.8 ^b	9.00 ± 2.8 ^b

VCL = curvilinear velocity; VSL = straight line velocity; VAP = average path velocity; LIN = VSL/VCL (linearity); STR = VSL/VAP (straightness); WOB = VAP/VCL (wobble); ALH = amplitude of lateral head displacement; BCF = beat cross frequency. Results are presented as the means ± standard deviation of 16 ejaculates of four bulls. ^{ab,cd} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$.

The medium had a significant effect on bovine sperm parameters. A significant effect of the storage was observed on progressive motility, total motility, HOS, LIN, STR, WOB, ALH. The equilibration decreased sperm quality for all the media. This decrease was more important in TCGG-CRYO3 and TCGG. Also, a significant interaction effect between the medium and the storage was found for progressive motility, VCL, VSL, VAP, STR, WOB, ALH. This interaction was mainly observed for BIOXcell, TCGG-CRYO3 and TCGG. OPTIXcell showed the highest percentages of viability while TCGG-CRYO3 and TCGG showed the lowest. Moreover, no significant difference was found between TCGG-EY, Optidyl and BIOXcell, and between TCGG-CRYO3 and TCGG.

Thermodynamic properties of the media

As shown in Table 6, the average melting temperature T_m of the two media were close. Paradoxically, TCGG-CRYO3 was found to show more variability than TCGG-EY, Optidyl and OPTIXcell for T_m . We observed that with a cooling rate of 50°C/min, TCGG-EY was the only medium which do not achieve its maximum crystallisation quantity (-188 J/g vs. -192 J/g for $\Delta H_{50^\circ\text{C}/\text{min}}$ and ΔH_{max} respectively). OPTIXcell was the least thermodynamically stable solution with a greater variability in ΔH_{max} and $H_{50^\circ\text{C}/\text{min}}$. The values of crystallization temperatures were close but TCGG-CRYO3 obtained the lowest with -19.66°C and -21.06°C at a cooling rate of 2.5°C/min and 50°C/min respectively.

Table 6. Thermodynamic indicators of the freezing media.

Medium	T_m (°C)	ΔH_{max} (J/g)	$T_{c2.5^\circ\text{C}/\text{min}}$ (°C)	$\Delta H_{(-50^\circ\text{C}/\text{min})}$ (J/g)	$T_{c50^\circ\text{C}/\text{min}}$ (°C)
Optidyl	-1.82 ± 0.03	-193.39 ± 3.38	-16.74 ± 3.56	-194.45 ± 1.95	-21.11 ± 1.82
OPTIXcell	-1.86 ± 0.09	-212.36 ± 3.76	-18.17 ± 0.57	-211.49 ± 4.09	-18.60 ± 0.40
TCGG-EY	-2.25 ± 0.06	-192.44 ± 2.28	-17.47 ± 0.92	-187.64 ± 2.12	-20.57 ± 2.30
TCGG-CRYO3	-2.11 ± 0.29	-210.04 ± 3.48	-19,66 ± 1.22	-210.66 ± 2.36	-21.06 ± 1.64

Results are presented as the means ± standard deviation of 3 replicates of each medium. $T_{c(2.5^\circ\text{C}/\text{min})}$: Crystallization temperature at a cooling rate of 2.5°C/min; $T_{c(50^\circ\text{C}/\text{min})}$: Crystallization temperature at a cooling rate of 50°C/min
 T_m : Melting temperature ; ΔH_{max} : maximum crystallization enthalpy variation; $\Delta H_{50^\circ\text{C}/\text{min}}$: crystallization enthalpy variation at a cooling rate of 50°C/min.

Discussion

Semen cryopreservation has been developed in numerous mammalian species and is widely used in farm animal breeding, particularly in bovine [27]. This study was performed to investigate the effect of a chemically defined bull sperm freezing medium on *in vitro* parameters. Generally, after bull sperm equilibration at 4°C, no significant difference was observed between TCGG-EY, Optidyl, OPTIXcell and BIOXcell and between TCGG-CRYO3 and TCGG, the latter showing the lowest values. After thawing, OPTIXcell showed the highest percentages of motion characteristics and flow cytometry parameters. After thawing, no difference was found between Optidyl, BIOXcell and TCGG-EY, and between TCGG-CRYO3 and TCGG. Concerning the thermodynamic properties of the media, the melting temperature and the crystallisation quantity of each medium were close. However, OPTIXcell was more thermodynamically stable compared to TCFG-CRYO3 for the melting temperature T_m . This observation was inverted for the crystallisation quantity formed.

In this study, phospholipid brought by egg yolk, liposome or soya lecithin seemed to protect bull spermatozoa better than the TCGG-CRYO3 medium with regard to *in vitro* results. We evaluated a synthetic product composed of hyaluronic acid. Several studies used hyaluronic acid as an antioxidant supplement in sperm freezing media [28–30], or as a cryoprotectant [31]. Hyaluronic acid is known to compose the extracellular matrix and to be present in several tissue and fluids [32]. More specifically, it seems that hyaluronic acid could regulate sperm metabolism and could be involved in sperm capacitation process [33]. Supplementation of human sperm with hyaluronic acid after thawing has been shown to be beneficial [34]. However, the addition of hyaluronic acid in the freezing medium does not improve sperm quality in human [34] nor in ram, as confirmed in our study and as previously observed [29]. Moreover, we found no significant difference between TCFG-CRYO3 and TCFG, showing that CRYO3 does not protect bull sperm. To our knowledge, this is the first study to compare the efficacy of different commercial media with a negative control, composed of a Tris buffer and glycerol only.

Values of sperm motility of our study are different from some previous studies [16,35,36] but consistent with others [39–42]. Lima-Verde et al. observed no significant difference between OPTIXcell and Andromed® (equivalent to BIOXcell, Minitüb GmbH, Germany) for *in vitro* parameters, as well as *in vivo* fertility (on 800 AI, around 65 % of non-return rate) [39]. As in our study, Ansari et al. found that OPTIXcell was superior than an egg yolk-based medium for

buffalo bull sperm cryopreservation in terms of *in vitro* parameters and *in vivo* fertility (on 400 AI, 60 % vs. 42%, respectively) [16]. Moreover, no significant difference was found between BIOXcell and Triladyl® (equivalent to Optidyl, Minitüb GmbH, Germany) [40].

The various parameters evaluated by CASA system could not distinguished more precisely the media in this study. Indeed, it seems difficult to quantify a correlation between *in vitro* and *in vivo* analyses of frozen-thawed sperm [43,44]. Nowadays, CASA systems cannot predict the fertility as sperm evolved in a microenvironment completely different from the genital tractus of the female [44]. Thus, *in vitro* fecundation or artificial inseminations are necessary to bring more information about the cryoprotection potential of each medium.

In our study, thermodynamic characterization could not predict the behavior of the medium during freezing-thawing, as we did not observe important difference between media. OPTIXcell showed however a greater variation, demonstrating its thermodynamic instability. Indeed, OPTIXcell is composed of liposomes, which, with the time, can aggregate and precipitate to form flat bilayers or bigger vesicles [17]. Moreover, the values for T_c have to be studied with caution because this parameter is more dependent to experimental conditions than sample composition, compared to T_m and ΔH . Indeed, crystallization can appear because of heterogenous nucleation, due to impurities on the aluminium pan surface, making T_c more variable. Thus, the use of DSC in understanding freezing medium behavior could improve freezing protocols particularly for embryo and stem cells slow freezing [24,45]. Thus, the use of DSC in understanding freezing medium behavior could improve freezing protocols particularly for embryo and stem cells slow freezing [24,45].

Conclusion

This study showed that CRYO3, used routinely in French stem cells cryobanks, does not protect bull sperm before and after freezing-thawing procedure. We can conclude that OPTIXcell®, containing liposomes as a substitute of egg yolk, is an appropriate medium for cryopreserving bull sperm.

Acknowledgements

We would like to thank Auriva-Elevage for providing and freezing the semen. We thank Stem Alpha for providing CRYO3 and IMV Technologies for providing the freezing media used in this study. We thank Marie-Laure Delignette-Muller for her kind support in the statistical

methods. This work was supported by a grant from the French national network of biological centres for animal resources CRB-Anim [ANR-INBS11-0003] (https://www.crbanim.fr/crb-anim_eng/).

Author Disclosure Statement

The authors have no competing financial interests.

References

1. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:3-22.
2. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:23-53.
3. Phillips PH. Preservation of Bull Semen. *J Biol Chem*. 1939;130:415-415.
4. Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R, Andersen Berg K. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 2002;57:823-36.
5. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:77-111.
6. Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. Milk Caseins Decrease the Binding of the Major Bovine Seminal Plasma Proteins to Sperm and Prevent Lipid Loss from the Sperm Membrane During Sperm Storage. *Biol Reprod*. 2007;77:120-6.
7. Lusignan M-F, Bergeron A, Lafleur M, Manjunath P. The Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Interact with Caseins and Whey Proteins of Milk Extender. *Biol Reprod*. 2011;85:457-64.
8. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev*. 2006;73:1338-44.
9. Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 1998;50:699-706.
10. Aires VA, Hinsch K-D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 2003;60:269-79.
11. Shannon P, Curson B. Kinetics of the aromatic l-amino acid oxidase from dead bovine spermatozoa and the effect of catalase on fertility of diluted bovine semen stored at 5°C and ambient temperatures. *J Reprod Fertil*. 1982;64:463-7.
12. Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. 2003;59:1157-70.
13. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 2003;59:1241-55.
14. Sharafi M, Zhandi M, Akbari Sharif A. Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flow cytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and Tissue Banking*. 2015;16:261-9.
15. Nishijima K, Kitajima S, Koshimoto C, Morimoto M, Watanabe T, Fan J, et al. Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. *Theriogenology*. 2015;84:1172-5.
16. Ansari MS, Rakha BA, Akhter S, Ashiq M. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*. 2016;85:528-32.
17. Lasic DD. On the thermodynamic stability of liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1990;140:302-4.
18. Jurga M, Forraz N, Basford C, Atzeni G, Trevelyan AJ, Habibollah S, et al. Neurogenic Properties and a Clinical Relevance of Multipotent Stem Cells Derived from Cord Blood Samples Stored in the

- Biobanks. *Stem Cells and Development*. 2012;21:923-36.
19. Sarnowska A, Jablonska A, Jurga M, Dainiak M, Strojek L, Drela K, et al. Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells by Bioscaffolds Protects Cell Survival and Attenuates Neuroinflammatory Reaction in Injured Brain Tissue after Transplantation. *Cell Transplantation*. 2013;22:67-82.
 20. Mueller AA, Forraz N, Gueven S, Atzeni G, Degoul O, Pagnon-Minot A, et al. Osteoblastic Differentiation of Wharton Jelly Biopsy Specimens and Their Mesenchymal Stromal Cells after Serum-Free Culture: Plastic and Reconstructive Surgery. 2014;134:59e-69e.
 21. Ducret M, Fabre H, Farges J-C, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, et al. Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal Manufacturing Approach. *J Endod*. 2015;41:1492-9.
 22. Bruyère P, Baudot A, Joly T, Commin L, Pillet E, Guérin P, et al. A Chemically Defined Medium for Rabbit Embryo Cryopreservation. *PLOS ONE*. 2013;8:e71547.
 23. Teixeira M, Commin L, Gavin-Plagne L, Bruyère P, Buff S, Joly T. Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium. *Cryobiology* [Internet]. 2018 [cité 24 juill 2018]; Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224018300749>
 24. Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G, Buff S. Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*. 2012;78:1294-302.
 25. Jeyendran RS, Ven HHV der, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984;70:219-28.
 26. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria; 2011 [cité 12 juill 2017]. Disponible sur: <http://www.R-project.org>
 27. Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*. 2016;172:1-9.
 28. Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Theriogenology*. 2004;61:63-70.
 29. Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*. 2007;67:1060-7.
 30. Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Ulutaş PA, Akçadağ Hİ. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 2009;81:90-5.
 31. Qian L, Yu S, Zhou Y. Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;87:287-9.
 32. Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Atikuzzaman M, Vicente-Carrillo A, Rubér M, Alvarez-Rodriguez M. The ubiquitous hyaluronan: Functionally implicated in the oviduct? *Theriogenology*. 2016;86:182-6.
 33. Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *International Journal of Andrology*. 2002;25:84-93.
 34. Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1997;12:1949-54.
 35. Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 2004;61:895-907.
 36. Celeghini ECC, de Arruda RP, de Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*. 2008;104:119-31.
 37. Gil J, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*. 2000;54:93-108.
 38. Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*. 2002;57:1781-92.
 39. Lima-Verde I, Johannisson A, Ntallaris T, Al-Essawe E, Al-Kass Z, Nongbua T, et al. Effect of

- freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reprod Dom Anim.* 2017;1-10.
40. Vera-Munoz O, Amirat-Briand L, Diaz T, Vásquez L, Schmidt E, Desherces S, et al. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl® and Bioxcell®. *Theriogenology.* 2009;71:895-900.
41. Kaka A, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Khumran AM, Sarsaifi K, et al. α -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. *Animal Reproduction Science.* 2015;153:1-7.
42. Khumran AM, Yimer N, Rosnina Y, Ariff MO, Wahid H, Kaka A, et al. Butylated hydroxytoluene can reduce oxidative stress and improve quality of frozen–thawed bull semen processed in lecithin and egg yolk based extenders. *Animal Reproduction Science.* 2015;163:128-34.
43. O’ Meara CM, Hanrahan JP, Prathalingam NS, Owen JS, Donovan A, Fair S, et al. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology.* 2008;69:513-22.
44. Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology.* 2014;81:5-17.e3.
45. Salvetti P, Joly T, Baudot A. Effect of antibiotics on thermodynamic properties of freezing media in rabbit species: A first calorimetric approach. *Cryobiology.* 2006;53:268-75.

1.3. Résultats et Discussion

L'évaluation *in vitro* de l'intégrité de la membrane, de l'acrosome, du potentiel mitochondrial transmembranaire et de la mobilité des spermatozoïdes montre que les milieux de congélation contenant du jaune d'œuf (sperme ovin) et les milieux commerciaux (sperme bovin) protègent mieux le sperme que les milieux contenant du CRYO3, après congélation à -196°C. L'évaluation *in vivo* réalisée chez les ovins (195 brebis charollaises inséminées) ne met en évidence aucune différence significative entre le milieu classique à base de jaune d'œuf et de lait et le milieu CRYO3 avec néanmoins des taux de fertilité élevés (72 % et 67 % de taux de gestation, respectivement). Chez le taureau, la fertilité *in vitro* (par fécondation *in vitro*) ou *in vivo* (par insémination artificielle) n'a pas été testée.

Dans notre étude, en dépit d'une semence fortement dégradée par l'utilisation du CRYO3 (environ 5 % de membranes et d'acrosome intacts vs. 20 % pour le milieu de référence), la fertilité n'est pas modifiée. Nous n'avons observé aucune corrélation entre les paramètres de mobilité des spermatozoïdes décongelés et les paramètres *in vivo* (taux de gestation, prolificité et GMQ). Selon la revue de Amann et Waberski en 2014 [435], les paramètres CASA de mobilité ne permettent pas de prédire la fertilité et sont moins pertinents pour les centres de collecte que pour les laboratoires de biologie. Nous avons supposé que la méthode d'insémination par laparoscopie ait pu gommer les différences observées *in vitro* entre les échantillons, notamment grâce au dépôt de la semence proche du site de fécondation. Mais cette seule hypothèse demeure insuffisante pour expliquer les résultats puisque l'intégrité de l'acrosome doit être conservée pour la fécondation. Une autre hypothèse serait que le CRYO3 sélectionne une sous population de spermatozoïdes plus résistante, qui conserve ainsi la capacité de féconder malgré les altérations engendrées par la congélation, ou qui reste la seule non altérée par les contraintes de la congélation.

Pour conclure, nous avons pu montrer que le milieu OPTIXcell®, composé de liposomes, présentait les meilleurs résultats *in vitro* pour le sperme bovin. Le sperme ovin peut être congelé dans un milieu synthétique (CRYO3) dès lors qu'une laparoscopie est utilisée pour la mise en place et que la valorisation commerciale n'est pas l'objectif privilégié (cryobanques vs. échanges internationaux).

Ces deux études préliminaires aboutissent à quatre constats : (i) le milieu composé de CRYO3 utilisé pour des analyses *in vitro* induit une chute **drastique de la qualité du sperme** après équilibration à 4°C (sperme bovin) et après décongélation (spermes bovin et ovin) ; (ii) l'insémination par laparoscopie chez la brebis permet **de compenser les différences de qualité de sperme** observées *in vitro* ; (iii) **aucune différence significative** n'est observée chez les bovins **entre le témoin négatif et le milieu CRYO3**, démontrant l'utilité d'un témoin négatif dans les études expérimentales ; et (iv) l'étude thermodynamique des solutions cryoprotectrices semble permettre de mieux prédire leur comportement et donc leur effet sur la conservation du sperme.

2. Optimisation des conditions de congélation du sperme ovin

Nous avons également cherché à optimiser la congélation du sperme dans l'espèce ovine par quatre voies différentes : (i) en **testant une vitesse de refroidissement plus rapide** et en **améliorant le tampon de base** (remplacement du glucose par du fructose) ; (ii) en **analysant la toxicité du CRYO3** durant **l'équilibration du sperme à 4°C** ; (iii) en **utilisant un témoin négatif *in vitro* et *in vivo*** ; et (iv) en **étudiant les propriétés thermodynamiques** des solutions cryoprotectrices. En effet, les analyses *in vitro* n'étant pas le plus souvent corrélées à la fertilité, il nous a semblé judicieux d'inséminer des brebis avec du sperme congelé dans un milieu dit témoin négatif sans additif à base de tris – glycérol). Pour des questions de disponibilité des animaux, cette troisième étude a été réalisée sur une race ovine différente (Blanche du Massif Central) de celle de la première étude et un autre environnement (station de testage Fedatest, Mazeyrat d'Allier).

2.1. Publication n°3 –

Laparoscopic insemination method in sheep allows the use of an animal protein-free and inexpensive freezing medium

Article prêt à soumettre à *Cryobiology*

Aujourd'hui, les produits d'origine animale sont largement utilisés dans les milieux de congélation de sperme pour leurs propriétés cryoprotectrices. À cause des risques sanitaires qu'ils peuvent engendrer, ces produits ont tendance actuellement à être substitués. STEMALPHA.CRYO3® (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) appelé "CRYO3" est un milieu de préservation chimiquement défini, couramment utilisé en France pour congeler les tissus et cellules souches hématopoïétiques humaines. Le but de cette étude est d'évaluer les effets d'un milieu composé de CRYO3 et de différentes cinétiques de refroidissement sur les paramètres *in vitro* et *in vivo* après congélation de sperme ovin. Le sperme de six béliers de race Blanche du Massif Central a été collecté à l'aide d'un vagin artificiel et congelé dans trois milieux différents : un milieu contenant du jaune d'œuf et du lait (témoin positif), un milieu contenant une base tris-fructose-glycérol-tréhalose (témoin négatif) et un milieu contenant une base tris-fructose-glycérol-tréhalose et du CRYO3. Deux cinétiques de refroidissement ont été utilisées : 5 cm ou 20 cm au-dessus de l'azote liquide. Le milieu contenant du CRYO3 et le milieu témoin positif ont été caractérisés par calorimétrie différentielle à balayage. L'intégrité membranaire (Iodure de Propidium/SYBR-1), l'intégrité de l'acrosome (FITC-PNA/IP) et le potentiel transmembranaire mitochondrial (JC-1) des spermatozoïdes ont été évalués par cytométrie en flux, tandis que l'intégrité membranaire fonctionnelle a été évaluée à l'aide d'un test hypo-osmotique ; les paramètres de motilité ont été objectivés par un système d'analyse automatisée du sperme (CASA). Le taux de gestation, la prolificité et le gain moyen quotidien des agneaux ont été étudiés après insémination par laparoscopie (n = 75 brebis). En dehors du degré d'oscillation de part et d'autre de la trajectoire moyenne du spermatozoïde, aucun effet significatif de la cinétique de refroidissement n'a été observé. Le témoin positif composé de jaune d'œuf et de lait a permis d'obtenir de meilleurs taux de viabilité et qualités des spermatozoïdes, excepté pour la rectitude de la trajectoire des cellules. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée après insémination, quel que soit le

milieu (témoin positif, milieu CRYO3 et témoin négatif, respectivement) et le paramètre étudié : taux de gestation (71 %, 64 % et 74 %), taux de mise bas (68 %, 61 % et 74 %) et prolificité (2.0, 2.1 et 1.7). Cette étude démontre que le CRYO3 ne peut pas remplacer le jaune d'œuf et le lait dans le milieu de congélation. De plus, le recours à la laparoscopie permet d'obtenir des taux de mise bas de 74 % avec un milieu simple à produire et peu onéreux. Ce milieu synthétique (tampon tris – glycérol – tréhalose sans autre additif) constitue une option intéressante pour une stratégie de stockage à long terme (préservation de la diversité génétique) et des échanges internationaux chez les ovins.

Laparoscopic insemination method in sheep allows the use of an animal protein-free and inexpensive freezing medium

Lucie Gavin-Plagne^{1*}, Lionel Boyer^{2,3}, Anne Baudot⁴, Magda Guedes Teixeira¹, Gérard Louis⁴, Loris Commin¹, Samuel Buff⁴, Thierry Joly^{1,5}

¹ UPSP ICE 2016.A104, VetAgro Sup, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France

² Fedatest, Mazeyrat d'Allier, France

³ GIE Us Rom, Mazeyrat d'Allier, France

⁴ INSERM U1148, Université Paris Descartes, Paris, France

⁵ UPSP ICE 2011-03-101, ISARA-Lyon, Université de Lyon, Lyon, France

* Corresponding author

Telephone : +33 676 675 790

Fax : +33 478 876 788

E-mail: lucie.gavin-plagne@vetagro-sup.fr (LGP)

VetAgro Sup

1 avenue bourgelat

69280, Marcy l'étoile

France

Funding : This work was supported by CRB-Anim [ANR-INBS11-0003].

Abstract

Animal-derived products are widely used in sperm cryopreservation for their cryoprotective properties. These components, however, require to be replaced because of sanitary risks. STEMALPHA.CRYO3 (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) called "CRYO3" is a chemically defined preservation medium currently used for freezing human tissue and adult stem cells. The aim of this study was to evaluate the effects of a CRYO3-based medium and of different cooling rates on *in vitro* parameters and *in vivo* fertility of ram sperm. Sperm from four *Blanche du Massif Central* rams was collected using an artificial vagina, then split and frozen using three media and two cooling rates. Sperm membrane integrity (PI/SYBR-14), acrosome integrity (FITC-PNA/PI) and mitochondrial membrane potential (JC-1) were assessed using flow cytometry, while functional membrane integrity was assessed using a hypo-osmotic swelling test and motion characteristics, evaluated by computer-assisted sperm analysis. Pregnancy rate, parturition rate and prolificacy were evaluated after performing laparoscopic inseminations. Moreover, the freezing media were characterized thermodynamically using a differential scanning calorimeter. The cooling rates had no significant effect, except on the wobble motion parameter. The positive control medium showed significantly higher results than CRYO3-based medium and the negative control medium for all *in vitro* parameters, except for straightness motion parameter. Conversely, field trials showed no significant difference between the media for pregnancy rate (71%, 64% and 74%), parturition rate (68%, 61% and 74%) and prolificacy (2.0, 2.1 and 1.7), for the positive control, CRYO3-based medium and the negative control respectively. This study showed that the product, CRYO3, cannot replace egg yolk and milk in freezing extenders. Moreover, for the first time, we showed that laparoscopic inseminations allowed a 74 % parturition rate thanks to an easy and inexpensive medium composed only of a Tris buffer and glycerol. This medium, although could not be used in large scale, remains an option for international transport or long-term storage of genetic diversity.

Introduction

Animal-derived products (egg yolk, milk) have long been used to preserve frozen sperm in many species [1], especially rams [2,3]. Since 1939 [4], egg yolk has been routinely added to the sperm freezing media for minimising cryoinjuries. Indeed, egg yolk provides protection against cold shock [4,5] and has a protective effect on the plasma membrane [2]. Milk, as

skimmed milk or whole milk, has also been used as a component for freezing media [2]. Nevertheless, the use of animal-derived products presents numerous drawbacks. The first major concern of using egg yolk or milk is the sanitary risk [6]. Moreover, the biochemical composition of egg yolk is extremely variable, which leads to variable results. Likewise, the presence of debris and the greater viscosity of these components render standardising microscopy assessment of frozen thawed semen more difficult [7]. Additionally, egg yolk provides aromatic amino acids and therefore contributes to the production of reactive oxygen species to the detriment of live spermatozoa [8,9]. Also, spreading exotic disease through international transport is an emerging concern.

Today, alternatives to animal-derived products for sperm freezing are available. Indeed, soya lecithin and liposome-based media have been used extensively in many species to replace media containing animal proteins [3,6,7,10–13], despite of their unstable and variable properties [14]. In breed societies managing ovine species, sperm is cryopreserved according to a method adapted from Colas [15], using egg yolk and milk in extenders. Using such media is acceptable within a short-term commercial strategy. However, it sounds necessary to develop the use of stable, synthetic and chemically defined medium in biobank to overcome any update of the regulations by the future. It might be necessary to cryopreserve semen in a stable, synthetic and chemically defined medium. STEMALPHA.CRYO3 (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) called "CRYO3" is a patented serum-free, protein-free and dextran-free medium (manufactured according to good manufacturing practices [cGMP-annex 1] in compliance with 2001/83/EC). CRYO3 is composed of synthetic hyaluronic acid of high molecular weight ($> 10^6$ D), glucose, carbohydrates, amino acids, mineral salts, vitamins, fatty acids esters and buffers. It was initially designed for clinical applications, in order to replace serum in somatic and human adult stem cells freezing medium [16–19]. More recently, it has been shown as a potential medium to cryopreserve reproductive cells (ie. Rabbit [20,21] and bovine [22] embryos, ram sperm [Gavin-Plagne et al., 2018; *In Press*]).

The objectives of this study were firstly to avoid all forms of derived (plant or animal origin), or unstable and variable products, and secondly to test a faster cooling rate. The aim of the present study was to evaluate **the effect of a chemically defined medium** (CRYO3-based medium) on ***in vitro* parameters** and **fertility parameters of ovine sperm**. The evaluation of CRYO3 as a potential substitute to egg yolk and milk was performed using two approaches: a thermodynamic approach using Differential Scanning Calorimetry (DSC) and a biological approach using ovine sperm freezing and artificial inseminations.

Materials and Methods

The design of this veterinary clinical study was approved by the animal research ethics committee of VetAgro Sup. All animal procedures conformed to the European Regulations (Regulation (EU) 2016/1012 related to zootechnical and genealogical conditions for the breeding, trade in and entry into the Union of purebred breeding animals, hybrid breeding pigs and the germinal products thereof).

Experimental design

The experimental design is summarized in Figure 1. Twenty-four ejaculates (6 rams, four replicates) and two factors were evaluated:

- the effect of the freezing medium, with a positive control (egg yolk and milk-based medium), a tested medium (CRYO3-based medium) and a negative control (glycerol-based medium without additives);
- the effect of the cooling rate, related to the distance between the straws and the surface of liquid nitrogen during the freezing process (5 cm and 20 cm).

Sperm was assessed *in vitro* before (hypo-osmotic swelling test [HOS test] and subjective motility score) and after freeze-thaw procedure (flow cytometry, CASA and HOS test). Moreover, the toxicity of the media was evaluated by HOS test during equilibration at 4°C before the addition of glycerol-based extender (2h), after its addition (2h20) and at the end of equilibration (4h). Also, DSC was used to characterize the media and the cooling rates were recorded using a thermocouple. Finally, the post-thaw fertility of sperm samples was assessed performing laparoscopic inseminations.

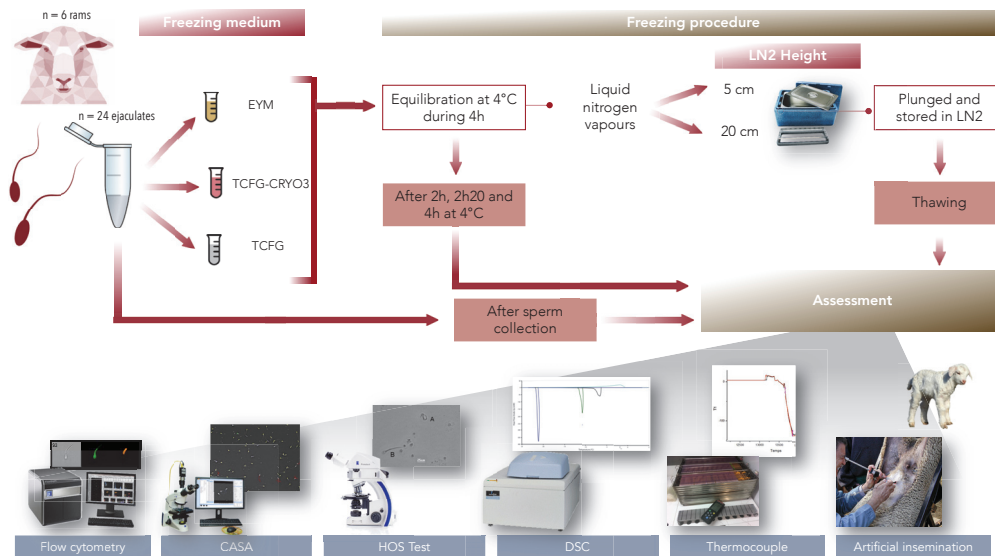


Figure 1. Experimental design of the study.

Ram sperm was frozen either in a control medium (EYM), containing egg yolk and milk; or in a CRYO3-based medium, called “TCFG-CRYO3”, or in a negative control, called “TCFG”, consisted of a Tris buffer and glycerol. After collection, sperm was assessed by subjective motility and HOS Test, while equilibrated sperm at 4°C after 2h, 2h20 and 4h was only assessed by HOS Test. Frozen-thawed sperm quality was evaluated by flow cytometry, CASA and HOS Test. Freezing media were thermodynamically characterized using a Differential Scanning Calorimeter. The cooling rates associated to the two levels of LN2 heights were recorded. Artificial inseminations on 75 ewes were performed to evaluate sperm fertility. CASA: Computer-Assisted Sperm analysis; DSC : differential scanning calorimeter; LN2 : Liquid Nitrogen; TCF : Tris buffer supplemented with citric acid and fructose.

Semen collection

Sexually mature *Blanche du Massif Central* rams ($n = 6$ rams; three to four years old) with proven fertility were used four times for this study. The rams were housed in a breed society managing ovine species (Fedatest GIE US Rom, Agreement No. CO4301, Mazeyrat d’Allier, France) under uniform conditions. Animals were maintained under natural light and were subjected to semen collection twice a week. For this study, rams were subjected to semen collection twice in the morning with an artificial vagina. Directly after collection, the volume and concentration (ACCUREAD photometer, IMV Technologies, L’Aigle, France) of each ejaculate were evaluated. Subjective motility (negative phase contrast) was assessed using a motility score from 0 to 5 [23]. Only ejaculates that presented a white colour and a motility score greater or equal to 4 were used and held at 37°C in a water bath before dilution and freezing procedure.

Semen freezing

Each ejaculate ($n = 24$) was split into three equal aliquots that were cryopreserved in three media (Table 1) :

- a medium containing a Tris buffer supplemented with citric acid and glucose (TCF; Tris-hydroxymethyl-aminomethane: 27 g/L, citric acid: 14 g/L, fructose: 10 g/L; pH = 7.24; osmolarity = 294 mOsmol), trehalose and glycerol (TCFG), as negative control;
- a CRYO3-based medium (TCFG-CRYO3) composed of the same base medium (TCFG) supplemented with 20 % (v/v) CRYO3 (pH = 6.8-7.6; osmolarity = 305-390 mOsm; viscosity = 1-7 cps);
- the egg yolk and milk-based medium (EYM) adapted from Colas [15] and currently used by French breed societies managing ovine species, as positive control.

The composition of each freezing medium and the addition of glycerol in a two-step dilution procedure are summarized in Table 1 and Figure 2.

Table 1. Composition of extender 1 and extender 2 for each freezing medium.

		EYM	TCFG-CRYO3	TCFG
Extender 1 (at 30°C)	Sugar	Lactose (102.96 g/L)	-	-
	Additive	20 % (v/v) hen egg yolk	20 % CRYO3	-
	Buffer	Gentamicin (Gibco, 10 mg/mL) in sterile water	TCF	TCF
Extender 2 (at 4°C)	Sugar	-	0.2 M trehalose	0.2 M trehalose
	Glycerol	10 % (v/v) glycerol	10 % (v/v) glycerol	10 % (v/v) glycerol
	Buffer	90 % (w/v) of milk powder diluted in sterile water (Regilait, 40 g/L of semi-skimmed milk) and gentamicin (Gibco, 10 mg/mL)	TCF	TCF
	pH	Adjusted at 6.8	7.0	7.0

TCF: Tris buffer supplemented with citric acid and fructose (Tris-hydroxymethyl-aminomethane, 27 g/L; citric acid, 14 g/L; fructose, 10 g/L; pH = 7.0).

Briefly, the semen was diluted at 30°C up to 800×10^6 spz/mL in a glycerol-free extender (Extender 1, Table 1), then equilibrated at 4°C during two hours. A second extender containing

glycerol was added (1:1, v:v) at 4°C in two steps (20 min apart) up to a final concentration of 400×10^6 spz/mL (Table 1, Figure 2). Total sperm equilibration lasted four hours.

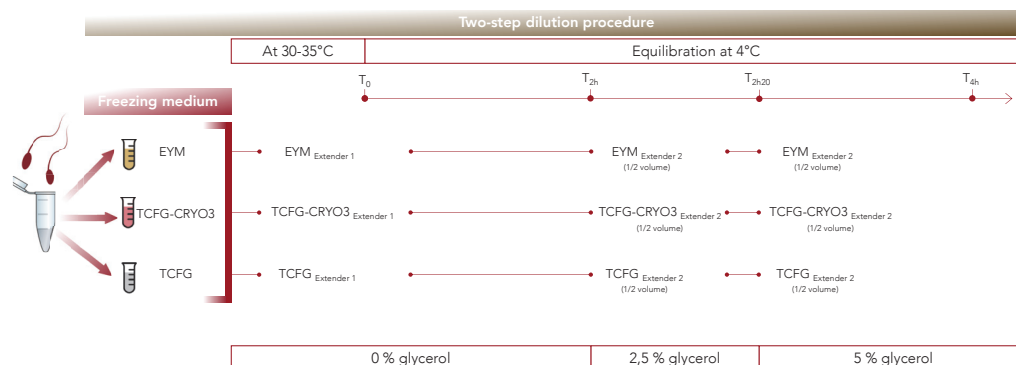


Figure 2. The two-step dilution procedure of ram sperm during equilibration at 4°C.

EYM: egg yolk and milk-based medium (positive control); TCFG-CRYO3: CRYO3-based medium in TCF buffer and glycerol; TCFG: TCF buffer and glycerol (negative control); TCF: Tris buffer supplemented with citric acid and fructose.

After equilibration, sperm was loaded into 0.25 mL French straws (IMV Technologies, L'Aigle, France). Straws were then suspended horizontally 5 cm or 20 cm above the liquid nitrogen surface for ten minutes, before being plunged into liquid nitrogen. Straws were stored in liquid nitrogen for at least two weeks prior to *in vitro* assessment or artificial inseminations. Thawing was performed by submerging the straws in a water bath at 37°C for 30 seconds. Two straws corresponding to the same experimental condition were thawed and pooled before assessment, in order to reduce inter-straw variation.

Physical assessment

Monitoring the cooling rates

The cooling rates were calculated using type T thermocouples (TC Direct, Dardilly, France) inserted in a separate straw containing cells and freezing medium. Thermocouples were connected to a four-channel recorder, which allowed the record of the thermal evolution of the freezing procedure. Temperatures were recorded every two seconds.

Thermodynamic properties of the media

The phase transitions of the freezing media were characterized using a power compensation DSC (Diamond DSC, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) equipped with a liquid

nitrogen cooling accessory (Cryofill) and the Pyris software (11.11.1 version). The accuracy provided in the technical specifications of this DSC is $\pm 0.11^\circ\text{C}$ for temperature and $\pm 1.10\%$ for energy. The DSC was calibrated for temperature and energy at $+2.5^\circ\text{C}/\text{min}$ with two standards: the ice melting of pure bi-osmosed water (0°C ; 333.40 J/g) and the crystallographic transition of cyclohexane in its solid state (-87.06°C ; 79.58 J/g), for a high data range of 720 mW . The validity of the calibration was verified regularly using tests on pure bi-osmosed water and cyclohexane, and the maximal error of reproducibility obtained with these pure standards was $\pm 0.36^\circ\text{C}$ (temperature) and $\pm 0.62\%$ (energy). Experiments were conducted using standard hermetically sealed aluminium pans (Ref. 0219–0062, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) designed for volatile samples. The pans were previously cleaned following the standard procedure provided by Perkin-Elmer. During the experiment, the cryopreservation media were stored less than 2 weeks at 4°C in Eppendorf tube previously cleaned and sterilized to remove any impurities that could interfere with the thermodynamic measures. Three replicate measurements were taken for each solution. Before testing, each solution was stored at room temperature for approximately 30 min. The solution was then gently mixed through a series of 5 capsizing. The solution was then loaded in aluminum pans ($20\ \mu\text{L}$) using a micropipette to limit the variations in weight between the samples. The aluminum pans were first weighed without cryopreservation solution on a high sensibility scale balance (XS105 DualRange, Metler Toledo, France) and were then weighed after the loading of the cryopreservation solution in order to measure the sample mass. The weights were determined with a resolution of 10^{-5} g . The samples weight was 3.70 ± 0.38 (mean \pm standard deviation, $n = 6$). Three cycles of cooling and warming between 10°C and -150°C were applied to each sample to determine the melting temperature (T_m , in degree celcius [$^\circ\text{C}$]) and the crystallization enthalpy variation (ΔH , in Joules per gram [J/g]). An empty oven baseline of the DSC, systematically subtracted from the sample thermograms, was regularly recorded with care, using the same protocol in temperature variations T_m is the temperature under which crystallization can occur, and ΔH allows the quantification of crystallized ice in the solution (Joules per gram, J/g). We determined ΔH_{max} which represents the maximum crystallization quantity that can develop in each medium, and $\Delta H_{50^\circ\text{C}/\text{min}}$ which represents the crystallization quantity at a cooling rate of $50^\circ\text{C}/\text{min}$. A rapid cooling ($100^\circ\text{C}/\text{min}$) was followed by a slow warming ($2.5^\circ\text{C}/\text{min}$) to measure T_m . T_m was defined at the top of the main melting peak. A slow cooling ($2.5^\circ\text{C}/\text{min}$) was followed by a rapid warming ($20^\circ\text{C}/\text{min}$) to determine ΔH_{max} . For determining $\Delta H_{50^\circ\text{C}/\text{min}}$, a rapid cooling of $50^\circ\text{C}/\text{min}$ and a rapid warming ($20^\circ\text{C}/\text{min}$) was

applied. ΔH was measured by evaluating the area encompassed between the peak of crystallization and the baseline. The areas were calculated using a sigmoid curve baseline.

Sperm evaluation before and after thawing

Post-thawed semen was diluted in the TCF buffer in order to obtain 100×10^6 spz/mL for assessment. Sperm after collection was evaluated by subjective motility (score 1 to 5) [24] and HOS test. Equilibrated sperm in EYM and TCFG-CRYO3 at 4°C was assessed using HOS test. After freezing-thawing, sperm was assessed by flow cytometry, HOS test and CASA.

Flow cytometry analyses

Frozen-thawed semen was evaluated by flow cytometry to assess the plasma membrane integrity (fresh and frozen-thawed samples), the acrosome integrity and the mitochondrial membrane potential. For all samples, the sperm population was identified (FSC/SSC dot plots) and 10,000 events among the sperm population were analysed at a low rate (200 cells/s). Analyses were performed using Flowsight Amnis (Emd Millipore, Seattle, WA) equipped with blue-green ($\lambda=488$ nm, 60 mW), red ($\lambda=642$ nm, 100 mW) and side scatter (SSC; $\lambda=785$ nm, 12 mW) solid-state lasers. The Flowsight is equipped with a quantitative imaging upgrade that includes a 488-nm laserpower doubler and increased image resolution (40× magnification). It allowed the visualisation of each event acquired via a classical microscope objective. It permitted us to gate precisely the sperm population, and thus to eliminate debris and other cell particles, leading to an accurate analysis of the sample. Post-acquisition analyses were performed on Amnis IDEAS software (Millipore-Amnis; version 6.2).

Plasma membrane integrity was evaluated with a Live/Dead Sperm Viability Kit (Invitrogen, Eugene, OR, USA) using propidium iodide (PI) and SYBR-14 staining. Intact spermatozoa appeared green in SYBR-14, whereas membrane-damaged spermatozoa were stained in red by PI. For each sample, 10 μ L of semen (100×10^6 spz/mL) were incubated with SYBR-14 (working concentration 45 nM) and PI (working concentration 11 μ M) in a TCF extender (5 min, 37°C). Sperm membrane integrity was assessed with a 488-nm excitation laser and a 530 ± 30 nm bandpass emission filter for SYBR-14 and 650 ± 13 nm bandpass emission filter for PI. The percentages of intact (SYBR-14 +) and membrane-damaged (PI +) spermatozoa were determined.

Acrosome integrity was assessed using FITC-PNA (1 mg/mL, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). For each sample, 10 μ L of semen (100×10^6 spz/mL) were incubated with

FITC-PNA (working concentration 10 µg/mL) in TCF extender (15 min, 37°C). Propidium iodide (working concentration 11 µM) was added 5 minutes before the end of the incubation. Fluorescence was collected with a 488 nm excitation laser, a 530 ± 30 nm bandpass emission filter for FITC-PNA and a 650 ± 13 nm bandpass emission filter for PI. The percentages of cells with intact acrosome (PI - / FITC-PNA -) were recorded.

High mitochondrial membrane potential was assessed using the lipophilic cation JC-1 (1,5 mM, Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, USA). For each sample, 10 µL of semen (100×10^6 spz/mL) were incubated with JC-1 (working concentration 0.75 mM) in TCF extender (15 min, 37°C). Fluorescence was collected with a 488-nm excitation laser, a 530 ± 30 nm bandpass emission filter and 610 ± 30 nm bandpass emission filter. The percentages of cells with high mitochondrial membrane potential (hMMP) staining in orange and with low mitochondrial membrane potential (green stained cells) were recorded.

Hypo-osmotic swelling test

The functional integrity of sperm membrane can be evaluated with the hypo-osmotic swelling test, as described by Jeyendran et al. [24]. HOS test was performed for evaluating sperm after sperm collection, after an equilibration at 4°C and after freezing-thawing. Briefly, 10 µL of semen at a concentration of 100×10^6 sperm/mL were diluted in 100 µL of a hypo-osmotic solution (100 mOsmol; 4.9 g/L citrate sodium, 9 g/L fructose). A smear test was performed after 30 min of incubation at 37°C. A total of 100 spermatozoa were observed under a phase-contrast microscope at magnification 400×. Spermatozoa with functional membranes appeared with swollen and curved tails.

Motion characteristics

The post-thaw motility was evaluated using Sperm Class Analyser software (SCA2013, Microptic S.L; Barcelona, Spain) with a 10× negative phase contrast objective. Each semen sample was diluted to a concentration of 20×10^6 spz/mL. Briefly, a 5 µL sample of the diluted semen was loaded in a pre-warmed analysis chamber with a depth of 20 µM (Leja Products, Nieuw-Vennep, The Netherlands). For each sample, 10 fields were analysed and percentages of motile (VAP > 10 µm/s) and progressively motile (STR index > 80%) spermatozoa, amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity (LIN=VSL/VCL), wobble (WOB=VAP/VCL) and straightness (STR=VSL/VAP) were recorded. The camera setting was 50 frames/s.

