

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2019/073071 A1**

(43) Date de la publication internationale  
18 avril 2019 (18.04.2019)

(51) Classification internationale des brevets :  
A01N 1/02 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/EP2018/077969

(22) Date de dépôt international :  
13 octobre 2018 (13.10.2018)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
1771081 13 octobre 2017 (13.10.2017) FR

(71) Déposant : **BIODESIV EFNium** [FR/FR] ; 4 rue Bous-  
singault, 67000 Strasbourg (FR).

(72) Inventeur : **COURRIER, Quentin** ; 56 rue du Maréchal  
Koenig, 67210 OBERNAI (FR).

(74) Mandataire : **MUNDEL, Lysiane** ; Cabinet Mundel, 52  
avenue des Vosges, 676000 STRASBOURG (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,  
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,  
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,  
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,  
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,  
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,  
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,  
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM),  
européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,  
FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,  
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée:**

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2(h))



WO 2019/073071 A1

(54) Title: ANTIMICROBIAL POLYMER FOR ANIMAL SEMEN

(54) Titre : POLYMERE ANTIMICROBIEN POUR SEMENCES ANIMALES

(57) Abstract: The present invention relates to an additive for the preservation of animal semen, in total or partial substitution of antibiotic compounds. This additive with an antimicrobial effect contains one or more synthetic polymers having an antimicrobial effect. It also has a good solubility in the animal semen or in the medium for delivering or preserving the animal semen, as well as being totally innocuous with respect to the spermatozoa in order not to compromise the viability of the animal semen preserved in this way.

(57) Abrégé : La présente invention propose un additif pour la préservation des semences animales en substitution totale ou partielle de composés antibiotiques. Cet additif présentant un effet antimicrobien contient un ou plusieurs polymères synthétiques présentant un effet antimicrobien. Il présente également une bonne solubilité dans la semence animale ou dans le milieu d'administration ou de conservation de la semence animale, ainsi qu'une totale innocuité vis-à-vis des spermatozoïdes afin de ne pas compromettre la viabilité de la semence animale ainsi conservée.

## Polymère antimicrobien pour semences animales

La présente invention propose un additif pour la préservation des semences animales en substitution totale ou partielle de composés antibiotiques. Cet additif présentant un effet antimicrobien contient un ou plusieurs polymères synthétiques présentant un effet antimicrobien. Il présente également une bonne solubilité dans la semence animale ou dans le milieu d'administration ou de conservation de la semence animale, ainsi qu'une totale innocuité vis-à-vis des spermatozoïdes afin de ne pas compromettre la viabilité de la semence animale ainsi conservée.

Le domaine d'application de la présente invention est celui de la reproduction animale par insémination artificielle dans le champ d'exercice des vétérinaires et spécialistes de l'insémination. Les élevages d'animaux, aussi bien à destination de l'industrie agro-alimentaire (lapins, porcs, bovins) que pour l'agrément, les disciplines sportives ou certains travaux (chevaux, chiens) ont couramment recours à l'insémination pour la reproduction des animaux en vue du maintien de caractéristiques phénotypiques ou génotypique sélectionnées.

Après la collecte de la semence animale, les spermatozoïdes mélangés au plasma séminal ont une très faible durée de vie. Il convient donc de les incorporer à un milieu susceptible de prolonger leur survie et de maintenir en vigueur leurs fonctionnalités. Par ailleurs, la semence prélevée sur les mâles n'étant pas systématiquement utilisée directement pour une insémination, il est alors nécessaire de la traiter pour permettre sa conservation.

Pour être efficace, le milieu de conservation des spermatozoïdes doit fournir l'énergie nécessaire au bon fonctionnement et au maintien en vie des cellules, avoir un système tampon interdisant les fortes variations de pH, éviter le développement des germes microbiens et présenter un équilibre ionique adéquat. L'art antérieur décrit très largement la conservation de la semence à l'état liquide dans des dilueurs de différentes compositions, ainsi que la conservation à l'état congelé qui elle aussi met en œuvre des dilueurs de congélation et de décongélation ainsi que différentes techniques de préparation et de conditionnement de la semence.

Il existe autant de dilueurs que de procédés pour ce faire et notamment le conditionnement de la semence avec un dilueur combiné à la conservation du mélange à basse température (réfrigération, congélation, cryogénéisation). Chaque dilueur fournit aux spermatozoïdes les

éléments nutritifs et protecteurs permettant leur survie après congélation. Cependant, la semence contient naturellement différents microorganismes, notamment des bactéries et virus, dont le développement peut altérer la qualité de la semence. En effet, d'une part les bactéries entrent en compétition avec les spermatozoïdes en consommant les nutriments qui leurs sont nécessaires et d'autre part elles peuvent libérer des substances toxiques pour les spermatozoïdes. La présence de microbes peut également être la cause de la transmission de maladies entre l'animal donneur de semence et l'animal inséminé ; la maladie se transmettant d'autant plus vite qu'un donneur de semence sert à la fécondation de nombreuses femelles. Enfin l'étape de décongélation réactive beaucoup de mécanismes en dormance et rend les microbes plus virulents ce qui risque une nouvelle fois de contaminer l'échantillon de semence animale et de compromettre la qualité des spermatozoïdes. Pour empêcher ou tout du moins minimiser ces inconvénients, il est d'usage d'utiliser des additifs antibactériens pour éliminer les microbes ou limiter leur développement au sein de la semence ou du mélange spermatozoïdes/dilueur. Ces additifs antibactériens sont des composés antibiotiques choisis pour éliminer ou détruire les microbes classiquement présents dans la semence tout en affectant au minimum la qualité des spermatozoïdes. À titre d'exemple et de manière non exhaustive, on retrouve dans les dilueurs, les antibiotiques suivant : aminoglycosides ou aminosides dont les plus courants sont le sulfate de gentamicine (ou gentamicine, typiquement dosée à 250mg/L de dilueur), la streptomycine (typiquement dosée à 1000mg/L de dilueur), la dibekacine, l'amikacine et l'apramycine ; les bêta-lactames dont le plus courant est la pénicilline (typiquement dosée à 625mg/L de dilueur). D'autres additifs de la famille des fluoroquinolones peuvent entrer dans la composition des dilueurs en tant qu'antibiotiques. Il est également d'usage d'utiliser des antibiotiques seuls ou en mélange afin d'obtenir un spectre d'efficacité plus large.

25 La demande de brevet FR2725342 décrit l'utilisation de dérivés d'indole pour la préparation de dilueurs de sperme qui permettent d'améliorer la conservation des spermatozoïdes. Ces dérivés ne présentent aucune activité antimicrobienne, ils ne sont pas des substituts d'antibiotiques, et sont simplement ajoutés aux composants connus de l'art antérieur pour améliorer les performances des spermatozoïdes.

30 La demande de brevet PCT/US2002/000777 décrit un dilueur de semence comportant une quantité de phospholipide protectrice de la cellule spermatique, une quantité efficace de tensio-actif réduisant la formation de cristaux de glace lors de la congélation de la composition, un hydrate de carbone et un tampon biologique conférant à la solution

d'utilisation du dilueur un pH compris entre environ 6,9 et environ 7,5 et une osmolarité comprise entre environ 250 mOsM et environ 350 mOsM. Des antibiotiques tels la gentamycine, la tylosine, la lyncomycine ou la spectinomycine sont prévus dans ce dilueur.

