

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

①1 N° de publication : **2 638 323**
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **88 14107**

⑤1 Int Cl⁵ : A 01 N 1/02 // A 61 B 17/42.

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 28 octobre 1988.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 18 du 4 mai 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *Fu-Nan WANG. — TW.*

⑦2 Inventeur(s) : *Fu-Nan Wang.*

⑦3 Titulaire(s) :

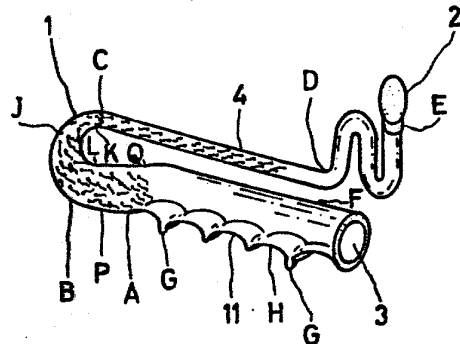
⑦4 Mandataire(s) : *Cabinet Cuer.*

⑤4 Procédé et dispositif pour le traitement du sperme.

⑤7 L'invention concerne un procédé et un dispositif pour le traitement de sperme, notamment pour débarrasser le sperme des microbes et des bactéries qu'il contient, et pour séparer le sperme en spermatozoïdes porteurs du chromosome X et en spermatozoïdes porteurs du chromosome Y.

Le procédé est caractérisé par le fait que l'on place le sperme à traiter dans un tube de séparation 1 contenant un milieu de culture, que l'on fait incubé l'ensemble pendant le temps nécessaire à une migration significative du sperme vers une autre portion du tube de séparation, et que l'on détache cette portion C-D pour l'utilisation ultérieure du sperme qu'elle contient.

Application à l'insémination artificielle.



FR 2 638 323 - A1

D

La présente invention concerne un procédé de traitement de sperme et, en particulier, un procédé permettant de séparer le sperme des microbes et bactéries qu'il contient et de séparer les spermatozoïdes porteurs du chromosome X de ceux porteurs du chromosome Y. L'invention concerne aussi un dispositif pour la mise en oeuvre de ce procédé.

Les procédés modernes pour le traitement de la stérilité et la résolution de divers problèmes gynécologiques comprennent l'insémination artificielle in utero, la fertilisation externe ("bébés éprouvettes"), la transplantation de l'embryon et la transplantation sperme/ovaire dans l'oviducte. Au cours de ces interventions modernes, les échantillons de sperme traité peuvent contenir diverses colonies bactériennes et divers microbes, du fait que la semence brute est contaminée par ceux-ci et que les procédés connus ne permettent pas de séparer les bactéries ou les microbes des échantillons de sperme.

Ces procédés connus de traitement utilisés lors du prélèvement d'échantillons de sperme comprennent les techniques suivantes :

- 1°) Procédé de déplacement ou de migration simple des spermatozoïdes décrit par Makler et autres en 1983.
- 2°) Technique de migration classique.
- 3°) Procédé de déplacement vers le bas.
- 4°) Gradient de percolation discontinue.
- 5°) Procédé de centrifugation utilisé dans l'insémination in utero.

Le tableau de la page 2 montre de manière schématique les résultats produits par ces divers procédés connus en ce qui concerne la concentration du sperme, son taux d'activité, sa morphologie et sa concentration en microbes en partant d'un sperme brut normal. Il indique également dans sa dernière ligne un but visé par la présente invention, qui est d'obtenir un sperme stérile dont le taux d'activité et la morphologie soient améliorés.

Procédé	Concentration en sperme	Taux d'activité (%)	Morphologie (% de la normale)	Concentration en microbes (U.F.C./ml)
Semence brute	Dans la fourchette normale	Dans la fourchette normale	Dans la fourchette normale	1×10^5 (ou plus)
Déplacement simple	↓ ↓ ↓	↑	↑	↓
Migration classique	↓ ↓ ↓	↑	↑	↓
Procédé descendant	↓ ↓	↑	↑	↓
Gradient de percolation discontinue	↓ ↓ ↓ ↓ ↓	↑ ↑	↑ ↑	↓ ↓ ↓
Centrifugation	↑ ↑ ↑	↑	Pas de variation	↑ ↑ ↑
Présent procédé	↓ ↓	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑ ↑	Sans microbes

↑ indique un accroissement proportionnel au nombre de flèches

↓ indique une diminution proportionnelle au nombre de flèches

U.F.C. = Unités de formation de colonies.

