



(72) SAINT-RAMON, JEAN-GERARD, FR

(72) DESHERCES, SERGE, FR

(72) DECUADRO-HANSEN, GUSTAVO, FR

(71) IMV TECHNOLOGIES, FR

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> A01N 1/02, A61K 35/52

(30) 1999/05/14 (99 06 177) FR

(54) **DILUEUR POUR LA CRYOCONSERVATION DE  
SPERMATOZOÏDES DE BOVINS**

(54) **EXTENDER FOR THE CRYOPRESERVATION OF BOVINE  
SEMEN**

(57) Dilueur pour la cryoconservation de spermatozoïdes de bovins comprenant au moins un phospholipide, au moins une vitamine liposoluble accompagnée d'un émulsifiant, au moins un agent antioxydant et au moins un polyol.

ABREGE

Dilueur pour la cryoconservation de spermatozoïdes de bovins comprenant au moins un phospholipide, au moins une vitamine liposoluble accompagnée d'un émulsifiant, au moins un agent antioxydant et au moins un polyol.

"Dilueur pour la cryoconservation de spermatozoïdes de bovins"

L'invention se rapporte à un dilueur pour la cryoconservation de spermatozoïdes de bovins. Plus précisément, l'invention concerne un milieu dilueur aqueux ne contenant pas de substances d'origine animale et susceptible d'être conservé prêt à l'emploi sur des périodes prolongées.

5 On connaît des dilueurs pour la cryoconservation de spermatozoïdes de bovins. Le FR-B-2 720 407 de la Demanderesse décrit un tel dilueur qui contient des agents de nutrition, des tampons et des sels minéraux ainsi qu'un produit protecteur constitué de lécithine de soja.

10 Le dilueur décrit dans le brevet précité est destiné à diluer de la semence bovine et à la congeler pour une utilisation ultérieure. C'est une démarche essentiellement "sanitaire". Ce dilueur donne une relative satisfaction.

Il est facile à préparer, et est très clair. L'absence de produits d'origine animale garantit l'absence de tout agent d'infection.

15 Cependant, la question de l'efficacité biologique du produit n'avait pas été soulevée. L'efficacité dans les gammes de concentration utilisées auparavant ne permet pas de travailler avec la souplesse que l'on doit avoir dans un centre d'insémination.

En effet, à présent on désire optimiser la production de semence, c'est-à-dire, on souhaite produire un nombre important de doses avec une concentration minimale de spermatozoïdes dans une paillette.

20 Dans des tests in vivo, avec une concentration très basse de spermatozoïdes dans la paillette, la performance du dilueur du FR-B-2 720 407 n'a pas été excellente.

Un objet de la présente invention est de fournir un dilueur pour la cryoconservation de spermatozoïdes de bovins ayant des résultats in vivo améliorés.

25 Un autre objet de l'invention est de fournir un tel dilueur conduisant à une survie des spermatozoïdes satisfaisante à basse concentration.

La présente invention fournit un dilueur répondant aux objets ci-dessus.

Le dilueur pour la cryoconservation de spermatozoïdes de bovins de la présente invention comprend au moins un phospholipide, au moins une vitamine liposoluble accompagnée d'un émulsifiant, au moins un agent antioxydant et au moins un polyol.

30 La vitamine est par exemple la vitamine A.

La vitamine est accompagnée d'un émulsifiant, par exemple le monooléate de sorbitane commercialisé sous l'appellation Tween 80.

L'agent antioxydant peut être un acide aminé ayant des propriétés antioxydantes, par exemple, la taurine et la glycine.

L'agent antioxydant peut aussi être un peptide antioxydant, par exemple du glutathion réduit.

5 Le dilueur de la présente invention peut contenir en outre un stérol, notamment du cholestérol.

Dans le cas où un stérol est présent dans le dilueur, celui-ci contiendra avantageusement des cyclodextrines qui le solubilisent en milieu aqueux.

10 Le dilueur de la présente invention peut également contenir en outre des sels et des carbohydrates.

Les carbohydrates sont par exemple le glucose, le fructose, le lactose.

Les sels sont notamment des tampons, par exemple la triméthylolméthylamine, ce tampon étant dénommé habituellement Tampon Tris ou, simplement, Tris.

15 Le dilueur de l'invention contient une dose efficace d'au moins un polyol apte à inhiber la formation de cristaux de glace. Le polyol sera avantageusement du glycérol.