5 Le brevet FR2813756 décrit un dilueur liquide pour la conservation de spermatozoïdes porcins qui contient un conservateur, une formulation antibiotique liquide, au moins un sel et au moins un agent antioxydant. Le conservateur est un phospholipide (cyclohexanols, choline, éthanolamine et sérine), l'antibiotique est choisi parmi l'enrofloxacin, la lincomycine et la spectinomycine, le carbohydrate est choisi parmi le saccharose, le tréhalose, le raffinose, le glucose et le fructose. Ce dilueur contient des antibiotiques.

10 Le brevet FR2720407 décrit un milieu pour micro-organismes non autonomes, tels que gamètes et embryons, à maintenir vivants en dehors de leur milieu naturel et susceptibles d'être conservés prêts à l'emploi sur des périodes prolongées, ce milieu comprenant, outre notamment des agents de nutrition, des tampons et des sels minéraux, un produit protecteur sous la forme d'une lécithine extraite de graines de soja. Ce milieu est particulièrement bien  
15 adapté à la conservation des spermatozoïdes de bovins.

La demande de brevet PCT/CN2016/000657 décrit un dilueur de congélation pour la semence d'espèces d'élevage. Ce dilueur contient du trihydroxyméthyl aminométhane, de l'acide citrique, du monosaccharide, du jaune d'oeuf frais, un agent de protection perméable, de la pénicilline, de la streptomycine, de l'alcool polyvinylique et de l'eau ultrapure. Un polymère  
20 polyvinylique à haut poids moléculaire commun est utilisé ici comme inhibiteur de cristaux de glace au lieu d'une protéine antigel naturelle. Ce polymère n'est en aucun cas un substitut à un agent antimicrobien puisque de la pénicilline et de la streptomycine sont également utilisées dans ce dilueur.

La demande de brevet RU2177277 décrit l'utilisation d'une préparation antibactérienne  
25 contenant de l'apramycine et de l'ermomycine pour la dilution et la cryoconservation de la semence animale. Là encore un mélange d'antibiotiques connus est utilisé pour assurer la survie et la conservation des spermatozoïdes de l'échantillon de semence.

La demande de brevet CN104322483 décrit un dilueur pour la semence de verrat contenant de la poudre d'alpha-D-glucopyranose, du fructose, du citrate de trisodium dihydraté, de l'acide  
30 éthylènediamine tétraacétique disodique, du bicarbonate de sodium, de l'alcool polyvinylique, du trishydroxyméthylaminométhane, de l'inositol, de la vitamine C, de l'arginine, de l'extrait de radix isatidis et de ceftiofur sodium, et enfin de la ribavirine. La formule comprend des

nutriments riches, des composants antibactériens de médecine chinoise (Radix Isatidis, dont le constituant actif principal est le Onjisaponin B) et occidentale et des composants antibactériens (Ribavirine, Ceftiofur sodium), assurant ainsi le métabolisme normal du sperme.

5 On connaît donc de l'art antérieur l'utilisation d'additifs aux propriétés antibactériennes ou antivirales tels des extraits de plantes ou des peptides, aux propriétés favorisant l'efficacité des spermatozoïdes conservés tels des indoles, des lécithines ou des phospholipides, aux propriétés favorisant la congélation ou la cryogénéisation tels l'alcool polyvinylique, pour la conservation d'échantillons de semence animale. Cependant l'art antérieur ne décrit pas de  
10 substitut à l'utilisation d'antibiotiques pour la conservation de la semence animale.

On connaît également de l'art antérieur l'utilisation de polymères naturels comme les polysaccharides (demandes de brevet WO 2010/139956 ou WO 97/14785) ou encore les polypeptides naturels communément appelés protéines naturelles (demandes de brevet WO 98/37904 ou WO 2015/181558). Cependant l'art antérieur ne décrit pas de substitut à  
15 l'utilisation d'antibiotiques pour la conservation de la semence animale car il n'est pas du tout évident que l'une des molécules naturelle ou synthétique décrites ci-dessus permettent à la fois la protection et la conservation des propriétés de la semence animale.

On connaît de plus de l'art antérieur l'utilisation de molécules non polymériques comme l'iode (demandes de brevet WO 00/16812, WO 92/04031, WO 93/17693 ou WO 97/48482 et  
20 brevet US 5,360,605) ou le peroxyde d'hydrogène (demande de brevet WO 94/00161) en tant qu'agents antimicrobiens. L'iode est connu pour réagir avec des fonctions chimiques (N-H, S-H ou double liaison carbone-carbone, etc.) portées par les acides aminés composant notamment les protéines inhibant ou perturbant l'activité desdites protéines. Le peroxyde d'hydrogène est à la fois oxydant, réducteur, acide et du fait de son instabilité, il peut se  
25 décomposer notamment en radicaux  $H^\bullet$ ,  $HO^\bullet$  ou  $HOO^\bullet$ ; le peroxyde d'hydrogène peut donc très facilement réagir avec des substances biologiques, notamment des protéines et les dénaturer. Dans tous les cas, ces protéines étant impliquées dans les processus biologiques des agents pathogènes, leur dénaturation mène à l'inactivation ou à la mort de l'agent pathogène. L'iode est le plus couramment utilisé, le peroxyde d'hydrogène est habituellement utilisé en  
30 combinaison avec l'iode, ce dernier augmentant l'efficacité anti microbienne de l'iode. Ces molécules non polymériques sont classiquement utilisées en mélange avec une ou plusieurs molécules organiques. Lorsqu'il s'agit d'iode, on parle alors d'iodophore.

L'iodophore est défini comme le produit résultant de l'association d'iode avec un agent complexant ou solubilisant.

Dans ce contexte d'utilisation de molécules non polymériques mélangés avec un polymère, on utilisera classiquement comme iodophores des polymères naturels comme l'albumine ou synthétiques comme les dérivés de povidone ou PVP. Ces polymères servent en premier lieu de vecteur de l'agent antimicrobien (iode ou peroxyde d'hydrogène) vers le fluide biologique à traiter. En complexant l'agent antimicrobien, il améliore sa solubilité dans le fluide biologique à traiter puis il relargue l'agent antimicrobien dans le fluide biologique à traiter. Ces polymères peuvent également assurer un rôle de protection des substances biologiques à traiter contre leur endommagement par l'agent antimicrobien, ce dernier, étant donné son mode d'action, pouvant altérer aussi bien les protéines des agents pathogènes à éliminer que celles des substances biologiques présentes dans le fluide biologique à traiter. Enfin, ces polymères peuvent servir d'adsorbant de l'agent antimicrobien (iode ou peroxyde d'hydrogène) pour le retirer partiellement ou totalement du fluide biologique à traiter. En conclusion, ces polymères ne possèdent pas d'activité anti microbienne intrinsèque mais remplissent des fonctions d'auxiliaires technologiques pour permettre, améliorer ou contrôler le pouvoir antimicrobien des molécules non polymériques antimicrobiennes comme l'iode. En effet, ces complexes (par exemple du type povidone-iode) sont obtenus par simple mélange entre l'agent antimicrobien et le polymère ; l'agent antimicrobien est simplement complexé par le polymère et non greffé sur ce dernier ce qui sous-entendrait une réaction chimique entre l'agent antimicrobien et le polymère. En effet, l'objectif est que l'agent antimicrobien soit relargué sous sa forme initiale dans la solution biologique à traiter afin qu'il conserve son activité anti microbienne. Dans le cas d'un iodophore, l'iode conserve donc sa structure chimique I<sub>2</sub>.

