



(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
MA 39410 A1

(51) Cl. internationale :
G01N 33/92

(43) Date de publication :
30.11.2017

(21) N° Dépôt :
39410

(22) Date de Dépôt :
29.04.2014

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:
PCT/EP2014/058741 29.04.2014

(71) Demandeur(s) :
LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES ROMAN PAÏS, Rue Seutin, 11 B-1400 Nivelles (BE)

(72) Inventeur(s) :
VERHOEFT, André

(74) Mandataire :
ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)

(54) Titre : **PROCEDE DE DOSAGE D'ACIDES GRAS ERHYTROCITAIRE**

(57) Abrégé : Procédé comprenant les étapes de amenée d'un volume d'un échantillon de sang humain contenant des acides gras érythrocytaires et des composants constitutifs du sang, obtention d'une solution concentrée desdits acides gras, estérification pour former une solution contenant des esters méthyliques dérivant desdits acides gras érythrocytaires, extraction desdits esters méthyliques dudit solvant, ladite étape d'extraction comprenant une étape d'évaporation, dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme pour obtenir une mesure de la quantité desdits esters méthyliques, comparaison desdites quantités mesurées avec des valeurs prédéterminées de quantités d'esters méthyliques pour doser lesdits acides gras érythrocytaires.

ABREGE**« PROCÉDE DE DOSAGE D'ACIDES GRAS ERYTHROCYTAIRES »**

Procédé comprenant les étapes de amenée d'un volume
5 d'un échantillon de sang humain contenant des acides gras érythrocytaires
et des composants constitutifs du sang, obtention d'une solution
concentrée desdits acides gras, estérification pour former une solution
contenant des esters méthyliques dérivant desdits acides gras
érythrocytaires, extraction desdits esters méthyliques dudit solvant, ladite
10 étape d'extraction comprenant une étape d'évaporation, dosage par
chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de
flamme pour obtenir une mesure de la quantité desdits esters méthyliques,
comparaison desdites quantités mesurées avec des valeurs
prédéterminées de quantités d'esters méthyliques pour doser lesdits
15 acides gras érythrocytaires.



"PROCÉDE DE DOSAGE D'ACIDES GRAS ERHYTHROCYTAIRES"

La présente invention se rapporte à un procédé de dosage d'acides gras érythrocytaires qui est appliqué dans le cadre d'analyses en biologie nutritionnelle et fonctionnelle.

5 Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique et possèdent une chaîne carbonée constituée de 4 à 36 atomes de carbone. La biosynthèse des acides gras est réalisée en présence d'acétyl-coenzyme A qui présente deux atomes de carbone. Ainsi, les acides gras contiennent donc toujours un nombre pair d'atomes
10 de carbone. On retrouve les acides gras dans les triglycérides, les esters de cholestérol et les phospholipides.

Chez l'être humain, les acides gras présentent un rôle métabolique car ils constituent une source d'énergie essentielle pour l'organisme. Les acides gras sont contenus sous forme de triglycérides
15 dans les tissus adipeux. Les mécanismes de la β -oxydation permettent la production d'énergie sous forme d'ATP suite à la dégradation par l'organisme des acides gras.

De plus, les acides gras présentent un rôle structural en ce qu'ils contribuent à la synthèse de lipides autres que les triglycérides tels
20 que les phospholipides. Ces derniers forment les membranes situées autour des cellules et des organites. La composition en acides gras des phospholipides dicte les propriétés d'élasticité et de viscosité liées aux membranes.

Les acides gras peuvent également jouer un rôle de
25 messenger intra- et extracellulaires. Par exemple, l'acide arachidonique est le précurseur des eicosanoïdes qui sont des hormones qui interviennent en cas d'inflammation.

Les acides gras de la présente invention concernent les
30 acides gras qui sont associés aux phospholipides des membranes érythrocytaires. La concentration des acides gras liés aux phospholipides des membranes érythrocytaires permet de contrôler le métabolisme

hépatique, les apports alimentaires, la digestion et l'adsorption desdits acides gras. Une perturbation basée sur la concentration en acides gras déterminée permet d'identifier plusieurs type de pathologies humaines telles que les dépressions, les cancers, les diabètes de type 2, etc.