Pour la préparation des dilueurs selon l'invention, on effectue les étapes suivantes:

a) préparation d'une dispersion d'au moins un phospholipide sous forme de particules dans au moins un polyol à une température suffisante;

20 b) agitation de la dispersion de l'étape a) de façon à microniser lesdites particules de phospholipide;

c) repos de la dispersion obtenue dans l'étape b) pendant une durée d'au moins environ 12 heures de façon à atteindre une stabilité de l'émulsion obtenue, c'est-à-dire sans séparation de phases, conduisant à une préparation, dénommée préparation de l'étape c);

25 d) préparation d'une phase aqueuse comprenant au moins un acide aminé ayant des propriétés antioxydantes, au moins un peptide antioxydant et au moins une vitamine, conduisant à une phase, dénommée phase aqueuse de l'étape d);

e) réunion de la préparation de l'étape c) et de la phase aqueuse de l'étape d), conduisant à une préparation, dénommée préparation de l'étape e);

30 f) stérilisation de la préparation de l'étape e).

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la stérilisation de l'étape f) est effectuée par rayonnement ionisant dans une fourchette de dose d'irradiation d'environ 5 à environ 20 Kgy, de préférence d'environ 15 à environ 20 Kgy .

Parmi les techniques pour obtenir la dispersion de l'étape a), on peut utiliser des disperseurs mécaniques et des émulsionneurs qui agissent par voie de pression.

Pour obtenir une émulsion stable dans l'étape c), il est nécessaire de laisser reposer la dispersion pendant au moins 12 heures.

5 De préférence, le dilueur de l'invention est formulé avec une quantité d'eau réduite, et on le dilue pour l'emploi avec de l'eau stérile.

Au moment de son utilisation, le dilueur contient avantageusement un agent antibiotique. Toutefois, si l'agent antibiotique est ajouté au dilueur lors de sa préparation, il peut perdre son efficacité lors de l'étape de stérilisation.

10 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, l'agent antibiotique est ajouté extratemporanément au moment de l'utilisation.

Dans ce mode de réalisation, le dilueur sans antibiotique est avantageusement contenu dans un récipient fermé par un bouchon. Par exemple, l'agent antibiotique sous forme de poudre est présent dans le bouchon et est libéré dans le dilueur en exerçant une pression sur ledit bouchon.

15 L'agent antibiotique est par exemple de la gentamycine sous forme de sulfate.

Typiquement, le dilueur de l'invention contiendra les phospholipides suivants dans les proportions pondérales indiquées ci-dessous:

20 "Lécithine 100" ayant les proportions pondérales indiquées des phospholipides suivants:

- phosphatidylcholine 20-24 %
- phosphatidyléthanolamine 18-22 %
- phosphatidylinositol 12-15 %

25 "Lécithine 130" ayant les proportions pondérales indiquées des phospholipides suivants:

- phosphatidyléthanolamine 14-20 %
- phosphatidylinositol 7-13 %
- phosphatidylcholine 30-35 %

La Lécithine 130 est en fait une lécithine enrichie en phosphatidylcholine.

30 Il faut noter que le dilueur de l'invention est destiné exclusivement à la cryoconservation de spermatozoïdes de bovins. Il n'est pas adapté pour la cryoconservation de spermatozoïdes d'autres espèces animales ou de l'espèce humaine.

En disposition préférée, un dilueur selon l'invention comprend pour 100 ml d'eau:

	Tris	1 à 2 g
	citrate trisodique dihydraté	5 à 10 g
	chlorure de potassium	0,2 à 0,5 g
5	fructose	0,6 à 1,0 g
	lactose monohydraté	0,18 à 0,30 g
	glycine	2,0 à 3,0 g
	glucose anhydre	0,25 à 0,40 g
	taurine	0,0030 à 0,0040 g
10	sulfate de gentamycine	0,20 g à 0,30 g
	tartrate de tylosine	0,028 à 0,040 g
	lincospectine 100	0,30 à 0,35 g
	glycérol	30 à 45 g
	lactate de calcium hydraté	0,03 à 0,05 g
15	lécithine 100	2,0 à 3,0 g
	lécithine 130	0,80 à 1,10 g
	acide citrique monohydraté	0,5 à 2 g
	eau ultra pure	qsp

Les Exemples suivants illustrent l'invention de façon non limitative.