En effet, dans les dilueurs de l'art antérieur les composés aux effets antimicrobiens, antibiotiques et/ou antiviraux, naturels ou de synthèse présentent de nombreux inconvénients. En premier lieu ils favorisent le développement de bactéries résistantes, du fait de l'action chimique sur les microbes (bactéries et virus) au sein de l'échantillon. La solution à ce problème consiste à augmenter les concentrations en ces substances ou à introduire régulièrement de nouvelles molécules antimicrobiennes dans le dilueur. Ensuite du fait de la petite taille des molécules aux effets antimicrobiens, celles-ci peuvent traverser les parois des organes de la femelle inséminée (vagin, utérus) et se retrouver dans le sang des animaux avec des effets multiples sur la santé de l'animal et/ou du consommateur si les animaux inséminés

ou nés de l'insémination sont consommés par l'homme ou d'autres animaux. Par ailleurs ces composés antimicrobiens sont efficaces uniquement à hautes doses, typiquement de 100 à 1000mg/L de dilueur, leur présence n'est donc pas anodine et sans conséquence pour l'animal inséminé et sa progéniture. Enfin les substances aux effets antimicrobiens sont également  
5 disséminées dans l'environnement puisque difficilement arrêtées par les stations d'épuration. Il y a donc un vrai besoin de réduire voire de supprimer les composés à effets antimicrobiens, en particulier des antibiotiques, dans la procédure d'insémination artificielle et dans la préservation de la semence qui y est utilisée.

Concernant les peptides, ces substances sont particulièrement coûteuses et de ce fait sont  
10 incompatibles à ce jour avec les contraintes économiques du domaine.

La présente invention décrit un additif antimicrobien pour la conservation de la semence animale, en substitution des composés antibiotiques de l'art antérieur, qui peut être utilisé seul ou au sein d'un dilueur. Cet additif consiste en au moins un polymère synthétique à activité antimicrobienne soluble dans la semence animale ou dans un milieu d'administration ou de  
15 conservation de ladite semence, sélectionné parmi les polymères polycationiques, les polymères polyanioniques ou les polymères sur lesquels sont greffées des substances antimicrobiennes. Ces polymères synthétiques aux propriétés antimicrobiennes sont efficaces en très faibles quantités tout en assurant la complète fonctionnalité des spermatozoïdes, ce qui constitue un avantage certain par rapport aux compositions de l'art antérieur.

Cette invention présente de nombreux avantages par rapport aux compositions de dilueurs décrites dans l'art antérieur. En effet, l'utilisation d'un additif consistant en au moins un polymère synthétique aux effets antimicrobiens limite le phénomène de résistance car les polymères synthétiques ont un mode d'action physico-chimique vis à vis des microbes, donc vis-à-vis des bactéries, virus et mycètes. Ils s'adsorbent à la surface des microbes et peuvent  
25 les agglomérer en fonction de leurs concentrations relatives. Le polymère synthétique interagit avec la membrane du microbe en l'endommageant ce qui mène à la destruction du microbe. Un autre effet intéressant est que ni l'animal inséminé ni sa progéniture ne sont contaminés par le polymère synthétique car ces polymères sont des macromolécules, ayant typiquement une masse molaire moléculaire de quelques 10000g/mol à quelques  
30 100000g/mol par chaîne de polymère, alors que les antibiotiques et antiviraux naturels ou de synthèse ont une masse molaire moléculaire de l'ordre de quelques 100g/mol à 2000g/mol. L'importante taille des polymères synthétiques selon l'invention empêche leur migration au travers des tissus de l'animal et leur dissémination dans d'autres parties du corps. Les

polymères synthétiques selon l'invention sont éliminés par les voies naturelles de l'animal. Les polymères synthétiques antimicrobiens selon l'invention sont efficaces à faible concentration, de l'ordre de 1mg/L de dilueur à quelques 10mg/L de dilueur alors que les antibiotiques et antiviraux sont couramment utilisés à de plus grandes concentrations pour être efficaces. Enfin les polymères synthétiques selon l'invention conservent la qualité de la semence sans aucune altération et de ce fait les performances reproductives de la semence (fertilité et prolificité) car leur effet n'est pas spermicide et conserve la motilité de spermatozoïdes. Par ailleurs les polymères synthétiques selon l'invention sont parfaitement solubles dans les compositions classiques de dilueurs et sont écologiques dans le sens où du fait de leur grande taille, ces polymères sont facilement bloqués lors des traitements de l'eau en station d'épuration. Ils sont également parfaitement inertes. Le dernier avantage est que les polymères selon l'invention ne sont pas irritants pour les muqueuses de l'animal inséminé.

Les polymères selon la présente invention sont choisis parmi les polymères synthétiques présentant une activité antimicrobienne vis à vis des bactéries ou virus naturellement présents dans les semences animales, une bonne solubilité dans la formulation de dilueur et une innocuité vis-à-vis des spermatozoïdes de la semence c'est-à-dire non spermicide et non diminution de la motilité des spermatozoïdes. Ces polymères synthétiques aux propriétés antimicrobiennes sont typiquement choisis dans la famille des polymères polycationiques, polyanioniques ou des polymères sur lesquels sont greffées des substances antimicrobiennes, tout au long de la chaîne polymérique ou en bouts de chaîne.

La présente invention décrit un additif antimicrobien pour la conservation de semences animales qui consiste en au moins un polymère synthétique à activité antibactérienne soluble dans la semence animale ou dans un milieu d'administration ou de conservation de la semence animale, sélectionné parmi les polymères polycationiques, les polymères polyanioniques ou les polymères sur lesquels sont greffées des substances antimicrobiennes. Afin d'augmenter le spectre d'efficacité de l'additif il est possible d'utiliser un mélange de différents polymères synthétiques. Il est également envisageable d'utiliser un mélange de polymères synthétiques selon l'invention et d'antibiotiques et/ou d'antiviraux pour augmenter le spectre d'efficacité de l'ensemble du dilueur.

Au sein d'un dilueur les polymères synthétiques selon l'invention peuvent être utilisés en combinaison avec d'autres substances antimicrobiennes comme les antibiotiques afin d'en diminuer la concentration ou comme peptides afin de diminuer le coût de la préparation antimicrobienne. Il est également possible d'obtenir des effets de synergie.