D'autre part, on sait que chaque centimètre cube de semence brute de 90% des individus normaux contient approximativement 1×10^8 colonies bactériennes, où Staphylococcus Epidermis est le plus fréquemment rencontré et représente environ 77%, Corynobacterium sp. représente environ 66%, Viridans Streptococci environ 50%, et, en outre, on peut rencontrer diverses bactéries aérobies comme le streptocoque α -hémolytique, Neisseria sp. (et non Nesseria gonorrhoeae), pseudomonas aeruginosa, des diphythéroïdes et diverses bactéries anaérobies comme le peptocoque prévotique, le pepto-streptocoque, etc.

Le tableau de la page 4 suivante montre la contamination bactérienne du sperme brut et du sperme préparé, respectivement non ensemencés et ensemencés par diverses bactéries, lorsqu'ils ont été traités par les cinq procédés classiques spécifiés ci-avant et numérotés de 1 à 5. La dernière colonne indique un but visé et atteint par le procédé selon la présente invention.

Ce tableau de la page 4 montre qu'il est difficile de recueillir des échantillons de sperme qui ne contiennent pas de microbes. C'est pour cette raison que les médecins ajoutent des antibiotiques aux échantillons de sperme avant de pratiquer des inséminations in utero ou des transferts de gamètes intra-fallopiaux. Il est exact que les antibiotiques tuent les microbes et les bactéries, mais les microbes tués ou ayant achevé leur cycle de vie deviennent des résidus et dégagent des endotoxines qui sont nuisibles pour le sperme, les ovules et les embryons, et entraînent l'échec de l'intervention ou augmentent le risque d'infection pour les femmes traitées pour stérilité en causant des complications cliniques ou subcliniques.

Aussi, un but de la présente invention est de proposer un procédé de séparation qui produise du sperme exempt de microbes et de bactéries, sans qu'il soit nécessaire de faire appel à des antibiotiques.

Echantillon	Procédé 1	Procédé 2	Procédé 3	Procédé 4	Procédé 5	Invention
Semence brute	Bactéries existantes en quantité réduite	Bactéries existantes en quantité réduite	Bactéries existantes en quantité réduite	Bactéries existantes en quantité apparemment réduite	Bactéries existantes en quantité fortement augmentée	Bactéries inexistantes
Semence préparée	Bactéries existantes en quantité réduite	Bactéries existantes en quantité réduite	Bactéries existantes en quantité réduite	Bactéries existantes en quantité réduite	Bactéries existantes en quantité réduite	Bactéries inexistantes
Semence brute ensemencée par E. Coli	E. Coli encore existants	E. Coli encore existants	E. Coli encore existants	E. Coli encore existants	E. Coli encore existants	E. Coli inexistantes
Semence brute ensemencée par Staphylococcus Aureus	S. Aureus encore existants	S. Aureus encore existants	S. Aureus encore existants	S. Aureus encore existants	S. Aureus encore existants	S. Aureus inexistantes
Semence brute ensemencée par Neisseria Gonorrhoeae	Neisseria Gonorrh. encore existants	Neisseria Gonorrh. encore existants	Neisseria Gonorrh. encore existants	Neisseria Gonorrh. encore existants	Neisseria Gonorrh. encore existants	Neisseria Gonorrh. inexistantes
Semence préparée ensemencée par E. Coli	E. Coli encore existants	E. Coli encore existants	E. Coli encore existants	E. Coli encore existants	E. Coli encore existants	E. Coli inexistantes
Semence préparée ensemencée par Staphylococcus Aureus	S. Aureus encore existants	S. Aureus encore existants	S. Aureus encore existants	S. Aureus encore existants	S. Aureus encore existants	S. Aureus inexistantes
Semence préparée ensemencée par Neisseria Gonorrhoeae	Neisseria Gonorrh. encore existants	Neisseria Gonorrh. encore existants	Neisseria Gonorrh. encore existants	Neisseria Gonorrh. encore existants	Neisseria Gonorrh. encore existants	Neisseria Gonorrh. inexistantes

Un autre but de l'invention est de fournir un tel procédé qui, en outre, soit susceptible de séparer les spermatozoïdes porteurs du chromosome X de ceux qui sont porteurs du chromosome Y ou, plus brièvement, de séparer le sperme X du sperme Y.

Un but supplémentaire est de réaliser un procédé de ce genre qui soit particulièrement apte à être utilisé pour des inséminations artificielles.

Selon l'invention, ces buts sont atteints grâce un procédé du genre spécifié plus haut qui est caractérisé par le fait que l'on place le sperme à traiter dans un tube de séparation contenant un milieu de culture, que l'on fait incuber l'ensemble pendant le temps nécessaire à une migration significative du sperme vers une autre portion du tube de séparation, et que l'on détache cette portion pour l'utilisation ultérieure du sperme qu'elle contient.

Grâce à ce procédé, on peut obtenir des échantillons de sperme exempts de germes sans addition d'antibiotiques.