Exemple 1 (voir page suivante)

Exemple 1

En suivant le mode opératoire décrit ci-dessus, on a formulé un dilueur selon l'invention ayant la composition suivante:

	Tris	1,8490 g
5	citrate trisodique dihydraté	7,3965 g
	chlorure de potassium	0,2955 g
	fructose	0,8875 g
	lactose monohydraté	0,2220 g
	glycine	2,7735 g
10	glucose anhydre	0,3695 g
	taurine	0,0037 g
	sulfate de gentamycine	0,2400 g
	tartrate de tylosine	0,0330 g
	lincospectine 100	0,3830 g
15	glycérol	40,2240 g
	lactate de calcium hydraté	0,0455 g
	lécithine 100	2,6000 g
	lécithine 130	1,0400 g
	acide citrique monohydraté	1,0400 g
20	eau ultra pure	0,0650 l

La formulation ci-dessus est effectuée pour obtenir 100 ml de dilueur concentré, ce dernier étant dilué à 500 ml pour l'utilisation.

Exemple 2 : Essais comparatifs in vitro : Anomalies et test de résistanceosmotique

25 Dans cet Exemple, le dilueur de l'invention de l'Exemple 1 est comparé au dilueur de l'art antérieur décrit dans EP-A-685 556 en ce qui concerne les anomalies et la résistance osmotique in vitro.

En suivant le mode opératoire décrit dans EP-A-685 556, on a formulé un dilueur selon l'art antérieur ayant la composition suivante:

6

	Triméthylol-méthylamine	3,4 g à 4,2 g
	Citrate trisodique dihydraté	13,7 g à 16,75 g
	Chlorure de potassium	0,55 g à 0,67 g
	Fructose	1,65 g à 2,0 g
5	Glucose	0,68 g à 0,84 g
	Lactose	0,41 g à 0,50 g
	Lactate de calcium	0,09 g à 0,11 g
	Glycine	5,15 g à 6,25 g
	Glycérol	64 ml à 78 ml
10	Lécithine de soja	6,75 g à 8,25 g

ce véhicule étant dilué, pour l'emploi, avec 750 ml à 900 ml d'eau.

Le Tableau I ci-après donne les résultats comparatifs du dilueur de l'art antérieur, DILUEUR A, et du dilueur de l'invention, DILUEUR I, avec différents taureaux : NIZAGO, NOMEL, NORRIS, NOVAK, OCARINA et OKAVANGO.

Tableau I (voir page suivante)

Tableau I

	LIBELLE	% anom. majeures	% anormaux	HOST
5	NIZAGO DILUEUR A	12,0%	23,5%	51,24%
	NIZAGO DILUEUR I			65,05%
	NOMEL DILUEUR A	13,5%	30,0%	34,31%
	NOMEL DILUEUR I			54,50%
10	NORRIS DILUEUR A	6,0%	17,5%	50,50%
	NORRIS DILUEUR I			53,00%
	NOVAK DILUEUR A	20,0%	26,0%	34,80%
	NOVAK DILUEUR I			47,71%
15	OCARINA DILUEUR A	7,5%	21,0%	50,00%
	OCARINA DILUEUR I			47,76%
20	OKAVANGO DILUEUR A	8,5%	18,5%	67,68%
	OKAVANGO DILUEUR I			67,65%
Résultats moyens DILUEUR A à 7.10 <sup>6</sup> spz/dose		11,0%	23,0%	48,09%
Résultats moyens DILUEUR I à 7.10 <sup>6</sup> spz/dose				55,95%

25 HOST = test de résistance osmotique

Spz = spermatozoïdes

Le Tableau I indique clairement la supériorité du dilueur de l'invention sur le dilueur de l'art antérieur car pour 7.10<sup>6</sup> spermatozoïdes par dose, on obtient un pourcentage de résistance osmotique in vitro très supérieur pour le dilueur de l'invention.

Exemple 3 : Essais comparatifs in vitro : Résultats après décongélation et test de thermo résistance.

Dans cet Exemple, le dilueur de l'invention de l'Exemple 1 est comparé au dilueur de l'art antérieur décrit dans EP-A-685 556 utilisé dans l'Exemple 2 en ce qui concerne les résultats après décongélation et la thermo résistance in vitro.