5 Les acides gras peuvent appartenir à la famille des acides gras saturés qui présentent des atomes de carbone totalement saturés en hydrogène, des acides gras monoinsaturés dont la chaîne d'atomes de carbone comprend une seule double liaison, des acides gras polyinsaturés dont la chaîne d'atomes de carbone comprend au moins deux doubles
10 liaisons, des acides gras « *trans* » qui sont des acides gras insaturés comprenant au moins une double liaison.

L'acide myristique est un acide gras saturé à 14 atomes de carbone et est produit par le foie à partir de carbohydrate et est obtenu par la consommation de graisses animales telles que la viande bovine, le
15 beurre, la crème fraîche, le fromage, le lard, la noix de coco. La fonction de l'acide myristique consiste à contribuer au fonctionnement des récepteurs aux hormones et au transport de protéines de la cellule vers les mitochondries. Un excès d'acide myristique peut être néfaste pour l'organisme et peut indiquer la présence d'un syndrome métabolique. En
20 effet, il est apparu qu'un excès d'acide myristique active la production de radicaux libres par les polymorphonucléaires neutrophiles (« Myristic Acid, A Side Chain of Phorbol Myristate Acetate (PMA), Can Activate Human Polymorphonuclear Leukocytes to Produce Oxygen Radicals More Potently than PMA » Tada.M and al. ; J. Clin. Biochem. Nutr. ; 2009
25 Nov ; 45(3):309-14).

Les acides gras « *trans* » sont des acides gras insaturés qui peuvent présenter deux formes géométriques soit les formes « *cis* » et « *trans* ». Chimiquement, les propriétés des deux formes diastéréoisomériques présentent des propriétés différentes. Dans les
30 molécules d'acides gras de type « *trans* », les doubles liaisons entre atomes de carbone sont en conformation « *trans* » et présentent donc

une forme relativement droite. La conformation « *cis* » des acides gras confèrent aux doubles liaisons entre atomes de carbone une forme relativement courbée.

L'acide trans-vaccénique est un exemple d'acide gras de type « *trans* » et provient de la transformation bactérienne d'acides gras insaturés dans le rumen des ruminants. Ces acides gras peuvent donc s'accumuler et se retrouver dans les produits laitiers comme le beurre, la crème ou le lait ; et dans les viandes.

De récentes études ont mis en évidence l'effet bénéfique des acides gras naturels de type trans-vaccénique contre le cancer du sein dans un modèle animal (« Influence of diet enriched with conjugated linoleic acids on their distribution in tissues of rats with DMBA induced tumors » ; Bialek A et al. Lipids Health Dis. 2010 Nov 2 ; 9 : 126). Malgré les résultats de cette récente étude, il est reconnu qu'une quantité trop élevée d'acides gras « *trans* » sont néfastes pour l'organisme.

Les acides gras polyinsaturés de type oméga-6 et oméga-3 sont largement connus dans le domaine de la nutrition. Le dosage desdits acides gras permet de définir un rapport oméga-6/oméga-3 pour identifier un éventuel déséquilibre alimentaire d'un individu, voire un trouble métabolique ou à détecter l'origine d'une pathologie. Le rapport précité représente le rapport entre l'ensemble des acides gras oméga-6 et l'ensemble des acides gras oméga-3. Un rapport préféré serait de 1/1. Le contrôle du rapport oméga-6/oméga-3 permet de mettre en évidence une augmentation éventuelle d'oméga-6. Une telle augmentation peut conduire à des pathologies comme les maladies cardiaques, inflammatoires, auto-immunes et des cancers. Le contrôle dudit rapport est avantageux pour pouvoir prévenir de telles pathologies humaines.