Un objet de la présente invention est, d'autre part, un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé spécifié ci-dessus qui permette d'en obtenir tous les effets et qui soit simple d'emploi

Avantageusement, un tel dispositif est caractérisé par le fait que chaque portion à détacher du tube de séparation est délimitée par des lignes de cassure préférentielle tracées annulairement au coupe-verre.

Il suffit alors de casser le tube de séparation aux endroits marqués au préalable pour recueillir le sperme exempt de germes ou le sperme enrichi en chromosomes Y.

Selon une première forme de réalisation, ce tube de séparation présente la forme générale d'un U couché dans un plan vertical, avec une branche inférieure sensiblement horizontale, ouverte à une extrémité et se rétrécissant à l'autre pour se raccorder à la branche supérieure, le point

où le sperme est déposé au début du traitement étant situé à la base du début du coude qui raccorde la branche inférieure à la branche supérieure, et la portion du tube que l'on détache après le traitement et qui contient le sperme exempt
5 de germes ou enrichi en chromosomes Y, s'étendant sur la majeure partie de sa branche supérieure.

Dans un tel tube, le sperme se déplace, par exemple, de droite à gauche, puis de bas en haut après être passé par deux coudes, puis de gauche à droite, ce qui dilue les
10 résidus et les substances chimiques nuisibles.

Un tel tube en U couché vertical permet en outre des observations au microscope qui permettent de suivre l'évolution de la quantité de sperme présente dans la partie du tube à détacher si le fond de la branche inférieure du tube de séparation comporte au moins une excroissance en demi-
15 lune qui s'étend dans le sens longitudinal, et si la branche supérieure de ce tube, au droit de chacune de ces excroissances en demi-lune, comporte au moins une sphère d'observation au microscope.

Selon une autre forme de réalisation de ce dispositif, son tube de séparation est un tube droit, rempli initialement de milieu de culture, qui est fermé à son extrémité supérieure, qui comprend des moyens pour l'accro-
20 cher verticalement dans un autre tube contenant le sperme à traiter, son extrémité inférieure plongeant dans ce sperme, et dont la portion détachable, destinée à recueillir le sperme exempt de microbes ou enrichi en chromosomes Y, s'étend sensiblement en son milieu.
25

Selon une forme de réalisation supplémentaire du dispositif en question, ledit tube de séparation est un tube droit, rempli initialement de milieu de culture, qui est fermé à son extrémité supérieure par une poire en caoutchouc ou similaire, qui est solidaire d'un disque annulaire percé de trous au moyen duquel il peut être posé verticalement sur
30 le bord supérieur d'un autre tube contenant le sperme à traiter, son extrémité inférieure plongeant dans ce sperme,
35

et qui comprend au moins une portion détachable s'étendant sensiblement en son milieu.

- La figure 1 représente une vue en perspective d'un tube de séparation en U couché selon la présente invention ;

5 - La figure 1A montre une variante de l'objet de la figure 1 ;

- La figure 2 montre, également en vue en perspective, un tube de séparation droit selon la présente invention;

10 - La figure 3 représente l'objet de la figure 2 en fonctionnement ;

- Les figures 4 et 5 sont analogues, respectivement, aux figures 2 et 3, mais elles représentent un tube de séparation selon l'invention du type à quatre trous ; et :

15 - La figure 6 représente, toujours en vue en perspective, une autre variante du tube de séparation selon l'invention.

20 Comme on le voit sur la figure 1, le tube de séparation en forme de U couché vertical 1 est composé d'un tube en verre terminé à sa partie supérieure par une poire 2 en caoutchouc ou en caoutchouc aux silicones. Sa partie inférieure comprend au moins une partie en verre en forme de croissant 11 qui fait saillie à l'intérieur de la paroi intérieure du tube.

25 Le reste de ce tube de séparation est un tube creux 3 contenant un milieu de culture liquide pour le sperme. Ce milieu de culture peut être du milieu B.W.W. ou du milieu de Ham F-10 avec 10% de sérum humain prélevé avant l'ovulation ou prélevé sur le cordon ombilical. Ce milieu est ajouté en A et la semence brute est placée en P. Le point H du verre convexe du croissant 11 peut empêcher le liquide de refluer et il réfléchit la lumière pour rendre le niveau supérieur 4 du tube en U couché plus clair lorsqu'on examine le sperme au microscope.

35 Dans la partie F, le diamètre intérieur du tube est de 6 mm. Dans l'espace collecteur d'air, la distance entre

les points Q et A est également de 6 mm. Le tube s'incline doucement à partir du point Q pour devenir plus étroit, et il s'incurve vers le haut pour former une zone collectrice d'air. La partie arrière du tube est horizontale et s'étend en U jusqu'au point D. Le diamètre intérieur en D est égal à 1 mm. Le tube peut être gravé annulairement au moyen d'un outil de découpe du verre en C, D et J pour faciliter sa cassure lors du processus clinique de prélèvement du sperme choisi.