Le Tableau II ci-après donne les résultats comparatifs du dilueur de l'art antérieur, DILUEUR A, et du dilueur de l'invention, DILUEUR I, avec différents taureaux : NIZAGO, NOMEL, NORRIS, NOVAK, OCARINA et OKAVANGO.

Tableau II (voir page suivante)

Tableau II

LIBELLE	Décongélation		TTR + 30 mn		TTR + 1 h 30		Décongélation		TTR 1 h à 1 h 45	
	% mobiles	motilité	%mobiles	motilité	%mobiles	motilité	%mobiles	motilité	%mobiles	motilité
NIZAGO DILUEUR A	55%	3	50%	2	30%	1,5	55%	3	0%	0
NIZAGO DILUEUR I	55%	3,5	55%	3	45%	2	55%	3	45%	2
NOMEL DILUEUR A	55%	3,5	55%	3	10%	1	45%	3	35%	2
NOMEL DILUEUR I	45%	3	45%	2	10%	0,5	45%	3	40%	3
NORRIS DILUEUR A	40%	2	40%	1	10%	0,5	50%	2,5	0%	
NORRIS DILUEUR I	45%	3	45%	2	45%	3	30%	3	5%	
NOVAK DILUEUR A	30%	2	30%	1,5	10%	0,5	45%	2,5	0%	
NOVAK DILUEUR I	35%	3	35%	2,5	35%	3	40%	3,5	0%	
OCARINA DILUEUR A	55%	3,5	50%	3	50%	3	45%	3	5%	
OCARINA DILUEUR I	60%	3,5	55%	3	50%	3,5	55%	4	10%	
OKAVANGO DILUEUR A	55%	3,5	45%	2,5	30%	2	55%	3	45%	2,5
OKAVANGO DILUEUR I	55%	3,5	60%	3,5	50%	3	55%	3	45%	3

Résultats moyens Dilueur A à 7.10 <sup>6</sup> spz/dose	48%	2,92	45%	2,17	23%	1,42	49%	2,83	14%	1,50
Résultats moyens Dilueur I à 7.10 <sup>6</sup> spz/dose	49%	3,25	49%	2,67	39%	2,50	47%	3,25	24%	2,67

TTR = test de Thermo résistance

Spz = spermatozoïdes

Le Tableau II indique clairement la supériorité du dilueur de l'invention sur le dilueur de l'art antérieur car pour  $7.10^6$  spermatozoïdes par dose, on obtient un pourcentage de mobiles et une motilité supérieurs, à l'exception du pourcentage de mobiles lors de la décongélation après 1 h 30 qui est très légèrement inférieur.

5            Exemple 4 : Essais comparatifs in vivo : Résultats in vivo d'insémination artificielle pour un taux de non retours à 25 jours.

10            Dans cet Exemple, le dilueur de l'invention de l'Exemple 1 est comparé au dilueur de l'art antérieur décrit dans EP-A-685 556 utilisé dans l'Exemple 2 en ce qui concerne les résultats in vivo d'insémination artificielle première (IAP), de fécondation par insémination artificielle première, IAP fécondée, et de pourcentage de fécondation par insémination artificielle première, % IAP fécondée, pour un taux de non-retours (TNR) à 25 jours.

Le Tableau III ci-après donne les résultats comparatifs du dilueur de l'art antérieur, DILUEUR A, et du dilueur de l'invention, DILUEUR I, avec différents taureaux : NIZAGO, NOMEL, NORRIS, NOVAK, OCARINA et OKAVANGO.

Tableau 3 (voir page suivante)