Artificial insemination

Multiparous *Blanche du Massif Central* ewes (n = 75) housed on free pasture were used for intrauterine insemination by laparoscopy. Ewes were synchronised with an intravaginal fluorogestone acetate sponge (20 mg, Chronogest, MSD Animal Health, Angers, France) for 14 days. Fifty-eight hours before artificial insemination (AI), the sponges were removed and animals were given an intramuscular injection of 500 IU of eCG (MSD Animal Health, Angers, France). Each ewe received one dose (one straw) of frozen-thawed semen. Briefly, the inseminating pipette was introduced into the lumen of each uterine horn. The straw was equally deposited (0.125 mL of frozen-thawed semen containing approximately 100×10^6 sperm) in each horn (50×10^6 sperm/horn). Ewes were randomly assigned to the EYM group (n = 28 ewes inseminated with the EYM medium), the CRYO3 group (n = 28 ewes inseminated with the TCFG-CRYO3 medium) and the negative group (n = 19 ewes inseminated with the TCFG medium).

Frozen straws were randomly assigned to ewes and equally distributed for AI (approximately 23 to 26 ewes inseminated per ram). In order to have sufficient number of inseminated ewes/ram, we decided to use the best three rams within the six rams collected, three sessions within the four sperm collection sessions and only sperm frozen at 5 cm of LN2 surface. AI procedures were performed by a certified operator. Also, animal welfare was of specific concern, during and after laparoscopic procedures.

Pregnancy rate, parturition rate and prolificacy were determined as the following equations:

$$\text{Pregnancy rate (\%)} = \frac{\text{Number of gravid ewes}}{\text{Total number of inseminated ewes}} \times 100$$

$$\text{Parturition rate (\%)} = \frac{\text{Number of delivered ewes}}{\text{Total number of inseminated ewes}} \times 100$$

$$\text{Prolificacy rate} = \frac{\text{Mean number of lambs}}{\text{Delivered ewes}}$$

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software [25]. The results were presented as mean \pm standard deviation. The percentage of functional membrane integrity (HOS test) evaluated during sperm equilibration at 4°C was analysed using a mixed model including the time and the medium as fixed effects, and the ram as a random effect. The percentage of membrane integrity, percentage of acrosome integrity, percentage of hMMP, percentage of functional membrane integrity and sperm motility parameters were analysed using a mixed model including the ram as a random effect. The medium and the distance above the surface of liquid nitrogen were included as fixed effects with three and two levels respectively. Pregnancy and parturition rates, following a binomial distribution, and prolificacy, assumed to follow a Poisson distribution, were analysed using generalized linear models, including the medium as a fixed effect and the ram as a random effect. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Thermodynamic values were analysed using descriptive statistics.

Results

Cooling rates and thermodynamic properties

Crystallization appeared at -11°C for the two levels of LN2 height (5 cm and 20 cm). The average cooling rates, as measured from the linear part of the temperature records, are shown in Table 2. Whatever the freezing step, the cooling rate was higher using the shortest distance from straws to the surface of liquid nitrogen.

Table 2. Cooling rates measured within the straw during the freezing procedure.

	LN2 Height	
	5 cm	20 cm
Before crystallization (from 5°C to -11°C)	129°C/min	49°C/min
After crystallization (from -11°C to -30°C)	68°C/min	27°C/min
Before being plunged into LN2	6°C/min	2°C/min

As shown in Table 3, the average melting temperature T_m of the two media were close. We observed that with a cooling rate of 50°C/min, EYM and TCFG-CRYO3 do not achieve their

maximum crystallisation (-198 J/g vs. -216 J/g and -218 J/g vs. -223 J/g for $\Delta H_{50^\circ\text{C}/\text{min}}$ and ΔH_{max} respectively). TCFG-CRYO3 was found to show more variability than EYM. Moreover, the crystallization temperature of EYM was lower than those of TCFG-CRYO3. The crystallization temperatures observed at a cooling rate of $2.5^\circ\text{C}/\text{min}$ and $50^\circ\text{C}/\text{min}$ were lower than observed with the thermocouple (-11°C).

Table 3. Thermodynamic characteristics of the freezing media.

Medium	T_m ($^\circ\text{C}$)	ΔH_{max} (J/g)	$T_{c2.5^\circ\text{C}/\text{min}}$ ($^\circ\text{C}$)	$\Delta H_{(-50^\circ\text{C}/\text{min})}$ (J/g)	$T_{c50^\circ\text{C}/\text{min}}$ ($^\circ\text{C}$)
EYM	-1.27 ± 0.16	-215.54 ± 5.70	-18.66 ± 2.33	-197.94 ± 0.91	-20.72 ± 1.21
TCFG-CRYO3	-1.44 ± 0.34	-223.14 ± 5.45	-15.42 ± 1.87	-217.74 ± 4.77	-16.84 ± 1.29

Results are presented as the means \pm standard deviation of 3 replicates of each medium. $T_{c(2.5^\circ\text{C}/\text{min})}$: Crystallization temperature at a cooling rate of $2.5^\circ\text{C}/\text{min}$; $T_{c(50^\circ\text{C}/\text{min})}$: Crystallization temperature at a cooling rate of $50^\circ\text{C}/\text{min}$; T_m : Melting temperature; ΔH_{max} : maximum crystallization enthalpy variation; $\Delta H_{50^\circ\text{C}/\text{min}}$: crystallization enthalpy variation at a cooling rate of $50^\circ\text{C}/\text{min}$.

Sperm quality before equilibration

Ejaculates had an average concentration of $3.93 \pm 0.80 \times 10^9$ spermatozoa/mL and an average volume of 2.70 ± 0.7 mL (Table 4). Fresh sperm exhibited an average functional membrane integrity (HOS test) of 54.8 ± 20.2 % and motility score of 4.78 ± 0.06 (Figure 2).

Table 4. Concentration and volume of ejaculates per ram.

	976	990	1022	1039	1046	1050
Concentration ($\cdot 10^9/\text{mL}$)	3.5 ± 0.3	3.8 ± 1.2	4.5 ± 1.0	4.0 ± 0.7	4.2 ± 0.8	3.6 ± 0.4
Volume (mL)	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.4	2.5 ± 0.5	1.5 ± 0.1	2.5 ± 0.8	1.5 ± 0.7

Results are presented as the means \pm standard deviation of 24 ejaculates from six rams.

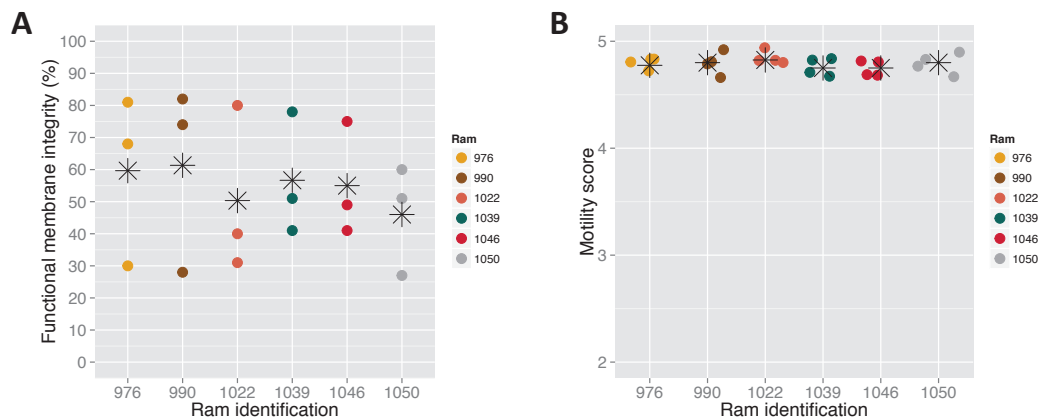


Figure 3. Sperm quality before freezing, per ram.
 (A) Functional membrane integrity (HOS Test), (B) Motility score (subjective motility).
 The symbol * within the graphs corresponds to the mean.

Sperm quality after equilibration

Sperm equilibrated at 4°C showed a significant decrease of functional membrane integrity depending on the time and the medium (Figure 2).

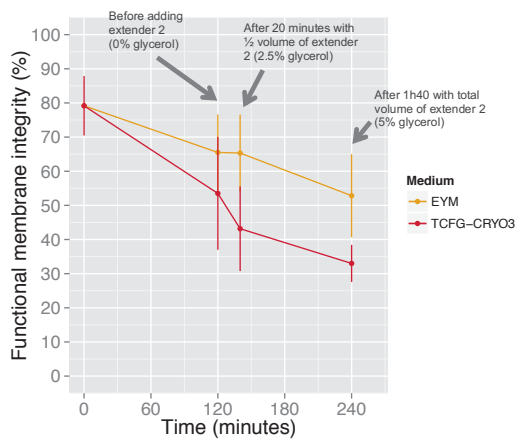


Figure 4. Functional membrane integrity of sperm equilibrated at 4°C depending on the time and the freezing medium.

Sperm quality after freezing-thawing

***In vitro* parameters**

The main sperm parameters are shown in Figure 5. Motions characteristics are shown in Table 5. The cooling rates had no significant effect, except on the wobble motion parameter and on the membrane integrity. However, significant differences were found between media, except for the straightness and the beat cross frequency. Globally, EYM showed the highest values after freezing-thawing. TCFG-CRYO3 and TCFG were not significantly different, except for the wobble (at 5 cm and 20 cm above LN2) and linearity (at 5 cm above LN2).

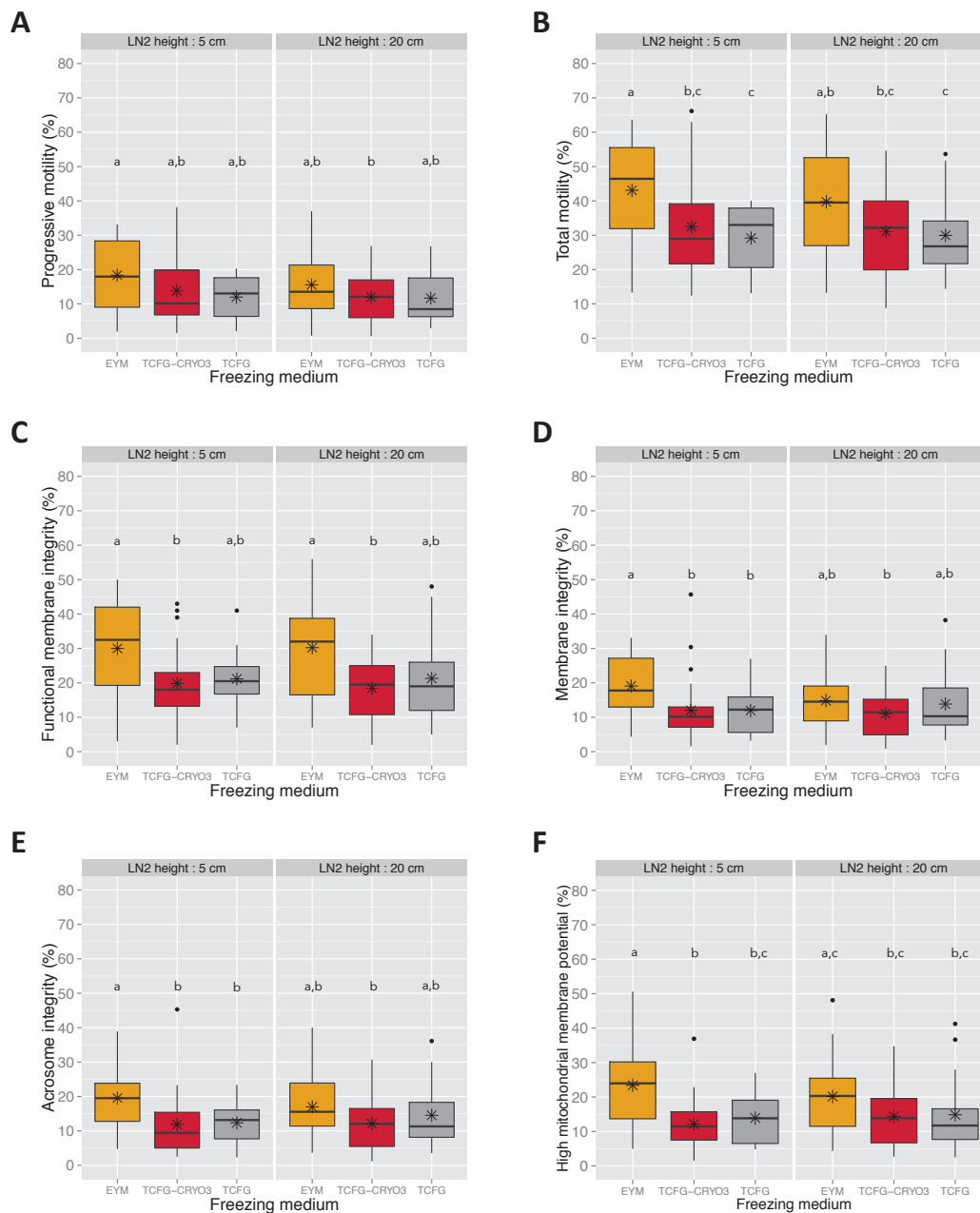


Figure 5. Main *in vitro* parameters of ram sperm frozen in different media using two cooling rates. (A) Progressive motility, (B) Total motility, (C) Functional membrane integrity (HOS test), (D) Membrane integrity, (E) Acrosome integrity, (F) High mitochondrial membrane potential.

The symbol * within the graphs corresponds to the mean.

The median is indicated by a horizontal line.

^{a,b,c} Values within a graph with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$

Table 5. Motion characteristics of sperm frozen at 5 cm and 20 cm above LN2 surface

	EYM		TCFG-CRYO3		TCFG	
	5 cm	20 cm	5 cm	20 cm	5 cm	20 cm
VCL ($\mu\text{m/s}$)	91.3 \pm 29.1 ^a	81.5 \pm 23.4 ^{ab}	76.8 \pm 24.7 ^{b,c}	67.8 \pm 19.8 ^{b,c}	65.8 \pm 19.4 ^{b,c}	60.6 \pm 17.0 ^c
VSL ($\mu\text{m/s}$)	29.0 \pm 11.6 ^a	25.5 \pm 8.6 ^a	23.0 \pm 8.1 ^{ab}	20.1 \pm 7.3 ^b	23.3 \pm 8.9 ^{ab}	20.3 \pm 6.1 ^b
VAP ($\mu\text{m/s}$)	47.0 \pm 15.4 ^a	41.8 \pm 12.9 ^{ab}	36.5 \pm 11.8 ^{b,c}	32.6 \pm 9.8 ^c	35.7 \pm 10.2 ^{b,c}	32.5 \pm 10.2 ^c
LIN (%)	26.2 \pm 3.9 ^a	24.5 \pm 4.2 ^a	23.5 \pm 3.6 ^{ab}	23.1 \pm 4.0 ^b	26.9 \pm 4.6 ^c	25.6 \pm 5.2 ^{b,c}
STR (%)	54.6 \pm 4.0 ^{NS}	53.0 \pm 3.8 ^{NS}	53.6 \pm 4.0 ^{NS}	53.5 \pm 4.0 ^{NS}	55.5 \pm 5.8 ^{NS}	55.0 \pm 4.0 ^{NS}
WOB (%)	48.0 \pm 3.8 ^a	45.9 \pm 4.4 ^{ab}	43.2 \pm 4.1 ^b	42.8 \pm 4.1 ^b	47.9 \pm 4.2 ^a	47.1 \pm 5.3 ^a
ALH (μm)	2.3 \pm 0.6 ^a	2.1 \pm 0.5 ^{ab}	2.1 \pm 0.6 ^{ab}	1.9 \pm 0.5 ^b	1.8 \pm 0.5 ^b	1.7 \pm 0.4 ^b
BCF (Hz)	8.2 \pm 3.1 ^{NS}	7.4 \pm 2.4 ^{NS}	6.7 \pm 2.3 ^{NS}	6.2 \pm 2.2 ^{NS}	7.6 \pm 2.4 ^{NS}	6.8 \pm 2.1 ^{NS}

VCL = curvilinear velocity; VSL = straight line velocity; VAP = average path velocity; LIN = VSL/VCL (linearity); STR = VSL/VAP (straightness); WOB = VAP/VCL (wobble); ALH = amplitude of lateral head displacement; BCF = beat cross frequency. Results are presented as the means \pm standard deviation of 24 ejaculates from six rams.
^{a,b,c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$.

Fertility parameters

Mixed models did not show a significant difference between the freezing media for the pregnancy rate, the parturition rate and the prolificacy (Table 6). However, the negative control TCFG showed the best parturition rate with 74 % of delivered ewes.

Table 6. Effect of the freezing medium on the fertilizing ability of ram sperm frozen at 5 cm above LN2.

	EYM	TCFG-CRYO3	TCFG
Pregnancy rate	71.4 % (20/28)	64.3 % (18/28)	73.7 % (14/19)
Parturition rate	67.9 % (19/28)	60.7 % (17/28)	73.7 % (14/19)
Prolificacy	2.0	2.1	1.7

AI were performed with straws frozen at a LN2 height of 5 cm, from three rams (rams No. 1022, 1046 and 1050) and three sessions.

Discussion

Semen cryopreservation has been developed in numerous mammalian species and is widely used in farm animal breeding, particularly in bovine [26]. Ram semen cryopreservation remains difficult, however, as reflected by the low fertility rates after artificial insemination observed in this species [2]. This study was performed to investigate the effects of a chemically defined sperm cryopreservation medium on *in vitro* parameters and *in vivo* fertility in ovine species.

For this study, better results were obtained using the highest cooling rate (straws placed 5 cm above the liquid nitrogen), even if this effect was not significantly different from the slowest (straws placed 20 cm above the liquid nitrogen). This slow cooling rate is obtained with the procedure usually operated in France, while most of the authors now suggest to use cooling rates of around 50°C/min for ram sperm cryopreservation [27].

In the present study, egg yolk and milk seemed better protect spermatozoa than the CRYO3-based medium with regard to *in vitro* results. Indeed, egg yolk and milk are used in cryopreservation media as a source of lipoproteins, which are known to protect sperm cells from cold shock, mainly by maintaining membrane phospholipid integrity [28]. Numerous authors have suggested that low density lipoproteins could be responsible for the resistance of sperm during cold shock and for the improvement of motility [29–31]. In our study, we

evaluated a synthetic product composed of hyaluronic acid. Several studies used hyaluronic acid as an antioxidant supplement in sperm freezing media [32–34], or as a cryoprotectant [35]. Hyaluronic acid is known to compose the extracellular matrix and to be present in several tissue and fluids [36]. More specifically, it seems that hyaluronic acid could regulate sperm metabolism and could be involved in sperm capacitation process [37]. Supplementation of human sperm with hyaluronic acid after thawing has been shown to be beneficial [38]. However, the addition of hyaluronic acid in the freezing medium does not improve sperm quality in human [38] nor in ram, as confirmed in our study and as previously observed [33].

Our *in vitro* results (especially the sperm motility) are different from some previous studies [39,40] but consistent with others [41–45]. These discrepancies may result from the freezing material that was used (Styrofoam box *vs.* programmable freezer) and the resulting oscillations of the temperature [46] or the more abrupt drop of the temperature between 5°C and -15°C [46]. Within this range of temperature, ram sperm is very sensible to cryo-damage. Thus, a cooling rate of 5°C/min between 5°C and -25°C is more appropriate [47]. Around the temperature of crystallization (-11°C in our study), the cooling rates varied between 27°C/min and 49°C/min (straws at 20 cm above LN2), and between 68°C and 129°C/min (straws at 5 cm above LN2) after and before crystallization, respectively. Moreover, we found no significant difference between TCFG-CRYO3 and TCFG, which confirms that CRYO3 cannot protect ram sperm. To our knowledge, no study was performed on a ram sperm using freezing medium free of any additives (antioxidants, egg yolk, milk, soya lecithin or liposomes). This is the first study to confirm that ram sperm can be efficiently frozen in an easy-to-produce, phospholipid-free and inexpensive medium composed only of a Tris buffer and glycerol.

Despite poor *in vitro* results, intrauterine inseminations by laparoscopy did result in a high parturition rate for the TCFG medium (74 % *vs.* 68 % for EYM and 61 % for TCFG-CRYO3, $p > 0.05$). The number of spermatozoa per dose and the pregnancy rate associated were similar to other studies using laparoscopic inseminations [27,48,49]. We obtained also similar pregnancy rate to studies using half of the number of spermatozoa per dose (50×10^6 instead of 100×10^6 in our study) [50], suggesting that this number could be reduced. Our *in vivo* results were even better compared to other studies using fresh or frozen-thawed ram semen [51,52]. This study showed that no matter the freezing medium used, the intrauterine insemination allow satisfying fertility results. It could mean that the freezing medium is not a factor of AI success when intrauterine insemination is used. A retrospective study on 44 448 AI in the Churra breed in Spain showed that the year, the farm, the season, the AI technique (vaginal or intrauterine

insemination), the technician and the age of the ewe influence significantly the fertility success [53]. Khalifa et al. [27] showed a significant difference between two extenders composed of soya lecithin (BIOXcell vs. AndroMed) only for young ram semen. This difference was not observed for mature ram semen. Moreover, despite significant differences observed between media for *in vitro* parameters, no difference was found for the *in vivo* parameters. This highlights the fact that estimation of sperm viability in the laboratory using multiple parameters (flow cytometry, HOS test or motions characteristics) cannot predict ram sperm *in vivo* fertility. This observation is consistent with a study that showed no significant correlation between *in vitro* and *in vivo* parameters in ovine species [54]. It raises the question of the relevance in carrying out so many laboratory tests.

In this study, differences observed for *in vitro* results were not related to differences in the thermodynamic characterization of the freezing media. TCFG-CRYO3 showed however a greater variation, demonstrating its thermodynamic instability. Moreover, T_c using DSC was different from the crystallization temperature observed within the straw using the thermocouple (around -16°C vs. -11°C , respectively). This parameter has to be observed with caution because it is more dependent to experimental conditions than sample composition, compared to T_m and ΔH . Indeed, crystallization can appear because of heterogeneous nucleation, due to impurities on the aluminium pan surface, making T_c more variable. Thus, the use of DSC in understanding freezing medium behavior could improve freezing protocols particularly for embryo and stem cells slow freezing [22,55].

In the present study, we showed that the negative control medium composed of TCF and glycerol only was as good as the positive control medium composed of egg yolk and milk. On the contrary, CRYO3 failed to protect ram spermatozoa whilst it appeared to be a good substitute to serum-based media in rabbit and bovine embryo freezing.

Conclusion

This study showed that no matter the freezing medium used, laparoscopic insemination allowed to recover an acceptable parturition rate with 61 % (CRYO3-based medium), 68 % (EYM, positive control) and 74 % (TCFG, negative control). The medium consisted only of a Tris buffer and cryoprotectants thus may be appropriate to overcome the forthcoming regulatory requirements in the international trade of semen from animals of high genetic value. It could also be considered for the long-term storage of biological resources in sheep cryobanking

programs. Adjustments of the freezing procedure and further analysis must nevertheless be studied to verify the potential sperm epigenetic modifications.

Acknowledgements

We would like to thank Fedatest and GIE Us Rom for providing the semen and the team for the work on the field. We thank Stem Alpha for providing CRYO3. We thank Marie-Laure Delignette-Muller for her kind support in the statistical methods. This work was supported by a grant from the French national network of biological centres for animal resources CRB-Anim [ANR-INBS11-0003] (https://www.crbanim.fr/crb-anim_eng/).

Author Disclosure Statement

The authors have no competing financial interests.

References

1. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:3-22.
2. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:77-111.
3. Gil J, Rodriguez-Iraozqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. 2003;59:1157-70.
4. Phillips PH. Preservation of Bull Semen. *J Biol Chem*. 1939;130:415-415.
5. Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R, Andersen Berg K. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 2002;57:823-36.
6. Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 1998;50:699-706.
7. Aires VA, Hinsch K-D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 2003;60:269-79.
8. Shannon P, Curson B. Kinetics of the aromatic l-amino acid oxidase from dead bovine spermatozoa and the effect of catalase on fertility of diluted bovine semen stored at 5°C and ambient temperatures. *J Reprod Fertil*. 1982;64:463-7.
9. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:23-53.
10. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 2003;59:1241-55.
11. Sharafi M, Zhandi M, Akbari Sharif A. Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flow cytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and Tissue Banking*. 2015;16:261-9.
12. Nishijima K, Kitajima S, Koshimoto C, Morimoto M, Watanabe T, Fan J, et al. Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. *Theriogenology*. 2015;84:1172-5.
13. Ansari MS, Rakha BA, Akhter S, Ashiq M. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*. 2016;85:528-32.

14. Lasic DD. On the thermodynamic stability of liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1990;140:302-4.
15. Colas G. Effect of initial freezing temperature addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *Journal of the Society for Reproduction and Fertility*. 1975;277-85.
16. Jurga M, Forraz N, Basford C, Atzeni G, Trevelyan AJ, Habibollah S, et al. Neurogenic Properties and a Clinical Relevance of Multipotent Stem Cells Derived from Cord Blood Samples Stored in the Biobanks. *Stem Cells and Development*. 2012;21:923-36.
17. Sarnowska A, Jablonska A, Jurga M, Dainiak M, Strojek L, Drela K, et al. Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells by Bioscaffolds Protects Cell Survival and Attenuates Neuroinflammatory Reaction in Injured Brain Tissue after Transplantation. *Cell Transplantation*. 2013;22:67-82.
18. Mueller AA, Forraz N, Gueven S, Atzeni G, Degoul O, Pagnon-Minot A, et al. Osteoblastic Differentiation of Wharton Jelly Biopsy Specimens and Their Mesenchymal Stromal Cells after Serum-Free Culture: Plastic and Reconstructive Surgery. 2014;134:59e-69e.
19. Ducret M, Fabre H, Farges J-C, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, et al. Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal Manufacturing Approach. *J Endod*. 2015;41:1492-9.
20. Bruyère P, Baudot A, Joly T, Commin L, Pillet E, Guérin P, et al. A Chemically Defined Medium for Rabbit Embryo Cryopreservation. *PLOS ONE*. 2013;8:e71547.
21. Teixeira M, Commin L, Gavin-Plagne L, Bruyère P, Buff S, Joly T. Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium. *Cryobiology* [Internet]. 2018 [cité 24 juill 2018]; Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224018300749>
22. Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G, Buff S. Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*. 2012;78:1294-302.
23. David I, Kohnke P, Lagriffoul G, Praud O, Plouarboué F, Degond P, et al. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*. 2015;161:75-81.
24. Jeyendran RS, Ven HHV der, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984;70:219-28.
25. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria; 2011 [cité 12 juill 2017]. Disponible sur: <http://www.R-project.org>
26. Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*. 2016;172:1-9.
27. Khalifa T, Lymberopoulos A, Theodosiadou E. Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-blind parallel group design. *Theriogenology*. 2013;79:517-27.
28. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 2002;57:1695-706.
29. Evans RJ, Bauer DH, Bandemer SL, Vaghefi SB, Flegal CJ. Structure of egg yolk very low density lipoprotein. Polydispersity of the very low density lipoprotein and the role of lipovitellenin in the structure. *Arch Biochem Biophys*. 1973;154:493-500.
30. Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*. 1974;39:1144-9.
31. Quinn PJ, Chow PYW, White IG. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil*. 1980;60:403-7.
32. Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Theriogenology*. 2004;61:63-70.
33. Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*. 2007;67:1060-7.
34. Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Ulutaş PA, Akçadağ Hİ. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 2009;81:90-5.

35. Qian L, Yu S, Zhou Y. Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;87:287-9.
36. Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Atikuzzaman M, Vicente-Carrillo A, Rubér M, Alvarez-Rodriguez M. The ubiquitous hyaluronan: Functionally implicated in the oviduct? *Theriogenology*. 2016;86:182-6.
37. Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *International Journal of Andrology*. 2002;25:84-93.
38. Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1997;12:1949-54.
39. Gil J, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*. 2000;54:93-108.
40. Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*. 2002;57:1781-92.
41. Emamverdi M, Zhandi M, Zare Shahneh A, Sharafi M, Akbari-Sharif A. Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin-Based Extender. *Reprod Dom Anim*. 2013;48:899-904.
42. Najafi A, Najafi M, Zanganeh Z, Sharafi M, Martinez-Pastor F, Adeldust H. Cryopreservation of Ram Semen in Extenders Containing Soybean Lecithin as Cryoprotectant and Hyaluronic Acid as Antioxidant. *Reprod Dom Anim*. 2014;49:934-40.
43. Martins KR, Gheller SSM, Ferreira CER, Goularte KL, Corcini CD, Mondadori RG, et al. Post-thawing quality of ram spermatozoa is impaired by inclusion of boar seminal plasma in the freezing extender. *Small Ruminant Research*. 2016;144:229-33.
44. Fang Y, Zhong R, Zhang X, Zhang J, Zhou D. Boar seminal plasma inhibits cryo-capacitation of frozen-thawed ram sperm and improves fertility following intracervical insemination. *Theriogenology*. 2018;105:84-9.
45. Masoudi R, Sharafi M, Zare Shahneh A, Towhidi A, Kohram H, Zhandi M, et al. Effect of dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean lecithin- and egg yolk-based extenders. *Theriogenology*. 2016;86:1583-8.
46. Anel L, de Paz P, Álvarez M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, et al. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*. 2003;60:1293-308.
47. Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, et al. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:265-75.
48. King ME, McKelvey WAC, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJA, et al. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*. 2004;62:1236-44.
49. Fair S, Hanrahan JP, O'Meara CM, Duffy P, Rizos D, Wade M, et al. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*. 2005;63:1995-2005.
50. Hiwasa M, Kohno H, Togari T, Okabe K, Fukui Y. Fertility after Different Artificial Insemination Methods Using a Synthetic Semen Extender in Sheep. *J Reprod Dev*. 2009;55:50-4.
51. Richardson L, Hanrahan JP, Donovan A, Martí JI, Fair S, Evans ACO, et al. Effect of site of deposition on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. *Animal Reproduction Science*. 2012;131:160-4.
52. Casali R, Pinczak A, Cuadro F, Guillen-Muñoz JM, Mezzalira A, Menchaca A. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*. 2017;103:30-5.
53. Anel L, Kaabi M, Abroug B, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, et al. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*. 2005;63:1235-47.
54. O' Meara CM, Hanrahan JP, Prathalingam NS, Owen JS, Donovan A, Fair S, et al. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial

insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 2008;69:513-22.
55. Salvetti P, Joly T, Baudot A. Effect of antibiotics on thermodynamic properties of freezing media in rabbit species: A first calorimetric approach. *Cryobiology*. 2006;53:268-75.

2.2. Résultats et Discussion

Au terme de cette étude et par comparaison avec l'étude précédente, le fructose semble être plus approprié que le glucose pour la congélation de sperme ovin. Néanmoins, il est important de noter que la race et les conditions de collecte du sperme ne sont pas comparables dans les deux études. De plus, nous observons une diminution importante de la qualité du sperme ovin après 2h (sans glycérol) et après 4h (avec glycérol) dans le milieu CRYO3. Aucun effet significatif n'a été observé pour la cinétique de refroidissement, bien que des semences congelées 5 cm au-dessus de l'azote liquide semblent néanmoins de meilleure qualité (simple tendance). Comme chez le taureau, aucune différence significative n'est observée sur les paramètres *in vitro* de qualité du sperme entre le milieu témoin négatif et le milieu CRYO3. Le milieu témoin positif contenant du jaune d'œuf et du lait est significativement le meilleur pour le maintien des paramètres du sperme étudiés *in vitro*. Cependant après insémination de 75 brebis, aucune différence significative n'est observée pour les paramètres analysés *in vivo*. Nous constatons toutefois que le milieu témoin négatif permet d'obtenir 74 % (14/19) de mise-bas vs. 68 % (19/28) pour le milieu témoin positif contenant du jaune d'œuf et du lait et 61 % (17/28) pour le milieu CRYO3.

L'étude thermodynamique des solutions cryoprotectrices ne permet pas de les distinguer, comme c'était déjà le cas pour les milieux utilisés dans la seconde étude sur le sperme de bovin. Les différences de qualité du sperme observées *in vitro* ne semblent donc pas être liées aux propriétés thermodynamiques des milieux de congélation testés.

Ainsi, l'hypothèse énoncée précédemment, selon laquelle l'acide hyaluronique contenue dans le CRYO3 permettrait de sélectionner une sous-population résistante à la congélation, est réfutée par cette dernière étude et l'utilisation du CRYO3 pour la conservation du sperme ovin est remis en cause. Nous démontrons qu'un **milieu synthétique simple** (tris – fructose – glycérol – tréhalose) et **peu onéreux permet d'obtenir 74 % de mise bas après insémination** par laparoscopie, ce dernier résultat étant tout à fait comparable aux données de la littérature [243,436–438].

Chapitre 2 : Les cellules souches pluripotentes

Étude d'un nouveau milieu synthétique pour la congélation de cellules souches pluripotentes de lapin

La littérature scientifique rapporte de nombreux articles sur la cryoconservation de cellules souches pluripotentes humaines, essentielles pour la thérapie cellulaire. Cependant, la qualité et les caractéristiques des PSC varient énormément selon l'espèce, mais également selon la lignée cellulaire. Il est donc nécessaire d'établir des protocoles spécifiques. Le lapin est un animal de laboratoire intéressant pour la modélisation de maladies humaines. Cette espèce, contrairement à la souris, partage en effet plus de similarités avec l'homme notamment au niveau des caractéristiques des PSC. La congélation des cellules souches pluripotentes de lapin a toujours été réalisée dans du FBS et 10 % de DMSO, en utilisant une enceinte contenant de l'isopropanol. Les taux de récupération après décongélation étant fortement variables, nous avons décidé d'évaluer l'effet du CRYO3 sur la congélation des rbPSC (rbESC et rbiPSC). Les variations observées pouvant être dues non seulement à la présence de FBS mais également à l'enceinte à isopropanol, nous avons également analysé l'effet d'une congélation lente contrôlée (congélateur programmable). Enfin, le DMSO étant potentiellement toxique pour les cellules, une gamme de concentrations de DMSO a été effectuée.

Les différentes conditions de congélation ont été comparées à un milieu de congélation témoin : le CryoStor® CS10, couramment utilisé pour la congélation des hPSC et des cellules souches adultes. Par ailleurs, nous avons réalisé tous les tests sur les mESC (lignée de référence) car ces cellules sont beaucoup plus facilement conservées dans les conditions classiques décrites ci-dessus que les rbPSC ou les hPSC.

Nous formulons l'hypothèse que le CRYO3 a la capacité d'une part à **remplacer le sérum** dans les milieux de congélations de PSC et d'autre part qu'il **protège mieux les PSC lorsque la concentration en cryoprotecteur est diminuée**.

1. Publication n°4 –

Cryopreservation of rabbit pluripotent stem cells in a synthetic medium with reduced DMSO concentration

Article soumis à *Reproduction*

Les cellules souches pluripotentes de lapin (rbPSC) ont la particularité d'exprimer des marqueurs de pluripotence à la fois identiques à leurs homologues murines et humaines. Comme pour les cellules souches pluripotentes humaines, il est nécessaire de développer un protocole de cryoconservation pour les rbPSC. En effet, les rbPSC représentent un modèle adéquat pour la recherche médicale et pour des applications précliniques d'utilisation de PSC en thérapie cellulaire. À notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la standardisation d'un protocole de cryoconservation de cellules souches pluripotentes chez le lapin. De plus, les produits d'origine animale et les concentrations élevées de DMSO dans les milieux de congélation sont encore très utilisés dans les laboratoires. Le STEMALPHA.CRYO3® (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) appelé "CRYO3" est un milieu de préservation chimiquement défini, couramment utilisé en France pour congeler les tissus et les cellules souches hématopoïétiques humaines. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet d'un milieu de congélation lente, chimiquement défini en combinaison avec une concentration diminuée de DMSO, sur les caractéristiques de pluripotence de cellules souches de lapin. Cette étude a été réalisée sur des cellules souches embryonnaires et des cellules souches pluripotentes induites. Des cellules souches embryonnaires de souris ont été utilisées comme cellules de référence. Les cellules ont été congelées en cellules dissociées, en utilisant deux types de méthodes de congélation lente (congélateur programmable ou enceinte à isopropanol à -80°C), dans trois milieux de congélation différents (FBS/KOSR ou CRYO3, ou CryoStor® CS 10 utilisé comme témoin positif) et six concentrations de DMSO (0, 2.5, 3, 4, 5 et 10 %). La viabilité a été évaluée par cytométrie en flux, après décongélation et au sixième passage. Les courbes de croissance ont été calculées de la décongélation au sixième passage. L'expression de gènes de pluripotence a été évaluée au premier et au sixième passage par PCR quantitative en temps réelle. Nous avons obtenu des taux de viabilité et des courbes de croissance acceptables ainsi qu'une expression génique stable, après avoir

congelé-décongelé les rbPSC. Le milieu CryoStor® CS10 ainsi que le milieu CRYO3 contenant 4 %, 5 % et 10 % de DMSO ont montré les résultats les plus intéressants. Ces données préliminaires permettent de conclure que les rbPSC peuvent être congelées dans un congélateur programmable ou dans une enceinte à isopropanol, dans un milieu synthétique comme le CryoStor® CS10 contenant 10 % de DMSO ou le CRYO3 additionné de 4 % à 10 % de DMSO.

Slow-cooling cryopreservation of rabbit pluripotent stem cells in a synthetic medium with reduced DMSO

Lucie Gavin-Plagne^{1,2}¶, Sophie Voisin²¶, Florence Perold², Pierre Osteil^{2, #}, Synara Moreira², Quitterie Combourieux^{2,5}, Véronique Saïdou², Magali Mure², Gérard Louis⁶, Anne Baudot⁶, Samuel Buff¹, Thierry Joly^{1,5}, Marielle Afanassieff^{1,2*}

¹ UPSP ICE 2016.A104, VetAgro Sup, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France

² Univ Lyon, Université Lyon 1, Inserm, Stem Cell and Brain Research Institute U1208, INRA USC 1361, Bron, France

³ UPSP ICE 2016.A104, ISARA-Lyon, Université de Lyon, Lyon, France

⁴ INSERM U1148, Université Paris Descartes, Paris, France

*** Corresponding author**

Stem Cell and Brain Research Institute, INSERM U1208, INRA USC 1361, 18 Avenue du Doyen Lépine, 69550 Bron, France; marielle.afanassieff@inserm.fr; +33 472 913 458

¶ These authors contributed equally to this work.

Present address: Embryology Unit, Children's Medical Research Institute, Westmead, NSW 2145, Australia

Funding: This work was supported by research grants from "Agence Nationale de la Recherche" (ANR): projects ORYCTOGENE n°ANR-12-RPIB-0013 and "Infrastructure Nationale en Biologie et Santé" CRB-Anim n° ANR-11-INBS-0003.

Manuscript Keywords: stem cells freezing, synthetic medium, serum-free, rabbit pluripotent stem cells, reduced DMSO

Abstract

Rabbit pluripotent stem cells (rbPSCs) show similar characteristics than their human counterpart, and therefore represent an interesting animal model for stem cell therapies. As for human pluripotent stem cells (hPSCs), there is a need to develop a cryopreservation protocol for rbPSCs, as these cells have poor capacities to support freezing conditions. To our knowledge, no study on a standardized protocol of rbPSCs cryopreservation was carried out in rabbits. Moreover, animal-derived products and high concentration of dimethyl sulfoxide (DMSO) in freezing media are still used in laboratories. The aim of this study was to evaluate the effect of a slow-freezing chemically defined medium, STEMALPHA.CRYO3, in combination with a diminished concentration of DMSO on the pluripotency characteristics of rbPSCs. STEMALPHA.CRYO3 (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) called "CRYO3" medium is a chemically defined cryopreservation medium currently used for freezing human tissue and adult stem cells. This study was performed on rabbit embryonic stem cells (rbESCs) and rabbit induced pluripotent stem cells (rbiPSCs). Mouse embryonic stem cells were used as a reference. Cells were cryopreserved in single cells by using three types of freezing media (Serum/KOSR or CRYO3, and CryoStor® CS10 as a positive control), six concentrations of DMSO (0, 2.5, 3, 4, 5 or 10 %) and two types of slow-freezing method (freezing container or controlled-rate freezer). Membrane integrity was evaluated after thawing and at passage 6 using flow cytometry. Growth curves were calculated from thawing to passage 6. Gene expression was assessed at passage 1 and passage 6 using reverse-transcriptase and real-time quantitative PCR. We showed acceptable viability rates, growth recoveries and stable gene expression after freezing-thawing rbPSCs. CryoStor® CS10 showed the best results with CRYO3 containing 4, 5 or 10% of DMSO. These preliminary results revealed that rbPSCs can be cryopreserved, either in a freezing container or a controlled-rate freezer, in synthetic media as CryoStor® CS10 or CRYO3, with less than 5 % of DMSO for CRYO3-based medium. Further analyses as karyotyping, phosphatase alkaline activity test and teratoma induction, should be performed in order to confirm the pluripotency quality of the recovering cells and the efficiency of this protocol.

Introduction

Rabbit pluripotent stem cells (rbPSCs) have the capacity to exhibit some features of pluripotency as long-term self-renewal, differentiation into the three germ layers, teratomas formation, and normal karyotype (Tancos *et al.*, 2012; Osteil, 2013; Osteil *et al.*, 2016). The rabbit could be a better model to study the pluripotency compared to the mouse, thanks to its similarities with primates in terms of embryo development, pluripotency state (cultured in a primed state) and placenta system (Graur *et al.*, 1996; Duranthon *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2012). In order to use pluripotent stem cells for clinical, pre-clinical applications and research, there is a need to develop a safe, standardized and xeno-free freezing protocol for stem cells banking. There are two major techniques to preserve pluripotent stem cells: slow-freezing and vitrification (Hunt, 2011; Li and Ma, 2012). Vitrification has been developed particularly for cryopreserving human pluripotent stem cells (hPSCs) in small clumps as their dissociation in single cells is critical (Reubinoff *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2004; Matsumura *et al.*, 2011; Ota *et al.*, 2017). This method, widely used for preserving mammal oocytes and embryos (Rall and Fahy, 1985; Vajta *et al.*, 1998; Dinnyés *et al.*, 2000; Kuwayama, 2007; dos Santos-Neto *et al.*, 2017; Vicente *et al.*, 2018), shows some limits for pluripotent stem cells, such as the risk of contamination via liquid nitrogen and a low industrial application, among others. Even if some authors tried to avoid these limitations (Richards *et al.*, 2004; Aerts *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008, 2010; Beier *et al.*, 2011; Nishigaki *et al.*, 2011), vitrification still remains a difficult and operator-dependent procedure (Antinori *et al.*, 2007; Stachecki *et al.*, 2008; Miyazaki and Suemori, 2016). On the contrary, the slow-freezing method can be accessible to any kind of laboratories, without prior expertise in cryobiology, thanks to a freezing container or a controlled-rate freezer. However, there still remains two main risks in biobanking stem cells: a sanitary risk in using serum and/or animal-derived products in freezing media, and a toxic risk in using high concentration of dimethyl sulfoxide (DMSO), usually 10 % (Abrahamsen *et al.*, 2002; Adler *et al.*, 2006; Katkov *et al.*, 2006). Moreover, to our knowledge, no study on standardized protocols of rbPSCs cryopreservation was carried out in the rabbit species. For these reasons and in order to overcome new biobanking regulations in the coming years, it might be necessary to develop a standardized protocol for cryopreservation of rbPSCs, and more generally for PSCs, while replacing serum and decreasing the amount of DMSO in freezing media. STEMALPHA.CRYO3 (Ref 5617, Stem Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France) called "CRYO3" is a patented serum-free, protein-free and dextran-free medium (manufactured according to good manufacturing practices [cGMP-annex 1] in compliance with

2001/83/EC). CRYO3 is composed of synthetic hyaluronic acid (HA) of high molecular weight ($> 10^6$ D), glucose, carbohydrates, amino acids, mineral salts, vitamins, fatty acids esters and buffers. It was initially designed for clinical applications, in order to replace serum in somatic and human adult stem cells freezing medium (Jurga *et al.*, 2012; Sarnowska *et al.*, 2013; Mueller *et al.*, 2014; Ducret *et al.*, 2015). Recently, it has been found that CRYO3 could be a potential medium to cryopreserve reproductive cells. Indeed, CRYO3 can be used for rabbit (Bruyère *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2018) and bovine (Bruyère *et al.*, 2012) embryo cryopreservation, as well as ovine sperm cryopreservation.