Les capacités des divers segments du tube sont environ les suivantes : P-C : 0,15 ml ; C-D : 0,12 ml ; D-E : 0,06 ml ; A-P : 0,05 ml. La capacité de la poire en caoutchouc est de 0,5 ml. La longueur de chaque segment est la suivante : A-B : 1 cm ; Q-L : 1 cm ; B-C (surface extérieure) : 2 cm ; K-L : 1 cm (fourchette : 0,5 à 1 cm) ; C-D : 6 cm ; D-E : 4 cm ; A-D : 9 cm. Les points G comportent quatre pieds qui permettent au tube de reposer de manière stable.

La partie en col-de-cygne du tube comprise entre les points D et E est destinée à le protéger contre les erreurs opératoires et la contamination par l'air. Le sperme stérile peut être récolté pour son traitement ultérieur après une incubation de 30 minutes à une heure. Le tube préparé doit être incubé dans un incubateur à 37°C avec une teneur élevée en humidité (96% et plus) et 5% de gaz carbonique. La concentration du sperme sur le segment C-D doit être égale à 20-30x10⁶ ou plus. La poire en caoutchouc peut empêcher le milieu de culture de refluer et elle peut aussi exprimer des échantillons de sperme contenus dans le milieu de culture.

Lorsque de la semence brute est placée dans le tube à l'endroit destiné aux échantillons, des bulles d'air peuvent parfois être présentes. C'est pour cela que la zone collectrice d'air au point Q peut empêcher les bulles d'air de se déplacer et d'entraîner des bactéries vers le segment C-D. Le point P est la zone destinée aux échantillons de sperme. Du fait que la densité de ces derniers est supé-

rieure à celles du milieu de culture, la semence mise en place se situe de manière stable au fond du tube entre les points A et B.

Le tube à extrémité en col-de-cygne des figures 2 et 3 est également en verre. Son diamètre intérieur est égal à 3,5 mm, et l'épaisseur de sa paroi est inférieure à 0,5 mm. La longueur de ses divers segments est la suivante : A-B : 2 mm ; B-C : 15 mm ; C-D : 25 mm. Leur capacité est environ la suivante : A-B : 0,02 ml ; B-C : 0,15 ml ; C-D : 0,25 ml ; D-E : 0,25 ml. Du point E jusqu'à son extrémité, le tube de séparation est plein. Sa capacité totale est de 0,65 ml environ. Ce tube est gravé annulairement au découpeur de verre en C et D afin de pouvoir détacher facilement les sections C-D et D-E qui contiennent le milieu de culture et les spécimens de sperme choisis.

Lors du fonctionnement, on verse un milieu de culture dans le tube à partir de son ouverture A. On place un échantillon de sperme convenable dans un tube en verre borosilicaté de 75 mm de longueur et de 22 mm de diamètre intérieur. On suspend ensuite le tube en col-de-cygne sur l'ouverture supérieure du tube en verre borosilicaté, la section inférieure A-B plongeant dans la partie centrale de l'échantillon de semence. L'incubateur est thermostaté à 37°C avec une humidité élevée et 5% de gaz carbonique. On fait incuber le tube préparé pendant une heure.

Après cette incubation, on coupe le tube en C pour séparer le segment C-D que l'on appelle "n°1", et le segment D-E appelé "n°2". La concentration du segment n°1 est de 6 à 12x10⁶/ml ; sa capacité étant de 0,25 ml, ce segment n°1 contient environ 20x10⁶ spermatozoïdes. Le segment n°2 en contient environ 75x10⁶. Les deux segments n°1 et n°2 ne contiennent pas de bactéries. L'échantillon du segment n°1 est utilisable pour la fertilisation de 10 à 40 ovules, la moyenne étant de 25 ovules environ. L'échantillon du segment n°2 est utilisable pour la fertilisation de 3 à 12 ovules, la moyenne étant de 7 ovules environ.

Le tube de séparation à quatre trous des figures 4 et 5 comprend un tube en verre et une poire en caoutchouc, le diamètre intérieur du tube étant de 3,5 mm environ, et l'épaisseur de sa paroi étant inférieure à 0,5 mm. La longueur de ses divers segments est la suivante : A-B : 2 mm ; A-C : 15 mm ; C-D : 25 mm ; D-E : 25 mm ; E-F : 7 mm ; H-J : 15 mm ; A-F : 72 mm ; longueur totale du tube : 90 mm. L'épaisseur de la partie G est égale à 3 mm et son diamètre à 25 mm, le diamètre de chaque trou H de la partie G étant égal à 2 mm.