Un exemple de rapport oméga-6/oméga-3 se rapporte au rapport acide arachidonique/acide eicosapentaénoïque qui donne une indication sur le statut pro-normo ou anti-inflammatoire d'un individu en mesurant la proportion entre l'acide arachidonique précurseur des

eicosanoïdes qui sont des acides gras pro-inflammatoires et l'acide eicosapentaénoïque qui est un précurseur des eicosanoïdes anti-inflammatoires (« Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention » ;
5 Russo GL., Biochem Pharmacol. 2009 Mar 15;77(6):937-46 et "The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases"; Simopoulos AP; Exp. Biol. Med. 2008 Jun;233(6):674-88).

Lorsque le rapport acide arachidonique/acide
10 eicosapentaénoïque dépasse une valeur seuil critique, un état pro-inflammatoire peut être observé chez l'individu concerné. Par conséquent, le déclenchement d'un processus anti-inflammatoire dans l'organisme de l'individu sera anormalement renforcé par la production excessive d'éicosanoïdes pro-inflammatoire. L'obtention d'un profil
15 d'acides gras de l'individu permet de mettre en lumière un tel déséquilibre pouvant être lié à une augmentation accrue d'acide arachidonique, à une carence d'acide éicosapentaénoïque ou les deux. Ainsi, l'administration d'un traitement efficace et approprié à un tel déséquilibre peut être adoptée par l'individu souffrant d'une telle
20 pathologie.

Il est également possible de contrôler le rapport entre l'acide linoléique et l'acide dihomogammalinoléique. Ce rapport renseigne de l'activité de la delta-6-désaturase qui est une enzyme hépatique qui assure la transformation des précurseurs de deux familles
25 d'acides gras polyinsaturés à savoir l'acide α -linoléique pour les acides gras de type ω 3 et l'acide linoléique pour les acides gras appartenant à la famille des ω 6. La delta-6-désaturase constitue l'étape limitante de cette voie métabolique des acides gras.

Lorsque le rapport acide linoléique/acide
30 dihomogammalinoléique est augmenté, il apparaît une déficience de l'activité de la delta-6-désaturase qui peut être néfaste pour la santé de

l'individu concerné. En effet, la conversion des précurseurs des acides gras de type $\omega 3$ et $\omega 6$, soit respectivement l'acide linoléique et l'acide α -linoléique. Cela peut se traduire par une carence en acides gras polyinsaturés. En outre, l'activité de la delta-6-désaturase est affectée en cas d'hyperinsulinisme, de diabète, de stress psychoaffectif, de maladie du foie, d'hypothyroïdie. Les cas précités pouvant se présenter lorsque l'individu consomme une trop grande quantité d'acides gras « *trans* » et qu'il est carencé en magnésium, zinc, vitamine B3 ou B6.

Dans un tel cas de figure, il s'avère nécessaire de pouvoir doser les différents types d'acides gras tels que les acides linoléiques, les acides dihomogammalinoléiques et les acides gras « *trans* » pour pouvoir corriger les carences éventuelles détectées.

Le pourcentage d'acide éicosapentaénoïque et d'acide docosahexanoïque permet de déterminer ce qu'on appelle un « indice oméga-3 » pour l'ensemble des acides gras des phospholipides membranaires des globules rouges. Cet indice constitue un indicateur fiable et efficace pour identifier un risque de mort subite par pathologie cardiovasculaire. La détermination de l'indice oméga-3 permet de contrôler une éventuelle augmentation de la quantité d'acides éicosapentaénoïques et docosahexanoïques.

En somme et au vu de tous les cas de figures précités, il est manifeste que les acides gras érythrocytaires sont des éléments majeurs de la constitution des membranes et sont donc des facteurs déterminants dans l'identification de plusieurs pathologies humaines ou leurs origines. Les acides gras contenus dans lesdites membranes jouent un rôle essentiel dans la structure, dans les différentes fonctions de transmission, dans l'inflammation et la coagulation desdites membranes. Il est recommandé que les différents acides gras soient présents en proportion idéale pour éviter de conduire à un déséquilibre dans l'organisme pouvant être responsable de nombreuses pathologies. La quantité desdits acides

gras érythrocytaires dépend des apports alimentaires journaliers ainsi que du fonctionnement des chaînes métaboliques concernées.