The aim of the study was to evaluate the effect of a slow-freezing chemically defined medium, CRYO3-based medium, in combination with a diminished concentration of DMSO on the pluripotency characteristics of rbPSCs. The evaluation of CRYO3 as a potential substitute to serum was performed using two approaches: a biological approach using rbPSCs slow freezing-thawing and a thermodynamic approach using Differential Scanning Calorimetry.

Materials and methods

Experimental design

Cells were cryopreserved in single cells by using three types of freezing media (FBS/KOSR or CRYO3, and CryoStor® CS10 (BioLife Solutions, WA, USA) as a positive control), six concentrations of DMSO (0, 2.5, 3, 4, 5 or 10 %) and two types of slow-freezing method (freezing container or controlled-rate freezer). This study was performed on rbESCs, rbiPSCs and mESCs as a reference. Three independent replicates were performed for each condition. After thawing, viability was assessed at passage 0 (P0, corresponding to thawing) and passage 6 (P6), growth recovery from passage P0 to P5 and gene expression at P1 and P5. Freezing media were also evaluated by a thermodynamic approach using a Differential Scanning Calorimeter (DSC). The experimental design is shown in Fig 1.

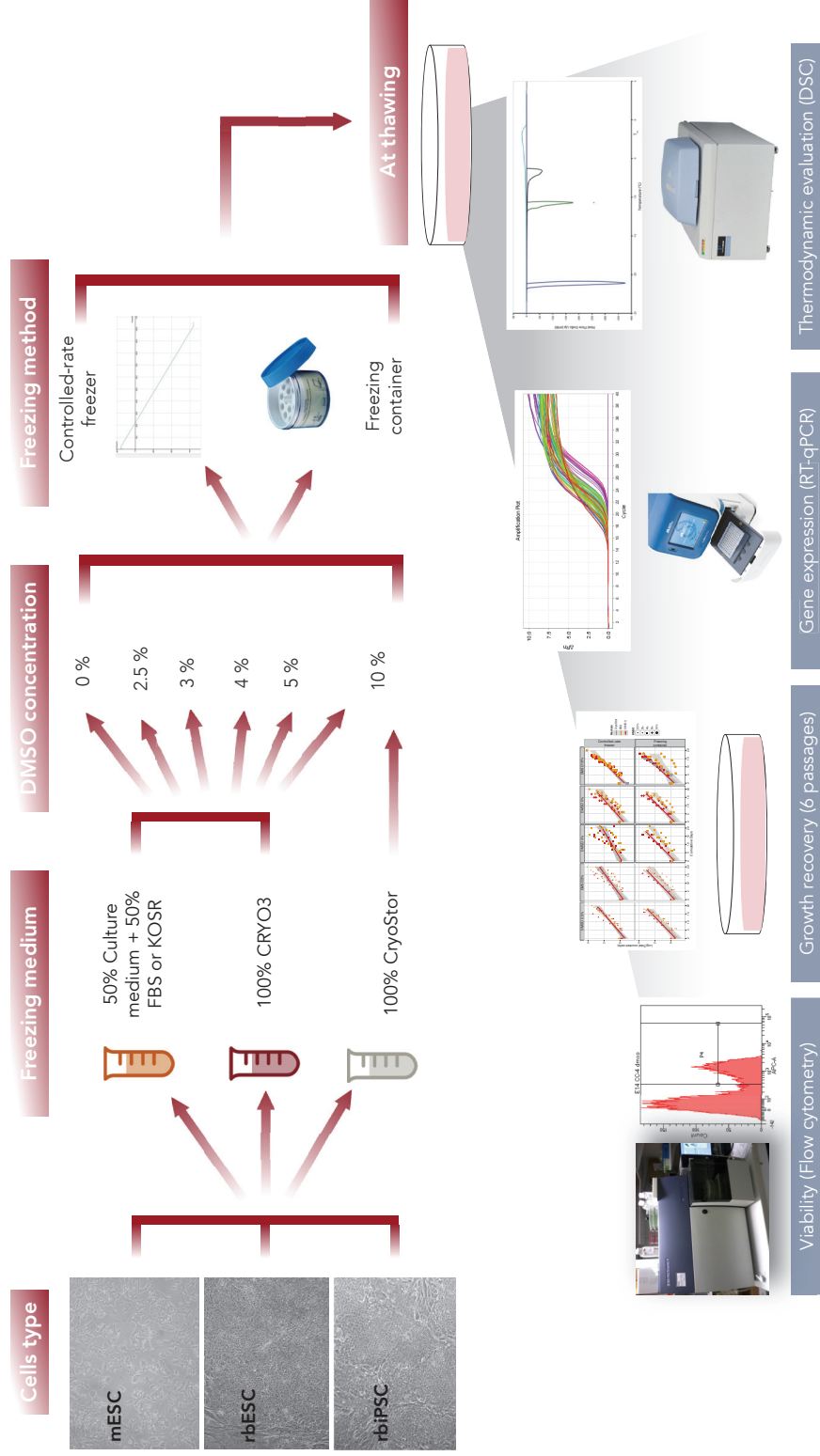


Figure 1. Experimental design of the study

Stem cell culture

rbPSCs were cultured on mouse embryonic fibroblast (MEFs) feeder cells. MEFs were prepared from 12.5-day-old embryos from the OF1 strain (Charles River). MEFs were prepared, cultured and treated with mitomycin-C (M4287, Sigma-Aldrich) as described elsewhere (Afanassieff *et al.*, 2014).

RbESCs

Rabbit embryonic stem cells (rbESCs, line ALF20) were derived from the isolated inner cell mass of one blastocyst from the New Zealand white rabbit strain (Hycole, Marcoing, France) as defined by Osteil and colleagues (Osteil *et al.*, 2016). rbESCs were maintained at 38°C with CO₂ + 5% O₂ and cultured on mitomycin C-treated MEFs (1.25x10⁴ MEF/cm²) in DMEM/F12 medium supplemented with **10 %** knockout serum replacement (KOSR) and 10 % FBS, 1 % non-essential amino acids, 1 % of a solution of 10,000 U/ml penicillin + 10,000 U/ml streptomycin + 29.2 mg/ml L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 100 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen™). For rbESC, the medium was supplemented with 0.1 % of leukemia inhibitory factor (LIF). The medium was refreshed every 24 hours. rbESCs were dissociated every two days into single-cell suspensions after treatment with 1X StemPro® Accutase (Gibco™) and seeded onto 6-well plates at a density of 0.4x10⁶ cells/well with pre-seeded MEFs.

rbiPSCs

Rabbit induced pluripotent stem cells (rbiPSCs, line B19) were generated from ear-skin fibroblasts of a 5-month-old female, by overexpressing Yamanaka's factors with pMX retroviral vectors as described previously (Osteil *et al.*, 2013). rbiPSCs were maintained at 38°C with CO₂ + 5% O₂ and cultured on mitomycin C-treated MEFs (1.25x10⁴ MEF/cm²) in DMEM/F12 medium supplemented with 20% KOSR, 1 % non-essential amino acids and 1 % of a solution of 10,000 U/ml penicillin + 10,000 U/ml streptomycin + 29.2 mg/ml L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 100 mM 2-mercaptoethanol. For rbiPSCs culture, the medium was supplemented with 10 ng/ml Fibroblast growth factor (FGF2, Gibco™). The medium was refreshed every 24 hours. rbiPSCs were dissociated every two days into single-cell suspensions after treatment with 0.05 % trypsin–EDTA and seeded onto 6-well plates at a density of 0.4x10⁶ cells/well.

mESCs

Mouse embryonic stem cells (mESCs, line E14Tg2a) were cultured as described elsewhere (Toyooka *et al.* 2008). mESCs were cultured on gelatin in GMEM BRK medium supplemented with 10 % FBS, 1 % non-essential amino acids and 1 % of a solution of 10,000 U/ml penicillin + 10,000 U/ml streptomycin + 29.2 mg/ml L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 100 mM 2-mercaptoethanol and 0.1 % LIF at 37°C in an incubator with a humidified atmosphere of 5 % CO₂. The medium was refreshed every 24 hours. mESCs were routinely dissociated into single-cell suspensions after treatment with 0.05 % trypsin–EDTA and seeded onto 6-well plates at a density of 1x10⁶ cells/100-dish.

Cryopreservation*Freezing media*

Three different types of freezing medium were used for each cell lines, each composed of six different concentrations of DMSO (except for CryoStor® CS10, which is composed of 10 % of DMSO), as described in Table 1. All freezing media were prepared the day before use.

Table 1. Composition of the freezing media.

Cell lines	Basal medium	DMSO concentration in freezing media (v/v, %)	Final DMSO concentration (v/v, %)
mESCs	FBS or CRYO3	0, 5, 6, 8, 10 or 20	0, 2.5, 3, 4, 5 or 10
	CryoStor® CS10	10	10
rbESCs	FBS or CRYO3	0, 5, 6, 8, 10 or 20	0, 2.5, 3, 4, 5 or 10
	CryoStor® CS10	10	10
rbiPSCs	KOSR or CRYO3	0, 5, 6, 8, 10 or 20	0, 2.5, 3, 4, 5 or 10
	CryoStor® CS10	10	10

Dilution

After dissociation and centrifugation (1200 RPM for 5 min), cells were re-suspended either in culture medium (for FBS and KOSR condition) or CRYO3 or CryoStor® CS10 to the required

concentration. For FBS/KOSR and CRYO3 condition, dissociated cells were split into 0.5 ml in cryotubes and an equal volume of 4°C freezing medium was added drop by drop. For each condition, final cell concentration was as follows: 2.5×10^6 cells/ml for mESCs and 2×10^6 cells/ml for rbESCs and rbiPSCs. Cryotubes were placed at 4°C before being processed for slow freezing.

Slow freezing procedure

Cryotubes were transferred either into a freezing container (Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene™) placed in a -80°C freezer or a controlled-rate freezer (Cryologic CL 8800i, Cryologic, Blackburn, Australia) using a cooling rate of 1°C/min until -80°C. Cryovials were then plunged into liquid nitrogen for storage after 15h for the freezing container and at the end of the freezing procedure for the controlled-rate freezer. The cooling rates were calculated using type T thermocouples (TC Direct, Dardilly, France) inserted in separate cryotubes in the presence of cells and freezing medium, The approximate cooling rates in the linear part of the curves were 0,6 °C/min and 0,8 °C/min for the freezing container and the controlled-rate freezer, respectively. Cryotubes were stored in liquid nitrogen for at least 2 weeks prior to thawing for assessment.

Thawing

Cryovials were thawed at 37°C directly from the liquid nitrogen to a water bath until last ice crystals melted. Cells were then first diluted by addition of 1 ml of 37°C culture medium drop by drop and transferred to a 15 ml tube. The cryovial was then rinsed with 1 ml of 37°C culture medium and transferred to the 15 ml tube. Finally, 4 ml of 37°C culture medium was added drop by drop to the thawed cells. After the supernatant was removed by centrifugation (1200 RPM for 5 min), cells were resuspended in 1 ml of culture medium. A volume of 1/5 of the thawed cell suspension was used for flow cytometry assessment and 4/5 was cultured in a 6-well plate with pre-seeded MEFs. The day after thawing, cells were rinsed twice with DPBS to remove dead cells.

Viability and growth assessment of post-thaw pluripotent stem cells

Viability by flow cytometry

For all samples, the pluripotent stem cells population was identified (FSC/SSC dot plots) and 10,000 events among the population were analyzed at a low rate (200 cells/s). Analyses were performed using FACS Canto II cytometer (Becton Dickinson) and acquired using the software

FACS Diva (Becton Dickinson). Viability was evaluated after thawing (P0), or after dissociation (P6 or fresh samples) by adding 5 µl of propidium iodide (1 mg/ml, Sigma Aldrich, France) to 1/5 of the thawed cell suspension (corresponding to 200 µl) 1 min before analysis.

Growth recovery

Growth recovery was calculated by counting cells (Countess™ II FL, Fisher Scientific, France) at each passage from the first plating following cell thawing to the sixth cell plating (P0 to P6). Results are presented as the logarithm of the total counted cells.

Characterization of post-thaw pluripotent stem cells

RNA extraction

Total RNA was isolated from cell pellets, stored at -80°C, using QIAshredder, RNase-Free DNase Set and RNeasy Mini Kit (QUIAGEN, France) according to the manufacturer's instructions. After RNA extraction, ARN quantity was assessed using NanoDrop 2000 and analyzed with the software associated (Fisher Scientific, France). The A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratios were around 2.0 and 2.2, respectively, for all samples, confirming nucleic acid purity.

Reverse Transcription

Reverse Transcription was performed with the High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Fisher Scientific, France) which was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, 9 µl of RNA sample at a concentration of 55 ng/µl was diluted in 10 µl of buffer Mix and 1 µl of RT Enzyme Mix, from the Kit. Diluted samples were then transferred to a thermal cycler performing an incubation of 37°C for 60 minutes followed by a heating to 95°C for 5 minutes.

Real-Time Reverse Transcriptase Quantitative PCR (RT-qPCR) Analysis

Quantitative PCR (qPCR) was performed with Fast SYBR® Green Master Mix (Fisher Scientific, France) and analyzed with StepOnePlus™ real-time PCR system (Fisher Scientific, France). Following 40 amplification cycles, melt-curve analysis was used to verify that only the desired PCR products had been amplified. qPCR efficiency for both target and reference genes was determined from the relative quantitative values for calibrator normalized target gene expression using StepOnePlus Software V2.1 (Applied Biosystems). In all cases, expression of the target genes was normalized to those of rabbit TATA-box binding protein (Tbp) gene and to those of mouse Actine b (Actb). But the same results were obtained with a normalization with the mRNA level of rabbit and mouse Gapdh gene. Gene expression was also normalized

to fresh samples, used as a reference sample. All primers used for RT-PCR and qPCR are shown in supplementary material Table S1. Gene expression was quantified with the $\Delta\Delta C_T$ method. qPCR assays were performed in triplicates and repeated in at least three independent experiments. Results (thawed cells at P1 and P6) are presented as logarithm of fold change.

Thermodynamic characterization using Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Media analysed using DSC were: mESCs, rbESCs and rbiPSCs freezing media containing 0 %, 5 % or 10 % DMSO, and CryoStor® CS10. The phase transitions of the freezing media were characterized using a power compensation DSC (Diamond DSC, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) equipped with a liquid nitrogen cooling accessory (Cryofill) and the Pyris software (11.11.1 version). The accuracy provided in the technical specifications of this DSC is $\pm 0.11^\circ\text{C}$ for temperature and $\pm 1.10\%$ for energy. The DSC was calibrated for temperature and energy at $+2.5^\circ\text{C}/\text{min}$ with two standards: the ice melting of pure bi-osmosed water (0°C ; 333.40 J/g) and the crystallographic transition of cyclohexane in its solid state (-87.06°C ; 79.58 J/g), for a high data range of 720 mW . Experiments were conducted using standard hermetically sealed aluminum pans (Ref. 0219–0062, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) designed for volatile samples and previously cleaned following the standard procedure provided by Perkin-Elmer. Three replicate measurements were taken for each solution. The aluminum pans were first weighed without cryopreservation solution on a high sensibility scale balance (XS105 DualRange, Metler Toledo, France) and were then weighed after the loading of the cryopreservation solution in order to measure the sample mass. The weights were determined with a resolution of 10^{-5} g . The samples weight was 4.06 ± 0.59 (mean \pm standard deviation, $n = 39$). Two cycles of cooling and warming between 10°C and -150°C were applied to each sample to determine temperature of crystallization (T_c , in degree Celsius [$^\circ\text{C}$]), the melting temperature (T_m , in degree Celsius [$^\circ\text{C}$]) and the crystallization enthalpy variation (ΔH , in Joules per gram [J/g]) of the cryopreservation media. An empty oven baseline of the DSC, systematically subtracted from the sample thermograms, was regularly recorded with care, using the same protocol in temperature variations. T_c corresponds to the peak of crystallization. T_m is the temperature under which crystallization can occur, and ΔH allows the quantification of crystallized ice in the solution. A rapid cooling ($100^\circ\text{C}/\text{min}$) was followed by a slow warming ($2.5^\circ\text{C}/\text{min}$) to measure T_m . T_m was defined at the top of the main melting peak. A slow cooling ($2.5^\circ\text{C}/\text{min}$) was followed by a rapid warming ($20^\circ\text{C}/\text{min}$) to determine T_c and ΔH . T_c was determined at the onset of the crystallization peak. ΔH was measured by evaluating the area

encompassed between the peak of crystallization and the baseline. The areas were calculated using a sigmoid curve baseline.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed on R software (R Development Core Team, 2011). The results correspond to 3 replicates for each condition and are presented as means \pm standard deviation. Viability, growth recovery and gene expression were analyzed using a linear model. The medium, the DMSO concentration and the freezing method were included in the models as fixed effects. In order to determine the best fit model, AICc were performed [Aikaike Information Criterion for small samples (Johnson and Omland, 2004; Symonds and Moussalli, 2011)]. A Tukey adjustment was used to compare each condition at a fixed 5 % error level. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Thermodynamic values were analyzed using descriptive statistics.

Results

Viability

Before freezing, viability rates of mESCs, rbiPSCs, and rbESCs were 92.33 %, 92.93 %, and 88.17 %, respectively (Figure 2). After thawing, viabilities of positive controls (cells frozen in CryoStor® CS10) for all three cell types were not significantly different with those of fresh samples regardless of the freezing system used (84.53 % and 86.43 % for mESC; 84.80 % and 89.60 % for rbiPSC; 71,07 % for rbESC in freezing container), excepted for rbESCs in controlled-rate freezer (only 8.20 %). In most case, CryoStor® CS10 medium showed the best viability compared to FBS and CRYO3-based media. For FBS and CRYO3 conditions, viabilities of all cell types decreased with decreasing DMSO percentages. Moreover, significant differences were observed between the controlled-rate freezer (Figure 2, A, C, E) and the freezing container (Figure 2, B, D, F), the latter showing less variability, and best viability with 10 % of DMSO. Generally, no significant differences were found between CryoStor® CS10 and CRYO3- or FBS- based media containing 4 %, 5 % and 10 % of DMSO, for mESCs with both method conditions (Figure 2, A, B), and for rbPSC with the freezing container condition (Figure 2, D,F). Finally, significant effects of medium and DMSO rate on cell viabilities were observed for mouse and rabbit cells, and, according to the cell type, significant effects of interaction of three tested parameters were also shown: interactions between method and percentage of DMSO, between medium and percentage of DMSO and between method and

medium for mESC (Figure 2, A,B); interaction between method and medium for rbESC (Figure 2, C,D); and interaction between method and percentage of DMSO for rbiPSC (Figure 2, E,F). Notably, CRYO3-based medium showed better viability of rbESCs with the freezing container while FBS-based medium showed better viability with the controlled-rate freezer.

Of note, at passage 5, all cells recovered a viability similar to fresh samples (data not shown).

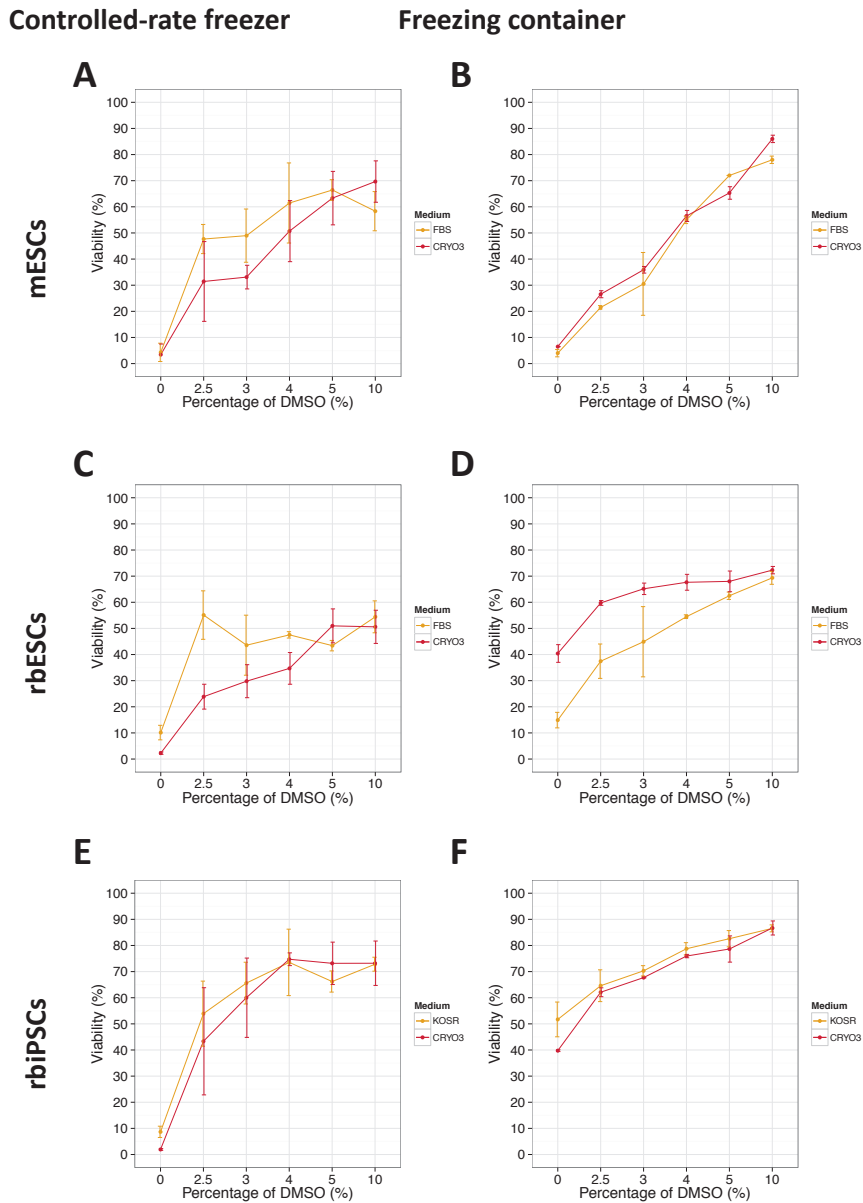


Figure 2. Viability of mESCs, rbESCs and rbiPSCs depending on the freezing method, the medium and the percentage of DMSO.

(A, B) Viability of mESCs; (C, D) Viability of rbESCs; (E, F) Viability of rbiPSCs; (A, C, E) Viability of cells frozen in a controlled-rate freezer; (B, D, F) Viability of cells frozen in a freezing container; Viability curves of of cells frozen in FBS- or KOSR-based media and in CRYO3-based medium are shown in orange and red respectively. Before freezing, the percentage of viability was $92.33 \pm 2.45 \%$, $88.17 \pm 1.52 \%$, $92.93 \pm 1.27 \%$ for mESCs, rbESCs and rbiPSCs, respectively. After thawing, the viability of the positive control (CryoStor® CS10) was $84.53 \pm 0.58 \%$ and $86.43 \pm 1.59 \%$ (for mESCs), $8.20 \pm 1.50 \%$ and $71.07 \pm 2.08 \%$ (for rbESCs), $84.80 \pm 2.56 \%$ and $89.60 \pm 0.17 \%$ (for rbiPSCs), frozen in the controlled-rate freezer and the freezing container, respectively.

Growth Recovery

We found significant effects of the time, the freezing method and the DMSO concentration on the total number of recovered mESCs (Figure 3). For rbESCs and rbiPSCs, all the fixed parameters (freezing method, freezing medium and DMSO concentration), besides the time, influenced significantly the total number of recovered cells (Figure 4 and 5). However, the observed differences are slight and similar growth patterns were obtained between the freezing methods the freezing media and the DMSO concentrations. Generally, no significant difference in mESCs, rbESCs and rbiPSC growth recoveries was found between CryoStor® CS10 (frozen in the freezing container or controlled-rate freezer) and CRYO3- or FBS-based containing 4 %, 5 % and 10 % of DMSO. However, CRYO3-based medium induced faster recovery and less variability of cell growth compared to FBS-based medium, especially for rbESCs and rbiPSCs.

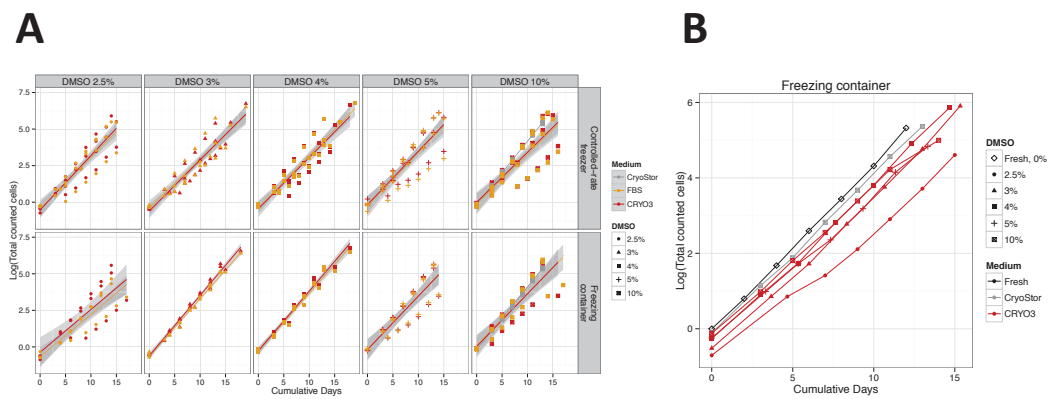


Figure 3. Growth recovery of frozen-thawed mESCs depending on the freezing methods, the freezing media and the DMSO concentrations.

(A) Global growth recoveries of mESCs, (B) Comparison between growth recovery of fresh and frozen-thawed mESCs frozen in CryoStor or CRYO3-based medium using freezing containers.

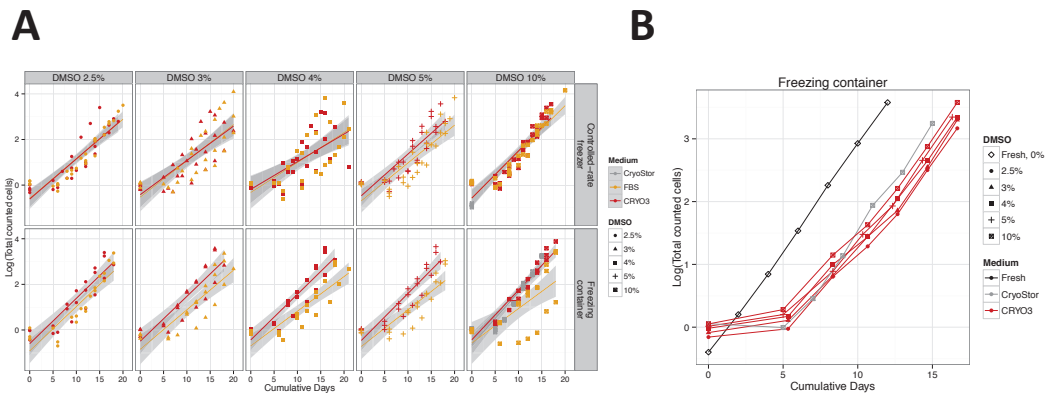


Figure 4. Growth recovery of frozen-thawed rbESCs depending on the freezing methods, the freezing media and the DMSO concentrations.
 (A) Global growth recoveries of rbESCs, (B) Comparison between growth recovery of fresh and frozen-thawed rbESCs frozen in CryoStor or CRYO3-based medium using freezing containers.

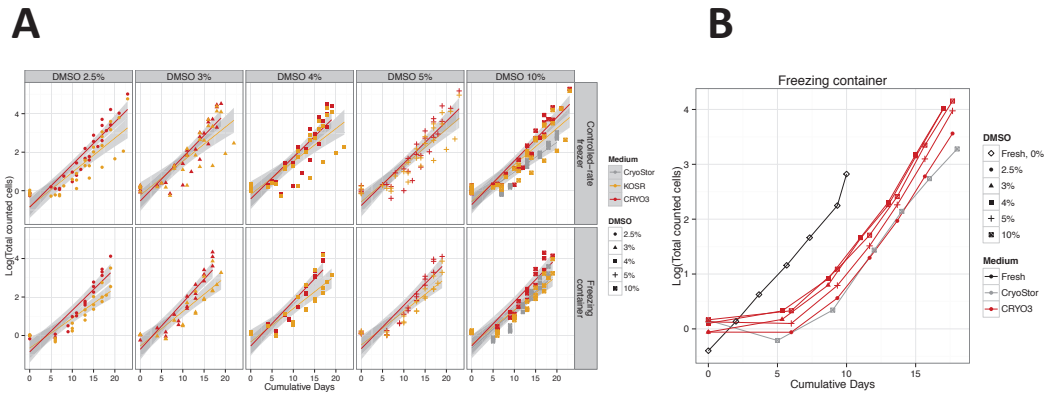


Figure 5. Growth recovery of frozen-thawed rbiPSCs depending on the freezing methods, the freezing media and the DMSO concentration.s
 (A) Global growth recoveries of rbiPSCs, (B) Comparison between growth recovery of fresh and frozen-thawed rbiPSCs frozen in CryoStor or CRYO3-based medium using freezing containers.

Gene expression

For mESCs, we observed significant effects on gene expressions of freezing methods (*Oct4*, *Nanog* and *Rex1*), DMSO concentrations (*Nanog*) and the interaction between freezing methods and freezing media (*Oct4*) (Figure 6). The linear model did not permit to observe significant difference for the gene *Esrrb*. For rbESCs, significant effects on gene expressions were found for freezing method s(*Oct4*, *Rex1*, *Cdh1* and *Cdh2*), freezing media (*Cdh2*), DMSO concentrations (*Cdh1*), passage numbers (*Esrrb*, *Rex1*, *Cdh1*) (Figure 7). Also, the interactions

between the freezing media and passage numbers (*Nanog*), between freezing methods and passage numbers (*Cdh2*) as well as between DMSO concentrations and passage numbers (*Cdh2*) were found significant. For rbiPSCs, there were significant effects on gene expressions of freezing methods (*Nanog*, *Esrrb*), freezing media (*Oct4*, *Nanog*, *Esrrb*) and passage numbers (*Oct4*, *Nanog*, *Esrrb*, *Cdh1*, *Cdh2*) (Figure 8). Moreover, we found significant effects of the interactions between freezing methods and freezing media (*Oct4*, *Cdh1*) and between freezing methods and passage numbers (*Rex1*). Above all, we observed that P6 gene expressions of samples frozen with 4 % or 5 % of DMSO were mainly closer to those of fresh samples, compared to samples frozen with other DMSO concentrations.

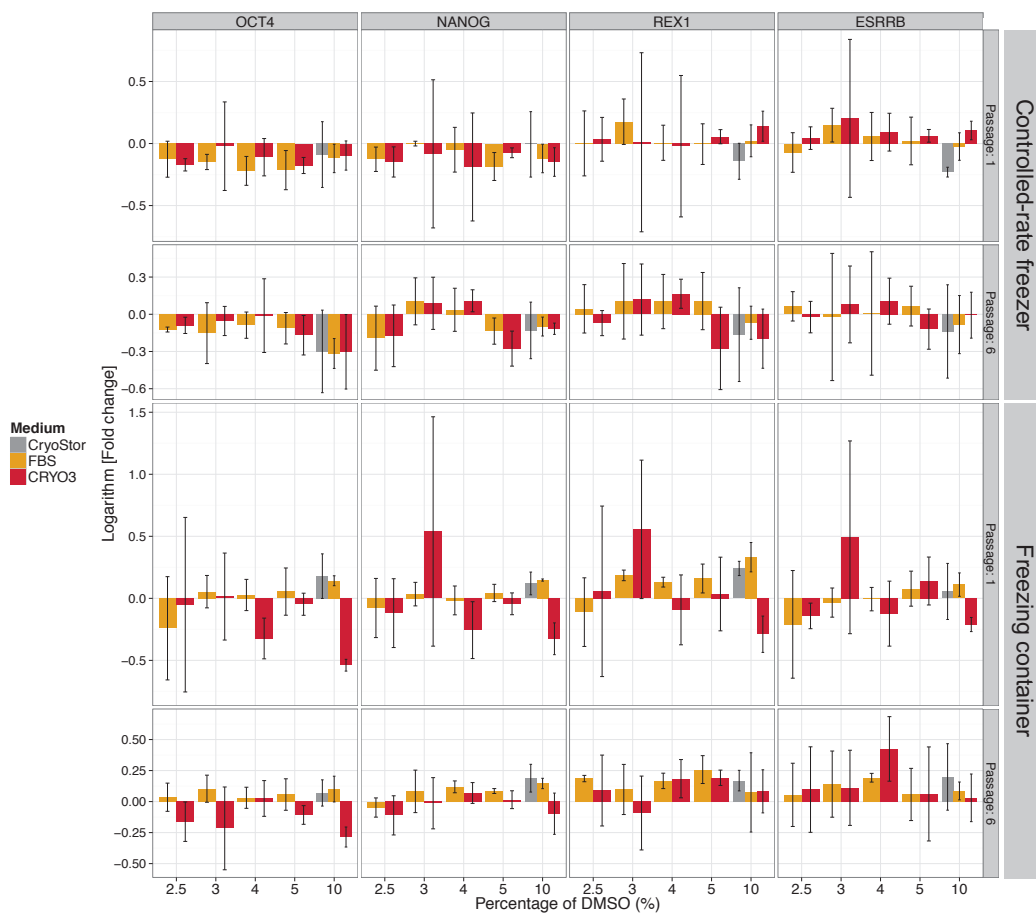


Figure 6. Gene expression of frozen-thawed mESCs depending on freezing methods, freezing media, DMSO concentrations, at P1 and P6 post-thawing.

The graph shows the logarithm of fold change, normalized to mouse *Actb* gene and mean fresh samples (three independent replicates) for each condition, at passages 1 and 6.

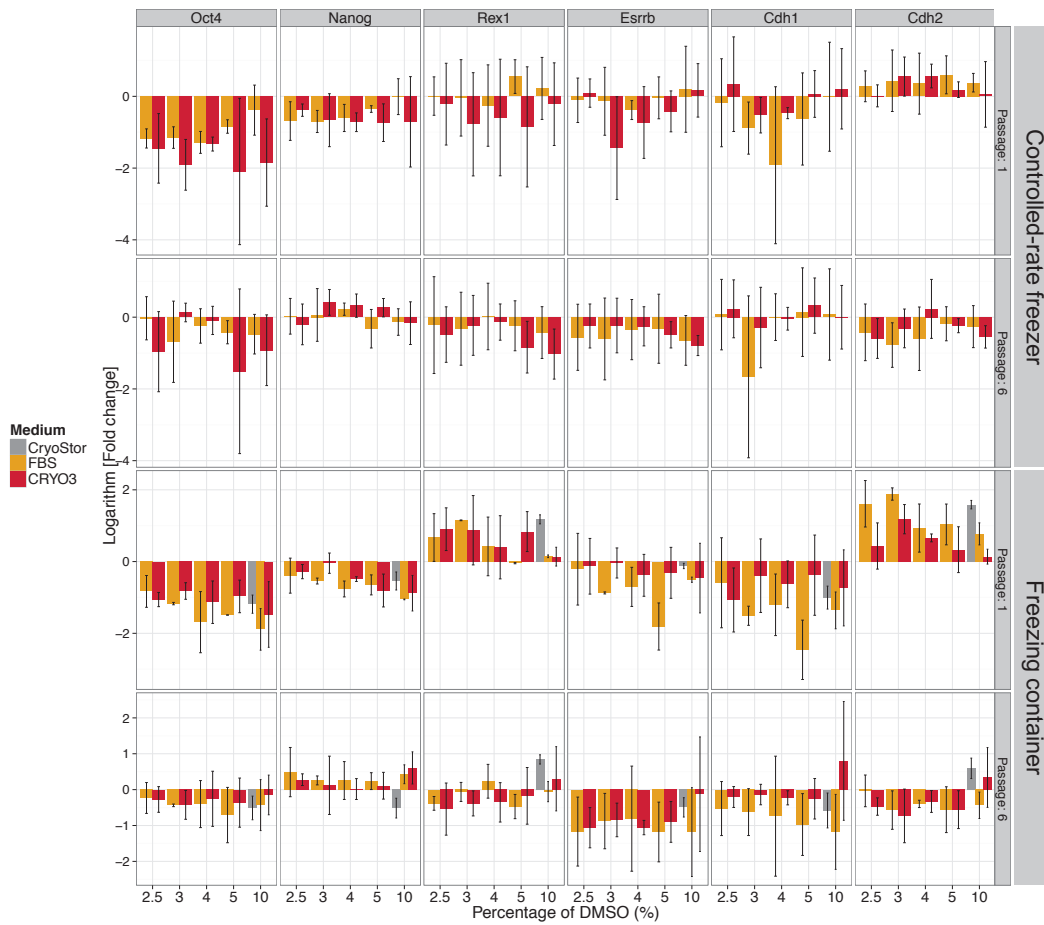


Figure 7. Gene expression of frozen-thawed rbESCs depending on the freezing methods, freezing media, DMSO concentrations, at P1 and P6 post-thawing.

The graph shows the logarithm of fold change, normalized to rabbit *Tbp* gene and mean fresh samples (three independent replicates) for each condition, at passages 1 and 6.

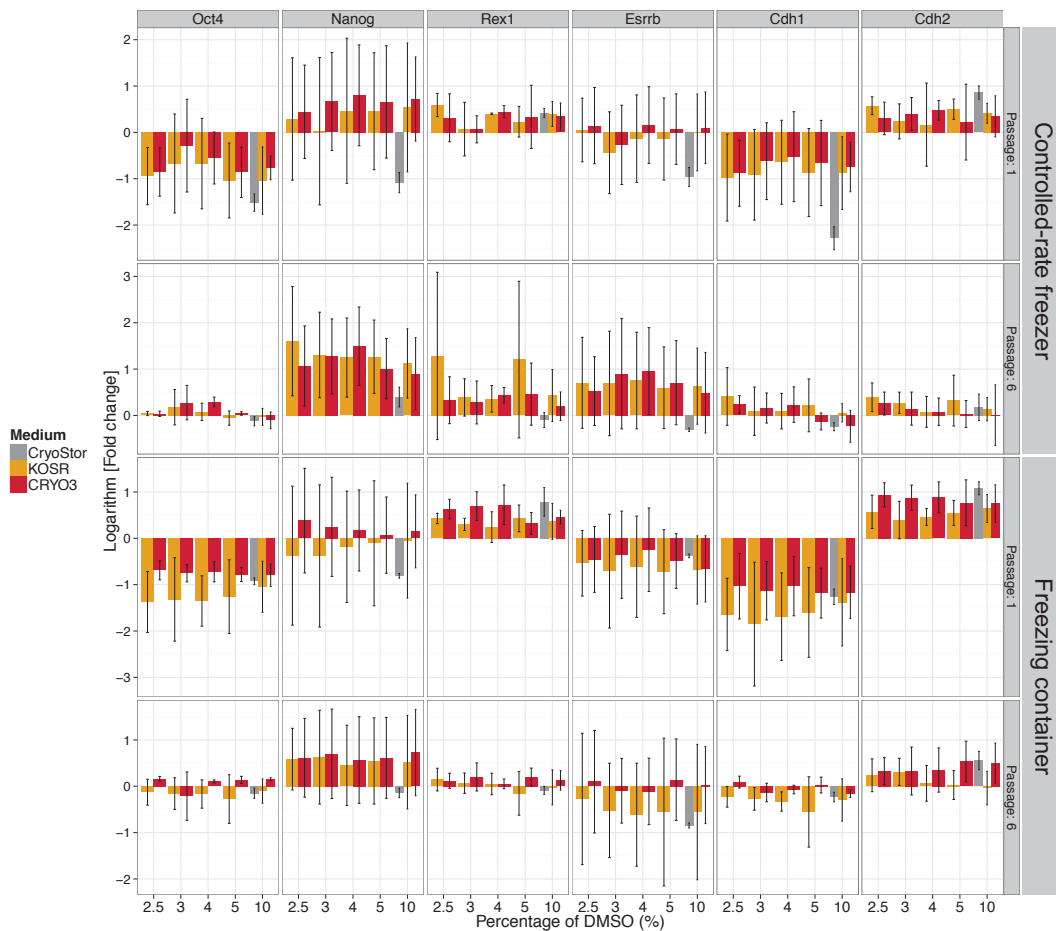


Figure 8. Gene expression of frozen-thawed rbiPSCs depending on freezing methods, freezing media, DMSO concentrations, at P1 and P6 post-thawing.
 The graph shows the logarithm of fold change, normalized to rabbit *Tbp* gene and mean fresh samples (three independent replicates) for each condition, at passages 1 and 6.

Thermodynamic properties of the freezing media

Predictably, melting temperatures (T_m), as well as maximum crystallization enthalpy variation (ΔH), decreased with increasing DMSO concentration in the tested freezing media (Table 2). This observation was not confirmed for crystallization temperatures (T_c). It means that, when concentration of DMSO is increased in the freezing medium, the temperature at equilibrium between phases as well as the temperature of liquid phase decreased on the one hand, and the quantity of ice formed is reduced on the other hand. Cryostor® CS10 had the lowest T_c , T_m and ΔH . Paradoxically, CRYO3-based media were thermodynamically less stable than media containing FBS or KOSR, since we observed a high amplitude of their measured ΔH .

Table 2. Thermodynamic properties of used freezing media.

Cells	Medium	DMSO concentration	T _c (°C)	T _m (°C)	ΔH (J/g)
mESC	FBS	0%	-16.73 ± 1.01	0.99 ± 0.04	-280.27 ± 4.01
mESC	FBS	5%	-15.97 ± 4.33	-1.56 ± 0.08	-224.78 ± 4.31
mESC	FBS	10%	-18.68 ± 1.81	-3.61 ± 0.34	-185.06 ± 3.11
RbESC	FBS	0%	-17.95 ± 1.25	0.71 ± 0.28	-274.05 ± 5.10
RbESC	FBS	5%	-19.65 ± 1.01	-2.53 ± 0.42	-205.53 ± 0.98
RbESC	FBS	10%	-19.19 ± 4.23	-3.82 ± 0.12	-184.05 ± 3.11
RbiPSC	KOSR	0%	-18.22 ± 4.58	0.45 ± 0.06	-256.32 ± 5.51
RbiPSC	KOSR	5%	-21.74 ± 3.35	-1.70 ± 0.27	-215.06 ± 1.20
RbiPSC	KOSR	10%	-19.50 ± 2.23	-3.99 ± 0.14	-175.71 ± 0.11
all	CRYO3	0%	-16.61 ± 1.96	0.51 ± 0.10	-263.15 ± 1.32
all	CRYO3	5%	-15.66 ± 2.83	-1.69 ± 0.28	-224.34 ± 9.40
all	CRYO3	10%	-21.32 ± 3.35	-4.20 ± 0.16	-183.70 ± 7.28
all	CryoStor	10%	-22.42 ± 1.63	-4.45 ± 0.35	-158.61 ± 1.33

Results are presented as the mean ± standard deviation of 3 replicates of each tested medium.

T_c: crystallization temperature; T_m: melting temperature; ΔH: maximum crystallization enthalpy variation.