Tableau III

TNR à 25 jours													
LIBELLE	IAP	IAP féc	% IAP féc	IA2	IA2 féc	% IA2 féc	IA3+	IA3 + féc	% IA3 + féc	IA tot	IA féc tot	% IA féc total	
NIZAGO DILUEUR A	66	44	66,67%	48	35	72,92%	74	55	74,32%	188	134	71,28%	
NIZAGO DILUEUR I	68	55	80,88%	33	27	81,82%	89	71	79,78%	190	153	80,53%	
NOMEL DILUEUR A	76	60	78,95%	45	37	82,22%	71	59	83,10%	192	156	81,25%	
NOMEL DILUEUR I	72	59	81,94%	48	40	83,33%	72	60	83,33%	192	159	82,81%	
NORRIS DILUEUR A	74	61	82,43%	42	31	73,81%	75	56	74,67%	191	148	77,49%	
NORRIS DILUEUR I	60	51	85,00%	41	33	80,49%	73	54	73,97%	174	138	79,31%	
NOVAK DILUEUR A	80	63	78,75%	34	31	91,18%	63	50	79,37%	177	144	81,36%	
NOVAK DILUEUR I	68	52	76,47%	50	45	90,00%	77	67	87,01%	195	164	84,10%	
OCARINA DILUEUR A	73	60	82,19%	41	38	92,68%	73	60	82,19%	187	158	84,49%	
OCARINA DILUEUR I	72	65	90,28%	47	37	78,72%	74	59	79,73%	193	161	83,42%	
OKAVANGO DILUEUR A	74	57	77,03%	34	29	85,29%	60	49	81,67%	168	135	80,36%	
OKAVANGO DILUEUR I	71	52	73,24%	47	39	82,98%	75	63	84,00%	193	154	79,79%	

Résultats moyens Dilueur A à 7.10 <sup>e</sup> spz/dose	443	345	77,88%	244	201	82,38%	416	329	79,09%	1103	875	79,33%	
Résultats moyens Dilueur I à 7.10 <sup>e</sup> spz/dose	411	334	81,27%	266	221	83,08%	460	374	81,30%	1137	929	81,71%	
Résultats moyens taureaux de testage sur la même période à 20.10 <sup>e</sup> spz/dose DILUEUR A	2028	1630	80,37%										

TNR = taux de non-retours

Spz = spermatozoïdes

Le Tableau III indique clairement la supériorité du dilueur de l'invention sur le dilueur de l'art antérieur car on obtient dans tous les cas sauf un (pour le taureau OKAVANGO) un pourcentage de IAP très supérieur. Les résultats moyens pour  $7.10^6$  spermatozoïdes par dose révèlent un pourcentage de IAP très nettement supérieur pour le dilueur de l'invention.

D'une façon surprenante, le dilueur de l'art antérieur présente même pour  $20.10^6$  spermatozoïdes par dose des résultats moyens très inférieurs à ceux du dilueur de l'invention pour seulement  $7.10^6$  spermatozoïdes par dose.

Exemple 5 : Essais comparatifs in vivo : Résultats in vivo d'insémination artificielle pour un taux de non-retours à 60 jours.

Dans cet Exemple, le dilueur de l'invention de l'Exemple 1 est comparé au dilueur de l'art antérieur décrit dans EP-A-685 556 utilisé dans l'Exemple 2 en ce qui concerne les résultats in vivo d'insémination artificielle première (IAP), de fécondation par insémination artificielle première, IAP fécondation, et de pourcentage de fécondation par insémination artificielle première, % IAP fécondation, pour un taux de non-retours (TNR) à 60 jours.

Le Tableau IV ci-après donne les résultats comparatifs du dilueur de l'art antérieur, DILUEUR A, et du dilueur de l'invention, DILUEUR I, avec différents taureaux : NIZAGO, NOMEL, NORRIS, NOVAK, OCARINA et OKAVANGO.

Tableau IV (voir page suivante)

Tableau IV

LIBELLE	TNR à 60 jours												
	IAP	IAP féc	% IAP féc	IA2	IA2 féc	% IA2 féc	IA3+	IA3 + féc	% IA3 + féc	IA tot	IA féc tot	% IA féc total	
NIZAGO DILUEUR A	55	24	43,64%	40	15	37,50%	68	39	57,35%	163	78	47,85%	
NIZAGO DILUEUR I	68	40	58,82%	33	22	66,67%	87	60	68,97%	188	122	64,89%	
NOMEL DILUEUR A	72	41	56,94%	43	27	62,79%	64	41	64,06%	179	109	60,89%	
NOMEL DILUEUR I	62	38	61,29%	38	24	63,16%	63	36	57,14%	163	98	60,12%	
NORRIS DILUEUR A	69	39	56,52%	41	24	58,54%	72	40	55,56%	182	103	56,59%	
NORRIS DILUEUR I	55	35	63,64%	34	19	55,88%	65	38	58,46%	154	92	59,74%	
NOVAK DILUEUR A	61	36	59,02%	47	37	78,72%	72	47	65,28%	180	120	66,67%	
NOVAK DILUEUR I	74	44	59,46%	30	21	70,00%	57	37	64,91%	161	102	63,35%	
OCARINA DILUEUR A	44	27	61,36%	31	24	77,42%	53	35	66,04%	128	86	67,19%	
OCARINA DILUEUR I	68	50	73,53%	44	28	63,64%	72	46	63,89%	184	124	67,39%	
OKAVANGO DILUEUR A	39	26	66,67%	23	15	65,22%	42	27	64,29%	104	68	65,38%	
OKAVANGO DILUEUR I	70	36	51,43%	46	29	63,04%	75	52	69,33%	191	117	61,26%	