La capacité de chaque segment est environ la suivante : A-B : 0,02 ml ; A-C : 0,15 ml ; C-D : 0,25 ml ; D-E : 0,25 ml ; E-F : 0,07 ml ; F-J : 0,18 ml ; A-F : 0,72 ml. La capacité de la poire en caoutchouc est égale à 0,65 ml environ qui est aussi la capacité du tube entre le point A et le point E.

Les quatre trous H de la partie G permettent au gaz carbonique de pénétrer dans le tube contenant l'échantillon de semence au cours de l'incubation. Le sperme doit être alimenté en dextrose, en acides aminés et en gaz carbonique pour recevoir de l'énergie. La paroi du tube doit être gravée annulairement au découpeur de verre en C pour pouvoir casser facilement le tube lorsque l'on recueille le segment A-G. La poire en caoutchouc est destinée à aspirer le milieu de culture liquide pour l'échantillon de semence des segments C-D et D-E.

Du fait que la capacité de la poire en caoutchouc est de 0,65 ml, et donc égale à celle du segment compris entre les points A et E, lorsque l'on aspire du milieu de culture destiné à la semence depuis l'ouverture A du tube de séparation, le liquide monte jusqu'au point E. Lors du fonctionnement, on place du sperme au fond d'un tube en verre borosilicaté du 75 mm de long et de 22 mm de diamètre intérieur. On place ensuite le tube de séparation à quatre trous dans ce tube en verre borosilicaté, la partie G couvrant l'ouverture de ce dernier, et la partie avant du

tube de séparation plongeant dans la partie centrale de l'échantillon de sperme du point A jusqu'au point B.

On met alors les deux tubes dans un incubateur à taux d'humidité élevé avec 5% de gaz carbonique, et on
5 laisse incuber pendant une heure pour permettre au sperme de monter. Après cette incubation, on coupe le tube en C et on exprime le milieu liquide des segments C-D et D-E, lesquels sont respectivement numérotés 3 et 4. Les segments n°3 et
10 n°4 sont respectivement identiques aux segments n°1 et n°2 décrits ci-avant. Tous ces segments ne contiennent pas de microbes ou de résidus de sperme, et aucun antibiotique n'est nécessaire. Le sperme obtenu est pur et il convient parfaitement à la fertilisation.

Ce qui vient d'être décrit concerne la séparation du
15 sperme et des microbes. Le tube en verre de la figure 1 est aussi utilisable pour la séparation des chromosomes X et Y du sperme.

Du fait que la taille du chromosome Y du sperme est environ 1/6 de celle du chromosome X, le chromosome Y est
20 nettement plus petit et plus léger que le chromosome X. La tête du spermatozoïde X est grande et elle comporte un nucléole circulaire. La tête du spermatozoïde Y est petite et elle résiste mieux aux solutions alcalines que le spermatozoïde X. Le sperme Y présente un taux de survie supérieur
25 dans un milieu faiblement alcalin à pH relativement élevé. Dans un tel milieu, et pour une durée déterminée, le sperme Y peut normalement se déplacer sur une distance supérieure au sperme X. Pour cette raison, plus le tube de séparation est long, meilleure est la séparation réalisée du sperme X
30 et du sperme Y. Ceci explique pourquoi on recueille plus de sperme Y à l'extrémité arrière du tube de séparation.

Pour séparer le sperme X du sperme Y en utilisant le dispositif de la figure 1, on commence par ajouter un milieu faiblement alcalin dont la viscosité est faible dans le tube
35 creux jusqu'au niveau A. Le milieu adopté peut être le milieu B.W.W. ou le milieu de Ham F-10 avec 10% de sérum

humain recueilli avant l'ovulation ou prélevé sur le cordon ombilical, et on ajuste le milieu à pH 8,0 avant l'emploi.

Après cela, on place la semence brute qui contient originairement des microbes au point P de la zone destinée à l'échantillon de semence. La partie H est destinée à éviter le reflux ou le débordement du milieu liquide. Le diamètre intérieur du tube est égal à 6 mm, sa forme et ses dimensions étant celles décrites plus haut au sujet de la figure 1. Le sperme de l'échantillon de semence n'a besoin que d'une heure à une heure et demie pour se déplacer jusqu'au milieu de culture. Lorsque ce processus est achevé, le rapport du sperme Y au sperme X recueilli à l'extrémité arrière du segment C-D est compris entre 4 et 5 environ.

Pour résumer, le tableau suivant montre les avantages du procédé selon l'invention, ainsi que ses différences avec les techniques existantes.