Discussion

In this study, we report the effects of synthetic media for cryopreserving rbPSCs in using freezing container or controlled-rate freezer, with a cooling rate of 1°C/min. We showed that CRYO3-based medium could replace FBS or KOSR-based media for rbPSCs freezing, especially if DMSO concentration is reduced to 4-5 %. Indeed, this synthetic medium induced acceptable viability rates, growth recoveries and pluripotency gene expression level in presence of only 4 % or 5 % of cryoprotectant. However, the control synthetic medium CryoStor® CS10 containing 10 % of DMSO, gave rise to the best viability rate after thawing of rbPSCs, and showed lowest melting temperature and crystallization enthalpy variation by differential scanning calorimetry analysis. Nevertheless, this medium did not seem to allow better preservation of the stem cell quality as shown by the pluripotency gene expression level in recovered rbPSCs with the tested freezing media.

Vitrification method has been used in stem cell cryopreservation, especially for freezing hPSCs clumps as a result of the dissociation sensitivity of these cells (Miyazaki and Suemori, 2016). rbPSCs can be dissociated by enzymatic reaction and then frozen in single cells with a slow-freezing procedure. We showed that rbPSCs can be frozen either in a controlled-rate freezer or a freezing container. However, surprisingly, the freezing container showed better survival rates after thawing and appeared to be less variable, compared to the controlled-rate freezer. Some

authors applied an embryo protocol to hPSCs using a manual induction of nucleation, called “seeding” at -7°C or -10°C (Ware *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010). Variation observed in our study could be due to the non-controlled crystallization.

Pluripotent stem cells are usually frozen in a serum-based medium containing 10 % of DMSO (Wang *et al.*, 2007; Hunt, 2011; Li and Ma, 2012). Since animal-derived product could contribute to expose cells to pathogens as well as variability in the freezing procedure, it is necessary to replace these products with synthetic and chemically defined molecules. Many studies on human or mouse pluripotent stem cells showed that FBS or Human Serum Albumin could be substituted with commercial synthetic media containing high molecular weight polymer (Miyamoto *et al.*, 2012; Sart *et al.*, 2013; Liu and Chen, 2014; Ota *et al.*, 2017). We chose CryoStor® CS10 as a positive control because this product is widely used for stem cells freezing. In our study, we compared a commercial synthetic product, CRYO3, accredited for clinical purposes, to CryoStor® CS10, a medium widely used for stem cell freezing. CRYO3 is composed of hyaluronic acid (HA). Several studies used HA in tissue engineering (Kayakabe *et al.*, 2006; Saw *et al.*, 2011; Collins and Birkinshaw, 2013) or cryopreservation (Joly *et al.*, 1992; Sbracia *et al.*, 1997; Lotfi *et al.*, 2017). Our results confirmed that CRYO3 can be a potential substitute to serum, as rbPSC characteristics after freezing in CRYO3-based media were similar or even better than those of cells frozen in serum-based media. These data are coherent with previous studies of our team on embryo cryopreservation (Bruyère *et al.*, 2012, 2013; Teixeira *et al.*, 2018).

Beside the sanitary risk of classical PSC freezing medium, there is a risk of toxicity in employing high level of cryoprotectants in freezing media such as 10 % DMSO. Indeed, increase of cell differentiation and decrease in *Oct4* pluripotency gene expression were observed in hPSCs frozen in presence of DMSO (Adler *et al.*, 2006; Katkov *et al.*, 2006). Moreover, for clinical aspects, DMSO residues trigger adverse effects in patients such as nausea, headaches and diarrhea (Davis *et al.*, 1990; Abrahamsen *et al.*, 2002; Windrum and Morris, 2003; Thirumala *et al.*, 2009). In our study, similar results were observed between 4 %, 5 % and 10 % of DMSO mostly for CRYO3-based media, showing that it is possible to decrease DMSO concentration with high efficiency of preservation. Sart *et al.* (Sart *et al.*, 2013) also observed similar viability rates after freezing mouse PSCs in 2 % or 5 % DMSO, compared to 10 % DMSO, in a synthetic medium (HypoThermosol FRS, Bio-Life Solutions). However, after two days of culture, viability dropped to 10 % and 40 % respectively. We did not find a such phenomenon in our study, in which we observed on the contrary, an improved quality of

the recovered cells with time. Many studies referred the substitution or the combination of DMSO with other cryoprotectants, such as ethylene glycol (EG) or polyethylene glycol (PEG) (Ha *et al.*, 2005; Katkov *et al.*, 2006; Baran and Ware, 2007; Xu *et al.*, 2010; Ota *et al.*, 2017; Ntai *et al.*, 2018). However, it was also shown that EG and PEG were more genotoxic than DMSO for human oocyte cryopreservation (Aye *et al.*, 2010).

Thermodynamic characterization of the tested freezing media was consistent with cryobiology theory and results about quality of recovered cells. Indeed, melting temperature and crystallization enthalpy variation, corresponding to the forming ice quantity, decreased with increased DMSO percentage. This inversed relation was not observed for crystallization temperature, because this parameter is more dependent to experimental conditions than sample composition, compared to T_m and ΔH . In fact, crystallization can appear because of heterogeneous nucleation induced by the presence of impurities on the aluminum pan surface, resulting in variable T_c . Moreover, CryoStor® CS10 was stable thermodynamically and showed the lowest parameters, suggesting that lower quantity of ice was formed at lower temperature this medium. This observation was consistent with high observed viability rate of mESCs and rbPSCs thawing from CryoStor® CS10. We observed that CRYO3-based medium showed higher variability of ΔH compared to CryoStor® CS10, suggesting its poor thermodynamical stability, although this instability was not demonstrated for embryo freezing medium containing CRYO3 (Bruyère *et al.*, 2012, 2013). Furthermore, except for CryoStor® CS10, all tested freezing media exhibited similar thermodynamic patterns, corresponding to lower viability of the thawing cells. This data shows the interest of thermodynamic approaches using DSC in understanding the physical behavior of freezing media and in establishing relevant freezing protocols.

Conclusion

This is the first study to report a rbPSCs freezing method in a synthetic medium with reduced DMSO concentration. These preliminary results revealed that it is possible to cryopreserve rbPSCs in CryoStor® CS10 or in CRYO3 containing less than 10 % of DMSO, either in a freezing container or a controlled-rate freezer. Further analyses as karyotype, phosphatase alkaline and teratoma analysis should be performed in order to confirm the efficiency of this protocol.

Acknowledgments

We thank Stem Alpha Society for providing CRYO3 solutions used in this study. We thank Marie-Laure Delignette-Muller for her kind support in the choice of used statistical methods. Lucie Gavin-Plagne and Sophie Voisin were funding by PhD grants from the French national network of biological centers for animal resources CRB-Anim [ANR-INBS11-0003] (https://www.crbanim.fr/crb-anim_eng/).

Author Disclosure Statement

The authors have no competing financial interests.

References

- Abrahamsen JF, Bakken AM and Bruserud Ø** (2002) Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion* **42** 1573–1580.
- Adler S, Pellizzer C, Paparella M, Hartung T and Bremer S** (2006) The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. *Toxicology in Vitro* **20** 265–271.
- Aerts JMJ, De Clercq JBP, Andries S, Leroy JLMR, Van Aelst S and Bols PEJ** (2008) Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical transplants after Cryologic solid surface vitrification or slow-rate freezing. *Cryobiology* **57** 163–169.
- Afanassieff M, Taponnier Y and Savatier P** (2014) Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in Rabbits. In *Induced Pluripotent Stem (IPS) Cells*, pp 149–172. Eds K Turksen and A Nagy. New York, NY: Springer New York.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C and Antinori S** (2007) Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reproductive BioMedicine Online* **14** 72–79.
- Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J and Courbiere B** (2010) Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and Chemical Toxicology* **48** 1905–1912.
- Baran SW and Ware CB** (2007) Cryopreservation of Rhesus Macaque Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development* **16** 339–344.
- Beier AFJ, Schulz JC, Dörr D, Katsen-Globa A, Sachinidis A, Hescheler J and Zimmermann H** (2011) Effective surface-based cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. *Cryobiology* **63** 175–185.
- Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G and Buff S** (2012) Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology* **78** 1294–1302.
- Bruyère P, Baudot A, Joly T, Commin L, Pillet E, Guérin P, Louis G, Josson-Schramme A and Buff S** (2013) A Chemically Defined Medium for Rabbit Embryo Cryopreservation. *PLOS ONE* **8** e71547.
- Collins MN and Birkinshaw C** (2013) Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers* **92** 1262–1279.
- Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S and Santos GW** (1990) Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood* **75** 781–786.
- Dinnyés A, Dai Y, Jiang S and Yang X** (2000) High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology of*

Reproduction **63** 513–518.

Ducret M, Fabre H, Farges J-C, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, Mallein-Gerin F and Perrier-Groult E (2015) Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal Manufacturing Approach. *Journal of Endodontics* **41** 1492–1499.

Duranthon V, Beaujean N, Brunner M, Odening KE, Santos AN, Kacs Kovics I, Hiripi L, Weinstein EJ and Bosze Z (2012) On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Research* **21** 699–713.

Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarrete Santos A and Duranthon V (2012) Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* **144** 1–10.

Graur D, Duret L and Gouy M (1996) Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* **379** 333–335.

Ha SY, Jee BC, Suh CS, Kim HS, Oh SK, Kim SH and Moon SY (2005) Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Human Reproduction* **20** 1779–1785.

Hunt C (2011) Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **38** 107–123.

Johnson JB and Omland KS (2004) Model selection in ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **19** 101–108.

Joly T, Nibart M and Thibier M (1992) Hyaluronic acid as a substitute for proteins in the deep-freezing of embryos from mice and sheep: An in vitro investigation. *Theriogenology* **37** 473–480.

Jurga M, Forraz N, Basford C, Atzeni G, Trevelyan AJ, Habibollah S, Ali H, Zwolinski SA and McGuckin CP (2012) Neurogenic Properties and a Clinical Relevance of Multipotent Stem Cells Derived from Cord Blood Samples Stored in the Biobanks. *Stem Cells and Development* **21** 923–936.

Katkov II, Kim MS, Bajpai R, Altman YS, Mercola M, Loring JF, Terskikh AV, Snyder EY and Levine F (2006) Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology* **53** 194–205.

Kayakabe M, Tsutsumi S, Watanabe H, Kato Y and Takagishi K (2006) Transplantation of autologous rabbit BM-derived mesenchymal stromal cells embedded in hyaluronic acid gel sponge into osteochondral defects of the knee. *Cytotherapy* **8** 343–353.

Kuwayama M (2007) Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology* **67** 73–80.

Li Y and Ma T (2012) Bioprocessing of Cryopreservation for Large-Scale Banking of Human Pluripotent Stem Cells. *BioResearch Open Access* **1** 205–214.

Li X, Meng G, Krawetz R, Liu S and Rancourt DE (2008) The ROCK Inhibitor Y-27632 Enhances the Survival Rate of Human Embryonic Stem Cells Following Cryopreservation. *Stem Cells and Development* **17** 1079–1086.

Li Y, Tan J and Li L (2010) Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. *Fertility and Sterility* **93** 999–1005.

Liu W and Chen G (2014) Cryopreservation of Human Pluripotent Stem Cells in Defined Medium. *Current Protocols in Stem Cell Biology* **31** 1C.17.1-1C.17.13.

Lotfi S, Mehri M, Sharafi M and Masoudi R (2017) Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster. *Animal Reproduction Science* **184** 204–210.

Matsumura K, Bae JY, Kim HH and Hyon SH (2011) Effective vitrification of human induced pluripotent stem cells using carboxylated ϵ -poly-L-lysine. *Cryobiology* **63** 76–83.

Miyamoto Y, Noguchi H, Yukawa H, Oishi K, Matsushita K, Iwata H and Hayashi S (2012) Cryopreservation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Medicine* **3** 89–95.

Miyazaki T and Suemori H (2016) Slow Cooling Cryopreservation Optimized to Human Pluripotent Stem Cells. In *Biobanking and Cryopreservation of Stem Cells*, pp 57–65. Springer, Cham.

Mueller AA, Forraz N, Gueven S, Atzeni G, Degoul O, Pagnon-Minot A, Hartmann D, Martin I, Scherberich A and McGuckin C (2014) Osteoblastic Differentiation of Wharton Jelly Biopsy Specimens and Their Mesenchymal Stromal Cells after Serum-Free Culture: *Plastic and Reconstructive Surgery* **134** 59e-69e.

Nishigaki T, Teramura Y, Nasu A, Takada K, Toguchida J and Iwata H (2011) Highly efficient cryopreservation of human induced pluripotent stem cells using a dimethyl sulfoxide-free solution. *International Journal of Developmental Biology* **55** 305–311.

- Ntai A, La Spada A, De Blasio P and Ida Biunno I** (2018) Trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*.
- Osteil P** (2013) Étude de la pluripotence des cellules souches embryonnaires chez le lapin.
- Osteil P, Moulin A, Santamaria C, Joly T, Jouneau L, Aubry M, Tapponnier Y, Archilla C, Schmaltz-Panneau B, Lecardonnell J et al.** (2016) A Panel of Embryonic Stem Cell Lines Reveals the Variety and Dynamic of Pluripotent States in Rabbits. *Stem Cell Reports* **7** 383–398.
- Ota A, Matsumura K, Lee J-J, Sumi S and Hyon S-H** (2017) StemCell Keep™ is Effective for Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells by Vitrification. *Cell Transplantation* **26** 773–787.
- R Development Core Team** (2011) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- Rall WF and Fahy GM** (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* **313** 573–575.
- Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G and Trounson AO** (2001) Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Human Reproduction* **16** 2187–2194.
- Richards M, Fong C-Y, Tan S, Chan W-K and Bongso A** (2004) An Efficient and Safe Xeno-Free Cryopreservation Method for the Storage of Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* **22** 779–789.
- dos Santos-Neto PC, Cuadro F, Barrera N, Crispo M and Menchaca A** (2017) Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of in vivo and in vitro produced ovine embryos. *Cryobiology* **78** 8–14.
- Sarnowska A, Jablonska A, Jurga M, Dainiak M, Strojek L, Drela K, Wright K, Tripathi A, Kumar A, Jungvid H et al.** (2013) Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells by Bioscaffolds Protects Cell Survival and Attenuates Neuroinflammatory Reaction in Injured Brain Tissue after Transplantation. *Cell Transplantation* **22** 67–82.
- Sart S, Ma T and Li Y** (2013) Cryopreservation of pluripotent stem cell aggregates in defined protein-free formulation. *Biotechnology Progress* **29** 143–153.
- Saw K-Y, Anz A, Merican S, Tay Y-G, Ragavanaidu K, Jee CSY and McGuire DA** (2011) Articular Cartilage Regeneration With Autologous Peripheral Blood Progenitor Cells and Hyaluronic Acid After Arthroscopic Subchondral Drilling: A Report of 5 Cases With Histology. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* **27** 493–506.
- Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J and Huszar G** (1997) Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Human Reproduction* **12** 1949–1954.
- Stachecki JJ, Garrisi J, Sabino S, Caetano JP, Wiemer KE and Cohen J** (2008) A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* **17** 360–367.
- Symonds MRE and Moussalli A** (2011) A brief guide to model selection, multimodel inference and model averaging in behavioural ecology using Akaike's information criterion. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **65** 13–21.
- Tancoz Z, Nemes C, Polgar Z, Gocza E, Daniel N, Stout TAE, Maraghechi P, Purity MK, Osteil P, Tapponnier Y et al.** (2012) Generation of rabbit pluripotent stem cell lines. *Theriogenology* **78** 1774–1786.
- Teixeira M, Commin L, Gavin-Plagne L, Bruyère P, Buff S and Joly T** (2018) Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium. *Cryobiology*.
- Thirumala S, Goebel WS and Woods EJ** (2009) Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis* **5** 143–154.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T and Callesen H** (1998) Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development* **51** 53–58.
- Vicente JS, Viudes-de-Castro MP, Cedano-Castro JI and Marco-Jiménez F** (2018) Cryosurvival of rabbit embryos obtained after superovulation with corifollitropin alfa with or without LH. *Animal Reproduction Science*.
- Wang S, Tang X, Niu Y, Chen H, Li B, Li T, Zhang X, Hu Z, Zhou Q and Ji W** (2007) Generation and Characterization of Rabbit Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* **25** 481–489.

Ware CB, Nelson AM and Blau CA (2005) Controlled-rate freezing of human ES cells. *Biotechniques* **38** 879.

Windrum P and Morris TCM (2003) Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* **31** 315.

Xu X, Cowley S, Flaim CJ, James W, Seymour LW and Cui Z (2010) Enhancement of Cell Recovery for Dissociated Human Embryonic Stem Cells After Cryopreservation. *Biotechnology Progress* **26** 781–788.

Yang P-F, Hua T-C, Wu J, Chang Z-H, Tsung H-C and Cao Y-L (2006) Cryopreservation of human embryonic stem cells: A protocol by programmed cooling. *CryoLetters* **27** 361–368.

Supplementary Material

Table S 1. Primers used for RT-qPCR

Gene	Origin		Primers
<i>Oct4</i>	Rabbit	Forward	CCTGCTCTGGGCTCCCCCAT
		Reverse	TGACCTCTGCCTCCACCCCG
<i>Nanog</i>	Rabbit	Forward	CACTGATGCCCGTGGTGCC
		Reverse	AGCGGAGAGGCGGTGTCTGT
<i>Esrrb</i>	Rabbit	Forward	CGTGGAGGCCGCCAGAAGTA
		Reverse	TCTGGCTCGGCCACCAAGAG
<i>Rex1 (Zfp42)</i>	Rabbit	Forward	AGCCCAGCAGGCAGAAATGGAA
		Reverse	TGGTCAGTCTCACAGGGCACAT
<i>Cdh1</i>	Rabbit	Forward	TGCACAGGCCGAAACCAGT
		Reverse	ACGGCCTTCAGCGTGACCTT
<i>Cdh2</i>	Rabbit	Forward	CCGTGGCAGCTGGACTGGAT
		Reverse	GATGACGGCCGTGGCTGTGT
<i>Tbp</i>	Rabbit	Forward	CTTGGCTCCTGTGCACACCATT
		Reverse	ATCCCAAGCGTTTGCTGTCTGT
<i>Oct4</i>	Mouse	Forward	ATGCAAATCGGAGACCCTGGTGC
		Reverse	AGCCCAAGCTGATTGGCGATGTG
<i>Nanog</i>	Mouse	Forward	AAGCCATGCGCATTTTAGCACCC
		Reverse	AAGGAACCTGGCTTTGCCCTGAC
<i>Esrrb</i>	Mouse	Forward	CTCGCCAACTCAGATTTCGAT
		Reverse	AGAAGTGTTCACGGCTTTG
<i>Rex1 (Zfp42)</i>	Mouse	Forward	TGTGTGCAGAGTGTGGCAAAGC
		Reverse	TGGGTGCGCAAGTTGAAATCCAG
<i>Actb</i>	Mouse	Forward	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTTGCC
		Reverse	TTTGCACATGCCGAGCCGTTG

2. Résultats et Discussion

Cette étude montre qu'il est possible d'obtenir jusqu'à 60 % (rbESC) et 80 % (rbiPSC) de viabilité après décongélation pour les milieux FBS/KOSR et CRYO3 additionnés de 10 % de DMSO. Les meilleurs résultats de viabilité sont observés pour le milieu CryoStor® CS10 (71 % pour les rbESC et environ 85 % pour les rbiPSC). De façon surprenante, l'utilisation du congélateur programmable pour les rbESC s'est avéré être délétère sur la survie cellulaire (8 %). Pour les rbiPSC, de meilleurs résultats et de plus faibles variations sont observés avec l'enceinte à isopropanol en comparaison du congélateur programmable, que ce soit pour les paramètres de viabilité ou les courbes de croissance. Les taux de viabilité plus faibles pour les concentrations de DMSO inférieures à 10 % sont compensés par la reprise de la croissance cellulaire (observation après 5 passages). De plus, de manière générale, une plus grande variabilité est observée pour les milieux contenant du FBS ou du KOSR, comparé au CRYO3. De façon notable, l'expression des gènes de pluripotence est plus stable dans les cellules congelées avec une concentration en DMSO de 4 % en présence du milieu CRYO3.

L'étude thermodynamique des solutions cryoprotectrices (tous les milieux à 0 %, 5 % et 10 % de DMSO) conforte l'étude biologique. En effet, le CryoStor® CS10 (biologiquement plus performant aux autres milieux) possède des caractéristiques thermodynamiques intéressantes. En effet, la température de cristallisation (T_c) et de fin de fusion (T_m), ainsi que la quantité potentielle de glace formée (proportionnelle à ΔH) sont faibles. Pour les autres milieux, ces valeurs thermodynamiques sont proches pour chaque concentration en DMSO et globalement un peu moins intéressantes que pour le milieu témoin positif.

Notre hypothèse de départ est ainsi validée : le **CRYO3 peut remplacer le FBS et le KOSR** pour la **congélation lente de rbPSC**, car ces produits ont une composition qui peut fortement varier d'un lot à un autre. Par ailleurs, le milieu CryoStor® CS10 est une alternative intéressante dès lors que la diminution de la concentration en DMSO n'est pas nécessaire. Il serait de plus intéressant d'utiliser ce même milieu avec des pourcentages moins élevés de DMSO (4 ou 5%) afin d'optimiser encore la cryoconservation des rbPSC. L'ensemble des résultats de cette étude est cohérent avec ceux observés en congélation lente et en vitrification des embryons de lapin.

Discussion générale

&

Perspectives

Notre objectif était de substituer les **POA contenus dans les milieux de congélation** par un milieu synthétique et chimiquement défini sur deux nouveaux modèles cellulaires distincts : les **spermatozoïdes** (ovin et bovin) et les **cellules souches pluripotentes** (lapin) (Figure 18).

Au delà des réponses apportées à l'objectif de départ, ce travail soulève différentes questions résumées dans la figure 18 et développées dans la partie ci-dessous.

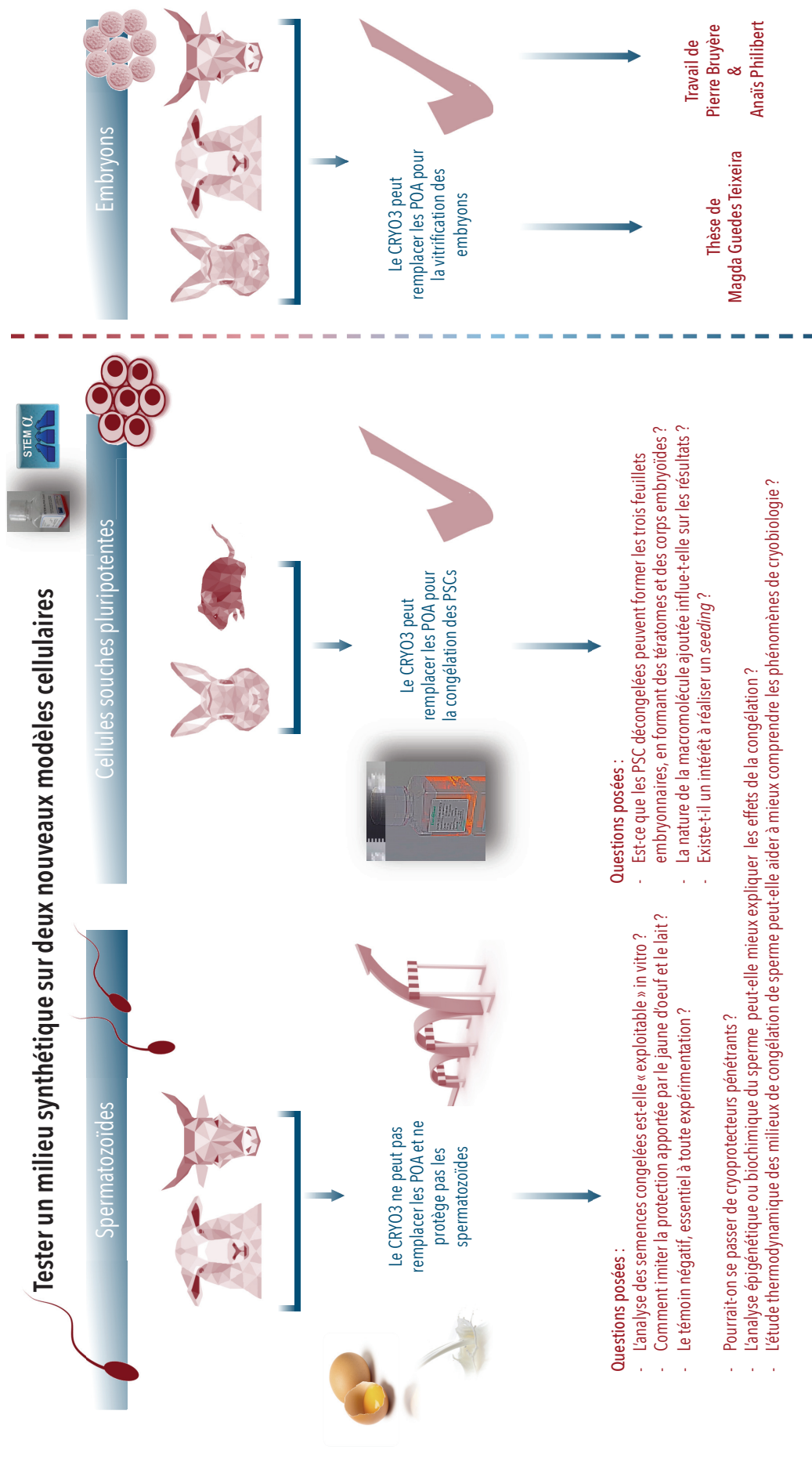


Figure 18. Synthèse et discussion générale de la thèse.

EB : Corps embryoides ; POA : produits d'origine animale ; PSC : Cellules souches pluripotentes.

1. Optimisation des méthodes de congélation et évaluation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes ovin et bovin

L'analyse in vitro de la semence congelée est-elle exploitable?

D'après l'analyse des paramètres testés *in vitro*, avec notamment moins de 5 % de viabilité pour le milieu CRYO3 dans la première étude, la semence décongelée de bélier serait classiquement rejetée pour une utilisation *in vivo*. Cependant, les résultats de fertilisation et de gestation obtenus avec cette semence sont tout à fait valables, remettant ainsi en cause l'utilité prédictive des études *in vitro*. En effet, la prédiction de la fertilité par des paramètres évalués en laboratoire est un sujet à développer pour faciliter le travail des éleveurs. De plus en plus de paramètres *in vitro* ont été développés pour caractériser de manière plus précise la fertilité des spermatozoïdes. Aujourd'hui, les études présentent des résultats contradictoires concernant une corrélation possible entre les paramètres définis *in vitro* et la fertilité des mâles [177,196,439–444]. Cette potentielle **corrélation est d'autant plus difficile à vérifier** car les études publiées montrent rarement les résultats bruts et les nuages de points correspondants aux données, ne faisant figurer dans l'article uniquement le coefficient de corrélation. Des **modèles plus complexes**, généralisés et prenant en compte des effets fixes et aléatoires, ont été utilisés pour permettre de **prendre en compte plusieurs paramètres in vitro** afin d'augmenter la part expliquée de la fertilité. Cependant, la sur-paramétrisation d'un modèle statistique augmente forcément le coefficient de corrélation. C'est le cas de l'étude de Sellem et al. [177] où les auteurs ont développé des modèles différents de régressions linéaires pour prédire la fertilité de taureaux. Le meilleur modèle prenant en compte des paramètres de mobilité ainsi que d'intégrité membranaire, acrosomique et d'activité mitochondriale permet d'expliquer la fertilité à hauteur de 40 % seulement. Holden et al. [443] n'ont, quant à eux, pas pu mettre en évidence une corrélation entre tous les paramètres *in vitro* évalués et la fertilité des taureaux. Néanmoins, quand la semence congelée est sexée, une corrélation entre la viabilité et le taux de gestation, ainsi qu'entre la mobilité et le taux de gestation, sont observées.

Nous pouvons nous demander alors pour quelles raisons les paramètres évalués au laboratoire ne permettent pas de prédire mieux la fertilité des mâles. En

fait, de nombreux facteurs de variation peuvent expliquer ces résultats contradictoires présents dans la littérature scientifique. Des artefacts peuvent être observés, liés notamment **au milieu de dilution** dans lequel sont placés les spermatozoïdes. Certaines solutions permettent notamment d'activer de manière importante la mobilité des spermatozoïdes, telles que les solutions HEPES-TALP pour la fécondation *in vitro* des spermatozoïdes (augmentation du phénomène d'hyperactivité des spermatozoïdes) ou des solutions contenant des antioxydants comme la caféine (augmentation de la mobilité) [445–448]. Il existe même sur le marché des lames de lecture de mobilité pour CASA, imprégnées de caféine (GenePro, Groupe Gènes Diffusion, France). Le **facteur dit femelle** est également source de variabilité pour les taux de fertilité, comme l'âge et la parité de la femelle, ainsi que la détection et synchronisation de ses chaleurs [449–451].

Dans le domaine de la reproduction, il semble ainsi essentiel de passer par le modèle *in vivo* pour confirmer ou infirmer des hypothèses et des résultats obtenus *in vitro*. Notre première étude montre que les résultats de mobilité obtenus par CASA ne sont pas corrélés aux résultats de fertilité des semences utilisées *in vivo*. En effet, bien qu'une différence significative ait été observée *in vitro* entre les deux milieux de congélation (le milieu classique avec jaune d'œuf et lait vs. un milieu à base de CRYO3), *in vivo*, cette différence n'a pas été mise en évidence. Notre deuxième étude confirme ces résultats et montre une amélioration des taux de viabilité quand les spermatozoïdes sont congelés avec une cinétique de refroidissement plus rapide. Les deux expériences ont été réalisées dans des **conditions expérimentales différentes** (même inséminateur mais races, centres de collectes et modalités d'élevage différents – élevage traditionnel vs. ferme expérimentale). Malgré cela, les taux de gestation, les taux de mise bas et la prolificité sont similaires. Les sources d'incertitudes étant multiples lors d'essais expérimentaux, nous avons toutefois cherché à **réduire les variations dues au facteur opérateur et au facteur temps en utilisant les modalités suivantes** :

- même opérateur pour la collecte de sperme au sein de chacun centre ;
- même inséminateur lors des deux expérimentations ;
- inséminations réalisées sur une seule journée pour chaque expérience.

Notre première expérience a été réalisée sur un pas de temps de deux années (116 brebis la première année et 79 brebis la deuxième année), mais aucune différence n'a été observée entre les deux séries. Les **résultats sont ainsi cohérents entre les séries**. À ce titre, il nous semble que les résultats obtenus n'ont pas matière à être remis en cause. Les inséminations ont été réalisées chez la brebis par voie laparoscopique, les spermatozoïdes sont donc déposés directement dans le tiers supérieur des cornes utérines et non dans le vagin comme lors d'une insémination classique. Nous avons ainsi fait le choix de cette technique pour évaluer la fécondité des spermatozoïdes. En effet, placer les spermatozoïdes proches du lieu de fécondation doit augmenter logiquement le taux de fécondation, en passant outre le chemin normalement emprunté du vagin jusqu'au site de fécondation. Cependant, la mobilité *in vitro* n'est pas forcément un facteur déterminant de la fertilité, car peu d'études démontrent une corrélation entre la mobilité observée au microscope et le taux de gestation après insémination classique. Une fois les spermatozoïdes transférés au sein de tractus génital de la femelle, des molécules comme les glycosaminoglycanes (acide hyaluronique par exemple) vont activer et sélectionner des spermatozoïdes qui pourront ainsi accéder jusqu'au col de l'utérus. Ce n'est donc pas grâce à la mobilité activée par les mitochondries du spermatozoïde que ce dernier pourra atteindre l'ovocyte au site de fécondation. Néanmoins, une étude de la semence inséminée de manière classique pourrait être intéressante pour des raisons de valorisation économique des semences dans les centres de collecte. Dans tous les cas, le **raffinement de la technique** dans notre étude a permis de **compenser un déficit de la semence observé *in vitro***. L'application de cette technique d'insémination par laparoscopie permet d'exploiter des semences de moins bonnes qualités et à ce titre est particulièrement intéressante pour les programmes de cryobanque et de conservation d'espèce.

Les paramètres évalués par cytométrie en flux ou par CASA restent intéressants pour caractériser la semence, afin de comparer de manière objective les résultats entre les publications. Ce sont également de bons outils pour étudier les différents mouvements selon les espèces (différence de trajectoire entre un spermatozoïde de mammifère et un spermatozoïde de faux-bourdon par exemple). Cependant, ces paramètres sont peu utiles pour les centres de collecte et d'inséminations puisqu'ils ne permettent pas de **prédire le comportement des**

spermatozoïdes en insémination et donc l'effet des milieux de congélation sur la fertilité [435]. La meilleure solution est donc de réaliser, en aval de l'expérimentation, des IA en hétéropermie (c'est-à-dire en mélangeant plusieurs éjaculats de différents mâles) afin de gommer les variations dues aux mâles, aux femelles, à la saison, à l'alimentation et aux conditions d'élevages [450,452].

- PERSPECTIVES

Aujourd'hui, il est nécessaire de réaliser des études *in vivo* pour améliorer les conditions de cryopréservation des semences. Il n'existe pas d'outils fiables permettant de prédire le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. L'objectif serait de pouvoir s'affranchir du test fonctionnel *in vivo*. Des solutions toutefois peuvent être proposées pour améliorer la prédiction :

- l'analyse spermatique de taureaux à faible, intermédiaire et haute fertilité et de différentes races améliorerait l'extrapolation sur une population hétérogène d'individus [450,453].

Les études de corrélation entre les paramètres *in vitro* et *in vivo* sont souvent réalisés sur un échantillon d'individus sélectionnés sur leur fertilité. Il serait plus intéressant d'analyser cette corrélation sur un échantillon plus hétérogène (individus de fertilité différente et connue) afin de mieux prédire la fertilité d'une population et de mieux corréler les paramètres *in vitro* et *in vivo* [453,454].

- la prise en compte des sous-populations que constituent un éjaculat pourrait aider à mieux prédire la fertilité [455].

En effet, l'éjaculat représente un mélange de plusieurs cohortes de cellules mûrées dans l'épididyme et stockées plus ou moins longtemps dans la partie caudale. Ainsi, l'éjaculat est une suspension d'une population hétérogène de cellules spermatiques et d'un plasma séminal à composition variable. Lors du dépôt de la semence dans le vagin, une sous-population va être sélectionnée, composée uniquement de spermatozoïdes vivants. Afin de mimer cette sélection *in vivo*, les techniques de « swim-up » ou de la centrifugation par gradient de densité sont utilisées depuis longtemps (revue de ces techniques par Rodríguez-Martínez [455]). Une étude récente a été publiée sur un système de migration (distance de 20 mm) des spermatozoïdes dans des solutions de différentes viscosité (tris – acide citrique

– fructose puis acide hyaluronique et acrylamide) afin de les sélectionner [456]. L'amélioration de ces techniques combinée à l'analyse par CASA de sous-populations [175] permettraient de développer des outils efficaces de prédiction de la fertilité.

- l'utilisation d'un système 3D d'oviducte artificiel chez le bovin pourrait permettre d'analyser le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

Marcía A.M.M Ferraz a développé lors de sa thèse un **système de culture cellulaire de cellules épithéliales d'oviducte chez le bovin**, permettant de mimer le microenvironnement de l'oviducte et d'étudier l'interaction des gamètes et le développement embryonnaire précoce [457]. Le système est composé d'une double chambre en forme de U, séparée par une membrane poreuse et une couche confluente de cellules épithéliales d'oviducte bovin [458]. Cet oviducte 3D peut être **perfusé** (fluide avec sperme par exemple) et **manipulé** (possibilité d'imagerie). Une de ses études montre que les cellules épithéliales d'oviducte bovin conservent leur différenciation jusqu'à six semaines. Le système est simple d'utilisation et permet la visualisation de la fécondation *in vitro* [459].

Comment mimer la protection apportée par le jaune d'œuf et le lait lors de congélation de sperme?

Aujourd'hui, les phospholipides du jaune d'œuf et les protéines du lait ont pu être remplacés par **des phospholipides végétaux** (lécithines de soja [246,460,461]) ou des **liposomes composés de lipides spécifiques** [250,462]. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la protection apportée par le jaune d'œuf et le lait (partie bibliographique – les spermatozoïdes – partie 2.2.3.1). Il existe également un **dilueur à base de noix de coco** (poudre lyophilisée d'eau de noix de coco commercialisée, lait ou huile de noix de coco) utilisé pour la congélation de sperme de bélier [463], chien [464], d'agoutis [465], de rhinocéros (lait de noix de coco) [466]. Malheureusement, ces différents produits, certes synthétiques, ne sont **pas toujours chimiquement définis**. Le problème sanitaire est donc résolu mais celui de la variabilité des produits peut porter encore à débat.

Une piste prometteuse est l'acide hyaluronique, dont les travaux portant sur son utilisation pour la congélation d'embryons ont porté ses fruits [257,395,433,434].

Même si les études de son emploi dans la congélation du sperme sont pour l'instant contradictoires [213,259,260,467–470], la piste de l'utilisation de l'acide hyaluronique mérite d'être explorée. En effet, la présence de glycosaminoglycanes dans l'oviducte et leur rôle dans la réaction acrosomique et la capacitation des spermatozoïdes [432,471] sont en faveur de son intérêt dans la congélation du sperme ; et ce d'autant plus que le CRYO3 qui est composé en partie d'acide hyaluronique (composition exacte non divulguée), s'est avéré efficace pour la congélation d'embryons dans notre laboratoire. Après analyse de ce produit pour la congélation de semences de taureau et de bélier, nous avons observé que le CRYO3 ne protège pas les spermatozoïdes. Il est possible que la composition du CRYO3 ne soit pas adéquate dans ce cas même avec la présence d'acide hyaluronique. Ainsi, même si les produits actuels (lécithine de soja et liposomes) ne sont pas complètement chimiquement définis, ils représentent une alternative efficace.

- PERSPECTIVES

Le développement des connaissances sur les nanoparticules a permis la mise au point de nouveaux produits pour substituer les POA. C'est le cas des liposomes enveloppant des lipides pour mimer les micelles de caséine de lait ou les LDL du jaune d'œuf. Le mécanisme par lequel les liposomes protègent les spermatozoïdes est encore mal connu. Les chercheurs ne savent pas exactement s'il existe un transfert ou une libération des lipides du liposome. Le transfert des lipides du liposome vers la membrane des spermatozoïdes est possible mais ce mécanisme est lent et il faut donc incuber les spermatozoïdes à 4°C avec les liposomes pour augmenter la viabilité post-décongélation chez le taureau [250]. Chez l'homme, Isaac et al. [472] ont congelé le sperme dans du SpermFreeze™ (composé de HSA ; FertiPro, Belgique) en présence de liposomes contenant du zinc. Les images obtenues par microscopie électronique à balayage permettent de voir que les liposomes entourent la membrane des spermatozoïdes. Ainsi, les nanoparticules semblent représenter une approche à développer dans le domaine des biotechnologies de la reproduction [473].

Le témoin négatif, essentiel pour toute expérimentation ?

Nos résultats *in vitro*, particulièrement les paramètres définis par cytométrie en flux, sont plus faibles que ceux observés dans la littérature [223,241,251,474,475]. Toutefois, la mobilité des spermatozoïdes est cohérente avec certaines études chez le taureau [246,476–478] et chez le bélier [479–483]. Nous avons pu observer une diminution significative de la qualité spermatique *in vitro* chez le bélier et le taureau quand les spermatozoïdes étaient congelés dans un milieu contenant du CRYO3, par rapport aux milieux contenant des POA, des liposomes, ou des lécithines de soja. **Le CRYO3 ne permet pas de protéger les spermatozoïdes lors de la descente en température** (à 4°C ou après congélation-décongélation). De manière surprenante, lorsque le sperme est congelé dans un **milieu dépourvu d'additif** (témoin négatif) tels que des phospholipides ou de l'acide hyaluronique, la **diminution en qualité spermatique est similaire** à celle du milieu contenant du CRYO3. À notre connaissance, aucune étude sur la congélation de sperme n'a présenté un milieu dit témoin négatif, dépourvu de tout additif. Pourtant inclure ce type de témoin est essentiel dans la démarche scientifique. Cette démarche nous a permis de montrer que le **CRYO3**, à une concentration de 20 % dans le milieu de congélation, **n'apportait aucune protection supplémentaire**.

Par ailleurs, l'insémination de 195 brebis charollaises par voie laparoscopique ne permet pas de différencier les milieux (Figure 19). De même que pour l'analyse *in vitro*, après 75 inséminations laparoscopiques de brebis Blanche du Massif Central, aucune différence n'est observée entre le milieu classique comportant du jaune d'œuf et du lait, le milieu contenant du CRYO3 et le témoin négatif. Ainsi, dans des conditions expérimentales différentes, nous observons les mêmes résultats. Le témoin négatif permet de montrer que la **semence peut être congelée dans un milieu synthétique et chimiquement défini**. La laparoscopie permet d'éliminer les différences observées *in vitro* entre les spermatozoïdes selon leur milieu de congélation et d'obtenir un taux de gestation élevé (environ 70 % sur les deux expériences) et un taux de prolificité acceptable.

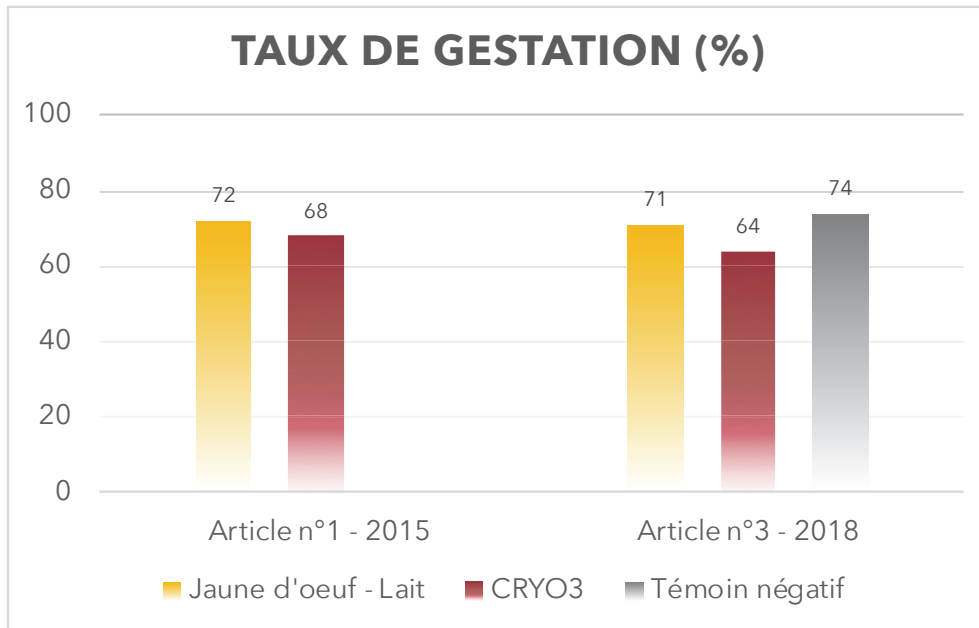


Figure 19. Synthèse des résultats d'insémination *in vivo* chez l'espèce ovine.

Toutefois, ces résultats sont à analyser avec précaution. Certes, nous n'avons pas mis en évidence une différence significative entre les milieux pour le paramètre de taux de gestation. Pour autant, le nombre de brebis inséminées dans notre première étude ($n = 195$ brebis) ne pouvait pas permettre de distinguer un écart de 5 points (67 % vs. 72%). Avec cet effectif, la **différence significative n'aurait été observée qu'à partir de 17 points**. En effet, avec un risque de première espèce α et une puissance ($1 - \beta$) de 80 %, il **aurait fallu 1330 individus par groupe**. Dans notre deuxième étude, le même constat est observé. Pour observer une différence significative entre le milieu CRYO3 (64 %, 18/28) et le milieu témoin négatif (74 %, 14/19), il aurait nécessité **d'inséminer 335 brebis par groupe**. Par ailleurs, la méthode par laparoscopie décrite dans notre étude n'est **pas utilisable en élevage à des fins commerciales**. En effet, cette méthode engendre des coûts économiques et des coûts en temps (trois minutes pour la laparoscopie vs. moins d'une minute par voie classique) trop importants par rapport à des inséminations classiques. De plus, il n'existe pas de statut réglementaire concernant le bien-être animal pour cette technique d'insémination qui peut potentiellement provoquer des douleurs ; par exemple, il n'existe aucune législation pour la réalisation systématique d'anesthésie locale. Pour toutes ces raisons, il est difficile de mettre en pratique nos expériences **dans le cadre d'une démarche commerciale** ; 5 points en taux de gestation ainsi que deux minutes pour inséminer étant des coûts considérables en élevage. Cependant,

pour **des objectifs de conservation *ex situ***, la congélation dans un milieu synthétique et la remise en place par laparoscopie **méritent d'être effectuées**.