La détermination de la quantité des acides gras érythrocytaires d'intérêt dans le cadre d'une identification pathologique humaine permet de mieux contrôler les mécanismes fonctionnels pouvant survenir dans l'organisme.

Le dosage des acides gras érythrocytaires est effectué sur un échantillon de sang humain et permet d'établir un profil qui met en lumière des éléments différentiels par rapport à des profils de référence issus d'individus sains. Cette mise en évidence d'écart permet de déterminer la présence d'une pathologie liée à une augmentation de la quantité d'acides gras érythrocytaires ou à un déséquilibre entre différents acides gras érythrocytaires ou encore à une carence d'acides gras érythrocytaires. Ainsi, une approche thérapeutique ciblée peut être appliquée sur l'individu concerné.

L'échantillon de sang comprend toutefois des acides gras érythrocytaires mais également d'autres composants constitutifs du sang comme le plasma sanguin. Une des difficultés de la mise en œuvre d'un procédé de dosage de ces acides gras érythrocytaires réside dans l'isolation des espèces d'intérêts qui permettraient de déterminer ledit écart différentiel car tout échantillon de sang contient de nombreux constituants qui ne présentent pas d'intérêt pour un tel procédé de dosage, mais qui en outre interfèrent avec les analyses.

Malheureusement, les techniques actuelles de dosage d'acides gras érythrocytaires ne sont pas encore optimales pour permettre un dosage aisé, rapide, reproductible et fiable d'une grande série d'acides gras érythrocytaires en pathologie humaine.

L'invention a pour but de pallier les inconvénients de l'état de la technique en procurant un procédé de dosage d'une grande série d'acides gras érythrocytaires (jusque 25 différents) qui soit aisément réalisable, fiable et reproductible.

Pour résoudre ce problème, il est prévu suivant l'invention un procédé qui comprend les étapes de :

- 5 - amenée d'un volume prédéterminé d'un échantillon de sang humain contenant des acides gras érythrocytaires et des composants constitutifs du sang,
- obtention d'une solution concentrée desdits acides gras érythrocytaires,
- 10 - estérification desdits acides gras érythrocytaires pour former une solution contenant des esters méthyliques dérivant desdits acides gras érythrocytaires en présence d'un solvant,
- extraction desdits esters méthyliques desdits acides gras érythrocytaires dudit solvant, ladite étape d'extraction comprenant notamment une étape d'évaporation à 15 condensation refroidie du solvant,
- dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme desdits esters méthyliques extraits pour obtenir une mesure de la quantité desdits esters méthyliques,
- 20 - comparaison desdites quantités mesurées desdits esters méthyliques avec des valeurs prédéterminées de quantités d'esters méthyliques correspondant à des quantités d'acides gras érythrocytaires pour doser lesdits acides gras érythrocytaires dans ledit volume 25 prédéterminé de l'échantillon de sang.

Le dosage d'acides gras érythrocytaires selon la présente invention est donc réalisé par un traitement d'un volume prédéterminé d'un échantillon de sang humain qui contient des acides gras érythrocytaires et des composants constitutifs du sang. Les acides gras érythrocytaires sont 30 alors séparés desdits composants constitutifs du sang, lesquels ne

présentent pas d'intérêt pour le dosage selon l'invention, pour obtenir une solution concentrée desdits acides gras érythrocytaires.

Lorsque les espèces à doser sont séparées des composants constitutifs du sang, elles sont simultanément remises en suspension et
5 estérifiées en présence d'un solvant pour former des esters méthyliques qui dérivent directement desdits acides gras érythrocytaires. Cela permet d'obtenir les esters méthyliques de manière concentrée dans un petit volume de solvant qui pourront être identifiés et quantifiés pour établir un
10 profil devant être analysé. En effet, la volatilité des esters méthyliques est supérieure à celle des acides gras ce qui rend l'analyse en chromatographie en phase gazeuse aisée.