Par polymère synthétique on entend dans la présente invention une grande molécule constituée d'unités fondamentales appelées monomères reliées par des liaisons covalentes. On parle de polymères synthétique par opposition aux polymères naturels tels le caoutchouc naturel, les polypeptides (protéines, laine, soie, etc.), et les polysaccharides (glucides, cellulose, alginate, amidon, glucides sous forme d'osides, etc.). Les polymères synthétiques selon la présente invention excluent spécifiquement les polymères naturels purs mais incluent les polymères naturels ayant subi des transformations chimiques (réaction de fonctionnalisation, par exemple la désacétylation de la chitine pour obtenir du chitosane). Sont spécifiquement exclus de cette définition de polymères synthétiques les polypeptides et les polysaccharides (polyoses ou osides), ainsi les monomères ne peuvent en aucun cas être des acides aminés ou des oses sauf si ces derniers ont été polymérisés entre eux par l'action directe ou indirecte de l'homme ou s'ils ont été copolymérisés avec des monomères synthétiques car dans ces deux cas, les polymères formés répondent à la présente définition de polymères synthétiques selon l'invention. Ces polymères synthétiques peuvent être des homopolymères dans lesquels tous les monomères sont identiques ou des copolymères dont les unités sont constituées de monomères de deux ou plus sortes différentes, soit deux ou plus monomères chimiquement différents. Ces polymères synthétiques peuvent être linéaires, ramifiés ou réticulés.

Ainsi dans un mode de réalisation particulier l'invention décrit un additif antimicrobien pour la conservation de semences animales qui consiste en au moins un polymère synthétique soluble dans la semence animale ou dans un milieu d'administration ou de conservation de la semence animale, ledit polymère n'étant ni un polypeptide ni un polysaccharide.

Dans la présente invention on entend par « polymères sur lesquels sont greffées des substances antimicrobiennes » des polymères synthétiques, à l'exclusion des polypeptides et des polysaccharides, sur lesquels sont greffées des fonctions antibactériennes avec des liaisons fortes ; en d'autres termes ce ne sont pas de simples mélanges entre un composé antibactérien et un polymère (par exemple : iodophores) avec des liaisons faibles. Ces « polymères sur lesquels sont greffées des substances antimicrobiennes » subissent une modification chimique qui intègre des fonctions antibactériennes dans leur structure.

Par polymères synthétiques anioniques on entend des polymères qui portent des groupes chargés négativement et par polymères synthétiques cationiques on entend des polymères qui portent des groupes chargés positivement. Les polymères synthétiques sur lesquels sont greffées des fonctions antimicrobiennes sont des polymères dont la structure générale ne

présente pas d'activité antimicrobienne mais sur lesquels sont greffés des groupes présentant lesdites fonctions antimicrobiennes ; ces groupes peuvent être greffés en bout de chaîne, sur la chaîne principale ou sur des ramifications.

5 Par dilueur standard on entend dans la présente invention un dilueur qui permet de fournir l'énergie nécessaire au bon fonctionnement et au maintien en vie des spermatozoïdes, qui dispose d'un système tampon interdisant les fortes variations de pH et qui présente un équilibre ionique adéquat.

Par fonction antimicrobienne ou effet antimicrobien on entend dans la présente invention la capacité d'éliminer ou tout du moins de réduire significativement la prolifération de microbes.  
10 Les microbes concernés peuvent être des bactéries, des virus, des levures, des mycètes ou des parasites. Dans le cas de la semence les microbes sont plus particulièrement des virus et des bactéries, qui sont en général contenus à l'état naturel dans le liquide séminal. Sans l'étape d'insémination artificielle, lesdits microbes seraient transmis par voie naturelle du mâle à la femelle lors de la copulation.

15 Un additif selon la présente invention contient un polymère synthétique présentant un effet antimicrobien pouvant être sélectionné parmi les sels d'ammonium quaternaire tels :

- les homopolymères et copolymères à base de méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle ou DMAEMA (CAS 2867-47-2), par ex. le poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle) (CAS 25154-86-3) comme homopolymère, le sel quaternaire de chlorure de méthyle de  
20 poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle) aussi nommé poly[chlorure de 2-(méthacryloyloxy)éthyle]triméthylammonium) ou PDMAEMAq (CAS 26161-33-1) comme homopolymère du monomère quaternisé, le poly[(2-éthyltriméthylammonioéthyle méthacrylate éthyle sulfate)-co-(1-vinylpyrrolidone)] (CAS 53633-54-8) comme copolymère avec un monomère hydrosoluble ;

25 - les polymères et copolymères à base d'acrylate de 2-(diméthylamino)éthyle ou DMAEA, par ex. le poly(acrylate de 2-(diméthylamino)éthyle) comme homopolymère et le poly[chlorure de 2-(acryloyloxy)éthyle]triméthylammonium) comme homopolymère du monomère quaternisé ;

- les polymères et copolymères à base de chlorure de diallyldiméthylammonium ou DDA , par  
30 ex. le poly(chlorure de diallyldiméthylammonium) ou PDDA comme homopolymère et le chlorure de poly[acrylamide-co-(chlorure de diallyldiméthylammonium)] comme copolymère avec un monomère hydrosoluble (acrylamide) ;

- les polymères et copolymères à base de bromure de 2-vinyl-1-méthylpyridinium ;
  - les polymères et copolymères à base d'aziridine, par ex. la polyéthylèneimine ou la polyéthylèneimine quaternisée par ajout de bromooctane et méthylation par iodure de méthyle (noté PEIq).
- 5 Un additif selon la présente invention contient un polymère présentant un effet antimicrobien pouvant être sélectionné parmi les sels de phosphonium tels :
- le copolymère de chlorure de Tributyl(4-vinylbenzyl)phosphonium avec de l'acrylamide ;
  - le copolymère de chlorure de Méthacryloyloxyéthyl trioctyl phosphonium avec de l'acrylamide (noté PMAETP-AA).
- 10 Enfin un additif selon la présente invention contient un polymère présentant un effet antimicrobien dont les fonctions antimicrobiennes sont conférées par des fonctions acides ou aldéhydes portées par les chaînes polymériques, par ex. des polymères ou copolymère greffés par des dérivés de benzaldéhyde comme 4-hydroxybenzaldéhyde ou le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde, des polymères ou copolymère greffés par de l'acide salicylique ou
- 15 des polymères ou copolymère greffés par de l'acide 4-aminobenzoïque. Des polymères tels que ceux cités par Brodkorb et al. (Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 20050-20066) sont également parfaitement adaptés à leur utilisation dans un additif selon la présente invention, à savoir des polymères et copolymères possédant des groupes aminoalkyles, tels les alkylaminométhylstyrènes (par exemple le poly(2-(isobutylamino)méthylstyrène).
- 20 Ainsi dans un mode de réalisation particulier le polymère est sélectionné parmi les sels d'ammonium quaternaire, les sels de phosphonium et des chaînes de polymères solubles dans la semence animale ou dans un milieu d'administration ou de conservation de ladite semence, sur lesquelles sont greffées des fonctions antimicrobiennes de type acide, aldéhyde ou aminoalkyle.
- 25 Dans un mode de réalisation où un additif selon l'invention contient au moins un polymère qui est sélectionné parmi les sels d'ammonium quaternaire, ledit polymère est un homopolymère ou un copolymère à base de méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle, à base d'acrylate de 2-(diméthylamino)éthyle, à base de chlorure de diallyldiméthyl ammonium, à base de bromure de 2-vinyl-1-méthylpyridinium ou à base d'aziridine. Plus particulièrement
- 30 le polymère est sélectionné parmi un sel quaternaire de poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle) (CAS 25154-86-3), de chlorure de méthyle de poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle) aussi nommé poly[chlorure de 2-

(méthacryloyloxy)éthyle]triméthylammonium) ou PDMAEMAq (CAS 26161-33-1), le poly[(2-éthylidiméthylammonioéthyle méthacrylate éthyle sulfate)-co-(1-vinylpyrrolidone)] (CAS 53633-54-8), de poly(acrylate de 2-(diméthylamino)éthyle), de poly[chlorure de 2-(acryloyloxy)éthyle]triméthylammonium), de poly(chlorure de diallyldiméthylammonium) ou PDDA, de chlorure de poly[acrylamide-co-(chlorure de diallyldiméthylammonium)], de polyéthylèneimine, ou de polyéthylèneimine quaternisée par ajout de bromooctane et méthylation par iodure de méthyle (noté PEIq).