Même s'il paraît évident d'utiliser des témoins positif et négatif lors de la mise en place d'un plan expérimental, aucune étude publiée sur la congélation de sperme ne présente de milieux dépourvus d'additif, c'est-à-dire sans jaune d'œuf, lécithine de soja ou liposomes. Notre travail a ainsi pu montrer qu'il est possible de congeler le sperme de taureau ou de bélier dans **un milieu synthétique et chimiquement défini, dépourvu de sources de phospholipides**.

2. Standardisation des méthodes de congélation pour maintenir la pluripotence des cellules souches chez le lapin

La nature de la macromolécule ajoutée influe-t-elle sur les résultats ?

Nos résultats avec le CRYO3 sont concordants avec ceux des études sur la congélation d'embryons [17,105,106]. En effet, plusieurs études montrent que des macromolécules synthétiques à haut poids moléculaire (acide hyaluronique, dextran, ficoll), sont capables de remplacer les sérums dans les milieux de congélation d'embryons [43,484,485]. Dans notre étude, de meilleurs taux de viabilité des PSC ont été observés avec le milieu de congélation CryoStor® CS10. D'autres études menées sur différents types cellulaires (MSC, PSC, cellules hématopoïétiques, hépatocytes, etc.) ont prouvé la supériorité de ce milieu [353,385,396,398,486]. Peu de différences sont observées pour la reprise cellulaire (taux de croissance cellulaire après décongélation) et l'expression des gènes de pluripotence entre CryoStor® CS10 et CRYO3. Ces deux produits peuvent être injectés chez l'Homme car leur composition ionique est similaire à celle du milieu intracellulaire [385,486]. Le CRYO3 est à base d'acide hyaluronique tandis que le CryoStor® CS10 est composé de Dextran-40 [396]. L'acide hyaluronique, présent dans le CRYO3, est également beaucoup utilisé en cryoconservation d'embryons et en thérapie cellulaire. En effet, l'acide hyaluronique est présent dans les fluides folliculaires, utérin et d'oviducte [253,431,432]. Des embryons murins, bovins, ovins et équins ont été congelés avec succès dans de l'acide hyaluronique, en remplacement des sérums [257,395,433,434]. De plus, l'utilisation d'acide hyaluronique dans des milieux de

congélation apparaît pertinente car cette molécule entre dans la régulation des cellules hématopoïétiques [487] et permet de maintenir le renouvellement cellulaire et un caryotype normal chez des hESC [488]. Par ailleurs, la transplantation de MSC de moelle osseuse est facilitée par la présence d'acide hyaluronique pour la réparation de cartilage chez le chien [489].

Dans notre étude, nous avons également observé une **grande variabilité entre les réplicats** (n = 3) indépendants réalisés pour chaque condition. Cette variabilité peut être expliquée par la réalisation de notre étude par des opérateurs différents et sur deux années différentes. Les lots des produits utilisés, notamment le sérum (FBS et KOSR) et l'opérateur sont les deux facteurs de variabilité les plus importants à notre sens, qui peuvent expliquer ce phénomène.

Existe-t-il un intérêt à réaliser un seeding pour les PSC ?

Nous avons observé des **plus faibles taux de viabilité** lors de l'utilisation du **congélateur programmable**, par rapport à l'enceinte à isopropanol. Certaines études en congélation lente de PSC effectuent une induction manuelle de nucléation, le *seeding*, afin de contrôler la température de cristallisation et l'endroit où débute la nucléation [357,424,490]. Le *seeding* est réalisé en touchant un endroit précis (pour les embryons, par exemple, le *seeding* est appliqué sur une zone de la paillette où il n'y a pas les embryons) avec un instrument (coton ou pince en métal) refroidi à -196°C [27]. Le *seeding* permet d'obtenir une cristallisation homogène au sein de l'échantillon au lieu d'une cristallisation hétérogène obtenue sans *seeding*. Cependant, le *seeding* présente certains inconvénients. Le *seeding* demande l'intervention d'un opérateur durant la congélation, cette intervention devant être rapide pour éviter un réchauffement des échantillons lors de l'ouverture du congélateur. De plus, cette technique est chronophage et ne peut pas être effectuée sur plusieurs échantillons en même temps [491]. Dans notre cas, nous congelons **les rbPSC en cellules dissociées**, contrairement aux hPSC qui sont congelées dans la majorité des cas en *clumps*. Notre cas se rapproche peut-être plus de la congélation des spermatozoïdes (congélation de cellules en suspension) : les PSC sont sûrement emprisonnées dans les phases vitreuses, comme les têtes des spermatozoïdes. Cependant, les PSC sont congelées à une cinétique de refroidissement lente comme les embryons (1°C/min vs. > 45°C/min pour le sperme).

Pour vérifier ces hypothèses, il conviendrait d'expérimenter la technique de *seeding* sur les cryotubes afin de comparer les taux de viabilité entre un protocole avec ou sans *seeding*. De plus, l'étude de PSC, préalablement marquées par un fluorochrome, au sein des cryotubes par cryomicroscopie permettrait de vérifier si les cellules sont dans les phases cristallines ou les phases vitreuses. Par ailleurs, la température de *seeding* éventuellement utilisable peut être basée sur nos travaux en DSC. En effet, pour les solutions contenant 10 % de DMSO, les températures de fin de fusion sont proches de -4°C. Dans la littérature, le *seeding* est plutôt effectué à -7°C ou à -10°C (températures basées sur des solutions contenant du glycérol et utilisées pour la congélation lente d'embryons). Dans notre cas, un *seeding* au-dessus de -4°C serait plus approprié.

- PERSPECTIVES

Afin de confirmer l'efficacité du CRYO3 et de CryoStor® CS10 pour la congélation de PSC de lapin, il conviendrait d'étudier leur activité alcaline phosphatase qui est spécifique des cellules en forte croissance et d'analyser la normalité de leur caryotype, suite à leur congélation-décongélation. Par ailleurs, il est essentiel d'analyser la pluripotence des cellules décongelées grâce à la formation de tératomes et de corps embryoïdes. En effet, une analyse histologique des tératomes formés, après injection de PSC décongelées dans des souris immunodéprimées, pourrait être réalisée pour observer leur différenciation. De même, la formation de corps embryoïdes permettrait de vérifier si les PSC sont effectivement capables de former les trois feuillets embryonnaires. La majorité des études sur la cryoconservation de PSC évaluent également les marqueurs membranaires de pluripotence et leur répartition par rapport aux cellules non congelées.

Le milieu CryoStor® CS10 existe également à 5 % et 2 % de DMSO (CryoStor® CS5 et CryoStor® CS2). Dans notre étude, nous avons pu observer que la congélation des PSC était possible avec de plus faibles concentrations de DMSO. L'analyse de PSC congelées dans du CryoStor® CS5 ou du CryoStor® CS2 mériterait donc d'être étudiée. Nous pouvons en effet émettre l'hypothèse que ces deux solutions cryoprotectrices conservent aussi bien les PSC que le CRYO3 contenant 4 % ou 5 % de DMSO.

3. Pouvons-nous nous passer de cryoprotecteurs pénétrants ?

Il est admis que les cryoprotecteurs pénétrants sont essentiels pour améliorer les taux de viabilité des cellules après congélation à -196°C . Dans notre étude, l'expression des gènes de pluripotence des PSC est plus stable quand la concentration en DMSO est diminuée. Pour autant, la **suppression totale de cryoprotecteurs** est **difficile** à mettre en œuvre comme nous pouvons le vérifier avec les résultats obtenus avec les milieux sans DMSO. Ainsi, les chercheurs tendent de remplacer les cryoprotecteurs pénétrants afin de diminuer les risques de toxicité (génotoxicité ou choc osmotique trop important). Les cryoprotecteurs non pénétrants, tels que le **tréhalose** ou des **polymères à haut poids moléculaire** (dextran, acide hyaluronique) sont souvent utilisés en combinaison avec des cryoprotecteurs pénétrants. Dans notre étude ovine, nous avons ajouté **0,1 M de tréhalose** dans les milieux de congélation testés (témoin négatif et milieu contenant du CRYO3) en combinaison avec 5 % de glycérol. En effet, pour la congélation de sperme, des disaccharides sont ajoutés pour : (i) **atténuer la toxicité** de cryoprotecteurs pénétrants (comme le saccharose pour diminuer la toxicité du DMSO pour la congélation de sperme de lapin [35,190]) ; (ii) **vitrifier du sperme** (tréhalose chez l'étalon [492] et le bélier [493], saccharose [494] et tréhalose [495] chez l'homme) ; ou encore (iii) **améliorer l'intégrité des membranes et de l'acrosome** (chez le bélier [212]). Nous pouvons observer le même effet des disaccharides sur la congélation des PSC. Une étude récente a montré que les PSC humaines peuvent être congelées avec du tréhalose **comme seul cryoprotecteur** [41]. Les disaccharides (tréhalose ou saccharose) permettent : (i) **d'équilibrer la pression osmotique** entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule lors de la descente en température ; (ii) **d'améliorer la transition vitreuse** ; (iii) **d'empêcher la cristallisation** [496] ; (iv) **d'augmenter la fluidité membranaire** chez les spermatozoïdes [42] ; et (v) **d'interagir avec les phospholipides de la membrane** empêchant sa dénaturation et sa déstabilisation dues au stress oxydatif et à la déshydratation [497].

- PERSPECTIVES

Certains auteurs ont réussi à congeler du sperme ou des PSC en présence de disaccharides et donc en absence de cryoprotecteur pénétrant [41,494]. Par ailleurs, des polymères à haut poids moléculaire, tels que le **dextran** [498], le **chitosane** [499],

le **polyvinyl pyrrolidone** (PVP) [500,501] ou des **hydrogels** [502–504], peuvent présenter un potentiel pour remplacer les cryoprotecteurs traditionnels lors de congélation ou de conservation des cellules à moyen terme. Le mécanisme de protection par les polymères à haut poids moléculaire est encore mal connu mais ils permettent **d'abaisser le potentiel chimique de l'eau extracellulaire** [505]. Par conséquent, une **diminution du risque de cristallisation intracellulaire** et une vitrification de la solution extracellulaire à des températures plus élevées sont observées [505].

4. La compréhension du comportement thermodynamique des solutions cryoprotectrices est-elle utile pour tous les modèles cellulaires ?

Le DSC est un outil à développer en biologie pour la cryoconservation de cellules ou d'organes. Plusieurs études utilisent cet outil pour caractériser les solutions de congélation lente, de congélation rapide ou de vitrification d'embryons, de sperme, de levures ou d'organes (foie, ovaire) [8,106,120,122,506–509]. Cet outil permet de vérifier la capacité d'une solution cryoprotectrice à abaisser la température de cristallisation et la proportion de glace formée, avant de l'expérimenter sur des cellules animales. Par conséquent, cet outil permet de répondre plus efficacement aux 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement [331]) et donc de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Ceci s'applique plus particulièrement aux embryons, qui demandent un plus grand nombre d'animaux pour évaluer plusieurs conditions. L'approche thermodynamique permet ainsi de **caractériser les solutions de cryoconservation** mais également **d'affiner les cinétiques de refroidissement** et les **concentrations en cryoprotecteur** ainsi que de **définir les températures de seeding**.

Dans notre étude, nous avons observé peu de différences entre les caractéristiques thermodynamiques des différents milieux de congélation de sperme. Ce constat est également observé pour des solutions cryoprotectrices d'embryons, contenant soit du CRYO3, soit du sérum [106]. Cependant, la caractérisation thermodynamique des solutions cryoprotectrices des PSC a pu expliquer les différences observées biologiquement. Salvetti et al. [120] n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les milieux pour les grandeurs thermodynamiques étudiées dans notre étude. Néanmoins, ils ont montré que l'ajout d'antibiotiques dans

les milieux de congélation a un effet sur la température de cristallisation et la quantité de glace formée, même si cette différence n'a pas été statistiquement vérifiée. Hormis les protocoles de vitrification, l'exploitation des résultats de température de fin de fusion permet de définir les températures de *seeding*. Or, cette grandeur physique n'est pas pertinente pour les spermatozoïdes car leur congélation ne nécessite pas de *seeding*. Toutefois, pour la vitrification ou la lyophilisation du sperme, le DSC est un outil indispensable.

5. D'autres disciplines peuvent-elles mieux objectiver les méthodes de congélation ?

Si l'étude thermodynamique des solutions cryoprotectrices permet de comprendre leur comportement, **d'autres domaines de la biologie** permettent de comprendre les mécanismes de régulation des cellules lors d'un stockage à long terme. La mobilité pour les spermatozoïdes ou la viabilité pour les PSC ne sont pas des paramètres suffisamment discriminants. Tout du moins, ces paramètres reflètent difficilement la fertilité pour le sperme, ou la pluripotence pour les PSC. Ainsi, au-delà des approches classiques utilisées, d'autres approches pourraient objectiver et discriminer les méthodes de congélation. La protéomique et la biochimie sont déjà des disciplines permettant d'objectiver la congélation des cellules spermatiques. Depuis quelques années, un autre domaine prend de l'ampleur : l'épigénétique, car des variations de marques épigénétiques ont été observées lors de la congélation de cellules spermatiques ou de cellules souches pluripotentes.

L'étude biochimique des membranes, notamment la **transition de phase des phospholipides de la membrane** liée à la descente en température, a été largement menée. En effet, plusieurs études ont permis de mieux comprendre le **rôle des sucres et des POA** dans le mécanisme de protection des membranes des spermatozoïdes [45,49,211,510,511]. Depuis une vingtaine d'années, les chercheurs se sont intéressés aux protéines contenues dans le plasma séminal des spermatozoïdes. Si pour les PSC, il est simple de vérifier leur pluripotence par l'analyse de l'expression de certains gènes, pour les spermatozoïdes, nous pouvons imaginer que certaines **protéines puissent expliquer leur fertilité**. Une revue récente rapporte les principales protéines, parmi des milliers analysés, pouvant être marqueurs de fertilités faible ou élevée chez l'Homme, la souris, le taureau, le bélier,

l'étalon ou le verrat [188]. Cependant, les protéines définies sont le plus souvent spécifiques d'une espèce ou même d'un individu, ces **études montrant des résultats contradictoires**.

Enfin, depuis quelques années, le domaine de l'épigénétique ouvre les portes de nouvelles interrogations : l'effet des biotechnologies de la reproduction et plus particulièrement l'effet de la congélation sur l'ADN et les marques épigénétiques, ayant des conséquences sur les descendants [512–515]. Le terme épigénétique fait référence aux **changements héréditaires** (transmissibles par division cellulaire) mais **réversibles** de l'expression des gènes, **sans modifications de la séquence nucléotidique** [516,517]. Des changements épigénétiques pourraient donc expliquer la fertilité des spermatozoïdes ou la pluripotence des PSC. En effet, une perte en méthylation de l'ADN a été observée dans les spermatozoïdes de patients présentant une tératozoospermie (soit un taux élevé de spermatozoïdes anormaux) et/ou une oligo-asthéo-tératozoospermie (soit un éjaculat peu concentré avec des spermatozoïdes anormaux et peu mobiles) [518]. L'étude du taux de méthylation de l'ADN [519,520] ou de l'existence des modifications spécifiques des histones [520,521] peut permettre de mieux comprendre les mécanismes liés à la congélation. Toutefois, ces études globales ne permettent pas d'expliquer **comment ces changements impactent certains gènes et influencent le destin des cellules décongelées** [522]. Ainsi il serait plus approprié de définir des marques épigénétiques spécifiques de la fertilité pour le sperme ou de la pluripotence pour les PSC. C'est le cas des marques épigénétiques **H3K4me3** (triple méthylation de la lysine 4 de l'histone 3) et **H3K27me3** (triple méthylation de la lysine 27 de l'histone 3), montrées comme très importantes pour la pluripotence des PSC. En effet, les marques activatrices H3K4me3 [523,524] et répressives H3K27me3 [525] sont observées sur le promoteur d'un même gène et permettent une adaptation très rapide de leur expression. Ces doubles marques dites bivalentes sont spécifiques aux mESC. Par ailleurs, une **déméthylation de l'histone H3K4** observée dans des spermatozoïdes de souris mâles de certaines lignées transgéniques, entraîne des **développements embryonnaires altérés** et un **taux de survie** des descendants **réduit** [526, 527]. De même, un taux élevé **d'acétylation de l'histone H3K9** semble **améliorer le taux de survie d'embryons** clonés après transfert nucléaire de cellules somatiques chez le chat des sables (*Felis margarita*) [528].

6. Domaines d'application des résultats de la thèse

- ÉVOLUTION RÉGLEMENTAIRE ET ÉCHANGES INTERNATIONAUX

Aujourd'hui, les réglementations portant sur la sécurité sanitaire des cryobanques ne sont que des recommandations. La FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) a notamment publié un recueil de lignes de conduite pour la conservation de ressources génétiques animales. Ce document cite dans le chapitre 9 des recommandations provenant d'autres organismes sur lesquels les professionnels peuvent s'appuyer. C'est le cas du document de référence de l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale) « Code de santé des animaux terrestres » [83]. Il existe par ailleurs des réglementations internes à chaque pays ou fédération (Etats-Unis et Union Européenne) pour le transport international de ressources biologiques. Récemment, une **norme internationale pour les biobanques** (ISO 20387 : 2018 « *Biobanking* » - Exigences générales relatives au « *biobanking* ») a été publiée en août 2018 mais n'est pas encore inscrite au catalogue français.

De plus en plus, le **cadre législatif tend à se rigidifier** et la législation adoptée pour les échantillons d'origine animale à se calquer sur celle qui existe pour les échantillons d'origine humaine. Il semble donc important d'anticiper cette évolution et de prendre en considération le remplacement des POA par des produits synthétiques dans les biobanques.

- CONSERVATION DES RESSOURCES GENETIQUES ANIMALES

La standardisation des protocoles de congélation ainsi que l'utilisation de milieux synthétiques deviennent des questionnements essentiels pour les Centres de Ressources Biologiques (CRB), notamment en termes de biosécurité et d'intégrités génétique et épigénétique des échantillons conservés. La congélation de plusieurs éléments biologiques d'un même individu (sperme ou ovocyte/embryon, sang et tissu somatique) permet une conservation sécurisée. Les données génétiques associées aux données de reproduction permettent également une caractérisation complémentaire et efficace des ressources.

Aujourd'hui, l'application de ces méthodes est effective. En effet, les **résultats issus de ce travail ont été intégrés aux procédures du système de management de la qualité**, dans le respect des principes de l'amélioration continue, du CRB CryAnim.

Ce CRB basé à VetAgro Sup est en effet certifié conforme au référentiel NF S96-900, propre aux **centres de ressources biologiques**. L'amélioration continue ainsi qu'un système de management de la qualité audités régulièrement sont ainsi mis en place aujourd'hui. L'évolution des conditions de conservation pour améliorer la qualité des échantillons ainsi que l'augmentation de leur caractérisation permettent de connaître la probabilité de réussite après transfert d'embryons ou autres utilisations des ressources biologiques.

- **APPLICATION MEDICALE HUMAINE**

Pour les cellules spermatiques, mais surtout pour les cellules souches pluripotentes, il est nécessaire d'utiliser des produits synthétiques lors de la congélation des cellules. Ces produits, testés sur des cellules de lapin, pourront être par la suite utilisés sur des cellules humaines dans le cadre de thérapie cellulaire. Il existe déjà des milieux commerciaux disponibles sur le marché qui sont dépourvus de produits d'origine animale ou humaine. L'ensemble des certifications que l'entreprise Stem Alpha a pu obtenir, **garantit une mise en œuvre rigoureuse des Bonnes Pratiques de Fabrication**. Elle est certifiée ISO 13485 : 2003, ISO 9001 : 2015 et NF EN ISO 13485 : 2012 pour les dispositifs médicaux. L'entreprise présente une expertise en conception, développement et production de milieux synthétiques pour la culture, la conservation et préservation de tissus et cellules humaines. Un essai clinique en thérapie cellulaire est en cours et la CTI (banque de cellules humaines à Lyon) conserve déjà leurs cellules dans du CRYO3. Le niveau d'endotoxine est inférieur à 1 U/ml, sans risque de mutagénicité des cellules (test de Ames négatif). Les milieux de l'entreprise Stem Alpha sont stables pendant 24 mois à -20°C et 12 mois à +4°C. Leurs produits sont donc intéressants pour atteindre l'objectif d'absence totale de POA dans les milieux de congélation et à terme dans les milieux de culture.

7. Conclusion

Cette thèse transdisciplinaire et sur de multiples espèces a permis de vérifier rapidement le potentiel d'un produit synthétique dans la conservation à long terme de cellules spermatiques et de PSC. **Nos résultats ont donc permis de montrer qu'il est possible de congeler des cellules spermatiques de taureau et de bélier et des cellules souches pluripotentes de lapin, dans des milieux synthétiques et**

chimiquement définis. Le CRYO3 est un substituant potentiel aux sérums utilisés pour la cryoconservation de PSC mais ce produit ne peut pas, aujourd'hui, remplacer le jaune d'œuf et le lait dans les milieux de congélation de sperme.

Mon travail a été articulé autour de différentes thématiques au sein de notre équipe et autour de plusieurs collaborations (projets de thèse et de recherche). En effet, la cryobiologie est une discipline qui nécessite l'expertise d'autres domaines afin de comprendre les mécanismes mis en place lors du stockage à long terme de cellules ou d'organes. Chacune de ces disciplines, physique, physiologie, biologie moléculaire ou biologie cellulaire, ayant sa propre logique et son propre langage, la cryobiologie requiert des compétences transversales. Ma formation d'ingénieur agronome généraliste, couplée à mes trois années de doctorat, m'a permis de gérer différents projets et de valoriser de manière pointue (congrès scientifiques internationaux) ou vulgarisée (Ma Thèse en 180 secondes, Nuit européenne des Chercheurs) les travaux de notre équipe de recherche.

Bibliographie

1. Maljean-Dubois S. La Convention de Rio sur la diversité biologique. La diversité dans la gouvernance internationale. Bruylant; 2013. p. 15.
2. Joly T. Etablissement d'une cryobanque de semence ou d'embryons pour la conservation ex situ de la diversité génétique chez les mammifères domestiques : l'exemple du lapin (*Oryctolagus Cuniculus*) [Internet]. Lyon, INSA; 1997 [cité 14 juin 2016]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/1997ISAL0094>
3. Hildebrandt TB, Hermes R, Colleoni S, Diecke S, Holtze S, Renfree MB, et al. Embryos and embryonic stem cells from the white rhinoceros. *Nature Communications*. 2018;9:2589.
4. Joly T, Salvetti P, Neto V. Cryopreservation of Genetic Diversity in Rabbit Species (*Oryctolagus Cuniculus*). [Internet]. INTECH Open Access Publisher; 2012 [cité 9 juill 2015]. Disponible sur: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/31865.pdf>
5. Bruyère P. Evaluation thermodynamique et biologique d'un substituant synthétique aux produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères [Internet]. *VetAgro Sup*; 2014 [cité 18 mai 2015]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/93/61/11/PDF/TH2012BruyerePierre.pdf>
6. Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature London*. 1949;164-6.
7. Karlsson JOM, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996;17:243-56.
8. Baudot A-M. Cryopreservation d'organes par vitrification mesures calorimétriques et mesures diélectriques [Internet]. Grenoble INPG; 1997 [cité 29 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/1997INPG0023>
9. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*. 2007;47:935-45.
10. Karlsson JOM, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996;17:243-56.
11. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*. 2007;47:935-45.
12. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 1984;247:C125-42.
13. Mazur P, Leibo SP, Seidel GE. Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions. *Biol Reprod*. 2008;78:2-12.
14. Baudot A, Boutron P. Glass-Forming Tendency and Stability of Aqueous Solutions of Diethylformamide and Dimethylformamide. *Cryobiology*. 1998;37:187-99.
15. Mazur P, Leibo SP, Seidel GE. Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions. *Biology of Reproduction*. 2008;78:2-12.
16. Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*. 2014;81:96-102.
17. Teixeira M, Commin L, Gavin-Plagne L, Bruyère P, Buff S, Joly T. Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium. *Cryobiology* [Internet]. 2018 [cité 24 juill 2018]; Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224018300749>
18. Tan FCK, Lee KH, Gouk SS, Magalhães R. Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres: comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling "freezing" protocols. *Cryoletters*. 2007;28:445-60.
19. John Morris G, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*. 2012;64:71-80.
20. John Morris G, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*. 2012;64:71-80.
21. Maurer RR. Freezing mammalian embryos: A review of the techniques. *Theriogenology*. 1978;9:45-68.
22. Li Y, Ma T. Bioprocessing of Cryopreservation for Large-Scale Banking of Human Pluripotent Stem Cells. *BioResearch Open Access*. 2012;1:205-14.

23. Hunt C. Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2011;38:107-23.
24. Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reproductive BioMedicine Online*. 2003;7:623-33.
25. John Morris G, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation – A review. *Cryobiology*. 2013;66:85-92.
26. Saragusty J, Osmer J-H, Hildebrandt TB. Controlled ice nucleation—Is it really needed for large-volume sperm cryopreservation? *Theriogenology*. 2016;85:1328-33.
27. John Morris G, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation – A review. *Cryobiology*. 2013;66:85-92.
28. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 1984;247:C125-42.
29. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryoletters*. 2004;25:375-88.
30. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 2002;57:327-44.
31. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 2002;57:327-44.
32. Lemma A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. In: Manafi M, éditeur. *Artificial Insemination in Farm Animals* [Internet]. InTech; 2011 [cité 5 mars 2015]. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/effect-of-cryopreservation-on-sperm-quality-and-fertility>
33. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryoletters*. 2004;25:375-88.
34. Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature London*. 1949;164-6.
35. Mocé E, Vicente JS. Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science*. 2009;110:1-24.
36. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*. 2009;10:49–62.
37. Lemma A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. In: Manafi M, éditeur. *Artificial Insemination in Farm Animals* [Internet]. InTech; 2011 [cité 5 mars 2015]. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/effect-of-cryopreservation-on-sperm-quality-and-fertility>
38. Aboagla EM-E, Terada T. Trehalose-Enhanced Fluidity of the Goat Sperm Membrane and Its Protection During Freezing. *Biol Reprod*. 2003;69:1245-50.
39. Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP. Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 2004;88:299-312.
40. Wu CF, Tsung HC, Zhang WJ, Wang Y, Lu JH, Tang ZY, et al. Improved cryopreservation of human embryonic stem cells with trehalose. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:733-9.
41. Ntai A, La Spada A, De Blasio P, Ida Biunno I. Trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells. *Stem Cell Research* [Internet]. 2018 [cité 28 juill 2018]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506118301892>
42. Aboagla EM-E, Terada T. Trehalose-Enhanced Fluidity of the Goat Sperm Membrane and Its Protection During Freezing. *Biol Reprod*. 2003;69:1245-50.
43. Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. Studies on Replacing Most of the Penetrating Cryoprotectant by Polymers for Embryo Cryopreservation. *Cryobiology*. 2001;43:21-31.
44. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update*. 2015;21:209-27.

45. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*. 1993;265:432-7.
46. Sparr E, Hallin L, Markova N, Wennerström H. Phospholipid-Cholesterol Bilayers under Osmotic Stress. *Biophysical Journal*. 2002;83:2015-25.
47. Darin-Bennett A, White I. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. 1977;
48. Labbé C. Stress subi par les cellules au cours de la congélation-décongélation et méthodes de cryoconservation. *Sciences et techniques de l'animal de laboratoire*. 2013;39:15-20.
49. Companyó M, Iborra A, Villaverde J, Martínez P, Morros A. Membrane fluidity changes in goat sperm induced by cholesterol depletion using beta-cyclodextrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2007;1768:2246-55.
50. Mazur P, Koshimoto C. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? *Biol Reprod*. 2002;66:1485-90.
51. Morris GJ. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum Reprod*. 2006;21:2075-83.
52. Morris GJ, Faszer K, Green JE, Draper D, Grout BWW, Fonseca F. Rapidly cooled horse spermatozoa: Loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*. 2007;68:804-12.
53. Karlsson JOM, Cravalho EG, Toner M. A model of diffusion-limited ice growth inside biological cells during freezing. *Journal of Applied Physics*. 1994;75:4442-55.
54. Heng BC, Ye CP, Liu H, Toh WS, Rufaihah AJ, Yang Z, et al. Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis. *J Biomed Sci*. 2006;13:433-45.
55. Wong RCB, Pera MF, Pébay A. Role of Gap Junctions in Embryonic and Somatic Stem Cells. *Stem Cell Rev*. 2008;4:283-92.
56. Acker JP, Elliott JAW, McGann LE. Intercellular Ice Propagation: Experimental Evidence for Ice Growth through Membrane Pores. *Biophysical Journal*. 2001;81:1389-97.
57. Mullen SF, Critser JK. The Science of Cryobiology. *Oncofertility Fertility Preservation for Cancer Survivors* [Internet]. Springer, Boston, MA; 2007 [cité 10 juill 2018]. p. 83-109. Disponible sur: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-72293-1_7
58. Colas G. Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influence of the photoperiod on the semen quality of the ram. *Livestock Production Science*. 1979;
59. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993;362:709-15.
60. Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48:1905-12.
61. Nelson RG, Curtis Johnson W. Conformation of DNA in ethylene glycol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1970;41:211-6.
62. Schwartz AM, Fasman GD. Thermal denaturation of chromatin and lysine copolymer-DNA complexes. Effects of ethylene glycol. *Biopolymers*. 1979;18:1045-63.
63. Hu W, Marchesi D, Qiao J, Feng HL. Effect of slow freeze versus vitrification on the oocyte: an animal model. *Fertility and Sterility*. 2012;98:752-760.e3.
64. Nakanishi S, Adhya S, Gottesman M, Pastan I. Activation of Transcription at Specific Promoters by Glycerol. *J Biol Chem*. 1974;249:4050-6.
65. Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, et al. Long-Term Effects of Mouse Intracytoplasmic Sperm Injection with DNA-Fragmented Sperm on Health and Behavior of Adult Offspring. *Biol Reprod*. 2008;78:761-72.
66. Tachataki M, Winston RML, Taylor DM. Quantitative RT-PCR reveals tuberous sclerosis gene, TSC2, mRNA degradation following cryopreservation in the human preimplantation embryo. *Mol*

Hum Reprod. 2003;9:593-601.

67. Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote*. 2006;14:125-31.
68. Larman MG, Katz-Jaffe MG, McCallie B, Filipovits JA, Gardner DK. Analysis of global gene expression following mouse blastocyst cryopreservation. *Hum Reprod*. 2011;26:2672-80.
69. Saenz-de-Juano MD, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, Joly T, Vicente JS. Effects of Slow Freezing Procedure on Late Blastocyst Gene Expression and Survival Rate in Rabbit. *Biol Reprod* [Internet]. 2012 [cité 29 juill 2018];87. Disponible sur: https://academic.oup.com/biolreprod/article/87/4/91_1-9/2514035
70. Shaw L, Sneddon SF, Brison DR, Kimber SJ. Comparison of gene expression in fresh and frozen-thawed human preimplantation embryos. *Reproduction*. 2012;144:569-82.
71. Rivera RM, Stein P, Weaver JR, Mager J, Schultz RM, Bartolomei MS. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet*. 2008;17:1-14.
72. Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *The Lancet*. 2003;361:1975-7.
73. Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood*. 1990;75:781-6.
74. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis*. 2009;5:143-54.
75. Windrum P, Morris TCM. Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2003;31:315.
76. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud Ø. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion*. 2002;42:1573-1580.
77. Alessandrino EP, Bernasconi P, Caldera D, Colombo A, Bonfichi M, Malcovati L, et al. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. *Bone Marrow Transplantation*. 1999;23:533-7.
78. Benekli M, Anderson B, Wentling D, Bernstein S, Czuczman M, McCarthy P. Severe respiratory depression after dimethylsulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis. *Bone Marrow Transplantation*. 2000;25:1299-301.
79. Morris C, Wreede L de, Scholten M, Brand R, Biezen A van, Sureda A, et al. Should the standard dimethyl sulfoxide concentration be reduced? Results of a European Group for Blood and Marrow Transplantation prospective noninterventional study on usage and side effects of dimethyl sulfoxide. *Transfusion*. 2014;54:2514-22.
80. Choulis NH, Aronson JK. Miscellaneous drugs and materials, medical devices, and techniques. In: Aronson JK, éditeur. *Side Effects of Drugs Annual* [Internet]. Elsevier; 2005 [cité 10 juill 2018]. p. 587-601. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378608005804714>
81. Linderoth B, Lind G. Chapter 123 - Retrogasserian Glycerol Rhizolysis in Trigeminal Neuralgia. In: Quiñones-Hinojosa A, éditeur. *Schmidek and Sweet Operative Neurosurgical Techniques (Sixth Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2012 [cité 10 juill 2018]. p. 1393-408. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416068396101236>
82. Svalgaard JD, Talkhonchek MS, Haastrup EK, Munthe-Fog L, Clausen C, Hansen MB, et al. Pentaisomaltose, an Alternative to DMSO. Engraftment of Cryopreserved Human CD34+ Cells in Immunodeficient NSG Mice, Pentaisomaltose, an Alternative to DMSO. Engraftment of Cryopreserved Human CD34+ Cells in Immunodeficient NSG Mice. *Cell Transplant*. 2018;0963689718786226.
83. OIE. Code sanitaire pour les animaux terrestres [Internet]. 2016. Disponible sur: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=1&htmfile=chapitre_coll_semen.htm
84. Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology*. 2012;77:467-82.

85. Tedeschi R, Paoli PD. Collection and Preservation of Frozen Microorganisms. *Methods in Biobanking* [Internet]. Humana Press, Totowa, NJ; 2011 [cité 12 juill 2018]. p. 313-26. Disponible sur: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-423-0_18
86. Tedder RS, Gilson RJ, Briggs M, Loveday C, Cameron CH, Garson JA, et al. Hepatitis C virus: evidence for sexual transmission. *BMJ*. 1991;302:1299-302.
87. Wallis C, Melnick JL. Stabilization of enveloped viruses by dimethyl sulfoxide. *J Virol*. 1968;2:953-4.
88. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral Contamination of Embryos Cryopreserved in Liquid Nitrogen. *Cryobiology*. 2000;40:110-6.
89. Bielanski A, Bergeron H, Lau PCK, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 2003;46:146-52.
90. Mazzilli F, Delfino M, Imbrogno N, Elia J, Dondero F. Survival of Micro-organisms in Cryostorage of Human Sperm. *Cell and Tissue Banking*. 2006;7:75-9.
91. Glander H-J, Rytter M, Baumann L, Schönborn C. Risk of Transmission of Sexually Transmitted Diseases by Cryopreserved Semen. *Andrologia*. 2009;18:323-5.
92. Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y. Survival Rate of Microbes after Freeze-Drying and Long-Term Storage. *Cryobiology*. 2000;41:251-5.
93. Thorsen P, Møller BR, Halkier-Sørensen L, From E, Nielsen NC. Survival of chlamydiae in human semen prepared for artificial insemination by donor. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 70:133-5.
94. Pannekoek Y, Westenberg SM, de Vries J, Repping S, Spanjaard L, Eijk PP, et al. PCR Assessment of Chlamydia trachomatis Infection of Semen Specimens Processed for Artificial Insemination. *J Clin Microbiol*. 2000;38:3763-7.
95. Mitra J, Chowdhury S, Panda S, Chakraborty M, Singha A. Microbiological evaluation of bovine frozen semen samples in west bengal, india. *Explor Anim Med Res*. 2016;6:185-91.
96. Nardi Júnior G, Megid J, Mathias LA, Paulin L, Vicente AF, Cortez A, et al. Performance of microbiological, serological, molecular, and modified seminal plasma methods in the diagnosis of *Brucella abortus* in semen and serum of bovine bulls. *Biologicals* [Internet]. 2017 [cité 13 juill 2017]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105617300714>
97. Hoyos-Marulanda V, Goularte KL, Martins KR, Voloski F, Redü JFM, Duval EH, et al. Bacterial resistance to antibiotics commonly included in extenders for cryopreserved bull semen. *Animal Reproduction*. 2017;14:225-225.
98. Clarke GN. Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination? *Hum Reprod*. 1999;14:2941-3.
99. Even MS, Sandusky CB, Barnard ND. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends in Biotechnology*. 2006;24:105-8.
100. Perry GH. Risk assessment of transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in abattoir-derived in vitro produced embryos. *Theriogenology*. 2007;68:38-55.
101. Taylor DM. Inactivation of Transmissible Degenerative Encephalopathy Agents: A Review. *The Veterinary Journal*. 2000;159:10-7.
102. Nims RW, Gauvin G, Plavsic M. Gamma irradiation of animal sera for inactivation of viruses and mollicutes – A review. *Biologicals*. 2011;39:370-7.
103. Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 1998;50:699-706.
104. Kim J-H, Lee H-S, Choi H-K, Kim J-A, Chu I-S, Leem S-H, et al. Heterogeneous Niche Activity of Ex-Vivo Expanded MSCs as Factor for Variable Outcomes in Hematopoietic Recovery. *PLOS ONE*. 2016;11:e0168036.
105. Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G, Buff S. Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*. 2012;78:1294-302.

106. Bruyère P, Baudot A, Joly T, Commin L, Pillet E, Guérin P, et al. A Chemically Defined Medium for Rabbit Embryo Cryopreservation. *PLOS ONE*. 2013;8:e71547.
107. Kulaksız R, Çebi Ç, Akçay E, Daşkın A. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Research*. 2010;88:12-5.
108. Gholami M, Faraji Z, Zamiri MJ. Effect of egg yolk of four avian species on the cryopreserved ram spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2012;13:23-7.
109. Akhter S, Rakha BA, Ansari MS, Husna AU, Iqbal S, Khalid M. Evaluation of quail and turkey egg yolk for cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull semen. *Theriogenology*. 2017;87:259-65.
110. Aires VA, Hinsch K-D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 2003;60:269-79.
111. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:23-53.
112. Pini T, Rickard JP, Leahy T, Crossett B, Druart X, de Graaf SP. Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. *Journal of Proteomics*. 2018;181:73-82.
113. Sarnowska A, Jablonska A, Jurga M, Dainiak M, Strojek L, Drela K, et al. Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells by Bioscaffolds Protects Cell Survival and Attenuates Neuroinflammatory Reaction in Injured Brain Tissue after Transplantation. *Cell Transplantation*. 2013;22:67-82.
114. Jurga M, Forraz N, Basford C, Atzeni G, Trevelyan AJ, Habibollah S, et al. Neurogenic Properties and a Clinical Relevance of Multipotent Stem Cells Derived from Cord Blood Samples Stored in the Biobanks. *Stem Cells and Development*. 2012;21:923-36.
115. Mueller AA, Forraz N, Gueven S, Atzeni G, Degoul O, Pagnon-Minot A, et al. Osteoblastic Differentiation of Wharton Jelly Biopsy Specimens and Their Mesenchymal Stromal Cells after Serum-Free Culture: Plastic and Reconstructive Surgery. 2014;134:59e-69e.
116. Ducret M, Fabre H, Farges J-C, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, et al. Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal Manufacturing Approach. *J Endod*. 2015;41:1492-9.
117. Biltonen RL, Lichtenberg D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1993;64:129-42.
118. Demetzos C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *Journal of Liposome Research*. 2008;18:159-73.
119. Chiu MH, Prenner EJ. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011;3:39-59.
120. Salvetti P, Joly T, Baudot A. Effect of antibiotics on thermodynamic properties of freezing media in rabbit species: A first calorimetric approach. *Cryobiology*. 2006;53:268-75.
121. Devireddy RV, Swanlund DJ, Olin T, Vincente W, Troedsson MHT, Bischof JC, et al. Cryopreservation of Equine Sperm: Optimal Cooling Rates in the Presence and Absence of Cryoprotective Agents Determined Using Differential Scanning Calorimetry. *Biol Reprod*. 2002;66:222-31.
122. Seki S, Kleinhans FW, Mazur P. Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: Predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry. *Cryobiology*. 2009;58:157-65.
123. Clas S-D, Dalton CR, Hancock BC. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 1999;2:311-20.
124. Odagescu VM. Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices. 2005.
125. Abidalla M, Roversi PF. Vitrification Assessment: Thermal Analysis of Cryoprotective Aqueous Solutions 1,2 Propanediol and Ethylene Glycol. *Biopreservation and Biobanking*. 2018;16:207-16.
126. Peyridieu JF, Baudot A, Boutron P, Mazuer J, Odin J, Ray A, et al. Critical Cooling and Warming Rates to Avoid Ice Crystallization in Small Pieces of Mammalian Organs Permeated with Cryoprotective Agents. *Cryobiology*. 1996;33:436-46.
127. Nishigaki T, Teramura Y, Nasu A, Takada K, Toguchida J, Iwata H. Highly efficient

- cryopreservation of human induced pluripotent stem cells using a dimethyl sulfoxide-free solution. *Int J Dev Biol.* 2011;55:305-11.
128. Ota A, Matsumura K, Lee J-J, Sumi S, Hyon S-H. StemCell Keep™ is Effective for Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells by Vitrification. *Cell Transplantation.* 2017;26:773-87.
129. Devireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Bischof JC. Subzero Water Permeability Parameters of Mouse Spermatozoa in the Presence of Extracellular Ice and Cryoprotective Agents. *Biol Reprod.* 1999;61:764-75.
130. Devireddy RV. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Human Reproduction.* 2000;15:1125-35.
131. Alapati R, Goff K, Kubisch HM, Devireddy RV. Water transport in epididymal and ejaculated rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm during freezing. *Cryobiology.* 2008;57:182-5.
132. Thirumala S, Ferrer MS, Al-Jarrah A, Eilts BE, Paccamonti DL, Devireddy RV. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology.* 2003;47:109-24.
133. Devireddy RV, Fahrig B, Godke RA, Leibo SP. Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates. *Molecular Reproduction and Development.* 2004;67:446-57.
134. Pinisetty D, Huang C, Dong Q, Tiersch TR, Devireddy RV. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cryobiology.* 2005;50:250-63.
135. Thirumala S, Huang C, Dong Q, Tiersch TR, Devireddy RV. A theoretically estimated optimal cooling rate for the cryopreservation of sperm cells from a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Theriogenology.* 2005;63:2395-415.
136. Devireddy RV, Campbell WT, Buchanan JT, Tiersch TR. Freezing response of white bass (*Morone chrysops*) sperm cells. *Cryobiology.* 2006;52:440-5.
137. Thirumala S, Campbell WT, Vicknair MR, Tiersch TR, Devireddy RV. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology.* 2006;66:964-73.
138. Devireddy RV, Li G, Leibo SP. Suprazero cooling conditions significantly influence subzero permeability parameters of mammalian ovarian tissue. *Molecular Reproduction and Development.* 2005;73:330-41.
139. Gidenne T. *Le lapin, de la biologie à l'élevage.* Quae. 2015.
140. Boussit D. *Reproduction et insémination artificielle en cuniculture* [Internet]. Association française de cuniculture; 1989 [cité 14 mars 2015]. Disponible sur: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/282690>
141. David I, Kohnke P, Lagriffoul G, Praud O, Plouarboué F, Degond P, et al. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science.* 2015;161:75-81.
142. Albert M, Auer J, Auger J, de Almeida M, Dulioust E, Eiss D, et al. *Exploration de la fonction de reproduction versant masculin* [Internet]. BIOFORMA Formation continue des biologistes; 2009 p. 222. Report No.: 42. Disponible sur: <http://www.quali-bio.com/CahiersCd1/cahier42.pdf>
143. Dunphy BC, Kay R, Barratt CLR, Cooke ID. Quality Control During the Conventional Analysis of Semen, An Essential Exercise. *Journal of Andrology.* 1989;10:378-85.
144. Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology.* 2014;81:5-17.e3.
145. Lammers J, Spingart C, Barrière P, Jean M, Fréour T. Double-blind prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen assessment. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31:35-43.
146. Auger J, Eustache F, Ducot B, Blandin T, Daudin M, Diaz I, et al. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod.* 2000;15:2360-8.

147. Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 2005;64:492-504.
148. Björndahl L, Söderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod*. 2003;18:813-6.
149. Jeyendran RS, Ven HHV der, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984;70:219-28.
150. Zubair M, Ahmad M, Jamil H. Review on the screening of semen by hypo-osmotic swelling test. *Andrologia*. 2014;n/a-n/a.
151. Jeyendran RS, Ven HHV der, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984;70:219-28.
152. Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 2005;64:492-504.
153. Garner DL, Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*. 1995;53:276-84.
154. Leahy T, Gadella BM. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*. 2011;142:759-78.
155. Graham JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*. 2001;68:239-47.
156. Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma- and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles. *Biol Reprod*. 2003;68:1828-35.
157. Ronot X, Grunwald D, Mayol J-F, Boutonna J. La cytométrie en flux [Internet]. Editions Tec & Doc. Editions Tec & Doc; 2006 [cité 29 août 2018]. Disponible sur: https://ebook.chapitre.com/ebooks/la-cytometrie-en-flux-2-volumes-9782743019365_9782743019365_2.html
158. Garner DL, Thomas CA. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 1999;53:222-9.
159. Martinez-Pastor F, Johannisson A, Gil J, Kaabi M, Anel L, Paz P, et al. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*. 2004;84:121-33.
160. Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, et al. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian Journal of Andrology*. 2002;97-103.
161. Young KE, Robbins WA, Xun L, Elashoff D, Rothmann SA, Perreault SD. Evaluation of Chromosome Breakage and DNA Integrity in Sperm: An Investigation of Remote Semen Collection Conditions. *Journal of Andrology*. 2013;24:853-61.
162. Rodríguez-Martínez H. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Anim Reprod*. 2013;10:148-59.
163. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 1980;210:1131-3.
164. Morrell JM, Johannisson A, Dalin A-M, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand*. 2008;50:2.
165. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008;23:2663-8.
166. De Jonge C. Biological basis for human capacitation—revisited. *Hum Reprod Update*. 2017;23:289-99.

167. Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl.* 2011;13:406-19.
168. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K. Ca²⁺ Regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular Reproduction and Development.* 1995;40:233-41.
169. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod.* 2001;16:1922-30.
170. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl.* 2011;13:43-52.
171. Kim S-H, Yu D-H, Kim Y-J. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Animal Reproduction Science.* 2010;119:106-14.
172. Gadea J, Gumbao D, Gómez-Giménez B, Gardón JC. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. *Reproductive Biology.* 2013;13:24-33.
173. Domínguez-Rebolledo Á, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Olmo ED, Bisbal A, Ros-Santaella JL, et al. Comparison of the TBARS Assay and BODIPY C11 Probes for Assessing Lipid Peroxidation in Red Deer Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals.* 2010;45:e360-8.
174. Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev.* 2017;n/a-n/a.
175. Ledesma A, Zalazar L, Fernández-Alegre E, Hozbor F, Cesari A, Martínez-Pastor F. Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. *Animal Reproduction Science* [Internet]. 2017 [cité 11 juill 2017]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432017301860>
176. Barrier Battut I, Kempfer A, Becker J, Lebailly L, Camugli S, Chevrier L. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology.* 2016;86:1111-31.
177. Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, et al. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology.* 2015;84:1447-1454.e5.
178. David I, Kohnke P, Fehrenbach J, Simoes ARL, Debreuve E, Descombes X, et al. New objective measurements of semen wave motion are associated with fertility in sheep. *Reprod Fertil Dev.* 2018;30:889-96.
179. Santolaria P, Vicente-Fiel S, Palacín I, Fantova E, Blasco ME, Silvestre MA, et al. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science.* 2015;163:82-8.
180. O' Meara CM, Hanrahan JP, Prathalingam NS, Owen JS, Donovan A, Fair S, et al. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology.* 2008;69:513-22.
181. Del Olmo E, Bisbal A, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Ramon M, Jimenez-Rabadan P, et al. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Animal Reproduction Science.* 2013;138:102-9.
182. Januskauskas A, Johannisson A, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology.* 2000;53:859-75.
183. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology.* 2005;63:445-57.
184. Petrunkina AM, Töpfer-Petersen E. Heterogeneous osmotic behaviour in boar sperm populations and its relevance for detection of changes in plasma membrane. *Reprod Fertil Dev.* 2000;12:297-305.
185. Druart X, Gatti J-L, Huet S, Dacheux J-L, Humblot P. Hypotonic resistance of boar spermatozoa:

- sperm subpopulations and relationship with epididymal maturation and fertility. *Reproduction*. 2009;137:205-13.
186. Asadpour R, Alavi-Shoushtari SM, Rezaii SA, Ansari MHK. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Animal Reproduction Science*. 2007;102:308-13.
187. Rickard JP, Leahy T, Soleilhavoup C, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, et al. The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma. *Journal of Proteomics*. 2015;126:303-11.
188. Dacheux J-L, Dacheux F, Druart X. Epididymal protein markers and fertility. *Animal Reproduction Science*. 2016;169:76-87.
189. Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*. 2002;57:303-26.
190. Mocé E, Blanch E, Talaván A, Viudes de Castro MP. Reducing the time rabbit sperm are held at 5 °C negatively affects their fertilizing ability after cryopreservation. *Theriogenology*. 2014;82:1049-53.
191. Mehdipour M, Daghigh Kia H, Nazari M, Najafi A. Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. *Cryobiology* [Internet]. 2017 [cité 24 juill 2017]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224017300019>
192. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:77-111.
193. Masoudi R, Zare Shahneh A, Towhidi A, Kohram H, Akbarisharif A, Sharafi M. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology*. 2017;74:77-80.
194. Palomo MJ, García W, Tabarez A. Effect of seminal plasma and butylated hydroxytoluene (BHT) concentration on ram sperm freezability. *Small Ruminant Research*. 2017;153:66-70.
195. Stradioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology*. 2007;67:1249-55.
196. Gillan L, Kroetsch T, Chis Maxwell WM, Evans G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*. 2008;103:201-14.
197. Muiño R, Rivera MM, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Peña AI. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science*. 2008;109:50-64.
198. Muiño R, Peña AI, Rodríguez A, Tamargo C, Hidalgo CO. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology*. 2009;72:860-8.
199. Beran J, Stádník L, Bezdíček J, Louda F, Čítek J, Ducháček J. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Archives Animal Breeding*. 2012;55:207-18.
200. Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, et al. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*. 2014;81:1067-72.
201. Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Eken A, Akay C. Influence of fetuin and hyaluronan on the post-thaw quality and fertilizing ability of Holstein bull semen. *Cryobiology*. 2015;71:119-24.
202. Hernández M, Roca J, Gil MA, Vázquez JM, Martínez EA. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*. 2007;67:1436-45.
203. Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*. 2016;172:1-9.
204. Miki T, Wong W, Zhou E, Gonzalez A, Garcia I, Grubbs BH. Biological impact of xeno-free chemically defined cryopreservation medium on amniotic epithelial cells. *Stem Cell Research &*

Therapy. 2016;7:8.

205. Colas G. Effect of initial freezing temperature addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *Journal of the Society for Reproduction and Fertility*. 1975;277-85.
206. Wessel MT, Ball BA. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2004;84:147-56.
207. Graham EF, Crabo BG, Pace MM. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J Anim Sci*. 1978;47:80-119.
208. Jerez R, González N, Olaciregui M, Luño V, Blas I de, Gil L. Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 2016;134:34-8.
209. Macías García B, Ortega Ferrusola C, Aparicio IM, Miró-Morán A, Morillo Rodriguez A, Gallardo Bolaños JM, et al. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology*. 2012;77:1280-9.
210. Katkov II, Katkova N, Critser JK, Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*. 1998;37:325–338.
211. Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*. 2002;57:1801-8.
212. Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*. 2005;50:239-49.
213. Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*. 2007;67:1060-7.
214. Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Akbari Sharif A, Khodaei Motlagh M, et al. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*. 2013;66:275-82.
215. Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*. 2011;96:58-63.
216. Chen Y, Foote RH, Brockett CC. Effect of Sucrose, Trehalose, Hypotaurine, Taurine, and Blood Serum on Survival of Frozen Bull Sperm. *Cryobiology*. 1993;30:423-31.
217. Hu JH, Zan LS, Zhao XL, Li QW, Jiang ZL, Li YK, et al. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *Journal of Animal Science*. 2010;88:1657-62.
218. El-Sheshtawy RI, Sisy GA, El-Nattat WS. Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2015;4:26-31.
219. Phillips PH, Lardy HA. A Yolk-Buffer Pabulum for the Preservation of Bull Semen1. *Journal of Dairy Science*. 1940;23:399-404.
220. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev*. 2006;73:1338-44.
221. Manjunath P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Animal Reproduction Science*. 2012;9:809–815.
222. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*. 2002;57:1695-706.
223. Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 2004;61:895-907.

224. Pillet E. Mise au point d'un milieu pour la cryopréservation de la semence équine et mécanismes de cryoprotection impliqués [Thèse de doctorat]. [2008-...., France]: Agrocampus Ouest; 2009.
225. MacDonald BJ, Foulkes JA. A spectrofluorometric investigation, using 1-anilino-naphthalene-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil.* 1981;63:407-14.
226. Quinn PJ, Chow PYW, White IG. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil.* 1980;60:403-7.
227. Graham JK, Foote RH. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology.* 1987;24:42-52.
228. Lusignan M-F, Bergeron A, Lafleur M, Manjunath P. The Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Interact with Caseins and Whey Proteins of Milk Extender. *Biol Reprod.* 2011;85:457-64.
229. Plante G, Manjunath P. Epididymal Binder of Sperm genes and proteins: what do we know a decade later? *Andrology.* 2015;3:817-24.
230. Srivastava N, Srivastava S, Ghosh S, Jerome A, Das G, Mehrotra S. Sequestration of PDC-109 Protein by Specific Antibodies and Egg Yolk Cryoprotects Bull Spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 2013;48:724-31.
231. Fan J, Lefebvre J, Manjunath P. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. *Gene.* 2006;375:63-74.
232. Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. *Biol Reprod.* 2009;80:394-7.
233. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. *Biol Reprod.* 2002;67:1250-8.
234. Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of reproduction.* 2000;63:1531-1537.
235. Bernardini A, Hozbor F, Sanchez E, Fornés MW, Alberio RH, Cesari A. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology.* 2011;76:436-47.
236. Pini T, Farmer K, Druart X, Teixeira-Gomes AP, Tsikis G, Labas V, et al. Binder of Sperm Proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Cryobiology* [Internet]. [cité 15 avr 2018]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224017306272>
237. Darin-Bennett A, White I. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. 1977;
238. Pini T, de Graaf SP, Druart X, Tsikis G, Labas V, Teixeira-Gomes AP, et al. Binder of Sperm Proteins 1 and 5 have contrasting effects on the capacitation of ram spermatozoa. *Biology of Reproduction.* 2018;98:765-75.
239. Amirat L, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction.* 2005;129:535-43.
240. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology.* 2003;59:1241-55.
241. Gil J, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology.* 2000;54:93-108.
242. Aires VA, Hinsch K-D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology.* 2003;60:269-79.
243. Khalifa T, Lymberopoulos A, Theodosiadou E. Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-blind parallel group design. *Theriogenology.* 2013;79:517-27.
244. Sharafi M, Zhandi M, Akbari Sharif A. Supplementation of soybean lecithin-based semen

- extender by antioxidants: complementary flow cytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and Tissue Banking*. 2015;16:261-9.
245. Toker MB, Alcay S, Gokce E, Ustuner B. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology*. 2016;72:205-9.
246. Lima-Verde I, Johannisson A, Ntallaris T, Al-Essawe E, Al-Kass Z, Nongbua T, et al. Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reprod Dom Anim*. 2017;1-10.
247. Del Valle I, Gómez-Durán A, Holt WV, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Soy Lecithin Interferes With Mitochondrial Function in Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2012;33:717-25.
248. Del Valle Si, Casao A, Perez Pe R, Holt WV, Cebrian Perez JA, Muino Blanco T. Seminal Plasma Proteins Prevent Detrimental Effects of Ram Sperm Cryopreservation and Enhance the Protective Effect of Lecithin. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* [Internet]. 2017 [cité 13 déc 2017];06. Disponible sur: <https://www.omicsonline.org/open-access/seminal-plasma-proteins-prevent-detrimental-effects-of-ram-sperm-cryopreservation-and-enhance-the-protective-effect-of-lecithin-2161-1009-1000319.php?aid=89946>
249. Thun R, Hurtado M, Janett F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 2002;57:1087-94.
250. Röpke T, Oldenhof H, Leiding C, Sieme H, Bollwein H, Wolkers WF. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*. 2011;76:1465-72.
251. Ansari MS, Rakha BA, Akhter S, Ashiq M. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*. 2016;85:528-32.
252. Lasic DD. On the thermodynamic stability of liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1990;140:302-4.
253. Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Atikuzzaman M, Vicente-Carrillo A, Rubér M, Alvarez-Rodriguez M. The ubiquitous hyaluronan: Functionally implicated in the oviduct? *Theriogenology*. 2016;86:182-6.
254. Gardner DK, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction*. 1998;13:148-59.
255. Lu X, Kamat MN, Huang L, Huang X. Chemical Synthesis of a Hyaluronic Acid Decasaccharide. *J Org Chem*. 2009;74:7608-17.
256. Gardner DK, Rodriguez-Martinez H, Lane M. Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum Reprod*. 1999;14:2575-80.
257. Joly T, Nibart M, Thibier M. Hyaluronic acid as a substitute for proteins in the deep-freezing of embryos from mice and sheep: An in vitro investigation. *Theriogenology*. 1992;37:473-80.
258. Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *International Journal of Andrology*. 2002;25:84-93.
259. Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1997;12:1949-54.
260. Álvarez-Rodríguez M, Vicente-Carrillo A, Rodríguez-Martinez H. Hyaluronan improves neither the long-term storage nor the cryosurvival of liquid-stored CD44-bearing AI boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*. 2018;64:351-60.
261. Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem*. 1992;267:10149-55.
262. Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*. 1993;49:1202-7.
263. Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation

- with semen freezability. *Theriogenology*. 2004;61:255-66.
264. Baas JW, Molan PC, Shannon P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1983;68:275-80.
265. Maxwell WMC, Evans G, Mortimer ST, Gillan L, Gellatly ES, McPhie CA. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen–thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*. 1999;11:123-6.
266. Ledesma A, Fernández-Alegre E, Cano A, Hozbor F, Martínez-Pastor F, Cesari A. Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Animal Reproduction Science*. 2016;173:35-41.
267. O’Meara CM, Donovan A, Hanrahan JP, Duffy P, Fair S, Evans ACO, et al. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology*. 2007;67:1262-8.
268. Leahy T, Marti JI, Evans G, Maxwell WMC. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen–thawed ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2010;119:147-53.
269. Domínguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sánchez E, Cesari A, Alberio RH. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*. 2008;69:564-73.
270. Leahy T, Evans G, Maxwell WMC, Marti JI. Seminal plasma proteins do not consistently improve fertility after cervical insemination of ewes with non-sorted or sex-sorted frozen–thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 2010;22:606-12.
271. Muiño R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*. 2008;109:27-39.
272. Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Calvete JJ, Sanz L, Peña FJ, et al. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology*. 2009;71:662-75.
273. Mocé E, Lavara R, Vicente J. Effect of Cooling Rate to 5°C, Straw Size and Farm on Fertilizing Ability of Cryopreserved Rabbit Sperm. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010;45:e1-7.
274. Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham J. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010;45:57-66.
275. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*. 2005;51:241-9.
276. Purdy PH, Graham JK. Effect of Adding Cholesterol to Bull Sperm Membranes on Sperm Capacitation, the Acrosome Reaction, and Fertility. *Biol Reprod*. 2004;71:522-7.
277. Blommaert D, Franck T, Donnay I, Lejeune J-P, Detilleux J, Serteyn D. Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerol concentration into the freezing medium of equine sperm. *Cryobiology*. 2016;72:27-32.
278. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006;250:66-9.
279. Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, de Blas I, et al. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*. 2010;61:142-7.
280. Kalthur G, Raj S, Thiyagarajan A, Kumar S, Kumar P, Adiga SK. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw–induced DNA damage. *Fertility and Sterility*. 2011;95:1149-51.
281. Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Ulutaş PA, Akçadağ Hİ. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 2009;81:90-5.
282. Mihajlović AI, Bruce AW. The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity. *Open Biology*. 2017;7:170210.
283. Jaber M, Sebban S, Buganim Y. Acquisition of the pluripotent and trophectoderm states in the

- embryo and during somatic nuclear reprogramming. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2017;46:37-43.
284. Beddington RSP. Histogenetic and neoplastic potential of different regions of the mouse embryonic egg cylinder. *Development*. 1983;75:189-204.
285. Osorno R, Tsakiridis A, Wong F, Cambray N, Economou C, Wilkie R, et al. The developmental dismantling of pluripotency is reversed by ectopic Oct4 expression. *Development*. 2012;139:2288-98.
286. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126:663-76.
287. Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975;72:1441-5.
288. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154-6.
289. Rossant J, Tam PPL. New Insights into Early Human Development: Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2017;20:18-28.
290. Sun Y, Li H, Yang H, Rao MS, Zhan M. Mechanisms Controlling Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *CRE* [Internet]. 2006 [cité 27 juill 2018];16. Disponible sur: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/6dbf508d3b17c437,5671614a1bbdf32,278d0bf81ca44a82.html>
291. Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirie F, Rigby PWJ, et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990;345:686-92.
292. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*. 2007;9:625-35.
293. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*. 1998;12:2048-60.
294. Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK Signalling Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells. *Developmental Biology*. 1999;210:30-43.
295. Paling NRD, Wheadon H, Bone HK, Welham MJ. Regulation of Embryonic Stem Cell Self-renewal by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling. *J Biol Chem*. 2004;279:48063-70.
296. Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*. 2009;460:118-22.
297. Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, Joshi A, Hannah R, Ohtsuka S, et al. Esrrb Is a Pivotal Target of the Gsk3/Tcf3 Axis Regulating Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell*. 2012;11:491-504.
298. Taponnier Y. Cellules souches pluripotentes induites de lapin: caractérisation moléculaire et fonctionnelle des états naif et amorcé [Internet]. Université Claude Bernard-Lyon I; 2015 [cité 6 oct 2017]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01149017/>
299. Ying Q-L, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell*. 2003;115:281-92.
300. Li Z, Fei T, Zhang J, Zhu G, Wang L, Lu D, et al. BMP4 Signaling Acts via Dual-Specificity Phosphatase 9 to Control ERK Activity in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2012;10:171-82.
301. Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008;453:519-23.
302. Batlle-Morera L, Smith A, Nichols J. Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. *Genesis*. 2008;46:758-67.
303. Aladjem MI, Spike BT, Rodewald LW, Hope TJ, Klemm M, Jaenisch R, et al. ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA

- damage. *Current Biology*. 1998;8:145-55.
304. Martí M, Mulero L, Pardo C, Morera C, Carrió M, Laricchia-Robbio L, et al. Characterization of pluripotent stem cells. *Nature Protocols*. 2013;8:223-53.
305. Senner CE, Brockdorff N. Xist gene regulation at the onset of X inactivation. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2009;19:122-6.
306. Habibi E, Stunnenberg HG. Transcriptional and epigenetic control in mouse pluripotency: lessons from in vivo and in vitro studies. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2017;46:114-22.
307. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984;309:255-6.
308. Pease S, Williams RL. Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor. *Exp Cell Res*. 1990;190:209-11.
309. Hirabayashi M, Kato M, Kobayashi T, Sanbo M, Yagi T, Hochi S, et al. Establishment of rat embryonic stem cell lines that can participate in germline chimeras at high efficiency. *Molecular Reproduction and Development*. 2009;77:94-94.
310. Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkula M, et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*. 1990;110:815-21.
311. Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, 3rd WMR, et al. Hybrid Vigor, Fetal Overgrowth, and Viability of Mice Derived by Nuclear Cloning and Tetraploid Embryo Complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:6209-14.
312. Davidson KC, Mason EA, Pera MF. The pluripotent state in mouse and human. *Development*. 2015;142:3090-9.
313. Huang Y, Osorno R, Tsakiridis A, Wilson V. In Vivo Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation. *Cell Reports*. 2012;2:1571-8.
314. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 2007;448:196-9.
315. Hawkins K, Mohamet L, Ritson S, Merry CLR, Ward CM. E-cadherin and, in Its Absence, N-cadherin Promotes Nanog Expression in Mouse Embryonic Stem Cells via STAT3 Phosphorylation. *STEM CELLS*. 2012;30:1842-51.
316. Bernemann C, Greber B, Ko K, Sternecker J, Han DW, Araúzo-Bravo MJ, et al. Distinct Developmental Ground States of Epiblast Stem Cell Lines Determine Different Pluripotency Features. *STEM CELLS*. 2011;29:1496-503.
317. Rossant J. Stem Cells and Early Lineage Development. *Cell*. 2008;132:527-31.
318. Nichols J, Smith A. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*. 2009;4:487-92.
319. Debowski K, Warthemann R, Lentjes J, Salinas-Riester G, Dressel R, Langenstroth D, et al. Non-Viral Generation of Marmoset Monkey iPS Cells by a Six-Factor-in-One-Vector Approach. *PLOS ONE*. 2015;10:e0118424.
320. Nakamura T, Yabuta Y, Okamoto I, Sasaki K, Iwatani C, Tsuchiya H, et al. Single-cell transcriptome of early embryos and cultured embryonic stem cells of cynomolgus monkeys. *Scientific Data*. 2017;4:170067.
321. Brimble SN, Sherrer ES, Uhl EW, Wang E, Kelly S, Merrill AH, et al. The Cell Surface Glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 Are Not Essential for Human ESC Pluripotency. *STEM CELLS*. 2009;25:54-62.
322. Shen Y, Matsuno Y, Fouse SD, Rao N, Root S, Xu R, et al. X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:4709-14.
323. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*. 2005;118:4495-509.
324. Reubinoff BE, Pera MF, Fong C-Y, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology*. 2000;18:399-404.
325. Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Santos AN, Duranthon V. Rabbit as a reproductive

- model for human health. *Reproduction*. 2012;REP-12.
326. Püschel B, Daniel N, Bitzer E, Blum M, Renard J-P, Viebahn C. The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): a model for mammalian reproduction and early embryology. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010;2010:pdb.emo139.
327. Graur D, Duret L, Gouy M. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*. 1996;379:333-5.
328. Fan J, Watanabe T. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003;99:261-82.
329. Duranthon V, Beaujean N, Brunner M, Odening KE, Santos AN, Kacsokovics I, et al. On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Res*. 2012;21:699-713.
330. Khrouf M, Morel O, Hafiz A, Chavatte-Palmer P, Fernandez H. Evaluation of the rabbit as an experimental model for human uterine synechia. *J Hum Reprod Sci*. 2012;5:175-80.
331. MENESR. Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques [Internet]. *JORF n°0032 févr 7, 2013 p. 2199*. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2013/2/1/AGR1231951D/jo/texte>
332. Idkowiak J, Weisheit G, Plitzner J, Viebahn C. Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. *Dev Genes Evol*. 2004;214:591-605.
333. Manes C. The participation of the embryonic genome during early cleavage in the rabbit. *Developmental Biology*. 1973;32:453-9.
334. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development*. 1990;26:90-100.
335. Nicholls PK, Sun Z, Heng S, Li Y, Wang J, Nie G. Embryo implantation is closely associated with dynamic expression of proprotein convertase 5/6 in the rabbit uterus. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:43.
336. Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Schöler H, Niemann H. Expression Pattern of Oct-4 in Preimplantation Embryos of Different Species. *Biol Reprod*. 2000;63:1698-705.
337. Kuijk EW, van Tol LTA, Van de Velde H, Wubbolts R, Welling M, Geijssen N, et al. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development*. 2012;139:871-82.
338. Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba S, Miyoshi H, Inoue K, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in Rabbits POTENTIAL EXPERIMENTAL MODELS FOR HUMAN REGENERATIVE MEDICINE. *J Biol Chem*. 2010;285:31362-9.
339. Osteil P, Tapponnier Y, Markossian S, Godet M, Schmaltz-Panneau B, Jouneau L, et al. Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency. *Biology Open*. 2013;BIO20134242.
340. Táncoš Z, Nemes C, Varga E, Bock I, Rungarunlert S, Tharasanit T, et al. Establishment of a rabbit induced pluripotent stem cell (RbiPSC) line using lentiviral delivery of human pluripotency factors. *Stem Cell Research*. 2017;21:16-8.
341. Honda A, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Shimozawa N, et al. Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008;17:706-15.
342. Wang S, Tang X, Niu Y, Chen H, Li B, Li T, et al. Generation and Characterization of Rabbit Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*. 2007;25:481-9.
343. Honda A, Hirose M, Ogura A. Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Experimental Cell Research*. 2009;315:2033-42.
344. Hsieh Y-C, Intawicha P, Lee K-H, Chiu Y-T, Lo N-W, Ju J-C. LIF and FGF cooperatively support stemness of rabbit embryonic stem cells derived from parthenogenetically activated embryos. *Cell Reprogram*. 2011;13:241-55.
345. Lo N-W, Intawicha P, Chiu Y-T, Lee K-H, Lu H-C, Chen C-H, et al. Leukemia Inhibitory Factor

- and Fibroblast Growth Factor 2 Critically and Mutually Sustain Pluripotency of Rabbit Embryonic Stem Cells, Leukemia Inhibitory Factor and Fibroblast Growth Factor 2 Critically and Mutually Sustain Pluripotency of Rabbit Embryonic Stem Cells. *Cell Transplant*. 2015;24:319-38.
346. Intawicha P, Ou Y-W, Lo N-W, Zhang S-C, Chen Y-Z, Lin T-A, et al. Characterization of Embryonic Stem Cell Lines Derived from New Zealand White Rabbit Embryos. *Cloning and Stem Cells*. 2009;11:27-38.
347. Honda A. Isolation and Culture of Rabbit Embryonic Stem Cells. *Epiblast Stem Cells* [Internet]. Humana Press, Totowa, NJ; 2013 [cité 8 déc 2017]. p. 39-49. Disponible sur: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-628-3_4
348. Zakhartchenko V, Flisikowska T, Li S, Richter T, Wieland H, Durkovic M, et al. Cell-Mediated Transgenesis in Rabbits: Chimeric and Nuclear Transfer Animals. *Biol Reprod*. 2011;84:229-37.
349. Tapponnier Y, Afanassieff M, Aksoy I, Aubry M, Moulin A, Medjani L, et al. Reprogramming of rabbit induced pluripotent stem cells toward epiblast and chimeric competency using Krüppel-like factors. *Stem Cell Research*. 2017;24:106-17.
350. Gearhart J. New Potential for Human Embryonic Stem Cells. *Science*. 1998;282:1061-2.
351. Buzzard JJ, Gough NM, Crook JM, Colman A. Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat Biotechnol*. 2004;22:381-2; author reply 382.
352. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod*. 2001;16:2187-94.
353. Sart S, Ma T, Li Y. Cryopreservation of pluripotent stem cell aggregates in defined protein-free formulation. *Biotechnol Progress*. 2013;29:143-53.
354. Richards M, Fong C-Y, Tan S, Chan W-K, Bongso A. An Efficient and Safe Xeno-Free Cryopreservation Method for the Storage of Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*. 2004;22:779-89.
355. Mollamohammadi S, Taei A, Pakzad M, Totonchi M, Seifinejad A, Masoudi N, et al. A simple and efficient cryopreservation method for feeder-free dissociated human induced pluripotent stem cells and human embryonic stem cells. *Hum Reprod*. 2009;24:2468-76.
356. Yan Y, Sart S, Calixto Bejarano F, Muroski ME, Strouse GF, Grant SC, et al. Cryopreservation of embryonic stem cell-derived multicellular neural aggregates labeled with micron-sized particles of iron oxide for magnetic resonance imaging. *Biotechnol Progress*. 2015;31:510-21.
357. Baran SW, Ware CB. Cryopreservation of Rhesus Macaque Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 2007;16:339-44.
358. Martin-Ibañez R, Unger C, Strömberg A, Baker D, Canals JM, Hovatta O. Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor. *Hum Reprod*. 2008;23:2744-54.
359. Li Y, Tan J, Li L. Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. *Fertility and Sterility*. 2010;93:999-1005.
360. Lin P-Y, Yang Y-C, Hung S-H, Lee S-Y, Lee M-S, Chu I-M, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells by a programmed freezer with an oscillating magnetic field. *Cryobiology*. 2013;66:256-60.
361. Claassen DA, Desler MM, Rizzino A. ROCK inhibition enhances the recovery and growth of cryopreserved human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Mol Reprod Dev*. 2009;76:722-32.
362. Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y, Hattori N, Tanaka S, Yagi S, et al. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells*. 2006;24:2549-56.
363. Katkov II, Kim MS, Bajpai R, Altman YS, Mercola M, Loring JF, et al. Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology*. 2006;53:194-205.
364. Katkov II, Kan NG, Cimadamore F, Nelson B, Snyder EY, Terskikh AV. DMSO-Free Programmed Cryopreservation of Fully Dissociated and Adherent Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2011;2011. Disponible sur:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3118298/>

365. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 2007;25:681-6.
366. Barbaric I, Jones M, Buchner K, Baker D, Andrews PW, Moore HD. Pinacidil enhances survival of cryopreserved human embryonic stem cells. *Cryobiology*. 2011;63:298-305.
367. Olson MF. Applications for ROCK kinase inhibition. *Current Opinion in Cell Biology*. 2008;20:242-8.
368. Kurosawa H. Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012;114:577-81.
369. Ichikawa H, Nakata N, Abo Y, Shirasawa S, Yokoyama T, Yoshie S, et al. Gene pathway analysis of the mechanism by which the Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 inhibits apoptosis in isolated thawed human embryonic stem cells. *Cryobiology*. 2012;64:12-22.
370. Heng BC, Clement MV, Cao T. Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK Enhances the Freeze-Thaw Survival Rate of Human Embryonic Stem Cells. *Bioscience Reports*. 2007;27:257-64.
371. Xu X, Cowley S, Flaim CJ, James W, Seymour L, Cui Z. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnol Progress*. 2010;26:827-37.
372. Krawetz RJ, Li X, Rancourt DE. Human embryonic stem cells: caught between a ROCK inhibitor and a hard place. *Bioessays*. 2009;31:336-43.
373. Wang X, Lin G, Martins-Taylor K, Zeng H, Xu R-H. Inhibition of Caspase-mediated Anoikis Is Critical for Basic Fibroblast Growth Factor-sustained Culture of Human Pluripotent Stem Cells. *J Biol Chem*. 2009;284:34054-64.
374. Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, et al. Molecular Pathway and Cell State Responsible for Dissociation-Induced Apoptosis in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7:225-39.
375. Grossmann J. Molecular mechanisms of « detachment-induced apoptosis--Anoikis ». *Apoptosis*. 2002;7:247-60.
376. Zhou Q, Duan H, Wang Y, Qu M, Yang L, Xie L. ROCK Inhibitor Y-27632 Increases the Cloning Efficiency of Limbal Stem/Progenitor Cells by Improving Their Adherence and ROS-Scavenging Capacity. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19:531-7.
377. Zhang J-M, Wang H-C, Wang H-X, Ruan L-H, Zhang Y-M, Li J-T, et al. Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2013;166:52-5.
378. Li P, Li Z-H, Dzyuba B, Hulak M, Rodina M, Linhart O. Evaluating the Impacts of Osmotic and Oxidative Stress on Common Carp (*Cyprinus carpio*, L.) Sperm Caused by Cryopreservation Techniques. *Biol Reprod*. 2010;83:852-8.
379. Jia MX, Shi Y, Di W, Jiang XR, Xu J, Liu Y. ROS-induced oxidative stress is closely related to pollen deterioration following cryopreservation. *In Vitro CellDevBiol-Plant*. 2017;53:433-9.
380. Kim S-H, Yu D-H, Kim Y-J. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Animal Reproduction Science*. 2010;119:106-14.
381. Matsumura K, Hyon S-H. Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. *Biomaterials*. 2009;30:4842-9.
382. Miyamoto Y, Teramoto N, Hayashi S, Enosawa S. An Improvement in the Attaching Capability of Cryopreserved Human Hepatocytes by a Proteinaceous High Molecule, Sericin, in the Serum-Free Solution. *Cell Transplant*. 2010;19:701-6.
383. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis*. 2009;5:143-54.
384. Adler S, Pellizzer C, Paparella M, Hartung T, Bremer S. The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. *Toxicology in Vitro*. 2006;20:265-71.

385. Clarke D, Yadock D, Nicoud I, Mathew A, Heimfeld S. Improved Post-Thaw Recovery of Peripheral Blood Stem/Progenitor Cells Using a Novel Intracellular-like Cryopreservation Solution. *Cytotherapy*. 2009;11:472-9.
386. Nishigaki T, Teramura Y, Suemori H, Iwata H. Cryopreservation of primate embryonic stem cells with chemically-defined solution without Me2SO. *Cryobiology*. 2010;60:159-64.
387. Matsumura K, Bae JY, Hyon SH. Polyampholytes as Cryoprotective Agents for Mammalian Cell Cryopreservation. *Cell Transplant*. 2010;19:691-9.
388. Matsumura K, Bae JY, Hyon SH. Polyampholytes as Cryoprotective Agents for Mammalian Cell Cryopreservation. *Cell Transplantation*. 2010;19:691-9.
389. Matsumura K, Bae JY, Kim HH, Hyon SH. Effective vitrification of human induced pluripotent stem cells using carboxylated ϵ -poly-L-lysine. *Cryobiology*. 2011;63:76-83.
390. Xu X, Cowley S, Flaim CJ, James W, Seymour LW, Cui Z. Enhancement of Cell Recovery for Dissociated Human Embryonic Stem Cells After Cryopreservation. *Biotechnol Prog*. 2010;26:781-8.
391. Ha SY, Jee BC, Suh CS, Kim HS, Oh SK, Kim SH, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Hum Reprod*. 2005;20:1779-85.
392. Vanroose G, Soom AV, Kruif AD. From Co-culture to Defined Medium: State of the Art and Practical Considerations. *Reproduction in Domestic Animals*. 2001;36:25-8.
393. Bryan N, Andrews KD, Loughran MJ, Rhodes NP, Hunt JA. Elucidating the contribution of the elemental composition of fetal calf serum to antigenic expression of primary human umbilical-vein endothelial cells in vitro. *Bioscience Reports*. 2011;31:199-210.
394. Grilli G, Porcellini A, Lucarelli G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoietic stem cells. *Cryobiology*. 1980;17:516-20.
395. Hasler JF. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod Fertil Dev*. 2009;22:119-25.
396. Jitraruch S, Dhawan A, Hughes RD, Filippi C, Lehec SC, Glover L, et al. Cryopreservation of Hepatocyte Microbeads for Clinical Transplantation. *Cell Transplant*. 2017;26:1341-54.
397. Liu W, Chen G. Cryopreservation of Human Pluripotent Stem Cells in Defined Medium. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2014;31:1C.17.1-1C.17.13.
398. Holm F, Strom S, Inzunza J, Baker D, Stromberg AM, Rozell B, et al. An effective serum- and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Human Reproduction*. 2010;25:1271-9.
399. Miyamoto Y, Noguchi H, Yukawa H, Oishi K, Matsushita K, Iwata H, et al. Cryopreservation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Medicine*. 2012;3:89-95.
400. Fujioka T, Yasuchika K, Nakamura Y, Nakatsuji N, Suemori H. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *Int J Dev Biol*. 2004;48:1149-54.
401. Xu C, Police S, Hassanipour M, Li Y, Chen Y, Priest C, et al. Efficient generation and cryopreservation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Regen Med*. 2011;6:53-66.
402. Nicoud I, Nourigat C, Delaney C. A preclinical safety study of intravenous injection of biopreservation solutions as a vehicle for cellular products. Poster. 2008;
403. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 1985;313:573-5.
404. dos Santos-Neto PC, Cuadro F, Barrera N, Crispo M, Menchaca A. Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of in vivo and in vitro produced ovine embryos. *Cryobiology*. 2017;78:8-14.
405. Vicente JS, Viudes-de-Castro MP, Cedano-Castro JI, Marco-Jiménez F. Cryosurvival of rabbit embryos obtained after superovulation with corifollitropin alfa with or without LH. *Animal Reproduction Science* [Internet]. 2018 [cité 9 avr 2018]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432017306772>
406. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*.

1998;51:53-8.

407. Yacoub ANA, Gauly M, Holtz W. Open pulled straw vitrification of goat embryos at various stages of development. *Theriogenology*. 2010;73:1018-23.
408. Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertility and Sterility*. 2012;98:870-5.
409. Valbuena D, Póo ME, Aguilar-Gallardo C, Martinez S, Cobo AC, Pellicer A, et al. Comparison of Cryotip vs. Cryotop for mouse and human blastomere vitrification. *Fertility and Sterility*. 2012;97:209-17.
410. Isachenko V, Katkov II, Yakovenko S, Lulat AG-MI, Ulug M, Arvas A, et al. Vitrification of human laser treated blastocysts within cut standard straws (CSS): Novel aseptic packaging and reduced concentrations of cryoprotectants. *Cryobiology*. 2007;54:305-9.
411. Kitiyanant Y, Saikhun J, Guocheng J, Pavasuthipaisit K. Establishment and Long-Term Maintenance of Bovine Embryonic Stem Cell Lines Using Mouse and Bovine Mixed Feeder Cells and Their Survival after Cryopreservation. 2000;6.
412. Li T, Zhou C, Liu C, Mai Q, Zhuang G. Bulk vitrification of human embryonic stem cells. *Hum Reprod*. 2008;23:358-64.
413. Li T, Mai Q, Gao J, Zhou C. Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells with a New Bulk Vitrification Method. *Biol Reprod*. 2010;82:848-53.
414. Zhou CQ, Mai QY, Li T, Zhuang GL. Cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. *Chin Med J (Engl)*. 2004;117:1050-5.
415. Beier AFJ, Schulz JC, Dörr D, Katsen-Globa A, Sachinidis A, Hescheler J, et al. Effective surface-based cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. *Cryobiology*. 2011;63:175-85.
416. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reproductive BioMedicine Online*. 2007;14:72-9.
417. Stachecki JJ, Garrisi J, Sabino S, Caetano JP, Wiemer KE, Cohen J. A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008;17:360-7.
418. Miyazaki T, Suemori H. Slow Cooling Cryopreservation Optimized to Human Pluripotent Stem Cells. *Biobanking and Cryopreservation of Stem Cells [Internet]*. Springer, Cham; 2016 [cité 14 déc 2017]. p. 57-65. Disponible sur: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45457-3_5
419. Heng BC, Bested SM, Chan SH, Cao T. A proposed design for the cryopreservation of intact and adherent human embryonic stem cell colonies. *In Vitro CellDevBiol-Animal*. 2005;41:77-9.
420. Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*. 2000;63:513-8.
421. Aerts JMJ, De Clercq JBP, Andries S, Leroy JLMR, Van Aelst S, Bols PEJ. Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical transplants after Cryologic solid surface vitrification or slow-rate freezing. *Cryobiology*. 2008;57:163-9.
422. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*. 2006;12:779-96.
423. Ware CB, Nelson AM, Blau CA. Controlled-rate freezing of human ES cells. *Biotechniques*. 2005;38:879.
424. Yang P-F, Hua T-C, Wu J, Chang Z-H, Tsung H-C, Cao Y-L. Cryopreservation of human embryonic stem cells: A protocol by programmed cooling. *CryoLetters*. 2006;27:361-8.
425. Valbuena D, Sánchez-Luengo S, Galán A, Sánchez E, Gómez E, Poo ME, et al. Efficient method for slow cryopreservation of human embryonic stem cells in xeno-free conditions. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008;17:127-35.
426. Nie Y, Bergendahl V, Hei DJ, Jones JM, Palecek SP. Scalable culture and cryopreservation of

- human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol Progress*. 2009;25:20-31.
427. Amps KJ, Jones M, Baker D, Moore HD. In situ cryopreservation of human embryonic stem cells in gas-permeable membrane culture cassettes for high post-thaw yield and good manufacturing practice. *Cryobiology*. 2010;60:344-50.
428. Lee JY, Lee JE, Kim DK, Yoon TK, Chung HM, Lee DR. High concentration of synthetic serum, stepwise equilibration and slow cooling as an efficient technique for large-scale cryopreservation of human embryonic stem cells. *Fertility and Sterility*. 2010;93:976-85.
429. Serra M, Correia C, Malpique R, Brito C, Jensen J, BJORQUIST P, et al. Microencapsulation Technology: A Powerful Tool for Integrating Expansion and Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cité 29 avr 2018];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3151290/>
430. Carpenter MK, Frey-Vasconcells J, Rao MS. Developing safe therapies from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2009;27:606-13.
431. Lee CN, Ax RL. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci*. 1984;67:2006-9.
432. Lee CN, Clayton MK, Bushmeyer SM, First NL, Ax RL. Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *J Anim Sci*. 1986;63:861-7.
433. Palasz A, Alkemade S, Mapletoft RJ. The Use of Sodium Hyaluronate in Freezing Media for Bovine and Murine Embryos. *Cryobiology*. 1993;30:172-8.
434. Barfield JP, McCue PM, Squires EL, Seidel GE. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos. *Cryobiology*. 2009;59:36-41.
435. Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 2014;81:5-17.e3.
436. King ME, McKelvey WAC, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJA, et al. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*. 2004;62:1236-44.
437. Fair S, Hanrahan JP, O'Meara CM, Duffy P, Rizos D, Wade M, et al. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*. 2005;63:1995-2005.
438. Hiwasa M, Kohno H, Togari T, Okabe K, Fukui Y. Fertility after Different Artificial Insemination Methods Using a Synthetic Semen Extender in Sheep. *J Reprod Dev*. 2009;55:50-4.
439. Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*. 2004;61:673-90.
440. Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Multivariate Cluster Analysis Regression Procedures as Tools to Identify Motile Sperm Subpopulations in Rabbit Semen and to Predict Semen Fertility and Litter Size. *Reproduction in Domestic Animals*. 2007;42:312-9.
441. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Hum Reprod*. 2000;15:1562-7.
442. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 2005;63:445-57.
443. Holden SA, Fernandez-Fuertes B, Murphy C, Whelan H, O'Gorman A, Brennan L, et al. Relationship between in vitro sperm functional assessments, seminal plasma composition, and field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen. *Theriogenology*. 2017;87:221-8.
444. Saacke RG, Dalton JC, Nadir S, Nebel RL, Bame JH. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science*. 2000;60-61:663-77.
445. Stachecki JJ, Dresser BL, Pope CE, Armant DR. Stimulation of Ejaculated Domestic Cat Sperm Motility with Caffeine, Pentoxifylline, and 2'-Deoxyadenosine. *Archives of Andrology*. 1995;34:63-8.