L'extraction des esters méthyliques par un solvant et l'évaporation de celui-ci permettent d'obtenir une solution concentrée en esters méthyliques. Il a été constaté de manière surprenante que
15 l'évaporation par condensation refroidie dudit solvant permet d'extraire rapidement, aisément et efficacement les esters méthyliques sans leur porter atteinte, sans perte conséquente desdits esters pourtant volatils également. De cette façon, une solution concentrée en esters méthyliques peut être obtenue.

20 Le dosage desdites espèces d'intérêt, soit les esters méthyliques, peut alors avoir lieu par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme, ce qui permet d'identifier la nature et de mesurer la quantité desdits esters méthyliques extraits. Lesdites quantités mesurées desdits esters méthyliques sont comparées
25 avec des valeurs prédéterminées de quantités d'esters méthyliques correspondant à des quantités d'acides gras érythrocytaires pour doser lesdits acides gras érythrocytaires dans ledit volume prédéterminé de l'échantillon de sang.

30 En conséquence, le procédé selon la présente invention permet de traiter l'échantillon de sang avec une méthode de haute qualité,

ce qui détermine la fiabilité et la reproductibilité du procédé de dosage utilisé.

Avantageusement, l'étape d'évaporation est réalisée en appliquant un vide de 37 mbar à température ambiante durant 10 minutes à 80 tpm pour piéger le solvant à froid. Cela permet d'encore concentrer la solution obtenue en espèces à doser, sans perte ni dégradation consécutive.

De préférence, ladite étape de dosage par chromatographie en phase gazeuse est réalisée en appliquant une température initiale de 60 °C durant 4 minutes, puis en augmentant successivement la température de 6 °C/minute jusqu'à 120 °C durant 1 minute et de 8 °C/minute jusqu'à 240 °C durant 8,5 minutes pour séparer les esters méthyliques en fonction de leur temps de rétention et une augmentation de 20 °C par minute jusqu'à 250 °C. L'avantage d'un tel programme de température réside dans sa capacité à efficacement séparer les différents acides gras de façon à obtenir un signal qui soit aisément lisible et dont les pics repris sur le chromatogramme soient suffisamment séparés pour identifier la nature et pouvoir mesurer la hauteur des pics de chaque esters méthylique correspondant à un acide gras considéré dans le dosage.

Dans une forme de réalisation particulièrement avantageuse du dispositif selon l'invention, ladite étape d'obtention d'une solution concentrée desdits acides gras érythrocytaires comprend les étapes de :

- mélange dudit volume prédéterminé dudit échantillon de sang avec des anticoagulants,
- centrifugation du mélange jusqu'à la formation de deux phases, la première phase comprenant les composants constitutifs du sang, la deuxième phase contenant les acides gras érythrocytaires,
- séparation desdites deux phases pour isoler lesdits acides gras érythrocytaires desdits composants constitutifs dans une phase liquide, et

- lavage, agitation, centrifugation et isolation de la phase liquide constituée desdits acides gras érythrocytaires jusqu'à l'obtention d'une solution concentrée en acides gras érythrocytaires.

5 De plus, dans une forme de réalisation particulière, ladite étape d'estérification des acides gras érythrocytaires comprend les étapes de :

- 10 - addition à ladite solution concentrée en acides gras érythrocytaires d'un solvant et d'une solution d'estérification contenant de l'acide chlorhydrique et du méthanol pour obtenir un mélange,
- mise à l'étuve dudit mélange durant 2 heures à 95°C,
- agitation dudit mélange toutes les 30 minutes, et
- 15 - refroidissement dudit mélange estérifié pour former des esters méthyliques dérivant desdits acides gras érythrocytaires.