Dans un mode de réalisation où un additif selon l'invention contient au moins un polymère qui est sélectionné parmi les sels de phosphonium, le polymère est un copolymère de chlorure de tributyl(4-vinylbenzyl)phosphonium avec de l'acrylamide ou un copolymère de chlorure de méthacryloyloxyéthyl trioctyl phosphonium avec de l'acrylamide.

Dans un mode de réalisation où un additif selon l'invention contient une ou plusieurs chaînes de polymères sur lesquelles sont greffées des fonctions antibactériennes, ledit polymère est sélectionné parmi des polymères ou copolymères greffés par des dérivés de benzaldéhyde comme 4-hydroxybenzaldéhyde ou le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde, par de l'acide salicylique, par de l'acide 4-aminobenzoïque ou par un groupe aminoalkyle.

Les polymères selon la présente invention peuvent être dissous dans le dilueur ou fixés sur des substrats placés au contact de la semence ou du dilueur : sur des particules pleines ou poreuses, sur des fibres, sur des films ou sur des mousses. Dans tous les cas l'additif viendra se mélanger à la semence ou au dilueur.

La présente invention décrit également une méthode de conservation d'un échantillon de semence animale qui comporte les étapes suivantes :

- prélèvement de l'échantillon de semence chez le mâle de l'espèce sélectionnée ; puis
- ajout d'un additif selon la présente invention audit échantillon.

Cette méthode peut également être utilisée avec un dilueur. Dans ce mode de réalisation l'invention décrit une méthode de conservation d'un échantillon de semence animale qui comporte les étapes suivantes :

- ajout d'un additif selon l'invention au dilueur standard,
- prélèvement de l'échantillon de semence chez le mâle de l'espèce sélectionnée, et
- mise en solution dans ledit dilueur.

Dans un mode de réalisation particulier la méthode ci-dessus comporte en outre une étape de préparation du dilueur, contenant ou non des antibiotiques, avant l'ajout de l'additif selon l'invention. Dans ce mode de réalisation l'invention décrit une méthode de conservation d'un échantillon de semence animale qui comporte les étapes suivantes :

- 5
- préparation d'un dilueur contenant ou non des antibiotiques et un additif selon l'invention, puis
  - prélèvement de l'échantillon de semence chez le mâle de l'espèce sélectionnée, et
  - mise en solution dans ledit dilueur.

10 Enfin dans un autre mode de réalisation particulier une étape supplémentaire de réfrigération, de congélation ou de cryogénéisation est pratiquée sur l'échantillon de semence animale. Dans ce mode de réalisation l'invention décrit une méthode de conservation d'un échantillon de semence animale qui comporte les étapes suivantes :

- 15
- ajout d'un additif selon l'invention au dilueur standard,
  - prélèvement de l'échantillon de semence chez le mâle de l'espèce sélectionnée, et
  - mise en solution dans ledit dilueur, puis
  - réfrigération, congélation ou cryogénéisation de l'échantillon.

20 Une variante de cette dernière méthode est la préparation d'un dilueur contenant un ou plusieurs antibiotiques dans lequel on ajoute un ou plusieurs polymères selon l'invention afin d'élargir le spectre d'action. Dans ce mode de réalisation l'invention décrit une méthode de conservation d'un échantillon de semence animale qui comporte les étapes suivantes :

- 25
- préparation d'un dilueur contenant un ou des antibiotiques et un additif selon l'invention, puis
  - prélèvement de l'échantillon de semence chez le mâle de l'espèce sélectionnée, et
  - mise en solution dans ledit dilueur, puis
  - réfrigération, congélation ou cryogénéisation de l'échantillon.

Les exemples détaillés ci-après montrent l'intérêt particulier d'un additif selon l'invention contenant au moins un polymère selon l'invention en substitution totale ou partielle des antibiotiques pour la conservation des semences animales.

Sont illustrés ci-dessous l'efficacité antimicrobienne des polymères sur des microbes (ici bactéries et levures) naturellement présents dans les sécrétions animales, la non spermicité de ces polymères, ainsi que la préservation de la motilité des spermatozoïdes ; testé sur des échantillons de semence de mammifères (verrat et bovins).

5

Exemple 1 : propriétés antimicrobiennes

La présente étude vise à montrer les propriétés antimicrobiennes de 5 polymères selon l'invention. Les propriétés antimicrobiennes sont évaluées sur différentes bactéries et levures, classiquement présentes dans les semences de mammifères :

- 10
- Gram - :
    - *Pseudomonas aeruginosa*
    - *Escherichia coli*
    - *Proteus vulgaris*
    - *Citrobacter freundii*
- 15
- *Pantoea agglomerans*
  - Gram + :
    - *Micrococcus luteus*
    - *Streptococcus viridans*
    - *Staphylococcus aureus*
- 20
- Levure :
    - *Candida albicans*

Les bactéries et levures ont été mises en culture en suspension dans un liquide nutritif puis chaque polymère dissout dans le mélange. La solution a été agitée pendant 24h à une température de 37°C.

25 Les 5 polymères selon l'invention utilisés ici sont les suivants :

- 30
- PDMAEMAq pour poly[chlorure de 2-(méthacryloyloxy)éthyle]triméthylammonium)
  - PEIq pour polyéthylèneimine quaternisée
  - PDDA pour poly(chlorure de diallyldiméthylammonium)
  - PMAETP-AA pour copolymère de chlorure de méthacryloyloxyéthyl trioctyl phosphonium avec de l'acrylamide
  - poly(2-(isobutylamino)méthylstyrène).

Les tableaux ci-dessous présentent le pourcentage de microbes ou micro-organismes (ici des bactéries et des levures) inactivés suite à l'ajout des polymères. Le Tableau 1 montre l'effet des polymères selon l'invention sur des bactéries gram négatif. Le Tableau 2 montre l'effet des polymères selon l'invention sur des bactéries gram positif. Le Tableau 3 montre l'effet des polymères selon l'invention sur une variété très répandue de levure.

35

Tableau 1 : Propriétés antimicrobiennes sur bactéries de gram négatif

	PDMAEMAq 50mg/L	PEIq 5mg/L	PDDA 2mg/L	PMAETP-AA 100mg/L	poly(2(isobutylamino) méthylstyrène) 5mg/L
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%
<i>Escherichia coli</i>	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%
<i>Proteus vulgaris</i>	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%
<i>Citrobacter freundii</i>	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%
<i>Pantoea agglomerans</i>	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%

L'effet antibactérien des 4 polymères selon l'invention est de 99% sur l'ensemble des bactéries gram négatif testées.