446. Nabavi N, Todehdeghan F, Shiravi A. Effect of caffeine on motility and vitality of sperm and in vitro fertilization of outbreed mouse in T6 and M16 media. *Iran J Reprod Med.* 2013;11:741-6.
447. Pariz JR, Hallak J. Effects of caffeine supplementation in post-thaw human semen over different incubation periods. *Andrologia.* 2016;48:1049-54.
448. Yamaguchi S, Suzuki C, Noguchi M, Kasa S, Mori M, Isozaki Y, et al. Effects of caffeine on sperm characteristics after thawing and inflammatory response in the uterus after artificial insemination with frozen-thawed boar semen. *Theriogenology.* 2013;79:87-93.
449. Anel L, Kaabi M, Abroug B, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, et al. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology.* 2005;63:1235-47.
450. Gadea J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology.* 2005;63:431-44.
451. Vishwanath R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology.* 2003;59:571-84.
452. Stahlberg R, Harlizius B, Weitze KF, Waberski D. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. *Theriogenology.* 2000;53:1365-73.
453. Gadea J, Matás C, Lucas X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Animal Reproduction Science.* 1998;54:95-108.
454. Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, et al. Relationships Between Sperm Motility Characteristics Assessed by the Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) and Fertilization Rates In Vitro. *J Assist Reprod Genet.* 2001;18:215-20.
455. Rodríguez-Martínez H. Can We Increase the Estimative Value of Semen Assessment? *Reproduction in Domestic Animals.* 2006;41:2-10.
456. Martínez-Rodríguez C, Anel-López L, Alvarez M, Ortega-Ferrusola C, Boixo JC, Peña FJ, et al. Progesterone stimulates the long-distance migration of capacitated ram spermatozoa through viscous media under geotactic condition. *Theriogenology.* 2018;118:7-15.
457. Ferraz MAMM. Oviduct-on-a-chip : Creating an in vitro oviduct to study bovine gamete interaction and early embryo development. [Utrecht]: Utrecht Universiteit; 2018.
458. Ferraz MAMM, Henning HHW, Stout TAE, Vos PLAM, Gadella BM. Designing 3-Dimensional In Vitro Oviduct Culture Systems to Study Mammalian Fertilization and Embryo Production. *Ann Biomed Eng.* 2017;45:1731-44.
459. Ferraz MAMM, Henning HHW, Costa PF, Malda J, Melchels FP, Wubbolts R, et al. Improved bovine embryo production in an oviduct-on-a-chip system: prevention of poly-spermic fertilization and parthenogenic activation. *Lab Chip.* 2017;17:905-16.
460. Akhter S, Ansari M, Andrabi S, Rakha B, Ullah N, Khalid M. Soya-lecithin in Extender Improves the Freezability and Fertility of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals.* 2012;47:815-9.
461. Gil J, Rodriguez-Irazoqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology.* 2003;59:1157-70.
462. Pillet E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, et al. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology.* 2012;77:268-79.
463. Del Valle I, Souter A, Maxwell WMC, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal Reproduction Science.* 2013;138:213-9.
464. Uchoa D, Silva T, Mota Filho A, Silva L. Intravaginal Artificial Insemination in Bitches Using Frozen/Thawed Semen after Dilution in Powdered Coconut Water (ACP-106c). *Reprod Domest Anim.* 2012;47:289-92.
465. Silva M, Peixoto G, Sousa P, Bezerra F, Bezerra BS ACDS, Silva A. Interactions between Straw Size and Thawing Rates on the Cryopreservation of Agouti (*Dasyprocta aguti*) Epididymal Sperm. *Reproduction in Domestic Animals.* 2012;47:e4-6.

466. Wojtusik J, Stoops MA, Roth TL. Comparison of soy lecithin, coconut water, and coconut milk as substitutes for egg-yolk in semen cryodiluent for black rhinoceros (*Diceros bicornis*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *Theriogenology* [Internet]. 2018 [cité 17 août 2018]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X18305879>
467. Lotfi S, Mehri M, Sharafi M, Masoudi R. Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster. *Animal Reproduction Science*. 2017;184:204-10.
468. Qian L, Yu S, Zhou Y. Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;87:287-9.
469. Bakhtiari M, Sobhani A, Akbari M, Pasbakhsh P, Abbasi M. The effect of hyaluronic acid on motility, vitality and fertilization capability of mouse sperms after cryopreservation. *Int J Reprod BioMed*. 2012;5:45-50.
470. Bruemmer JE, Wilson CH, Coutino da Silva M, Squires EL. Effects of Hyaluronan Supplementation on Cryopreserved Equine Spermatozoa Hyaluronan and Cryopreserved Equine Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2009;29:223-8.
471. Killian G. Physiology and endocrinology symposium: evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock. *J Anim Sci*. 2011;89:1315-22.
472. Isaac AV, Kumari S, Nair R, Urs DR, Salian SR, Kalthur G, et al. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;494:656-62.
473. Feugang JM. Novel agents for sperm purification, sorting, and imaging. *Molecular Reproduction and Development*. 2017;84:832-41.
474. Gil J, Rodriguez-Irazoqui M, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*. 2002;57:1781-92.
475. Celeghini ECC, de Arruda RP, de Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*. 2008;104:119-31.
476. Vera-Munoz O, Amirat-Briand L, Diaz T, Vásquez L, Schmidt E, Desherces S, et al. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl® and Bioxcell®. *Theriogenology*. 2009;71:895-900.
477. Kaka A, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Khumran AM, Sarsaifi K, et al. α -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. *Animal Reproduction Science*. 2015;153:1-7.
478. Khumran AM, Yimer N, Rosnina Y, Ariff MO, Wahid H, Kaka A, et al. Butylated hydroxytoluene can reduce oxidative stress and improve quality of frozen-thawed bull semen processed in lecithin and egg yolk based extenders. *Animal Reproduction Science*. 2015;163:128-34.
479. Emamverdi M, Zhandi M, Zare Shahneh A, Sharafi M, Akbari-Sharif A. Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin-Based Extender. *Reprod Dom Anim*. 2013;48:899-904.
480. Najafi A, Najafi M, Zanganeh Z, Sharafi M, Martinez-Pastor F, Adeldust H. Cryopreservation of Ram Semen in Extenders Containing Soybean Lecithin as Cryoprotectant and Hyaluronic Acid as Antioxidant. *Reprod Dom Anim*. 2014;49:934-40.
481. Martins KR, Gheller SSM, Ferreira CER, Goularte KL, Corcini CD, Mondadori RG, et al. Post-thawing quality of ram spermatozoa is impaired by inclusion of boar seminal plasma in the freezing extender. *Small Ruminant Research*. 2016;144:229-33.
482. Fang Y, Zhong R, Zhang X, Zhang J, Zhou D. Boar seminal plasma inhibits cryo-capacitation of frozen-thawed ram sperm and improves fertility following intracervical insemination. *Theriogenology*. 2018;105:84-9.
483. Masoudi R, Sharafi M, Zare Shahneh A, Towhidi A, Kohram H, Zhandi M, et al. Effect of dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean lecithin- and egg yolk-based extenders. *Theriogenology*. 2016;86:1583-8.

484. Kuleshova LL, Shaw JM. A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. *Hum Reprod.* 2000;15:2604-9.
485. Gutiérrez A, Garde J, Artiga CG, Muñoz I, Pintado B. In vitro survival of murine morulae after quick freezing in the presence of chemically defined macromolecules and different cryoprotectants. *Theriogenology.* 1993;39:1111-20.
486. Nicoud IB, Clarke DM, Taber G, Stolowski KM, Roberge SE, Song MK, et al. Cryopreservation of umbilical cord blood with a novel freezing solution that mimics intracellular ionic composition. *Transfusion.* 2012;52:2055-62.
487. Haylock DN, Nilsson SK. The role of hyaluronic acid in hemopoietic stem cell biology. *Regenerative Medicine.* 2006;1:437-45.
488. Gerecht S, Burdick JA, Ferreira LS, Townsend SA, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:11298-303.
489. Li L, Duan X, Fan Z, Chen L, Xing F, Xu Z, et al. Mesenchymal Stem Cells in Combination with Hyaluronic Acid for Articular Cartilage Defects. *Sci Rep [Internet].* 2018 [cité 18 août 2018];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6028658/>
490. Ware CB, Baran SW. A Controlled-Cooling Protocol for Cryopreservation of Human and Non-Human Primate Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Assays [Internet].* Humana Press; 2007 [cité 4 févr 2018]. p. 43-9. Disponible sur: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-536-7_4
491. Petersen A, Schneider H, Rau G, Glasmacher B. A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature. *Cryobiology.* 2006;53:248-57.
492. Pérez-Marín CC, Requena FD, Arando A, Ortiz-Villalón S, Requena F, Agüera EI. Effect of trehalose- and sucrose-based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results. *Cryobiology [Internet].* 2017; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224017303759>
493. Arando A, Gonzalez A, Delgado JV, Arrebola FA, Perez-Marín CC. Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science.* 2017;181:175-85.
494. Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina AM, Sanchez R. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. *Reproduction, Fertility and Development.* 2012;24:323.
495. Liu J, Tanrikut C, Wright DL, Lee GY, Toner M, Biggers JD, et al. Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant. *Cryobiology.* 2016;73:162-7.
496. Pan C, Yu S, Zhang P, Wang B, Zhu Z, Liu Y, et al. Effect of sucrose on cryopreservation of pig spermatogonial stem cells. *Journal of Integrative Agriculture.* 2017;16:1120-9.
497. Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL. Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radicals. *J Biol Chem.* 2001;276:24261-7.
498. Halberstadt M, Böhnke M, Athmann S, Hagenah M. Cryopreservation of human donor corneas with dextran. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:5110-5.
499. Teixeira AS, Deladino L, Fernandes CF, Martino M, Molina-García AD. Application of Chitosan Coating on Alginate Beads for Cryopreservation Uses. *Journal of Chitin and Chitosan Science.* 2014;2:46-54.
500. Ashwood-Smith MJ, Warby C. Studies on the molecular weight and cryoprotective properties of polyvinylpyrrolidone and dextran with bacteria and erythrocytes. *Cryobiology.* 1971;8:453-64.
501. Gutiérrez A, Garde J, Artiga CG, Muñoz I, Pintado B. In vitro survival of murine morulae after quick freezing in the presence of chemically defined macromolecules and different cryoprotectants. *Theriogenology.* 1993;39:1111-20.
502. Shu Z, Chen W, Shen AQ, Gao D. C-13: Application of hydrogel in cryopreservation as a novel cryoprotectant, encapsulation and single-cell-based functional sensing material. *Cryobiology.* 2014;69:506.
503. Chen B, Wright B, Sahoo R, Connon CJ. A Novel Alternative to Cryopreservation for the Short-Term Storage of Stem Cells for Use in Cell Therapy Using Alginate Encapsulation. *Tissue*

- Engineering Part C: Methods. 2012;19:568-76.
504. Zhao G, Liu X, Zhu K, He X. Hydrogel Encapsulation Facilitates Rapid-Cooling Cryopreservation of Stem Cell-Laden Core–Shell Microcapsules as Cell–Biomaterial Constructs. *Advanced Healthcare Materials*. 2017;6:1700988.
505. Wolfe J, Bryant G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration*. 2001;24:438-50.
506. Courbiere B, Odagescu V, Baudot A, Massardier J, Mazoyer C, Salle B, et al. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. *Fertility and Sterility*. 2006;86:1243-51.
507. Baudot A, Courbiere B, Odagescu V, Mazoyer C, Caquant L, Chelbi M, et al. 54. Physical investigations aiming to achieve the cryopreservation of the whole sheep ovary by vitrification. *Cryobiology*. 2006;53:390-1.
508. Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G, Buff S. Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*. 2012;78:1294-302.
509. Devireddy RV, Bischof JC. Measurement of Water Transport During Freezing in Mammalian Liver Tissue: Part II—The Use of Differential Scanning Calorimetry. *J Biomech Eng*. 1998;120:559-69.
510. Holt WV, North RD. Determination of lipid composition and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1985;73:285-94.
511. Holt WV, North RD. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1986;78:447-57.
512. Niemitz EL, Feinberg AP. Epigenetics and Assisted Reproductive Technology: A Call for Investigation. *The American Journal of Human Genetics*. 2004;74:599-609.
513. Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility*. 2009;91:305-15.
514. Urrego R, Rodriguez-Osorio N, Niemann H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics*. 2014;9:803-15.
515. Chavatte-Palmer P, Robles M, Tarrade A, Duranthon V. Gametes, Embryos, and Their Epigenome: Considerations for Equine Embryo Technologies. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2016;41:13-21.
516. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy [Internet]. *Nature*. 2004 [cité 22 août 2018]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nature02625>
517. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 2016;85:47-64.
518. Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I, et al. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *European Journal of Human Genetics*. 2010;18:73-80.
519. Perrier J-P, Sellem E, Prézélin A, Gasselin M, Jouneau L, Piumi F, et al. A multi-scale analysis of bull sperm methylome revealed both species peculiarities and conserved tissue-specific features. *BMC Genomics*. 2018;19:404.
520. Jiang Z, Wang Y, Lin J, Xu J, Ding G, Huang H. Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2017;44:90-104.
521. Yan L-Y, Yan J, Qiao J, Zhao P-L, Liu P. Effects of oocyte vitrification on histone modifications. *Reprod Fertil Dev*. 2010;22:920-5.
522. Chatterjee A, Saha D, Niemann H, Gryshkov O, Glasmacher B, Hofmann N. Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. *Cryobiology*. 2017;74:1-7.
523. Santos-Rosa H, Schneider R, Bernstein BE, Karabetsou N, Morillon A, Weise C, et al. Methylation of Histone H3 K4 Mediates Association of the Isw1p ATPase with Chromatin. *Molecular*

Cell. 2003;12:1325-32.

524. Sims RJ, Chen C-F, Santos-Rosa H, Kouzarides T, Patel SS, Reinberg* D. Human but not yeast chd1 binds directly and selectively to histone h3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem*. 2005;280:41789-92.

525. Ringrose L, Ehret H, Paro R. Distinct Contributions of Histone H3 Lysine 9 and 27 Methylation to Locus-Specific Stability of Polycomb Complexes. *Molecular Cell*. 2004;16:641-53.

526. Siklenka K, Erkek S, Godmann M, Lambrot R, McGraw S, Lafleur C, et al. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science*. 2015;350:aab2006.

527. Pérez-Cerezales S, Ramos-Ibeas P, Lopez-Cardona A, Pericuesta E, Fernandez-Gonzalez R, Pintado B, et al. Elimination of methylation marks at lysines 4 and 9 of histone 3 (H3K4 and H3K9) of spermatozoa alters offspring phenotype. *Reprod Fertil Dev*. 2017;29:740-6.


528. Gómez MC, Pope CE, Kutner RH, Ricks DM, Lyons LA, Ruhe M, et al. Nuclear Transfer of Sand Cat Cells into Enucleated Domestic Cat Oocytes is Affected by Cryopreservation of Donor Cells. *Cloning and Stem Cells*. 2008;10:469-84.


529. Khalifa MA. Improving cryopreservation capacity of ram spermatozoa by supplementing the diluent with melatonin. *International journal of Animal Research* [Internet]. 2017 [cité 22 déc 2017]; Disponible sur: <http://escipub.com/ijar-2017-11-0202/>

Annexes

Annexe 1. Plaquette du CRB Anim


Centre de Ressources Biologiques pour les Animaux Domestiques





Le CRB-Anim est une infrastructure nationale, financée par le programme Investissements d'Avenir de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Lancé en 2013, il fédère et permet d'améliorer le fonctionnement des différents Centres de Ressources Biologiques (CRB) qui collectent, stockent, caractérisent et distribuent des échantillons biologiques pour la reproduction et la génomique des animaux domestiques. Ces CRB, véritables banques de gènes, constituent un atout majeur pour la préservation et la gestion de la biodiversité. L'objectif principal du CRB-Anim est de favoriser la valorisation scientifique et socio-économique des échantillons conservés.

www.crb-anim.fr

Identifier et décrypter les maladies génétiques des animaux

Notamment des chiens, afin de proposer de nouveaux modèles biomédicaux pour améliorer la santé animale comme la santé humaine.

Faire progresser la recherche

En génétique, biologie moléculaire, physiologie et biotechnologies de la reproduction, technologies de biobanking... et les sciences du vivant en général. Les recherches sur la biodiversité et les maladies génétiques des animaux domestiques doivent pouvoir accéder à des échantillons biologiques caractérisés et disposer d'outils performants de cryoconservation des ressources biologiques.

Mettre les échantillons conservés à la disposition des utilisateurs

Les premiers bénéficiaires sont les éleveurs, principaux fournisseurs d'échantillons. CRB-Anim est aussi ouvert à tous les acteurs de l'élevage et de la sélection animale, à la communauté scientifique nationale et internationale et à tous les citoyens.

Et soutenir l'élevage d'aujourd'hui et de demain

Les échantillons conservés peuvent être utilisés pour reconstruire une population disparue, suite à une catastrophe sanitaire par exemple, à partir de la semence ou des embryons issus d'animaux anciens, ou pour réintroduire de la diversité dans les populations d'élevage et ainsi :

- Evaluer le progrès génétique réalisé chez les populations actuelles par rapport aux générations anciennes.
- Atténuer les conséquences défavorables de choix de sélection conjoncturels qui ont fortement diminué la diversité génétique de races sélectionnées et augmenter l'incidence d'anomalies génétiques.
- Revivifier une race à petit effectif et diminuer la consanguinité en ré-utilisant des reproducteurs anciens, peu apparentés aux reproducteurs actuels.
- Réinjecter des aptitudes spécifiques pour répondre à de nouveaux besoins (résistances aux pathogènes ou parasites, adaptation ou tolérance aux phénomènes climatiques, gènes liés à la qualité des produits...).

... et pour toutes les idées que nous soumettront les chercheurs et les éleveurs.





Porc



Lapin



Volaille



Bovins

Quels verrous le CRB-Anim devra-t-il lever ?

La conservation de cellules reproductives rencontre encore de nombreuses difficultés techniques que le CRB-Anim a pour ambition de résoudre.

Pour cela il devra :

- Mettre au point de nouveaux indicateurs de qualité pour choisir au mieux les cellules à conserver.
- Développer de nouveaux protocoles de conservation (milieux de dilution et procédés de congélation) pour garantir :
 - le potentiel reproducteur des cellules conservées;
 - l'intégrité génétique et épigénétique des animaux qui seront produits à partir de ces cellules;
 - la biosécurité et la qualité des échantillons conservés sur le long terme.

Suivez les actualités du CRB-Anim pour connaître les nouveaux protocoles en développement sur notre site web.

www.CRB-anim.fr

Qui sommes-nous ?

Coordonné par l'INRA, le CRB-Anim associe des équipes de plusieurs organismes publics de recherche (Inra, CNRS, Ifremer, Inseem) et établissements d'enseignement supérieur (Université de Tours, Université de Rennes 1, AgroParisTech, Ecoles Nationales Vétérinaires), les instituts techniques des filières animales (Idelie, Ifip, Ifce, SysAAF), la Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB), ainsi que LABOGENA, DNA, et ANTAGÈNE, deux entreprises privées spécialisées dans les activités d'analyse génétique qui hébergent des collections génomiques.

Enrichissement des Collections
Échantillonnages supplémentaires
programmés durant la phase de
contrôle des échantillons
22 espèces 281 individus

Quels échantillons conservons-nous ?

Environ 530 000 échantillons biologiques (semence, embryons, cellules, tissus, ADN, ARN) d'animaux d'élevage et de compagnie sont déjà conservés dans les 6 Centres du réseau CRB-Anim.

Ruminants, porcs, équidés, lapins, chiens, chats, volailles, poissons d'élevage, mollusques et insectes, au total 22 espèces sont concernées.
Le CRB-Anim réunit deux types de collections : les cryobanques, collections «reproductives» conservant de la semence ou des embryons dans l'azote liquide (-196°C), et des collections «génomiques» conservant le sang, les tissus ou l'ADN de ces mêmes animaux dans des congélateurs de laboratoire. Un couplage inédit qui vise à mieux connaître et documenter les ressources génétiques pour mieux les utiliser.

Pour quoi faire ?

Participer au maintien de la biodiversité animale domestique

- Sauvegarder une population en danger (maladie contagieuse, risque sanitaire, ...)
- Conserver des animaux représentatifs d'une population à un instant donné, des phénotypes extrêmes, des génotypes originaux d'intérêt génétique, scientifique et patrimonial.
- Préserver la diversité génétique, en particulier dans les espèces d'élevage soumises à une sélection intensive ou à une forte limitation du nombre de reproducteurs disponibles.

Caractériser cette biodiversité

Lessor de la génomique ouvre une ère nouvelle permettant l'analyse des échantillons conservés pour :

- Identifier les gènes contrôlant des phénotypes particuliers, à partir des échantillons d'ADN de référence stockés par le CRB-Anim.
- Analyser le fonctionnement du génome, à partir de cellules ou de tissus cryoconservés.
- Comprendre les relations entre phénotype et génotype et ainsi mieux valoriser la richesse phénotypique issue de la domestication des animaux.

Le CRB-Anim c'est aussi...

Un dispositif sécurisé, facile d'accès

Le CRB-Anim développe un système d'information robuste qui s'appuie sur la mise au point de nouveaux protocoles de description des échantillons permettant de documenter les collections, d'harmoniser et de partager les données.

- Le CRB-Anim met en œuvre des procédures d'assurance qualité avec la certification, en cours de toutes ses collections selon la norme NF 596-900 afin de garantir la traçabilité des échantillons.
- Le CRB-Anim met au point des règles d'accès claires et transparentes pour enrichir les collections, accroître leur valeur et faciliter la distribution des échantillons. Il va proposer, via son portail WEB, un formulaire de demande d'entrée ou de sortie d'échantillons. Toute entrée ou sortie sera associée à la signature d'un accord de transfert de matériel biologique et de tout autre document rendu nécessaire par l'entrée en vigueur du Protocole de Nagoya, accord international sur l'accès aux ressources génétiques et le partage des avantages découlant de leur utilisation, relatif à la Convention sur la diversité biologique.

Une stratégie de formation

Pour les étudiants de licence en biotechnologies, en production animale.

Pour les étudiants de master en biotechnologies et en génétique.

Pour les doctorants, avec des écoles d'été pour approfondir leurs connaissances sur la gestion des ressources génétiques animales.

Pour les professionnels de la sélection et de l'élevage soucieux de mieux préserver et valoriser leur patrimoine.

Suivez les événements de CRB-Anim

Que vous soyez simple citoyen, fournisseur ou utilisateur potentiel d'échantillons, ou bien chercheur, vos questions, points de vue et suggestions nous intéressent ! Contactez-nous via contact@crbanim.fr

Ils ont publié :

Bellachè J, Laneyre JJ, Gauty C, Yano A, Allémard J, Le Gac F. 2014. Spermatozoal Stem Cell Quest: nanos2, Marker of a Subpopulation of Undifferentiated A Spermatozoa in Trout testis. *BiolReprod.* 90(4):79-1-14.

Lalbas V, Grasseau L, Cahier K, Garigou A, Harichaux G., Teixeira-Gomes AP, Alves S, Bourin M, Gérard N., Blesbois E. 2015. Qualitative and quantitative proteomic approaches to phenotyping chicken semen. *Journal of Proteomics* 112: 313-335.

Suguet M., Arsenault-Pernet M.E., Raftisioti D., Mingant C., 2014. Gyroreproduction of great scallop (Pecten maximus) sperm: effect of extender, cryoprotectant and cooling rate on sperm survival. *Aquatic Living Resources.* 27:35-40.

Prassais J., Guaguère E., Lagoutte L., Guillory A.S., Dufaire De Citres C., Degorce-Rubiales F., Delverdier M., Vaysses A., Quignon P., Bieaut C., Hite C., Fauriel A., Kaerle C., Bellard P., Bensaïgnor E., Querey G., Bourrat E., Thomas A., André C. A Spontaneous KRT16 Mutation in a Dog Breed: a Model for Human Focal Palmoplantar Keratoderma (FNEPK). *J. Invest. Derm.* 2014. doi: 10.1038

Annexe 2. Article publié sur la congélation rapide d'embryons de lapin dans un milieu synthétique [17]

Accepted Manuscript

Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium

Magda Teixeira, Loris Commin, Lucie Gavin-Plagne, Pierre Bruyère, Samuel Buff, Thierry Joly



PII: S0011-2240(18)30074-9

DOI: [10.1016/j.cryobiol.2018.07.006](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.07.006)

Reference: YCRYO 3993

To appear in: *Cryobiology*

Received Date: 24 February 2018

Revised Date: 7 July 2018

Accepted Date: 21 July 2018

Please cite this article as: M. Teixeira, L. Commin, L. Gavin-Plagne, P. Bruyère, S. Buff, T. Joly, Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium, *Cryobiology* (2018), doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.07.006.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ACCEPTED MANUSCRIPT

1 **Title**
2
3 Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium
4
5 Magda Teixeira^{1*}, Loris Commin¹, Lucie Gavin-Plagne¹, Pierre Bruyère¹, Samuel Buff¹, Thierry
6 Joly^{1,2}
7 1: Université de Lyon, VetAgro Sup, Interaction cellule environnement, Marcy l'Etoile, France
8 2: Université de Lyon, ISARA-Lyon, Lyon, France
9 *corresponding author: magda.guedes-teixeira@vetagro-sup.fr
10

ACCEPTED MANUSCRIPT

11 Abstract

12 Embryo cryopreservation media usually contain animal-derived products, such as bovine serum
13 albumin (BSA). These products present two major disadvantages: an undefined variable
14 composition and a risk of pathogen transmission. We aimed to evaluate the effect of replacing BSA
15 in rabbit embryo rapid cooling “freezing” and warming media with a chemically defined medium with
16 no animal-derived products: STEM ALPHA.Cryo3 (“Cryo3”).

17 A total of 1540 rabbit morulae were divided into three cryopreservation groups (group 1: BSA,
18 group 2: 20% Cryo3 and group 3: 100% Cryo3) and a fresh controls group. After rapid cooling,
19 embryos were cultured (*in vitro* approach), or transferred into synchronized does (*in vivo*
20 approach). In the *in vitro* approach, post-warm survival rates obtained with 100% Cryo3 (94.9 %)
21 were superior to BSA (90.8%) and 20% Cryo3 (85.6 %). The blastocyst formation rate was similar
22 between BSA, 20% Cryo3 and 100% Cryo3 groups (85.1, 77.9 and 83.3 %, respectively), as was
23 the expansion / hatching rate (63.1, 63.4 and 58.0%, respectively) and embryo mitochondrial
24 activity. In the *in vivo* approach, pregnancy (80.0, 68.0 and 95.2 %, respectively), implantation
25 (40.5, 45.9 and 44.8%, respectively), and live-foetus rates (35.6, 35.5 and 38.1 %, respectively)
26 were similar between the three groups. To conclude, Cryo3 can replace BSA in rabbit embryo rapid
27 cooling “freezing” and warming media.

28

29 1. Introduction

30 Over the past few decades, embryo cryopreservation has become crucial to the long-term
31 preservation of genetic material in biobanks. Along with embryo transfer (ET), this technology has
32 contributed to the distribution of genetic materials worldwide, replacing animal exchange [36]. The
33 World Organisation for Animal Health assembled recommendations on risk management
34 procedures concerning embryo collection and processing [74]. Even if these guidelines are the best
35 way to reduce infectious disease transmission, embryo contamination is still of concern to health
36 authorities [36].

37 Animal-derived products, such as bovine serum albumin (BSA) or foetal calf serum, also referred to
38 as foetal bovine serum, are commonly added to animal embryo cryopreservation media
39 [5,49,66,68,77]. Serum-derived product composition is poorly known. Media containing BSA or
40 serum are classified as semi-defined or non-defined, respectively [72]. These products contain
41 growth factors, cell attachment and spreading factors, hormones, carbohydrates, amino acids,
42 proteins (such as albumin), vitamins and various undefined molecules [9,72].

43 Serum-derived products promote embryonic viability and development [4,9,60,69,71,72] and have
44 numerous advantageous properties in cryopreservation media, such as metal chelating activity,
45 oncotic pressure regulation, pH regulation [22] and toxin-scavenging [11]. Additionally, animal sera
46 have surfactant properties, which reduce the surface tension in the media, preventing embryos
47 from floating or sticking to glass and plastic surfaces [22,73], and avoiding the adsorption of some
48 media compounds (as hormones, growth factors and carrier proteins) to the material surfaces [53].
49 Moreover, the addition of serum-derived products to the cryopreservation media seems to protect
50 embryos from possible toxic effects of cryoprotectants during the cryopreservation process [23,55].

2

ACCEPTED MANUSCRIPT

51 Despite the numerous beneficial effects of serum on embryos during and after cryopreservation,
52 negative effects have also been suspected. Ruminant embryos cultured with serum before
53 blastocyst formation may present increased incidence of unusual development, accompanied by
54 "large offspring syndrome": high birth weight, prolonged gestation, frequent dystocia, elevated
55 abortion rates and organ defects [35,76].

56 Sera can be contaminated with pathogenic agents such as bacteria, viruses [20,58], yeast, fungi,
57 and mollicutes such as mycoplasmas [14], or prions [44], even if the risk of prion contamination
58 seems to be low [75]. Although commercial sera are usually declared to be pathogen-free,
59 treatments like heat inactivation and gamma irradiation don't always seem to be efficient [58].

60 The advantages of using synthetic medium, in cryopreservation media are widely recognized as
61 providing more defined, more consistent and more reproducible conditions, in addition to avoiding
62 animal welfare and ethical concerns.

63 Numerous studies have aimed to replace animal products in cryopreservation media with media
64 free of animal-derived products, such as silk protein sericin [24], vegetal peptones [18], HA [25,52],
65 and non-organic macromolecules such as polyvinyl alcohol [21,38,50,62], polyvinylpyrrolidone
66 [21,32,65] and Ficoll [21,32]. Hyaluronic acid (HA) is a glycosaminoglycan that can be synthesized
67 in its pure form [16] and can be found in follicular, oviduct and uterine fluids [37] and its
68 concentration increases in the uterus by the time of implantation [78]. After successfully replacing
69 albumin in embryo culture [17,42], HA became an interesting candidate to replace animal products
70 during cryopreservation.

71 Animal derived sera composition not only changes between batches but is also extremely variable
72 [9]. This variation can occur as a result of physiological and biochemical differences between
73 donors [40], and more generally with gender [2], age [29], diet [41], photoperiod [64] and
74 preparation methods [33]. Regarding embryotropic properties of BSA, some authors observed
75 considerable variations between suppliers and even between distinct lots from the same supplier
76 [4,27,45].

77

78 STEM ALPHA.Cryo3 (referred to as "Cryo3", Stem-Alpha, Saint-Genis-l'Argentière, France), is a
79 patented serum-free, protein-free and dextran-free medium (manufactured according to good
80 manufacturing practices [cGMP-annex 1] in compliance with 2001/83/EC). CRYO3 is composed of
81 synthetic HA of high molecular weight (> 106 D), glucose, carbohydrates, amino acids, mineral
82 salts, vitamins, fatty acids esters and buffers. This product was originally created for clinical
83 applications, as a serum substituent in somatic and human adult stem cell freezing medium.

84 Bruyère (2013) investigated foetal calf serum thermodynamic properties of three different suppliers
85 and compared them to the synthetic medium Cryo3 (used at 18% v/v). All the solutions presented
86 similar thermodynamic characteristics, but media containing foetal bovine serum presented more
87 variable results, as well as aberrant values, unlike 18% Cryo3 medium, whose results appeared to
88 be more stable.

89 The impossibility of characterizing animal-derived product composition and its variability lead to
90 unpredictable development rates and to experimental results that might not be reproducible.

91 Consequently, all serum-derived products seem to be unsuitable when the goal of a study is to
92 obtain defined media and standardized cryopreservation methods.

93

94 Bruyère observed that Cryo3 can successfully replace animal products in rabbit embryo and bovine
95 embryo slow-cooling “freezing” media [7,8].

96 Rapid-cooling “freezing” procedures comprise the use of higher solute concentrations than slow-
97 cooling “freezing”. These solutions, combined with a rapid cooling technique (such as direct
98 plunging in liquid nitrogen), allow the formation of an amorphous state during cooling, avoiding the
99 danger of ice crystal formation that occurs during slow-cooling “freezing”. However, unlike
100 vitrification media, the formation of ice crystals during rapid-cooling “freezing” procedures is
101 possible, especially during warming, if (i) warming rates are not quick enough [70], (ii) insufficient
102 high total solute concentration or (iii) exposure to cryopreservation solution was too brief.

103

104 The aim of our study was to evaluate the effect of replacing BSA with Cryo3 in rapid cooling
105 “freezing” and warming solutions on the *in vitro* and *in vivo* development of rabbit morulae.

106

107 2. Materials and methods

108 The Ethical and Animal Welfare Committee of VetAgro Sup approved this study (Permit Number:
109 05/26). All animals were handled according to the EU Directive 2010/63/EU for animal experiment
110 guidelines. Unless specified otherwise, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint
111 Quentin Fallavier, France).

112

113 2.1 Embryo production and recovery

114 A total of 62 rabbit New Zealand does (SARL HYCOLE, Marcoing, France) were housed in groups
115 of five and fed a commercial diet. Does received five doses of a pFSH:LH (ratio 5:1, 31.5 µg total,
116 Stimufol, Reprobiol, Belgium) preparation (administered twice-daily, subcutaneously). Eight hours
117 after the last injection, does were inseminated with sperm from multiple males (pooled ejaculates),
118 and an intramuscular injection of buserelin (2.0 µg Receptal, MSD Animal Health, Beaucauzé,
119 France) was administered.

120 Rabbit does were euthanized 65 to 68 h after the buserelin administration by cervical dislocation.
121 The oviducts and uteri were flushed using Euroflush (IMV Technologies, L’Aigle, France) at room
122 temperature. Embryos were recovered at the morula stage and classified according to the
123 International Embryo Transfer Society (IETS) manual, [6][5][48]Bó and Mapletoft 2013)
124 and quality 1 embryos [6] were pooled. Embryos (n = 1540) were randomly divided into three
125 cryopreservation groups and two control groups.

126 A group of embryos (n = 40) was cultured without cryopreservation (*in vitro* fresh control), and a
127 group of embryos (n = 59) was transferred without cryopreservation (*in vivo* fresh control).

128

129 2.2 Embryo rapid cooling

130 Unless specified otherwise, all percentages are expressed as volume/volume.

ACCEPTED MANUSCRIPT

91 Consequently, all serum-derived products seem to be unsuitable when the goal of a study is to
92 obtain defined media and standardized cryopreservation methods.
93

94 Bruyère observed that Cryo3 can successfully replace animal products in rabbit embryo and bovine
95 embryo slow-cooling “freezing” media [7,8].
96 Rapid-cooling “freezing” procedures comprise the use of higher solute concentrations than slow-
97 cooling “freezing”. These solutions, combined with a rapid cooling technique (such as direct
98 plunging in liquid nitrogen), allow the formation of an amorphous state during cooling, avoiding the
99 danger of ice crystal formation that occurs during slow-cooling “freezing”. However, unlike
100 vitrification media, the formation of ice crystals during rapid-cooling “freezing” procedures is
101 possible, especially during warming, if (i) warming rates are not quick enough [70], (ii) insufficient
102 high total solute concentration or (iii) exposure to cryopreservation solution was too brief.
103

104 The aim of our study was to evaluate the effect of replacing BSA with Cryo3 in rapid cooling
105 “freezing” and warming solutions on the *in vitro* and *in vivo* development of rabbit morulae.
106

107 **2. Materials and methods**

108 The Ethical and Animal Welfare Committee of VetAgro Sup approved this study (Permit Number:
109 05/26). All animals were handled according to the EU Directive 2010/63/EU for animal experiment
110 guidelines. Unless specified otherwise, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint
111 Quentin Fallavier, France).
112

113 **2.1 Embryo production and recovery**

114 A total of 62 rabbit New Zealand does (SARL HYCOLE, Marcoing, France) were housed in groups
115 of five and fed a commercial diet. Does received five doses of a pFSH:LH (ratio 5:1, 31.5 µg total,
116 Stimufol, Reprobiol, Belgium) preparation (administered twice-daily, subcutaneously). Eight hours
117 after the last injection, does were inseminated with sperm from multiple males (pooled ejaculates),
118 and an intramuscular injection of buserelin (2.0 µg Receptal, MSD Animal Health, Beaucauzé,
119 France) was administered.
120 Rabbit does were euthanized 65 to 68 h after the buserelin administration by cervical dislocation.
121 The oviducts and uteri were flushed using Euroflush (IMV Technologies, L’Aigle, France) at room
122 temperature. Embryos were recovered at the morula stage and classified according to the
123 International Embryo Transfer Society (IETS) manual, [6][5][48]Bó and Mapletoft 2013)
124 and quality 1 embryos [6] were pooled. Embryos (n = 1540) were randomly divided into three
125 cryopreservation groups and two control groups.
126 A group of embryos (n = 40) was cultured without cryopreservation (*in vitro* fresh control), and a
127 group of embryos (n = 59) was transferred without cryopreservation (*in vivo* fresh control).
128

129 **2.2 Embryo rapid cooling**

130 Unless specified otherwise, all percentages are expressed as volume/volume.

ACCEPTED MANUSCRIPT

131 Prior to rapid cooling, embryos (n = 1441) were randomly divided into three cryopreservation
132 groups. All media contained the same cryoprotectant composition and the following base media:
133 group 1 cryopreservation medium: IMV Embryo holding medium (IMV Technologies, L'Aigle,
134 France), containing 0.4 % (w/v) BSA (n = 543); group 2 cryopreservation medium: D-PBS
135 supplemented with 20% of Cryo3 (n = 423); group 3 cryopreservation medium: 100% Cryo3
136 medium (n = 475). Embryos were transferred into a first equilibration solution composed of 5 %
137 Me₂SO and 5 % ethylene glycol (EG) (5 min), and a second equilibration solution composed of
138 10% Me₂SO and 10% EG (2 to 3 min). Embryos were then exposed to the cryopreservation
139 solution of the correspondent group (30 sec) containing 20% Me₂SO (approx. 2.8 M) and 20% EG
140 (approx. 3.6 M), before being loaded to a Fibreplug (CVM kit, Cryologic) and cryopreserved by
141 solid surface vitrification (three to four embryos per Fibreplug). Warming was performed by
142 immersing the end of the Fibreplug directly into a thawing solution (0.5 M sucrose in group 1,
143 group 2, or group 3 base medium, respectively) at 38.5 °C for 5 min, followed by three successive
144 dilution baths (0.3 M, 0.1 M and 0.0 M sucrose).

145

2.3 *In vitro* embryo culture and morphology assessment

146 Embryos (n = 40) from the *in vitro in vitro* fresh control group were cultured (38.5 °C, 5 % CO₂) to
147 the expanded blastocyst stage in Medium 199 (without glutamate) supplemented with 10% foetal
148 calf serum and antibiotics (67 UI/mL penicillin and 67 µg/mL streptomycin, Dutscher, Brumath,
149 France). *In vitro* development was assessed after 24 h and 48 h of culture and classified according
150 to their development stage as morula, blastocyst, expanded and hatching embryos. Slightly
151 expanded blastocysts with herniation of embryonic cells (Figure 1) were included in the expanded /
152 hatching embryo group.

153

2.4 *In vivo* embryo transfer

154
155 Fresh embryos (n = 59) and warmed vitrified (total = 905; group 1 n = 358, group 2 n = 270,
156 group 3 n = 277) embryos were transferred to synchronized New Zealand recipient does (n = 84),
157 according to the protocol described by Salvetti [61]. Briefly, recipient does were synchronized with
158 a buserelein injection (0.8 µg, intramuscular, Receptal), 50 to 60 h before transfer. After
159 anaesthesia, a midventral laparotomy was performed, and 4 to 7 embryos (mean = 5.4) were
160 transferred to each uterine horn. Pregnancy diagnosis was realized by palpation 20 days after
161 embryo transfer.

162

2.5 Mitochondrial activity assessment with JC-1

163
164 The cationic dye JC-1 (5,5'6,6'-tetrachloro-1,1,3,3'tetraethylbenzimidazolycarbocyanine iodide;
165 Thermofisher Scientific, Illkirch, France) exhibits different fluorescent properties, based on its
166 accumulation within mitochondria. J-aggregates accumulate in mitochondria with high
167 mitochondrial membrane potential (MMP), showing red fluorescence, while J monomers
168 accumulate in low MMP mitochondria, presenting green fluorescence [54]. Consequently, embryos
169 with more active mitochondria exhibit higher red to green ratios than less active or inactive
170

ACCEPTED MANUSCRIPT

171 embryos. At the end of embryo culture, living embryos (n = 89) at the expanded / hatching stage
 172 from the three cryopreservation groups were subjected to a pretreatment of pronase (a protease,
 173 from *Streptomyces griseus*, 5 mg/mL) in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline medium (D-PBS)
 174 supplemented with D-glucose (5.56 mM), sodium pyruvate (0.33 mM) and bovine serum albumin (3
 175 mg/mL), at 38.5 °C, until the mucin coat began to dissolve. Embryos were then washed in six drops
 176 of modified D-PBS. Embryos were incubated with JC-1 for 75 min (1.5 μ M, 38.5 °C, 5 % CO₂) and
 177 observed using an Olympus IX71 epifluorescence microscope, with an excitation wavelength of
 178 488 nm. JC-1 aggregates were detected with a red filter (590 nm wavelength), whereas JC-1
 179 monomers were detected with a green filter (530 nm wavelength). To evaluate embryo
 180 mitochondrial activity, the staining intensity (by pixel) was measured, from both channels, in two
 181 randomly defined areas on each embryo, using the Fiji package [63] of ImageJ software (National
 182 Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), and the red to green ratio was quantified.
 183 An MMP disruptor (CCCP, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; Thermofisher scientific,
 184 Illkirch, France) was used as a control to confirm that directional changes in the dye signal were
 185 correctly interpreted.

186

2.6 Statistical analysis

187 *In vitro* and *in vivo* development rates were analysed with the chi-square test, whereas JC-1
 188 red/green ratios were analysed by one-way analysis of variance. All tests were performed with R-
 189 Studio software [57]. Groups were considered significantly different at $p < 0.05$.

191

3. Results***In vitro* and *in vivo* embryo development after cryopreservation**

192 The *in vitro* blastocyst formation and expansion/hatching rates and *in vivo* development rates
 193 (pregnancy rate, implantation live-birth rates) after rapid cooling with media containing animal
 194 products or chemically defined products (group 2 and group 3) are summarized in Table 1. *In vitro*
 195 fresh control embryos expressed significantly superior blastocyst and expansion / hatching rates.
 196 The group 3 medium appeared significantly superior in *in vitro* post-warm survival rates than group
 197 1 and group 2 media. No significant differences were observed regarding the other *in vitro* and *in*
 198 *vivo* development rates.

201

Mitochondrial activity assessment with JC-1

202 Ratios of J-aggregate to J-monomer of cryopreserved expanded or hatching embryos,
 203 cryopreserved with media containing animal products (group 1) or chemically defined products
 204 (groups 2 and 3) are represented in Figure 2 and summarized in Figure 3. No significant
 205 differences were observed between the three groups. After incubation with the CCCP control,
 206 images showed no red fluorescence.

208

4. Discussion

209

ACCEPTED MANUSCRIPT

210 Over the last few decades, there have been important efforts to replace animal serum with defined
211 media containing no animal products for embryo cryopreservation. Numerous natural or synthetic
212 molecules have been used in slow cooling, as in rapid cooling media, to replace the biological and
213 the physical properties of animal albumin. Studies demonstrate that animal products can be
214 successfully replaced with products such as the silk protein sericin [24] and vegetal peptones [18]
215 during bovine embryo slow-freezing, or HA during murine [26,52], bovine [51], and ovine [26] slow
216 freezing.

217 The non-organic macromolecule polyvinyl alcohol has been used to slow-freeze and vitrify embryos
218 from different species, obtaining equivalent post-thaw development rates for murine [21,50,51] and
219 porcine [62] embryos. However, inferior development rates were also obtained for murine [12],
220 bovine [51,65,67] and ovine [38] embryos. Studies using polyvinylpyrrolidone tend to demonstrate
221 a negative effect on cryopreservation media [65], as well as inferior surfactant properties [21,65]
222 and toxicity to embryos [13,32].