Procédé	Procédé de l'invention	Procédé classique
1. Milieu de culture.	Milieu de culture à faible viscosité.	Albumine.
2. Antibiotique.	Inutile.	Nécessaire ou devrait être utilisé.
3. Principes de base.	<ul style="list-style-type: none"> a) Application du procédé de séparation sperme/germes. b) Technique de migration multi-directionnelle. c) Technique de migration longue distance. d) Tube de séparation spécial nécessaire. e) Application de l'hydrodynamique et de l'équation de Bernouilli. 	<ul style="list-style-type: none"> a) Absence du principe de traitement rendant le sperme exempt de germes. b) Technique de migration uni-directionnelle. c) Technique de migration courte distance. d) Pas de tube de séparation spécial nécessaire. e) Théorie de l'hydrodynamique inutile.

4. Direction de migration.	De droite à gauche, puis de bas en haut, puis de gauche à droite, horizontalement. Passage par deux coudes.	Migration vers le bas ou selon une seule direction. Pas de coudes.
5. Tube de séparation.	Fait sur mesure pour le présent procédé.	Tube de centrifugeuse ou tube à essais classique.
6. Longueur du tube de séparation.	Long.	Court.
7. Calibre du tube de séparation.	Fin et se rétrécissant.	Gros et constant.
8. Position du tube de séparation.	Horizontale. Pas de support nécessaire.	Verticale. Support nécessaire.
9. Rupture du tube pour recueillir l'échantillon voulu.	Oui. Rupture facile.	Non.
10. Possibilité d'examen au microscope avant le prélèvement des échantillons.	Oui. Examen parfait.	Non. Inapplicable.
11. Distance de migration du sperme pendant la séparation.	9 cm ou plus.	Environ 3 cm seulement.
12. Longueur du tube de séparation.	Peut être choisie en fonction de l'échantillon de semence brute et en accord avec la physiologie.	Longueur fixe.
13. Procédé de prélèvement.	Utilisable pour l'insémination d'irecte in utero.	Procédé de suspension nécessaire. Non utilisable pour l'insémination directe in utero.

- | | | |
|---|--|--|
| 14. Contamination au cours du processus par des bactéries existant au préalable. | Non, car le tube doit être brisé par portions et la viscosité du milieu liquide est faible. Le sperme placé au fond du tube ne transporte pas de microbes. | Oui, par courant de convection. La quantité de bactéries correspond à la quantité initialement présente dans le sperme brut, et elle ne peut pas être éliminée par suspension. |
| 15. Existence de microbes ou de bactéries dans l'échantillon de sperme après la séparation. | Non. | Oui. Les antibiotiques ne peuvent pas garantir une élimination complète des microbes et des bactéries. |
| 16. Existence de toxines dans l'échantillon de sperme sélectionné. | Non. | Les bactéries tuées par l'antibiotique dégagent des substances toxiques. |
| 17. Durée de séparation. | Courte. | Longue. |
| 18. Effet. | Excellent. | Bon. |
| 19. Etat du patient après l'intervention. | a) Peu de cas de maux de ventre.
b) Pas de péritonite pelvienne. | a) Maux de ventre fréquemment rencontrés.
b) Péritonite pelvienne fréquente, généralement accompagnée de frissons et de pyrexie. |
| 20. Point faible. | Néant. | Quantité de sperme prélevée souvent insuffisante. |

5 Dans sa forme de réalisation représentée sur la figure 6, le fond 3 du tube de séparation 1 selon la présente invention comprend une pluralité de creux concaves 5 qui se présentent comme des lentilles convexes lorsqu'on les regarde depuis le haut.

Le tube de séparation 1 est un tube creux dont le fond est plus large et qui se rétrécit en tournant vers le

haut avec un calibre moindre en proportion. Ce tube comprend aussi une sphère 6 dans sa partie supérieure, cette sphère étant disposée à la verticale des lentilles convexes inférieures formées par les creux concaves 5, de sorte que la lumière peut être focalisée sur le milieu liquide avec l'effet de lentilles convexes lors de l'observation au microscope.

La partie supérieure 4 du tube de séparation 1 comporte une portion horizontale et une poire de caoutchouc 2 est montée sur son extrémité coudée. Des ovaires sont placés au préalable dans la sphère 6, et, lorsque le sperme se déplace dans le tube coudé, il peut fertiliser les ovaires de la sphère 6 pour réaliser une insémination artificielle in vitro.

Tout ovaire inséminé voit débiter le processus de division cellulaire dans la sphère 6, et le praticien peut utiliser un outil de découpage du verre pour recueillir l'embryon de l'ovaire inséminé en vue de le transplanter dans l'utérus d'une femme où se poursuit le processus de la conception.