5

Tableau 2: Propriétés antimicrobiennes sur bactéries de gram positif

	PDMAEMAq 20mg/L	PEIq 10mg/L	PDDA 10mg/L	PMAETP-AA 5mg/L	poly(2(isobutylamino) méthylstyrène) 10mg/L
<i>Micrococcus luteus</i>	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%
<i>Streptococcus viridans</i>	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%
<i>Staphylococcus aureus</i>	>99%	>99%	>99%		>99%

L'effet antibactérien des 4 polymères selon l'invention est de 99% sur l'ensemble des bactéries gram positif testées.

10

Tableau 3 : Propriétés antimicrobiennes sur une levure

	PDMAEMAq 1mg/L	PEIq 3mg/L	PDDA 5mg/L	PMAETP-AA 10mg/L	poly(2(isobutylamino) méthylstyrène) 10mg/L
<i>Candida albicans</i>	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%

L'effet antimicrobien sur les levures (ou effet antifongique ou antimycète) des 5 polymères selon l'invention est de 99% sur l'espèce de levure *Candida Albicans*.

Ces résultats montrent bien un effet antimicrobien puissant de plusieurs polymères selon l'invention sur des bactéries communes et une espèce de levure commune.

5

Exemple 2 : réalisation d'un mélange de polymères selon l'invention

On réalise une solution aqueuse contenant :

- 5mg/L de PMAETP-AA
- 3mg/L de PEIq
- 2mg/L de PDDA

10

Les 3 polymères selon l'invention utilisés ici sont les suivants :

PDMAEMAq pour poly[chlorure de 2-(méthacryloyloxy)éthyle]triméthylammonium)  
PEIq pour polyéthylèneimine quaternisée  
PDDA pour poly(chlorure de diallyldiméthylammonium)

15

On obtient un mélange permettant d'obtenir un large spectre d'efficacité, sur des bactéries à gram positif, sur des bactéries gram négatif et sur des levures. Ce mélange constitue un additif selon l'invention contenant plusieurs polymères. Cet additif peut être ajouté à un prélèvement de sperme pour une utilisation directe ou ajouté à un dilueur en vue de la conservation de l'échantillon de sperme pour une utilisation ultérieure.

20

Exemple 3 : évaluation des propriétés antimicrobiennes d'un mélange de polymères et de son action sur la qualité de la semence

De la semence bovine (échantillon T) provenant d'un même éjaculat a été diluée de la façon suivante:

25

- échantillon A : dans un dilueur standard contenant un antibiotique à streptomycine dosé à 1mg/ml
- échantillon B : dans un dilueur de même composition à l'exception de l'antibiotique, remplacé par le mélange de polymères issu de l'exemple 2, dosé à 10mg/L
- échantillon C : dans un dilueur de même composition ne contenant aucun antibiotique

30

Après dilution, les quatre échantillons de semence ont été refroidies à une température de 5°C puis conservées pendant 72h. La qualité de chacun des échantillons après 72h a été évaluée suivant les paramètres suivants :

- Concentration en gamètes mesurée par spectrophotométrie
- 5 • Pourcentage de gamètes mobiles mesuré par microscopie optique
- Motilité des gamètes mesurée par microscopie optique

Après 72h les échantillons ne présentent pas de différence de qualité, la concentration en gamètes, le pourcentage de gamètes mobiles ainsi que leur mobilité est identique dans tous les échantillons.

- 10 L'utilisation du mélange de polymères n'altère donc pas la qualité de la semence.

Les échantillons T avant dilution, A après 72h d'incubation, B après 72h d'incubation et C après 72h d'incubation ont été mis en culture sur une boîte de Pétri garnie d'un milieu nutritif afin d'effectuer un comptage des colonies s'étant développées après 48h à 37°C.

Échantillon	T avant dilution	A après 72h d'incubation	B après 72h d'incubation	C après 72h d'incubation
Nombre de colonies	45	5	0	>300

- 15 L'échantillon T représente la concentration initiale en microbes de l'éjaculat, soit une mesure réalisée avant l'ajout d'un additif ou la mise en solution dans un diluant. Ces microbes sont naturellement présents dans la semence bovine.

On observe que pour l'échantillon C il y a un très important développement de colonies microbiennes en l'absence d'antibiotiques.

- 20 Par contre pour les échantillons A et B il n'y a pas (pour B) ou peu (pour A) de développement de colonies microbiennes.

Ceci illustre clairement le fait que les polymères selon l'invention peuvent présenter un effet au moins équivalent voire supérieur à celui des antibiotiques utilisés de façon classique dans les dilueurs pour la conservation du sperme animal.

## REVENDICATIONS

1. Additif antimicrobien pour la conservation de semences animales caractérisé en ce qu'il consiste en au moins un polymère synthétique à activité antimicrobienne soluble dans la semence animale ou dans un milieu d'administration ou de conservation de la semence animale, sélectionné parmi les polymères polycationiques, les polymères polyanioniques ou les polymères sur lesquels sont greffées des substances antimicrobiennes.
2. Additif selon la revendication 1 caractérisé en ce que le au moins un polymère synthétique est sélectionné parmi les sels d'ammonium quaternaire, les sels de phosphonium et des chaînes de polymères solubles dans la semence animale ou dans un milieu d'administration ou de conservation de ladite semence, sur lesquelles sont greffées des fonctions antimicrobiennes de type acide, aldéhyde ou aminoalkyle.
3. Additif selon la revendication 2 caractérisé en ce que le sel d'ammonium quaternaire est un homopolymère ou un copolymère à base de méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle, à base d'acrylate de 2-(diméthylamino)éthyle, à base de chlorure de diallyldiméthyl ammonium, à base de bromure de 2-vinyl-1-méthylpyridinium ou à base d'aziridine.
4. Additif selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les composés suivants : sel quaternaire de poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle), chlorure de méthyle de poly(méthacrylate de (2-(diméthylamino)éthyle), de poly[(2-éthylldiméthylammonioéthyle méthacrylate éthyle sulfate)-co-(1-vinylpyrrolidone)], de poly(acrylate de 2-(diméthylamino)éthyle), de poly[chlorure de 2-(acryloyloxy)éthyle]triméthylammonium), de poly(chlorure de diallyldiméthylammonium) ou PDDA, de chlorure de poly[acrylamide-co-(chlorure de diallyldiméthylammonium)], de polyéthylèneimine, ou de polyéthylèneimine quaternisée.

5. Additif selon la revendication 2 caractérisé en ce que le sel de phosphonium est un copolymère de chlorure de tributyl(4-vinylbenzyl)phosphonium avec de l'acrylamide ou un copolymère de chlorure de méthacryloyloxyéthyl trioctyl phosphonium avec de l'acrylamide.

5 6. Additif selon la revendication 2 caractérisé en ce que les chaînes de polymères sur lesquelles sont greffées des fonctions antibactériennes sont sélectionnées parmi des polymères ou copolymères greffés par des dérivés de benzaldéhyde comme 4-hydroxybenzaldéhyde ou le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde, par de l'acide salicylique ou par de l'acide 4-aminobenzoïque, ou par un groupe aminoalkyle.