223 Kuleshova *et al.* cryopreserved mouse embryos by rapid-cooling, using animal product free media
224 containing 35 % polymers (dextran or Ficoll) and 25 % of penetrating cryoprotectants (EG), using a
225 double straw arrangement to diminish contamination risk, obtaining *in vitro* development rates of
226 100 % blastocyst expansion and *in vivo* fetuses rates of 76 % [31]. One year later, these authors
227 obtained development rates (96 - 100% blastocyst expansion and 62 - 76 % live fetuses) after
228 vitrifying mouse embryos with 34 to 49 % (w/v) of macromolecules (Ficoll or dextran) and 11 to
229 27% (w/v) EG, in protein-free media [32]. However, these authors did not compare these protein-
230 free media with media containing animal products [32]. Another author evaluated the substitution of
231 foetal calf serum with Ficoll, on mouse embryo quick freezing, obtaining equivalent development
232 rates [21]. These studies suggest that these two molecules may be good candidates for
233 replacement of animal products.

234 In 1990, Palasz obtained equivalent post-thaw murine and bovine embryo development rates after
235 embryo slow-freezing with synthetic HA and with NCS (n = 206) [52]. Joly observed equivalent post-
236 thaw murine (n = 443) and ovine embryo (n = 120) *in vitro* development rates, after embryo slow-
237 freezing in media containing HA and BSA [26].

238 Bioniche Life Sciences Inc. developed synthetic holding and freezing media (SYNGRO[®]) for
239 bovine, equine, sheep and goat embryos, based on synthetic HA. However, few studies regarding
240 cryopreservation were published with these commercial products [22]. Some authors used these
241 media to slow-freeze equine embryos [3] and to slow-freeze and vitrify bovine embryos [30], but
242 these studies didn't aim to compare with animal derived product based media.

243 In our previous work, we showed that animal products could be successfully replaced with 20 %
244 Cryo3 in bovine [7] and rabbit embryo slow-freezing [8], where better *in vivo* development rates
245 were obtained with 20% Cryo3, compared to foetal calf serum [8].

246 In the present study, we evaluated the effect of replacing BSA in rapid-cooling solutions and in
247 warming solutions, using the same synthetic product as in our previous studies: Cryo3.

248 In *in vitro* experiments, significantly superior survival rates were observed in the 100% Cryo3
249 (group 3) compared to BSA (group 1) or 20% Cryo3 (group 2). No differences were found

ACCEPTED MANUSCRIPT

250 regarding blastocyst formation, blastocyst expansion or blastocyst hatching development rates
251 between groups. In the literature, quite variable post-warm *in vitro* development can be found
252 (survival: 95.3 - 95.6 %, blastocyst formation: 56 – 91.7 %, hatching or expansion: 45 - 91.7 %)
253 [39,43,47,56]. This variability may depend on several factors, such as donor genetics, the housing
254 conditions of the animals and the embryo culture medium.

255 Our post-warm development rates were in the range of values found in the literature.
256 Embryos were not subjected to a pronase treatment to remove the mucin coat prior to culture.
257 Kasai compared the *in vitro* development with and without mucin coat digestion and observed that
258 approximately half of the non-treated embryos did not expand to a diameter more than twice that of
259 the morula (46 % non-treated vs 92 % treated embryos) [28]. Fischer observed that uterine
260 components are vital in the transformation of the extracellular coverings in the rabbit embryo. In
261 rabbit culture media lacking uterine components, the *zona pellucida* does not dissolve and loses
262 elasticity, leading to herniation of embryonic cells into the mucin coat, instead of expansion and
263 hatching [15]. Indeed, we observed slightly expanded embryos with embryonic cell herniation
264 (Figure 1) in cryopreserved and in non-cryopreserved groups. Considering these findings, we
265 pooled slightly expanded herniated blastocysts with expanded and hatching blastocysts.

266 To evaluate mitochondrial activity between cryopreservation groups, we only used developed
267 embryos. If we had randomly picked embryos from all developmental stages, the development
268 rates would have influenced the total mitochondrial activity and, therefore, confound our results.
269 We obtained equivalent mitochondrial activity between the three groups, suggesting that all the
270 developed embryos had the same energetic capacity of continuing further development. The
271 obtained JC-1 ratios are equivalent to ratios found in the literature for fresh mouse blastocysts
272 (approx. 1.35) [1]. Images obtained with the CCCP control demonstrated the JC-1 ratio is
273 dependent on mitochondrial potential variations.

274 In our *in vivo* experiments, no statistically significant difference was observed between fresh and
275 cryopreserved embryos. No difference was found regarding pregnancy rates of the three rapid
276 cooling groups, even if group 3 rates tended to be superior. Equivalent implantation rates and live-
277 birth rates were obtained with the three rapid cooling media groups. As in *in vitro* development
278 studies, post-transfer *in vivo* development rates found in the literature can considerably vary
279 (pregnancy: 56 - 100%, implantation: 8.7 – 65 %, live foetuses: 6.4 – 57.1 %) [25,28,43,48,59]. *In*
280 *vivo* development rates may depend on the cryopreservation medium, cooling device and
281 technique, transfer conditions (laparotomy / endoscopy, surgeon), and the housing conditions of
282 the animals. The *in vivo* development rates obtained in our study were in the range and close to the
283 superior limit for pregnancy and implantation rates.

284 Regarding cryopreservation effects on embryos, a difference was found between fresh (expansion
285 or hatching rate 97.5 %) and cryopreserved embryos during *in vitro* development, but this
286 difference was no longer observed after *in vivo* transfers. A possible explanation would be that
287 cryopreservation partially impairs embryos, and this damage can be reversible if embryos return to
288 physiological conditions after cryopreservation. Both *in vitro* and *in vivo* experiments in this study
289 indicate that animal products can be replaced by both concentrations (20% and 100%) of Cryo3.

ACCEPTED MANUSCRIPT

290 Ménézo and Khatchadourian observed that non-defined peptides could bond to albumin, with
 291 subsequent deleterious effects on embryo post-thaw survival [46]. When using cryopreservation
 292 media entirely composed of synthetic chemically defined products, such as Cryo3, these
 293 interactions are avoided.

294 Moreover, the use of a commercial synthetic medium for embryo cryopreservation, prepared
 295 industrially under rigorous quality control instead of laboratory-made media, avoids preparation
 296 variability, and increases reproducibility and standardization of the cryopreservation process.

297
 298

5. Conclusion

299 The results from this study seem to demonstrate that a chemically defined substitute (STEM
 300 ALPHA.Cryo3) can successfully replace BSA in rabbit embryo rapid-cooling and warming media.
 301 The elimination of animal products of embryo cryopreservation media may improve procedure
 302 standardisation, by avoiding variability in media composition and, consequently, more variable
 303 results. Additionally, it would avoid sanitary concerns inherent to animal-derived products.

304 To improve sanitary conditions, we have replaced BSA with 100% Cryo3 medium in rabbit embryo
 305 rapid-cooling media in the French National CryoBank.

306

6. Acknowledgements

308 This work was supported by the National Network of Biological Resources Centers CRB-ANIM
 309 (ANR11-INSB-0003).

310 The authors thank Daniel Licari (Head, Stem Alpha) for providing the Cryo3 medium, and Pr. Pierre
 311 Guérin for his review of the manuscript.

312

7. References

- 313
- 314 [1] B.M. Acton, A. Jurisicova, I. Jurisica, R.F. Casper, Alterations in mitochondrial membrane
 315 potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development, *Mol.*
 316 *Hum. Reprod.* 10 (2004) 23–32.
- 317 [2] R.E. Banks, Measurement of cytokines in clinical samples using immunoassays: problems
 318 and pitfalls, *Crit Rev Clin Lab Sci.* 37 (2000) 131–182.
- 319 [3] J. Barfield, P. McCue, E. Squires, G. Seidel, Effect of Dehydration Prior to Cryopreservation of
 320 Large Equine Embryos, *Cryobiology.* 59 (2009) 36–41.
- 321 [4] B.D. Bavister, Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts, *Hum. Reprod. Update.*
 322 1 (1995) 91–148.
- 323 [5] E.M.V. Bettencourt, C.M. Bettencourt, J.N.C.E. Silva, P. Ferreira, C.P. de Matos, E. Oliveira,
 324 R.J. Romão, A. Rocha, M. Sousa, Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved
 325 in vivo produced ovine embryos, *Theriogenology.* 71 (2009) 947–958.
- 326 [6] G.A. Bó, R.J. Mapletoft, Evaluation and classification of bovine embryos, *Anim. Reprod.* 10
 327 (2013) 344–348.
- 328 [7] P. Bruyère, A. Baudot, C. Guyader-Joly, P. Guérin, G. Louis, S. Buff, Improved
 329 cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing
 330 medium, *Theriogenology.* 78 (2012) 1294–1302.
- 331 [8] P. Bruyère, A. Baudot, T. Joly, L. Commin, E. Pillet, P. Guérin, G. Louis, A. Josson-Schramme,
 332 S. Buff, A chemically defined medium for rabbit embryo cryopreservation, *PLoS ONE.* 8
 333 (2013) e71547.

- 334 [9] N. Bryan, K.D. Andrews, M.J. Loughran, N.P. Rhodes, J.A. Hunt, Elucidating the contribution
335 of the elemental composition of fetal calf serum to antigenic expression of primary human
336 umbilical-vein endothelial cells in vitro, *Biosci. Rep.* 31 (2011) 199–210.
- 337 [10] S. Campbell, H.R. Swann, J.D. Aplin, M.W. Seif, S.J. Kimber, M. Elstein, Fertilization and early
338 embryology: CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development,
339 *Hum Reprod.* 10 (1995) 425–430.
- 340 [11] O.E. Claassens, J.B. Wehr, K.L. Harrison, Optimizing sensitivity of the human sperm motility
341 assay for embryo toxicity testing, *Hum. Reprod.* 15 (2000) 1586–1591.
- 342 [12] K.A. Creighton, G.M. Lindner, Effect of polyvinyl alcohol on in vitro survival of frozen-thawed
343 mouse embryos, *Theriogenology.* 19 (1983) 120.
- 344 [13] J.C. Dumoulin, J.M. Bergers-Janssen, M.H. Pieters, M.E. Enginsu, J.P. Geraedts, J.L. Evers, The
345 protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae
346 pellucidae and embryos, *Fertil. Steril.* 62 (1994) 793–798.
- 347 [14] O. Dussurget, A. Henry, B. Lemercier, D. Roulland-Dussoix, Polymerase chain reaction-based
348 diagnosis of molliculture infection of commercial animal sera, *Journal of Microbiological*
349 *Methods.* 20 (1994) 125–135.
- 350 [15] B. Fischer, U. Mootz, H.W. Denker, M. Lambertz, H.M. Beier, The dynamic structure of rabbit
351 blastocyst coverings. III. Transformation of coverings under non-physiological
352 developmental conditions, *Anat. Embryol.* 183 (1991) 17–27.
- 353 [16] D.K. Gardner, M. Lane, Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free
354 media, *Hum. Reprod.* 13 Suppl 3 (1998) 148–159; discussion 160.
- 355 [17] D.K. Gardner, H. Rodriegez-Martinez, M. Lane, Fetal development after transfer is increased
356 by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and
357 transfer, *Hum. Reprod.* 14 (1999) 2575–2580.
- 358 [18] F. George, M. Vrancken, B. Verhaeghe, F. Verhoeve, Y.-J. Schneider, A. Massip, I. Donnay,
359 Freezing of in vitro produced bovine embryos in animal protein-free medium containing
360 vegetal peptones, *Theriogenology.* 66 (2006) 1381–1390.
- 361 [19] C.W. Gray, P.M. Morgan, M.T. Kane, Purification of an embryotropic factor from
362 commercial bovine serum albumin and its identification as citrate, *J. Reprod. Fertil.* 94
363 (1992) 471–480.
- 364 [20] B. Guérin, M. Nibart, B.M.-L. Guienne, P. Humblot, Sanitary risks related to embryo transfer
365 in domestic species, *Theriogenology.* 47 (1997) 33–42.
- 366 [21] A. Gutiérrez, J. Garde, C.G. Artiga, I. Muñoz, B. Pintado, In vitro survival of murine morulae
367 after quick freezing in the presence of chemically defined macromolecules and different
368 cryoprotectants, *Theriogenology.* 39 (1993) 1111–1120.
- 369 [22] J.F. Hasler, Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos, *Reprod.*
370 *Fertil. Dev.* 22 (2010) 119–125.
- 371 [23] Z. Hubálek, Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, *Cryobiology.* 46
372 (2003) 205–229.
- 373 [24] T. Isobe, Y. Ikebata, T. Onitsuka, L.T.K. Do, Y. Sato, M. Taniguchi, T. Otoi, Cryopreservation
374 for bovine embryos in serum-free freezing medium containing silk protein sericin,
375 *Cryobiology.* 67 (2013) 184–187.
- 376 [25] T. Joly, V. Neto, P. Salvetti, Cryopreservation of Genetic Diversity in Rabbit Species
377 (*Oryctolagus cuniculus*), in: *Current Frontiers in Cryopreservation*, 2012.
- 378 [26] T. Joly, M. Nibart, M. Thibier, Hyaluronic acid as a substitute for proteins in the deep-
379 freezing of embryos from mice and sheep: An in vitro investigation, *Theriogenology.* 37
380 (1992) 473–480.
- 381 [27] M.T. Kane, Variability in different lots of commercial bovine serum albumin affects cell
382 multiplication and hatching of rabbit blastocysts in culture, *J. Reprod. Fertil.* 69 (1983) 555–
383 558.

- 384 [28] M. Kasai, Y. Hamaguchi, S.E. Zhu, T. Miyake, T. Sakurai, T. Machida, High survival of rabbit
385 morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method, *Biol.*
386 *Reprod.* 46 (1992) 1042–1046.
- 387 [29] J. Kratzsch, G. Schubert, F. Pulzer, R. Pfaeffle, A. Koerner, A. Dietz, M. Rauh, W. Kiess, J.
388 Thiery, Reference intervals for TSH and thyroid hormones are mainly affected by age, body
389 mass index and number of blood leucocytes, but hardly by gender and thyroid
390 autoantibodies during the first decades of life, *Clin. Biochem.* 41 (2008) 1091–1098.
- 391 [30] S. Kruse, Vitrification of in vitro- and in vivo-produced bovine embryos for direct transfer,
392 Thesis, Colorado State University. Libraries, 2012.
- 393 [31] L.L. Kuleshova, J.M. Shaw, A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double
394 straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen, *Hum. Reprod.*
395 15 (2000) 2604–2609.
- 396 [32] L.L. Kuleshova, J.M. Shaw, A.O. Trounson, Studies on replacing most of the penetrating
397 cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation, *Cryobiology.* 43 (2001) 21–31.
- 398 [33] M. Kurita, E. Aiba-Kojima, T. Shigeura, D. Matsumoto, H. Suga, K. Inoue, H. Eto, H. Kato, N.
399 Aoi, K. Yoshimura, Differential effects of three preparations of human serum on expansion
400 of various types of human cells, *Plast. Reconstr. Surg.* 122 (2008) 438–448.
- 401 [34] M. Lane, J.M. Maybach, K. Hooper, J.F. Hasler, D.K. Gardner, Cryo-survival and development
402 of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan,
403 *Mol. Reprod. Dev.* 64 (2003) 70–78.
- 404 [35] G. Lazzari, C. Wrenzycki, D. Herrmann, R. Duchi, T. Kruip, H. Niemann, C. Galli, Cellular and
405 molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring
406 syndrome, *Biol. Reprod.* 67 (2002) 767–775.
- 407 [36] B. Le Tallec, C. Ponsart, B. Marquant-Le Guienne, B. Guérin, Risks of transmissible diseases in
408 relation to embryo transfer, *Reprod. Nutr. Dev.* 41 (2001) 439–450.
- 409 [37] C.N. Lee, R.L. Ax, Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female
410 bovine reproductive tract, *J. Dairy Sci.* 67 (1984) 2006–2009.
- 411 [38] G. Leoni, L. Bogliolo, F. Berlinguer, I. Rosati, P.P. Pintus, S. Ledda, S. Naitana, Defined media
412 for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and
413 viability of in vitro derived ovine embryos, *Cryobiology.* 45 (2002) 204–212.
- 414 [39] T.A. Lin, C.H. Chen, L.Y. Sung, M.G. Carter, Y.E. Chen, F. Du, J.C. Ju, J. Xu, Open-pulled straw
415 vitrification differentiates cryotolerance of in vitro cultured rabbit embryos at the eight-cell
416 stage, *Theriogenology.* 75 (2011) 760–768.
- 417 [40] M.B. Lutz, S. Rössner, Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone
418 marrow: the special role of fetal calf serum, *Immunobiology.* 212 (2007) 855–862.
- 419 [41] Y. Ma, J.A. Griffith, L. Chasan-Taber, B.C. Olendzki, E. Jackson, E.J. Stanek, W. Li, S.L. Pagoto,
420 A.R. Hafner, I.S. Ockene, Association between dietary fiber and serum C-reactive protein-,
421 *Am J Clin Nutr.* 83 (2006) 760–766.
- 422 [42] I.M. Mahani, R. Davar, Hyaluronic acid versus albumin in human embryo transfer medium,
423 *East. Mediterr. Health J.* 13 (2007) 876–880.
- 424 [43] F. Marco-Jiménez, E. Jiménez-Trigos, V. Almela-Miralles, J.S. Vicente, Development of
425 Cheaper Embryo Vitrification Device Using the Minimum Volume Method, *PLOS ONE.* 11
426 (2016) e0148661.
- 427 [44] L. Matthews, D. Stringfellow, A. Bielanski, Thoughts on risk management for in vitro
428 production of bovine embryos., *Embryo Transfer Newsletter.* 16 (1998).
- 429 [45] S.H. McKiernan, B.D. Bavister, Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in
430 vitro development of hamster embryos, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A (1992) 154–156.
- 431 [46] Y. Ménéz, C. Khatchadourian, Peptides bound to albumin, *Life Sci.* 39 (1986) 1751–1753.
- 432 [47] S.Z. Meshreky, H.N. Fahim, E.S. Abdel-Aal, S.E. Ibrahim, Effect of vitrification and cryostorage
433 length on viability of rabbit embryos after thawing, *World Rabbit Science Association,*
434 *Proceedings 10 Th World Rabbit Congress.* (2012) 303–307.

- 435 [48] M.L. Mocé, A. Blasco, M.A. Santacreu, In vivo development of vitrified rabbit embryos:
436 effects on prenatal survival and placental development, *Theriogenology*. 73 (2010) 704–710.
- 437 [49] D. Moreno, A. Neira, L. Dubreil, L. Liegeois, S. Destrumelle, S. Michaud, C. Thorin, L. Briand-
438 Amirat, D. Bencharif, D. Tainturier, In vitro bovine embryo production in a synthetic
439 medium: embryo development, cryosurvival, and establishment of pregnancy,
440 *Theriogenology*. 84 (2015) 1053–1060.
- 441 [50] M.A. Nowshari, G. Brem, The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of
442 mouse embryos, *Theriogenology*. 53 (2000) 1157–1166.
- 443 [51] A. Palasz, S. Alkemade, R. Mapletoft, The use of sodium hyaluronate in freezing media for
444 bovine and murine embryos, *Cryobiology*. 30 (1993) 172–178.
- 445 [52] A. Palasz, S. Alkemade, R.J. Mapletoft, Substitution of chemically defined macromolecules
446 for protein in murine embryo freezing medium (abstract), *Theriogenology*. 33 (1990) 295.
- 447 [53] A. Palasz, M.B. Tornesi, J. Archer, R.J. Mapletoft, Media alternatives for the collection,
448 culture and freezing of mouse and cattle embryos, *Theriogenology*. 44 (1995) 705–714.
- 449 [54] S.W. Perry, J.P. Norman, J. Barbieri, E.B. Brown, H.A. Gelbard, Mitochondrial membrane
450 potential probes and the proton gradient: a practical usage guide, *BioTechniques*. 50 (2011)
451 98–115.
- 452 [55] G.A. Pessoa, M.I.B. Rubin, C.A.M. Silva, D.C. da Rosa, G.A. Pessoa, M.I.B. Rubin, C.A.M. Silva,
453 D.C. da Rosa, Decontamination of naturally contaminated liquid nitrogen storage tanks,
454 *Revista Brasileira de Zootecnia*. 43 (2014) 244–249.
- 455 [56] M. Popelková, Z. Turanová, L. Koprđová, A. Ostró, S. Toporcerová, A.V. Makarevich, P.
456 Chrenek, Effect of vitrification technique and assisted hatching on rabbit embryo
457 developmental rate, *Zygote*. 17 (2009) 57–61.
- 458 [57] R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing.,
459 Vienna, Austria. (2011).
- 460 [58] C.R. Rossi, C.R. Bridgman, G.K. Kiesel, Viral contamination of bovine fetal lung cultures and
461 bovine fetal serum, *Am. J. Vet. Res.* 41 (1980) 1680–1681.
- 462 [59] M.D. Saenz-de-Juano, F. Marco-Jimenez, M.P. Viudes-de-Castro, R. Lavara, J.S. Vicente,
463 Direct comparison of the effects of slow freezing and vitrification on late blastocyst gene
464 expression, development, implantation and offspring of rabbit morulae, *Reprod. Domest.*
465 *Anim.* 49 (2014) 505–511.
- 466 [60] M. Sakurai, C. Suzuki, K. Yoshioka, Effect of knockout serum replacement supplementation
467 to culture medium on porcine blastocyst development and piglet production,
468 *Theriogenology*. 83 (2015) 679–686.e1.
- 469 [61] P. Salvetti, M. Theau-Clément, J.F. Beckers, J. Hurtaud, P. Guérin, V. Neto, J. Falières, T. Joly,
470 Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does,
471 *Theriogenology*. 67 (2007) 1185–1193.
- 472 [62] J. Sanchez-Osorio, C. Cuello, M.A. Gil, I. Parrilla, C. Maside, C. Almiñana, X. Lucas, J. Roca,
473 J.M. Vazquez, E.A. Martinez, Vitrification and warming of in vivo-derived porcine embryos in
474 a chemically defined medium, *Theriogenology*. 73 (2010) 300–308.
- 475 [63] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C.
476 Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P.
477 Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat.*
478 *Methods*. 9 (2012) 676–682.
- 479 [64] S. Schlatt, C.R. Pohl, J. Ehmcke, S. Ramaswamy, Age-related changes in diurnal rhythms and
480 levels of gonadotropins, testosterone, and inhibin B in male rhesus monkeys (*Macaca*
481 *mulatta*), *Biol. Reprod.* 79 (2008) 93–99.
- 482 [65] G.E. Seidel, R.P. Elsdén, Z. Brink, Cryopreservation of bovine embryos in media with
483 chemically defined macromolecules, *Theriogenology*. 33 (1990) 322.
- 484 [66] T. Somfai, M. Ozawa, J. Noguchi, H. Kaneko, M. Nakai, N. Maedomari, J. Ito, N. Kashiwazaki,
485 T. Nagai, K. Kikuchi, Live piglets derived from in vitro-produced zygotes vitrified at the
486 pronuclear stage, *Biol. Reprod.* 80 (2009) 42–49.

ACCEPTED MANUSCRIPT

- 487 [67] V. Sommerfeld, H. Niemann, Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using
 488 ethylene glycol in controlled freezing or vitrification, *Cryobiology*. 38 (1999) 95–105.
- 489 [68] L.D. Spate, C.N. Murphy, R.S. Prather, High-throughput cryopreservation of in vivo-derived
 490 swine embryos, *PLoS ONE*. 8 (2013) e65545.
- 491 [69] Y. Takagi, K. Mori, M. Tomizawa, T. Takahashi, S. Sugawara, J. Masaki, Development of
 492 bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined
 493 medium, *Theriogenology*. 35 (1991) 1197–1207.
- 494 [70] F.C.K. Tan, K.H. Lee, S.S. Gouk, R. Magalhaes, A. Poonepalli, M.P. Hande, G.S. Dawe, L.L.
 495 Kuleshova, Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres:
 496 comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling freezing protocols, *Cryo*
 497 *Letters*. 28 (2007) 445–460.
- 498 [71] J.G. Thompson, In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a
 499 decade of achievement, *Anim. Reprod. Sci.* 60–61 (2000) 263–275.
- 500 [72] G. Vanroose, A. Van Soom, A. de Kruif, From co-culture to defined medium: state of the art
 501 and practical considerations, *Reprod. Domest. Anim.* 36 (2001) 25–28.
- 502 [73] J.A. Witkowski, W.D. Brighton, Influence of serum on attachment of tissue cells to glass
 503 surfaces, *Experimental Cell Research*. 70 (1972) 41–48.
- 504 [74] World Organisation for Animal Health, Terrestrial Animal Health Code, Office International
 505 Des Epizooties. (2016) 4.7-4.10.
- 506 [75] A.E. Wrathall, Risks of transmission of spongiform encephalopathies by reproductive
 507 technologies in domesticated ruminants, *Livestock Science*. 62 (2000) 287–316.
- 508 [76] L.E. Young, K.D. Sinclair, I. Wilmut, Large offspring syndrome in cattle and sheep, *Rev.*
 509 *Reprod.* 3 (1998) 155–163.
- 510 [77] D. Zander-Fox, M. Lane, H. Hamilton, Slow freezing and vitrification of mouse morula and
 511 early blastocysts, *J Assist Reprod Genet.* 30 (2013) 1091–1098.
- 512 [78] T.M. Zorn, M.A. Pinhal, H.B. Nader, J.J. Carvalho, P.A. Abrahamsohn, C.P. Dietrich,
 513 Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of
 514 pregnancy of the mouse, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)*. 41 (1995) 97–106.
- 515
- 516 Funding: This work was supported by the National Network of Biological Resources Centers CRB-
 517 ANIM (ANR11-INSB-0003).
- 518
- 519 Declarations of interest: none.
- 520

ACCEPTED MANUSCRIPT

521 Table 1. *In vitro* and *in vivo* rabbit embryo development rates after rapid cooling with media
 522 containing animal products (group 1) or chemically defined products (group 2 and group 3).
 523

		Group 1 (0.4 % BSA)	Group 2 (20% Cryo3)	Group 3 (Cryo3)	Control (Fresh)
<i>In vitro</i> development	% Survival	90.8% ^a (168/185)	85.6 % ^a (131/153)	94.9 % ^b (188/198)	
	% Blastocyst	85.1 % ^a (143/168)	77.9 % ^a (102/131)	83.3 % ^a (156/188)	97.5 % ^b (39/40)
	% Expansion*, or Hatching	63.1 % ^a (106/168)	63.4 % ^a (83/131)	58.0% ^a (109/188)	97.5 % ^b (39/40)
<i>In vivo</i> development	% Pregnancy rate	80.0% ^{NS} (24/31)	68.0% ^{NS} (17/24)	95.2 % ^{NS} (20/23)	83.3 % ^{NS} (5/6)
	% Implantation	40.5 % ^{NS} (117/303)	45.9 % ^{NS} (84/183)	44.8% ^{NS} (94/234)	46.9 % ^{NS} (23/49)
	% Live birth	35.6 % ^{NS} (103/303)	35.5 % ^{NS} (65/183)	38.1 % ^{NS} (80/234)	40.8% ^{NS} (20/49)

524 Different letters in the same row indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$). NS
 525 indicates no statistically significant difference was observed.

526 % Survival: number of morphologically intact embryos after freezing per frozen embryos.

527 % Pregnancy rate: number of does positive to pregnancy diagnosis per recipient

528 % Implantation: number of born kits (alive and dead) per transferred embryos on pregnant females

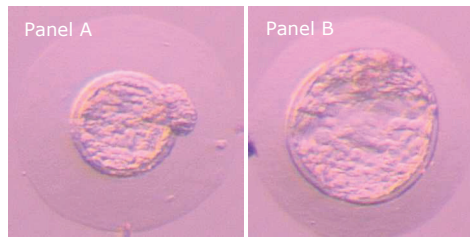
529 % Live birth: number of live-born kits per transferred embryos on pregnant females

530 *Slightly expanded blastocysts with herniation of embryonic cells comprised in this group

531

ACCEPTED MANUSCRIPT

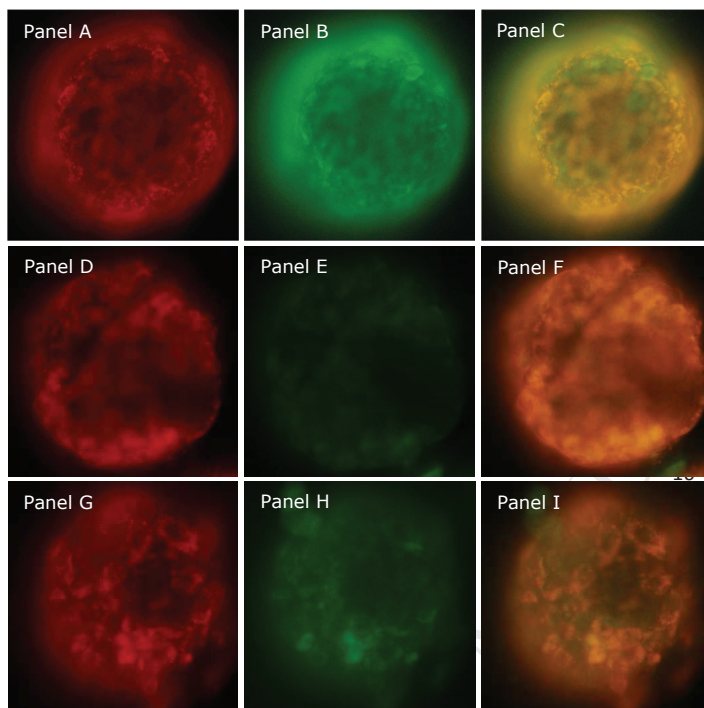
- 1 Figure 1. Stereoscopic pictures of rabbit embryos.



- 2
3 Panel A) A slightly expanded blastocyst with embryonic cell herniation.
4 Panel B) An expanded blastocyst.

1 Figure 2. Epifluorescence photomicrographs of rabbit embryos stained with JC-1.

2



23

24 Figure 2a. A, D, G) Regions of high MMP are indicated by red fluorescence (emission ~590 nm).

25 B, E, H) Depolarized regions are indicated by green fluorescence (emission ~529 nm).

26 C, F, I) Merged images.

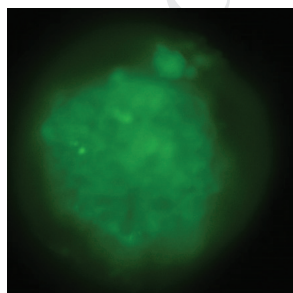
27 A, B, C) Embryo vitrified with a medium containing 0.4% BSA.

28 D, E, F) Embryo vitrified with a medium containing 20% CRYO3.

29 G, H, I) Embryo vitrified with a medium containing 100% CRYO3.

30

31



33

ACCEPTED MANUSCRIPT

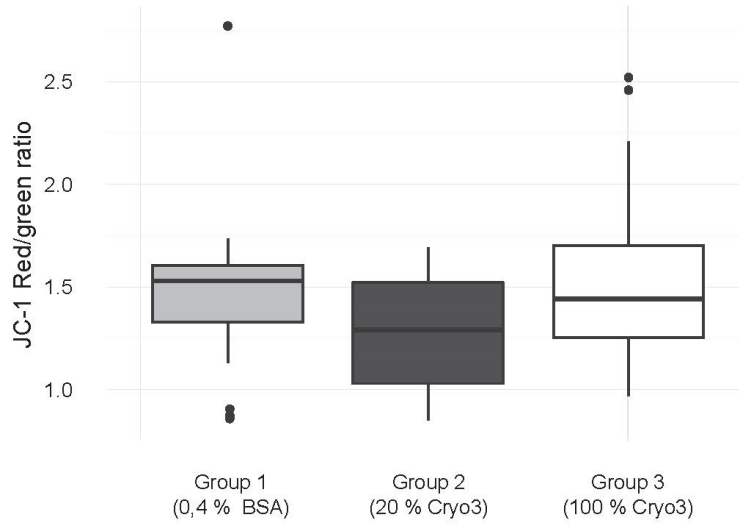
34 Figure 2b. After CCCP control (merged images). No regions of high MMP are visible.

35

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

- 1 Figure 3. JC-1 staining: red/green ratio of cryopreserved expanded or hatching blastocysts vitrified
 2 with media containing animal products (group 1) or chemically defined products (group 2 and group 3).



- 3
 4 Red/green ratio of embryos vitrified with group 1 (n = 31), group 2 (n = 27), or group 3 (n = 31),
 5 obtained with epifluorescence microscopy. No significant difference was observed between groups.
 6

ACCEPTED MANUSCRIPT

Highlights

- Embryo cryopreservation media usually contain animal-derived products.
- These products present an undefined variable composition and a contamination risk.
- We aimed to replace BSA with a synthetic medium in rapid cooling “freezing” media.
- Cryo3 can replace BSA in rabbit embryo rapid cooling “freezing” and warming media.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Annexe 3. Milieux commerciaux les plus utilisés pour la congélation de sperme de ruminants domestiques

Milieu commercialisé	Laboratoire	Espèce	Produit d'origine animale ?	Principal composant	Autres composants	Références
Optidyl®	IMV Technologies	Taureau	Oui	20 % jaune d'œuf ionisé	2,42 g tris*; 1,48 g acide citrique; 1,00 g fructose; 6,4 ml glycérol; 25 mg gentamicine, 50,000 UI pénicilline	[223]
BIOXcell®	IMV Technologies	Ruminants	Non	Lécithine de soja	tris*, acide citrique, sucres, antioxydants, tampons, eau pure, glycérol, et antibiotiques (tylosine, gentamicine, spectinomycine, and lincomycine) (<i>Notice d'emploi IMV Technologies</i>)	[243]
OPTIXcell®	IMV Technologies	Ruminants	Non	Liposomes	Carbohydrate, sels minéraux, tampon, antioxydants, glycérol, phospholipides, eau ultra pure, antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine, Lincomycine et Spectinomycine) (<i>Notice d'emploi IMV Technologies</i>)	[246,251]
Triladyl®	MiniTüb	Ruminants	Oui	20 % de jaune d'œuf frais à ajouter en extemporané	tris*, acide citrique, sucres, tampons, glycérol, eau pure, antibiotiques : Tylosine, Gentamicine, Spectinomycine, Lincomycine (<i>Notice d'emploi Minitüb</i>) 2,42g TRIS, 1,48g acide citrique, 1g fructose, 6,4 ml glycérol, antibiotiques [222]	[222]
Andromed®	MiniTüb	Ruminants	Non	Lécithine de soja	tris*, acide citrique, sucres, antioxydants, tampons, eau pure, glycérol, et antibiotiques (tylosine, gentamicine, spectinomycine, and lincomycine)	[246,529]

*tris : tris-hydroxymethyl-aminomethane

Publications

Valorisations scientifiques

Publications soumises à comité de lecture (Posters et articles)

Gavin-Plagne, L., L. Commin, P. Bruyère, S. Buff, and T. Joly. Comparison between an animal-derived product medium and a chemically defined medium for ram sperm cryopreservation. *Biopreservation and biobanking*. **In Press, 2018**.

<https://doi.org/10.1089/bio.2018.0067>

Gavin-Plagne, L., P. Bodranghien, A. Vachet, L. Commin, S. Buff, and T. Joly. Freezing bull semen in a synthetic medium. *Reproduction, Fertility and Development* 29, no. 1 (January 25, 2017): 134–134. <https://doi.org/10.1071/RDv29n1Ab53>.

Gavin-Plagne, L., Commin L., Mocé E., Viudes-de-Castro M-P., Bruyère P., Joly T., and Buff S. Cryopreservation of Rabbit Sperm in Synthetic Media. *Cryobiology* 71, no. 3 (December 1, 2015): 567. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.10.130>.

Gavin-Plagne L., Commin L., Desnos H., Bonte T., Bruyère P., Buff S., Joly, T. Post-thaw assessment of epididymal rabbit sperm cryopreserved in an animal protein-free extender. *18th International Congress on Animal Reproduction*, 26-30 juin 2016, Tours, France. **137-138**.

Teixeira M., Commin L., **Gavin-Plagne L.**, Bruyère P., Joly T., Buff S. Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium. *Cryobiology*. **In Press, 2018**. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.07.006>

Teixeira M., Commin L., **Gavin-Plagne L.**, Bruyère P., Philibert A., Joly T., Buff S. JC-1 dye is a valuable indicator of embryo's health in rabbits. *Cryobiology*, 24-27 juillet 2016, Ottawa, Canada. **399-443**.

Teixeira M., Commin L., **Gavin-Plagne L.**, Bruyère P., Philibert A., Joly T., Buff S. A chemically defined medium without animal products for rabbit embryo vitrification. *Cryobiology*, 24-27 juillet 2016, Ottawa, Canada.

Teixeira M., Commin L., Desnos H., **Gavin-Plagne L.**, Casarini D., Loiseau C., Bruyère P., Beckers JF., Joly T., Buff S. In vivo ovine embryo production: comparison of two superovulation treatments. *18th International Congress on Animal Reproduction*, 26-30 juin 2016, Tours, France. **499**.

Articles soumis

Gavin-Plagne L., Voisin S., Perold F., Osteil P., Moreira S., Combourieux Q., Saïdou V., Mure M., Louis G., Baudot A., Buff S., Joly T., Afanassieff M. Insight into species preservation: cryobanking of rabbit somatic and pluripotent stem cells.

Gavin-Plagne, L., Boyer L., Baudot A., Teixeira M., Louis G., Commin L, Buff S., and Joly T. Freezing ram sperm in a synthetic and inexpensive medium.

Gavin-Plagne, L., Vachet A., Bodranghien P., Buff S., and Joly T. CRYO3 does not protect bovine sperm during freezing procedure.

Présentation orale

Gavin-Plagne, L., P. Bodranghien, A. Vachet, L. Commin, S. Buff, and T. Joly. Freezing bull semen in a synthetic medium. *Reproduction, Fertility and Development* 29, no. 1 (January 25, 2017): 134–134. <https://doi.org/10.1071/RDv29n1Ab53>.

Gavin-Plagne L., Joly T. Cryopreservation of embryos, sperm and somatic tissues in the rabbit. 6th *Rabbit Biotechnology Meeting & RGB-net Meeting*. 3-4 novembre 2015, Lyon, France.

Valorisations professionnelles

Groupes de travail sur les recherches pour le projet CRB-Anim (<https://www.crb-anim.fr/>) :

Gavin-Plagne L., Joly T. Rapport d'activités sur la cryoconservation de sperme et d'embryons. Jouy-en-Josas, 2016.

Gavin-Plagne L. Progress on animal-free conservation media. Biennial Seminar CRB Anim. Paris, 2017.

Valorisations 'Grand Public'

- Deuxième finaliste du concours « Ma thèse en 180 secondes » pour la finale nationale à l'université Lyon-Saint Etienne, 2017.
- Nuit européenne des chercheurs, Villeurbanne, 2017.

Curriculum vitae



LUCIE GAVIN-PLAGNE

Ingénieur Essai Terrain II

Eligible au statut Jeune Chercheur - Crédit d'Impôt Recherche

PROFIL

Ayant un **bon relationnel**, étant **fiable** et **organisée**, je cherche un poste avec des missions transverses, mêlant technique/scientifique et gestion de projets, sur le terrain et en laboratoire.

CONTACT

<https://orcid.org/0000-0002-7230-2134>

✉ lucie.gp@hotmail.fr

in <http://tinyurl.com/k6je3a7>

INFORMATIONS

Née le 27.11.1992

Française - Néerlandaise

Permis B (2011), véhiculée

LANGUES

Anglais : Bilingue professionnel

Espagnol : Notions

Néerlandais : Notions

COMPÉTENCES



Pack Office
Logiciel statistique R
PAO (InDesign, Illustrator)

Biotechnologies en Reproduction
Culture Cellulaire | Cytométrie en flux
Expérimentation Animale (Concepteur)



INTÉRÊTS



Danse classique
depuis 1998



Guitare classique
depuis 2007



Championnats
de France de
danse sur glace
(1998 - 2006)



Couture depuis
2016

RÉFÉRENCES

Thierry JOLY (Directeur de thèse)

☎ +33 (0) 6 18423936

✉ tjoly@isara.fr

Samuel BUFF (Co-encadrant de thèse)

☎ +33 (0) 6 32630621

✉ samuel.buff@vetagro-sup.fr

Marielle AFANASSIEFF (Co-encadrante de thèse)

☎ +33 (0) 6 75917607

✉ marielle.afanassieff@inserm.fr

EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES

Chargée de projets R&D | Biotechnologies de la Reproduction

2015 - Aujourd'hui || VetAGRO SUP & INSERM 📍 Marcy L'Etoile (69) & Bron (69)

Missions scientifiques :

- Veille technologique et scientifique
- Gestion de projets sur le terrain et en laboratoire
- Expertise dans la collecte, congélation/vitrification, évaluation & transfert de sperme & d'embryons | Culture cellulaire, congélation et évaluation (RT-qPCR) des cellules souches pluripotentes (mammifères : bovin, ovin, etc.)
- Publications & communications (5) dans des journaux & congrès internationaux

Missions transverses :

- Porte-parole scientifique à des congrès pour l'entreprise Stem Alpha (IETS, ISEET 2016)
- Participation à la mise en place du SMQ selon la norme NF S96-900
- Gestion de la Base de Données du CRB CryAnim (espèce lapin)
- Membre du comité d'éthique en expérimentation animale à VetAgro Sup
- Encadrement de stagiaires niveau Master/Ingénieur

Assistante Enseignant - Chercheur | Cryobiologie de cellules germinales

2015 Janvier - Juillet || VetAGRO SUP 📍 Marcy L'Etoile (69)

Sujet de stage : Congélation de semence de lapin en milieux synthétiques

- Présentation d'un poster au congrès international CRYO, 2015, Rèp. Tchèque

Assistante Ingénieur de Recherche | Biotechnologies de la Reproduction

2013 Juillet - Septembre || VetAGRO SUP 📍 Marcy L'Etoile (69)

Sujet de stage : Standardisation des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence (mammifères) par cytométrie en flux

- Rédaction de modes opératoires et création d'une vidéo à but pédagogique

Stages 'ouvrier' dans deux exploitations de type polyculture - élevage bovin

2012 || 📍 Brazey (21)

- Analyse de données agronomiques, zootechniques & de gestion-comptabilité || GAEC DES CHAVANAS

2011 || 📍 Heerlen 🇳🇱

- Participation aux travaux de la ferme || FERME GIELKEN

FORMATION

Doctorat en Cryobiologie de cellules germinales et cellules souches pluripotentes

2015 - 2018 || VetAGRO SUP 📍 Marcy L'Etoile (69)

Sujet de doctorat : Cryoconservation de cellules spermatiques et cellules souches pluripotentes de mammifères en milieu synthétique et chimiquement défini

- 2ème prix régional 'Ma Thèse en 180 secondes' 2017 (Univ. Lyon & St Etienne)
- Animation de Tables Rondes Métiers au sein de l'association BioDocs-Lyon
- Co-Animation d'un workshop au congrès international ICAR, 2016, Tours

Ecole d'ingénieur en Agriculture, Agro-alimentaire & Environnement

2010 - 2015 || ISARA - LYON 📍 Lyon (69)

MSc. Elevage, Santé & Environnement (Mention Très Bien)

Semestre à l'étranger 'MSc. Animal Sciences'

2014 Janvier - Juin || WAGENINGEN UNIVERSITY 📍 Wageningen, Pays-Bas 🇳🇱

Baccalauréat Scientifique (Spécialité Physiques)

2010 || LYCÉE GUSTAVE EIFFEL 📍 Dijon (21)