Résultats moyens Dilueur A à 7.10 <sup>6</sup> spz/dose	340	193	56,76%	225	142	63,11%	371	229	61,73%	936	564	60,26%
Résultats moyens Dilueur I à 7.10 <sup>6</sup> spz/dose	397	243	61,21%	225	143	63,56%	419	269	64,20%	1041	655	62,92%
Résultats moyens taureaux de testage sur la même période à 20.10 <sup>6</sup> spz/dose DILUEUR A	1771	1097	61,94%									

TNR= taux de non-retours

Spz = spermatozoïdes

Le Tableau IV indique clairement la supériorité du dilueur de l'invention sur le dilueur de l'art antérieur car on obtient dans tous les cas sauf un (pour le taureau OKAVANGO) un pourcentage de IAP supérieur. Les résultats moyens pour  $7.10^6$  spermatozoïdes par dose révèlent un pourcentage de IAP nettement supérieur pour le dilueur de l'invention.

D'une façon surprenante, le dilueur de l'invention présente même, pour seulement  $7.10^6$  spermatozoïdes par dose, des résultats moyens supérieurs à ceux du dilueur de l'art antérieur pour  $20.10^6$  spermatozoïdes par dose.

Exemple 6 : Essais comparatifs in vivo : Résultats in vivo d'insémination artificielle pour un taux de non-retours à 90 jours.

Dans cet Exemple, le dilueur de l'invention de l'Exemple 1 est comparé au dilueur de l'art antérieur décrit dans EP-A-685 556 utilisé dans l'Exemple 2 en ce qui concerne les résultats in vivo d'insémination artificielle première (IAP), de fécondation par insémination artificielle première, IAP fécondée, et de pourcentage de fécondation par insémination artificielle première, % IAP fécondée, pour un taux de non-retours (TNR) à 90 jours.

Le Tableau V ci-après donne les résultats comparatifs du dilueur de l'art antérieur, DILUEUR A, et du dilueur de l'invention, DILUEUR I, avec différents taureaux : NIZAGO, NOMEL, NORRIS, NOVAK, OCARINA et OKAVANGO.

Tableau V (voir page suivante)

Tableau V

TNR à 90 jours												
LIBELLE	IAP	IAP féc	% IAP féc	IA2	IA2 féc	% IA2 féc	IA3+	IA3 + féc	% IA3 + féc	IA tot	IA féc tot	% IA féc total
NIZAGO DILUEUR A	65	24	36,92%	47	19	40,43%	74	35	47,30%	186	78	41,94%
NIZAGO DILUEUR I	68	37	54,41%	33	19	57,58%	89	55	61,80%	190	111	58,42%
NOMEL DILUEUR A	76	36	47,37%	45	24	53,33%	71	42	59,15%	192	102	53,13%
NOMEL DILUEUR I	72	37	51,39%	48	22	45,83%	72	38	52,78%	192	97	50,52%
NORRIS DILUEUR A	74	37	50,00%	42	23	54,76%	75	37	49,33%	191	97	50,79%
NORRIS DILUEUR I	60	31	51,67%	41	21	51,22%	73	42	57,53%	174	94	54,02%
NOVAK DILUEUR A	68	33	48,53%	50	35	70,00%	77	43	55,84%	195	111	56,92%
NOVAK DILUEUR I	78	41	52,56%	32	23	71,88%	62	38	61,29%	172	102	59,30%
OCARINA DILUEUR A	72	42	58,33%	41	25	60,98%	73	49	67,12%	186	116	62,37%
OCARINA DILUEUR I	72	46	63,89%	47	27	57,45%	74	42	56,76%	193	115	59,59%
OKAVANGO DILUEUR A	73	37	50,68%	34	20	58,82%	60	34	56,67%	167	91	54,49%
OKAVANGO DILUEUR I	71	31	43,66%	47	29	61,70%	75	47	62,67%	193	107	55,44%