Le procédé d'insémination artificielle appliqué dans la présente forme de réalisation préférée est mis en oeuvre de la manière décrite ci-avant, et il doit comprendre une phase d'incubation à 37°C dans un incubateur à teneur élevée en humidité contenant 5% de gaz carbonique.

- REVENDICATIONS -

1. Procédé de traitement de sperme, caractérisé par le fait que l'on place le sperme à traiter dans un tube de séparation contenant un milieu de culture, que l'on fait incuber l'ensemble pendant le temps nécessaire à une migration significative du sperme vers une autre portion du tube de séparation, et que l'on détache cette portion pour l'utilisation ultérieure du sperme qu'elle contient.
5
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'en vue de la séparation du sperme et des microbes, ledit milieu de culture est choisi dans le groupe comprenant le milieu B.W.W. et le milieu F-10 de Ham, et qu'il est additionné de 10% environ de sérum humain.
10
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'en vue de la séparation des spermatozoïdes porteurs du chromosome X et de ceux porteurs du chromosome Y, ledit milieu de culture est faiblement alcalin et à faible viscosité, et que le sperme brut peut être préparé au préalable en le mélangeant à un milieu de culture liquide dans un rapport en volume de l'ordre de 1 à 3, en agitant ce mélange, en le soumettant à une centrifugation, et en séparant le sperme ainsi traité.
15
20
4. Dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que chaque portion à détacher (C-D ; D-E) dudit tube de séparation (1) est délimitée par des lignes de cassure préférentielle tracées annulairement au coupe-verre.
25
5. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé par le fait que ledit tube de séparation (1) présente la forme générale d'un U couché dans un plan vertical, avec une branche inférieure (F) sensiblement horizontale, ouverte à une extrémité et se rétrécissant à l'autre pour se raccorder à la branche supérieure (4), le point (P) où le sperme est déposé au début du traitement étant situé à la base du début
30

du coude qui raccorde la branche inférieure (F) à la branche supérieure (4), et la portion (C-D) dudit tube (1) à détacher après le traitement s'étendant sur la majeure partie de ladite branche supérieure (4).

- 5 6. Dispositif selon la revendication 5, caractérisé par le fait que la branche supérieure (4) dudit tube de séparation (1) se termine, du côté opposé au coude (A-C) de ce dernier, par un col-de-cygne (D-E) fermé par une poire en caoutchouc (2) ou similaire.
- 10 7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5 et 6, caractérisé par le fait que le fond de la branche inférieure (F) dudit tube de séparation (1) comporte au moins une excroissance en demi-lune (11) qui s'étend dans le sens longitudinal et/ou des pieds de support (G).
- 15 8. Dispositif selon la revendication 7, caractérisé par le fait que la branche supérieure (4) dudit tube de séparation (1), au droit de chacune desdites excroissances en demi-lune (11), comporte au moins une sphère (6) d'observation au microscope.
- 20 9. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé par le fait que ledit tube de séparation est un tube droit, rempli initialement de milieu de culture, qui est fermé à son extrémité supérieure (E), qui comprend des moyens pour l'accrocher verticalement dans un autre tube contenant le sperme à traiter, son extrémité inférieure plongeant dans ce sperme, et dont la portion détachable (C-D) s'étend sensiblement en son milieu.
- 25 10. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé par le fait que ledit tube de séparation est un tube droit, rempli initialement de milieu de culture, qui est fermé à son extrémité supérieure (J) par une poire en caoutchouc ou similaire, qui est solidaire d'un disque annulaire (G) percé de trous (H) au moyen duquel il peut être posé verticalement sur le bord supérieur d'un autre tube contenant le sperme à traiter, son extrémité inférieure plongeant dans ce sperme.
- 30
- 35

et qui comprend au moins une portion détachable (C-D ; D-E)
s'étendant sensiblement en son milieu.