10

7. Additif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il est associé à un dilueur standard.

8. Méthode de conservation d'un échantillon de semence animale caractérisée en ce qu'elle comporte les étapes suivantes : prélèvement de l'échantillon de semence chez le mâle de l'espèce sélectionnée, et ajout d'un additif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9. Méthode de conservation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'additif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 est ajouté à un dilueur standard et que l'échantillon y est mis en solution.

20

10. Méthode de conservation selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que l'échantillon est ensuite soumis à une étape de réfrigération, de congélation ou de cryogénéisation.

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2018/077969

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A01N1/02  
ADD.  
  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A01N  
  
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/181558 A1 (IPABC LTD [GB]) 3 December 2015 (2015-12-03) cited in the application claims 17,35,37	1,2,6-10
X	WO 2010/139956 A1 (ALGIPHARMA IPR AS [NO]; ONSOYEN EDVAR [NO]; MYRVOLD ROLF [NO]; DESSEN) 9 December 2010 (2010-12-09) cited in the application claims 1,15,16,24 page 3, paragraph 2	1,2,7-10
X	WO 00/16812 A1 (AMERICAN NAT RED CROSS [US]) 30 March 2000 (2000-03-30) cited in the application page 5, last paragraph claims 1-5	1-4,6-10
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  31 January 2019	Date of mailing of the international search report  11/02/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Marie, Gérald

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2018/077969

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94/00161 A1 (SHANBROM EDWARD [US]) 6 January 1994 (1994-01-06) cited in the application claim 2 page 16, last paragraph -----	1,7-10
X	WO 92/04031 A1 (SHANBROM EDWARD [US]) 19 March 1992 (1992-03-19) cited in the application claim 7 page 29, last paragraph - page 30, paragraph 1 table II -----	1,7-10
X	US 5 360 605 A (SHANBROM EDWARD [US]) 1 November 1994 (1994-11-01) cited in the application column 15, last paragraph - column 17, paragraph 1 table I -----	1,7-10
X	WO 93/17693 A1 (SHANBROM EDWARD [US]) 16 September 1993 (1993-09-16) cited in the application page 30, paragraph 3 - page 31, paragraph 1 -----	1,2,6-10
X	WO 97/48482 A1 (AMERICAN NAT RED CROSS [US]; PHARMACIA BIOTECH AB [SE]; SHANBROM EDWAR) 24 December 1997 (1997-12-24) page 6, paragraph 5 page 22, paragraph 3 claims 1-6 -----	1,2,6-10
X	WO 97/14785 A2 (ADVANCED REPRODUCTION TECHNOLO [US]) 24 April 1997 (1997-04-24) cited in the application page 12, paragraph 3 page 10, last paragraph - page 11, paragraph 2 claim 2 table 7 examples 5,6 -----	1,2,7-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/077969

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015181558 A1	03-12-2015	AU 2015265637 A1	19-01-2017
		CA 2950517 A1	03-12-2015
		EP 3148334 A1	05-04-2017
		GB 2532302 A	18-05-2016
		US 2017150714 A1	01-06-2017
		WO 2015181558 A1	03-12-2015
WO 2010139956 A1	09-12-2010	AU 2010255542 A1	19-01-2012
		AU 2010255543 A1	19-01-2012
		BR PI1011248 A2	22-03-2016
		CA 2764195 A1	09-12-2010
		CA 2764197 A1	09-12-2010
		CN 102458474 A	16-05-2012
		CN 102497883 A	13-06-2012
		DK 2437783 T3	20-01-2014
		DK 2437784 T3	27-01-2014
		EP 2437783 A1	11-04-2012
		EP 2437784 A1	11-04-2012
		ES 2442793 T3	13-02-2014
		ES 2444541 T3	25-02-2014
		GB 2483203 A	29-02-2012
		GB 2483413 A	07-03-2012
		JP 5202763 B2	05-06-2013
		JP 5202764 B2	05-06-2013
		JP 2012528840 A	15-11-2012
		JP 2012528841 A	15-11-2012
		KR 20120034680 A	12-04-2012
		KR 20120035166 A	13-04-2012
		PT 2437783 E	22-01-2014
		PT 2437784 E	13-02-2014
		RS 53136 B	30-06-2014
		RS 53139 B	30-06-2014
		RU 2011148757 A	20-07-2013
		RU 2011148758 A	20-07-2013
		RU 2016109403 A	26-11-2018
		RU 2016109404 A	26-11-2018
		SI 2437783 T1	30-04-2014
SI 2437784 T1	30-04-2014		
US 2012115803 A1	10-05-2012		
US 2012122768 A1	17-05-2012		
US 2015238520 A1	27-08-2015		
WO 2010139956 A1	09-12-2010		
WO 2010139957 A1	09-12-2010		
WO 0016812 A1	30-03-2000	AU 6035099 A	10-04-2000
		US 6106773 A	22-08-2000
		WO 0016812 A1	30-03-2000
WO 9400161 A1	06-01-1994	EP 0605690 A1	13-07-1994
		JP H06510798 A	01-12-1994
		WO 9400161 A1	06-01-1994
WO 9204031 A1	19-03-1992	AU 644216 B2	02-12-1993
		CA 2072871 A1	05-03-1992
		EP 0500893 A1	02-09-1992
		JP H05502183 A	22-04-1993
		WO 9204031 A1	19-03-1992

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2018/077969
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5360605	A	01-11-1994	US 5360605 A US 5609864 A	01-11-1994 11-03-1997
-----				
WO 9317693	A1	16-09-1993	EP 0591483 A1 JP H06511013 A WO 9317693 A1	13-04-1994 08-12-1994 16-09-1993
-----				
WO 9748482	A1	24-12-1997	AU 721799 B2 CA 2257482 A1 EP 0910460 A1 JP 2000514045 A US 6096216 A WO 9748482 A1	13-07-2000 24-12-1997 28-04-1999 24-10-2000 01-08-2000 24-12-1997
-----				
WO 9714785	A2	24-04-1997	AU 723170 B2 CA 2235069 A1 EP 0857203 A2 JP 4421681 B2 JP 5069280 B2 JP 2000500327 A JP 2008005847 A JP 2010042027 A US 6140121 A US 2002193350 A1 US 2004073964 A1 US 2011183934 A1 WO 9714785 A2	17-08-2000 24-04-1997 12-08-1998 24-02-2010 07-11-2012 18-01-2000 17-01-2008 25-02-2010 31-10-2000 19-12-2002 15-04-2004 28-07-2011 24-04-1997
-----				