Résultats moyens Dilueur A à 7.10 <sup>6</sup> spz/dose	428	209	48,83%	259	146	56,37%	430	240	55,81%	1117	595	53,27%
Résultats moyens Dilueur I à 7.10 <sup>6</sup> spz/dose	421	223	52,97%	248	141	56,85%	445	262	58,88%	1114	626	56,19%
Résultats moyens taureaux de testage sur la même période à 20.10 <sup>6</sup> spz/dose DILUEUR A	1833	1009	55,05%									

TNR = taux de non-retours

Spz = spermatozoïdes

5 Le Tableau V indique clairement la supériorité du dilueur de l'invention sur le dilueur de l'art antérieur car on obtient dans tous les cas sauf un (pour le taureau OKAVANGO) un pourcentage de IAP supérieur. Les résultats moyens pour  $7.10^6$  spermatozoïdes par dose révèlent un pourcentage de IAP nettement supérieur pour le dilueur de l'invention.

D'une façon surprenante, le dilueur de l'invention présente même, pour seulement  $7.10^6$  spermatozoïdes par dose, des résultats moyens supérieurs à ceux du dilueur de l'art antérieur pour  $20.10^6$  spermatozoïdes par dose.

10 Bien que l'invention ait été décrite pour des modes de réalisation particuliers, on comprendra qu'elle embrasse toutes les variantes d'exécution dans le cadre des revendications.

**REVENDICATIONS**

1. Dilueur pour la cryoconservation de spermatozoïdes de bovins comprenant au moins un phospholipide, au moins une vitamine liposoluble accompagnée d'un émulsifiant, au moins un agent antioxydant et au moins un polyol.
2. Dilueur selon la revendication 1, caractérisé en ce que la vitamine est la  
5 vitamine A.
3. Dilueur selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'agent antioxydant est un acide aminé ayant des propriétés antioxydantes.
4. Dilueur selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent antioxydant est un peptide antioxydant.
- 10 5. Dilueur selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'acide aminé ayant des propriétés antioxydantes est la taurine.
6. Dilueur selon la revendication 4, caractérisé en ce que le peptide antioxydant est du glutathion réduit.
7. Dilueur selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il contient en outre un  
15 stérol.
8. Dilueur selon la revendication 7, caractérisé en ce que le stérol est le cholestérol.
9. Dilueur selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il contient en outre des cyclodextrines pour solubiliser le stérol.
- 20 10. Dilueur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polyol est du glycérol.
11. Dilueur selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient en outre des sels et des carbohydrates.
12. Procédé de préparation du dilueur selon la revendication 1, caractérisé en ce  
25 que l'on effectue les étapes suivantes :
  - a) préparation d'une dispersion d'au moins un phospholipide sous forme de particules dans au moins un polyol à une température suffisante,
  - b) agitation de la dispersion de l'étape a) de façon à microniser lesdites particules de phospholipide,
  - 30 c) repos de la dispersion obtenue dans l'étape b) pendant une durée d'au moins environ 12 heures de façon à atteindre une stabilité de l'émulsion obtenue, c'est-à-dire sans séparation de phases, conduisant à une préparation, dénommée préparation de l'étape c),

d) préparation d'une phase aqueuse comprenant au moins un acide aminé ayant des propriétés antioxydantes, au moins un peptide antioxydant et au moins une vitamine, conduisant à une phase, dénommée phase aqueuse de l'étape d),

5 e) réunion de la préparation de l'étape c) et de la phase aqueuse de l'étape d), conduisant à une préparation, dénommée préparation de l'étape e),

f) stérilisation de la préparation de l'étape e).

13. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la stérilisation de l'étape f) est effectuée par rayonnement ionisant dans une fourchette de dose d'irradiation d'environ 5 à environ 20 Kgy.

10 14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la fourchette de dose d'irradiation est d'environ 15 à environ 20 Kgy.

15. Procédé selon la revendication 13 pour la préparation du dilueur selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'un stérol est ajouté à la préparation de l'étape d).

15 16. Procédé selon la revendication 13 pour la préparation du dilueur selon la revendication 11, caractérisé en ce que des carbohydrates sont ajoutés à la préparation de l'étape d).