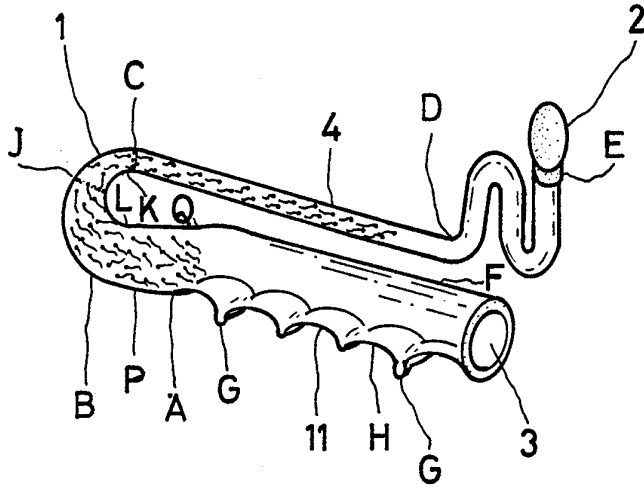


Fig. 1

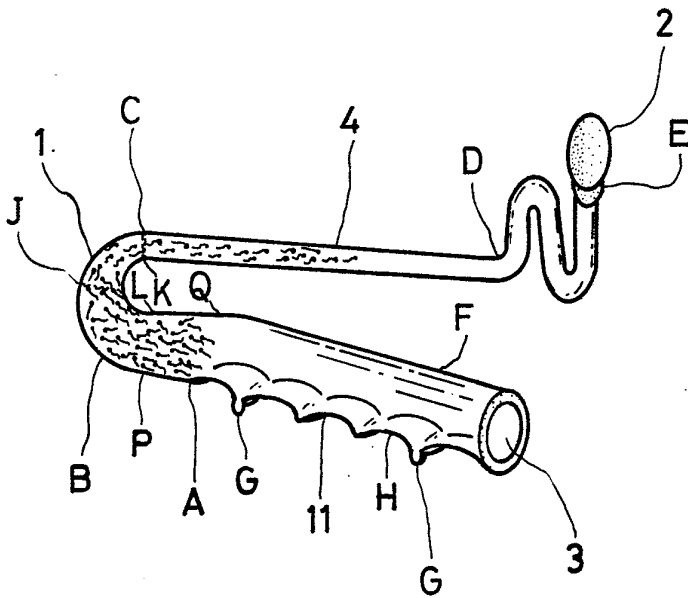


Fig. 1A

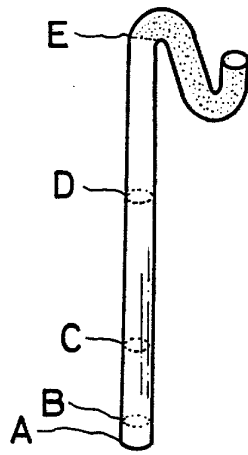


Fig. 2

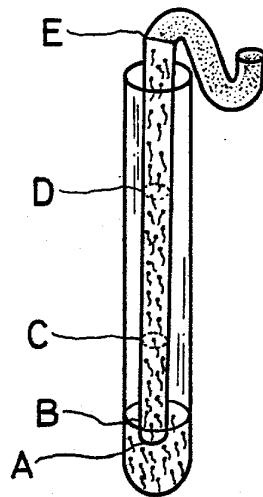


Fig. 3

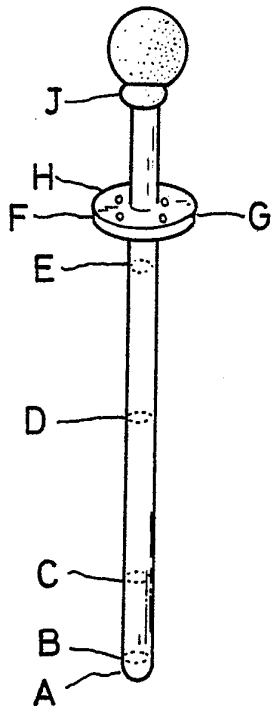


Fig.5

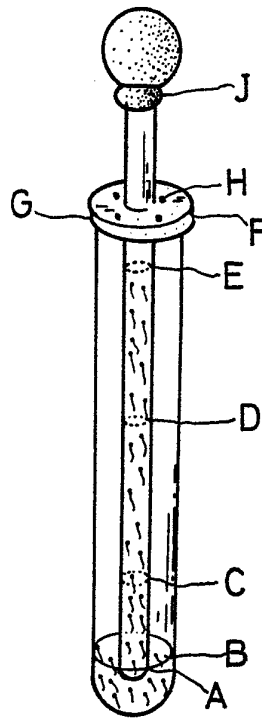


Fig4

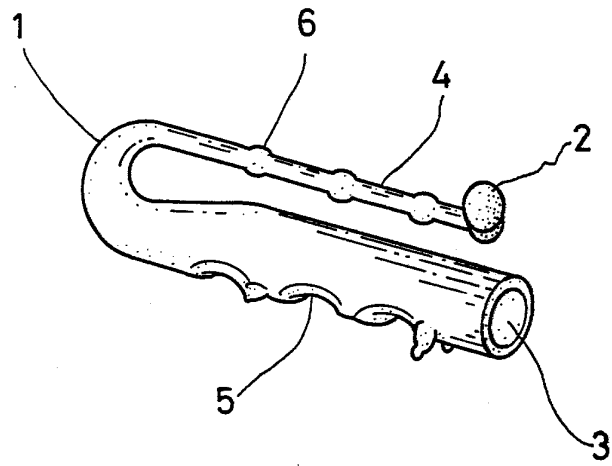


Fig. 6