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A01N1/02 ADD.</p> <p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>																	
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p> <p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A01N</p> <p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p> <p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data</p>																	
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Catégorie*</th> <th>Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents</th> <th>no. des revendications visées</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2015/181558 A1 (IPABC LTD [GB]) 3 décembre 2015 (2015-12-03) cité dans la demande revendications 17,35,37 -----</td> <td>1,2,6-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2010/139956 A1 (ALGIPHARMA IPR AS [NO]; ONSOYEN EDVAR [NO]; MYRVOLD ROLF [NO]; DESSSEN) 9 décembre 2010 (2010-12-09) cité dans la demande revendications 1,15,16,24 page 3, alinéa 2 -----</td> <td>1,2,7-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 00/16812 A1 (AMERICAN NAT RED CROSS [US]) 30 mars 2000 (2000-03-30) cité dans la demande page 5, dernier alinéa revendications 1-5 -----</td> <td>1-4,6-10</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-/--</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées	X	WO 2015/181558 A1 (IPABC LTD [GB]) 3 décembre 2015 (2015-12-03) cité dans la demande revendications 17,35,37 -----	1,2,6-10	X	WO 2010/139956 A1 (ALGIPHARMA IPR AS [NO]; ONSOYEN EDVAR [NO]; MYRVOLD ROLF [NO]; DESSSEN) 9 décembre 2010 (2010-12-09) cité dans la demande revendications 1,15,16,24 page 3, alinéa 2 -----	1,2,7-10	X	WO 00/16812 A1 (AMERICAN NAT RED CROSS [US]) 30 mars 2000 (2000-03-30) cité dans la demande page 5, dernier alinéa revendications 1-5 -----	1-4,6-10		-/--	
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées															
X	WO 2015/181558 A1 (IPABC LTD [GB]) 3 décembre 2015 (2015-12-03) cité dans la demande revendications 17,35,37 -----	1,2,6-10															
X	WO 2010/139956 A1 (ALGIPHARMA IPR AS [NO]; ONSOYEN EDVAR [NO]; MYRVOLD ROLF [NO]; DESSSEN) 9 décembre 2010 (2010-12-09) cité dans la demande revendications 1,15,16,24 page 3, alinéa 2 -----	1,2,7-10															
X	WO 00/16812 A1 (AMERICAN NAT RED CROSS [US]) 30 mars 2000 (2000-03-30) cité dans la demande page 5, dernier alinéa revendications 1-5 -----	1-4,6-10															
	-/--																
<p><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</p>		<p><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</p>															
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>																	
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p> <p style="text-align: center;">31 janvier 2019</p>		<p>Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale</p> <p style="text-align: center;">11/02/2019</p>															
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale</p> <p style="text-align: center;">Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p style="text-align: center;">Marie, Gérald</p>															

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 94/00161 A1 (SHANBROM EDWARD [US]) 6 janvier 1994 (1994-01-06) cité dans la demande revendication 2 page 16, dernier alinéa -----	1,7-10
X	WO 92/04031 A1 (SHANBROM EDWARD [US]) 19 mars 1992 (1992-03-19) cité dans la demande revendication 7 page 29, dernier alinéa - page 30, alinéa 1 tableau II -----	1,7-10
X	US 5 360 605 A (SHANBROM EDWARD [US]) 1 novembre 1994 (1994-11-01) cité dans la demande colonne 15, dernier alinéa - colonne 17, alinéa 1 tableau I -----	1,7-10
X	WO 93/17693 A1 (SHANBROM EDWARD [US]) 16 septembre 1993 (1993-09-16) cité dans la demande page 30, alinéa 3 - page 31, alinéa 1 -----	1,2,6-10
X	WO 97/48482 A1 (AMERICAN NAT RED CROSS [US]; PHARMACIA BIOTECH AB [SE]; SHANBROM EDWAR) 24 décembre 1997 (1997-12-24) page 6, alinéa 5 page 22, alinéa 3 revendications 1-6 -----	1,2,6-10
X	WO 97/14785 A2 (ADVANCED REPRODUCTION TECHNOLO [US]) 24 avril 1997 (1997-04-24) cité dans la demande page 12, alinéa 3 page 10, dernier alinéa - page 11, alinéa 2 revendication 2 tableau 7 exemples 5,6 -----	1,2,7-10

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2018/077969

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2015181558	A1	03-12-2015	AU 2015265637	A1 19-01-2017
			CA 2950517	A1 03-12-2015
			EP 3148334	A1 05-04-2017
			GB 2532302	A 18-05-2016
			US 2017150714	A1 01-06-2017
			WO 2015181558	A1 03-12-2015
-----				
WO 2010139956	A1	09-12-2010	AU 2010255542	A1 19-01-2012
			AU 2010255543	A1 19-01-2012
			BR PI1011248	A2 22-03-2016
			CA 2764195	A1 09-12-2010
			CA 2764197	A1 09-12-2010
			CN 102458474	A 16-05-2012
			CN 102497883	A 13-06-2012
			DK 2437783	T3 20-01-2014
			DK 2437784	T3 27-01-2014
			EP 2437783	A1 11-04-2012
			EP 2437784	A1 11-04-2012
			ES 2442793	T3 13-02-2014
			ES 2444541	T3 25-02-2014
			GB 2483203	A 29-02-2012
			GB 2483413	A 07-03-2012
			JP 5202763	B2 05-06-2013
			JP 5202764	B2 05-06-2013
			JP 2012528840	A 15-11-2012
			JP 2012528841	A 15-11-2012
			KR 20120034680	A 12-04-2012
			KR 20120035166	A 13-04-2012
			PT 2437783	E 22-01-2014
			PT 2437784	E 13-02-2014
			RS 53136	B 30-06-2014
			RS 53139	B 30-06-2014
			RU 2011148757	A 20-07-2013
			RU 2011148758	A 20-07-2013
			RU 2016109403	A 26-11-2018
			RU 2016109404	A 26-11-2018
SI 2437783	T1 30-04-2014			
SI 2437784	T1 30-04-2014			
US 2012115803	A1 10-05-2012			
US 2012122768	A1 17-05-2012			
US 2015238520	A1 27-08-2015			
WO 2010139956	A1 09-12-2010			
WO 2010139957	A1 09-12-2010			
-----				
WO 0016812	A1	30-03-2000	AU 6035099	A 10-04-2000
			US 6106773	A 22-08-2000
			WO 0016812	A1 30-03-2000
-----				
WO 9400161	A1	06-01-1994	EP 0605690	A1 13-07-1994
			JP H06510798	A 01-12-1994
			WO 9400161	A1 06-01-1994
-----				
WO 9204031	A1	19-03-1992	AU 644216	B2 02-12-1993
			CA 2072871	A1 05-03-1992
			EP 0500893	A1 02-09-1992
			JP H05502183	A 22-04-1993
			WO 9204031	A1 19-03-1992
-----				

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2018/077969

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5360605	A	01-11-1994	US 5360605 A	01-11-1994
			US 5609864 A	11-03-1997
-----				
WO 9317693	A1	16-09-1993	EP 0591483 A1	13-04-1994
			JP H06511013 A	08-12-1994
			WO 9317693 A1	16-09-1993
-----				
WO 9748482	A1	24-12-1997	AU 721799 B2	13-07-2000
			CA 2257482 A1	24-12-1997
			EP 0910460 A1	28-04-1999
			JP 2000514045 A	24-10-2000
			US 6096216 A	01-08-2000
			WO 9748482 A1	24-12-1997
-----				
WO 9714785	A2	24-04-1997	AU 723170 B2	17-08-2000
			CA 2235069 A1	24-04-1997
			EP 0857203 A2	12-08-1998
			JP 4421681 B2	24-02-2010
			JP 5069280 B2	07-11-2012
			JP 2000500327 A	18-01-2000
			JP 2008005847 A	17-01-2008
			JP 2010042027 A	25-02-2010
			US 6140121 A	31-10-2000
			US 2002193350 A1	19-12-2002
			US 2004073964 A1	15-04-2004
			US 2011183934 A1	28-07-2011
			WO 9714785 A2	24-04-1997
-----				