Selon un mode préféré, ladite étape d'extraction desdits esters méthyliques desdits acides gras érythrocytaires comprend, avant l'étape d'évaporation, de plus les étapes de :

- 20 - addition d'une solution contenant de l'hydrogencarbonate de sodium saturé à ladite solution dérivée contenant les esters méthyliques,
- addition d'un solvant en présence d'eau, de préférence de l'eau bidistillé,
- 25 - agitation et centrifugation de la solution pour former une phase organique,
- récupération de ladite phase organique,
- addition d'un solvant, de préférence du n-hexane, à ladite phase organique, et
- 30 - extraction desdits esters méthyliques desdits acides gras érythrocytaires.

9

L'ajout d'une solution contenant de l'hydrogencarbonate de sodium saturé à ladite solution dérivée contenant les esters méthyliques permet d'éviter la formation d'une émulsion.

5 Dans une variante du procédé selon l'invention, lesdits anticoagulants sont choisis dans le groupe constitué d'EDTA, d'héparine, de dérivés fluorés.

De manière particulière avantageuse, ladite étape de lavage est réalisée en présence d'une solution de lavage qui contient un mélange constitué de NaCl dissout dans de l'eau ultra pure caractérisée par une
10 résistivité de 18,2 MΩ.cm à 25°C correspondant à une conductivité de 0,055 μS/cm à 25°C, qui présente une valeur en carbone organique total (COT) inférieure à 5 ppb.

De préférence, ladite solution d'estérification contient de l'acide chlorhydrique concentré, tel que de l'acide chlorhydrique de grade
15 pour analyse, en particulier de l'acide chlorhydrique à 37 %.

De manière encore plus préférentielle, chaque étape de centrifugation est réalisée durant une période de 5 minutes pour une rotation comprise entre 3400 et 4000 tours par minutes (tpm), de préférence de 3600 tpm.

20 Avantageusement, la durée de chaque étape d'agitation est choisie dans la plage allant de 3 à 300 secondes, de préférences de 20 secondes.

Selon un mode de réalisation préféré, lesdits solvants sont choisis dans le groupe constitué du n-hexane.

25 D'autres formes de réalisation du dispositif, procédé suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

L'invention se rapport également à une utilisation du procédé de dosage selon l'invention. L'utilisation comprenant les étapes de :

30 - établissement d'un profil de données à analyser, lesdites données étant obtenues à l'issue du procédé,

- comparaison du profil de données établi avec une série de profils prédéterminés enregistrés dans un espace de stockage de données,
- détermination d'un écart différentiel entre ledit profil établi et lesdits profils prédéterminés et,
- identification d'un déclin cognitif ou de troubles de l'humeur.

De manière avantageuse, le procédé de dosage suivant l'invention est utilisé en biologie nutritionnelle et fonctionnelle.

De préférence, le procédé de dosage selon l'invention est utilisé pour déterminer le fonctionnement de membranes cellulaires et notamment des neurones.

De manière encore plus avantageuse, le procédé de dosage suivant la présente invention est utilisé pour identifier des pathologies cardiovasculaires, des cancers, des dépressions, des inflammations, du diabète de type 2, des maladies rénales chroniques.

D'autres formes de réalisation de l'utilisation suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention ressortiront de la description donnée ci-après, à titre non limitatif et en faisant référence aux dessins annexés.

Le procédé de dosage suivant l'invention comprend une amenée d'un volume prédéterminé d'un échantillon de sang contenant des acides gras érythrocytaires et des composants constitutifs du sang.

Le volume prédéterminé de l'échantillon de sang peut ensuite être mélangé à un anticoagulant comme de l'EDTA pour former une solution prête à être centrifugée. De cette façon, la phase contenant les espèces d'intérêts est prélevée, isolée desdits composants constitutifs du sang et lavée jusqu'à obtenir une phase concentrée en acides gras érythrocytaires. La phase peut être lavée à l'aide d'une solution de NaCl. La solution concentrée en acides gras érythrocytaires

ainsi obtenue est ensuite estérifiée en présence d'un solvant et d'une solution d'estérification, de préférence une solution contenant de l'acide chlorhydrique et du méthanol. La réaction d'estérification permet donc de former des esters méthyliques qui sont des espèces plus volatiles que les
5 acides gras érythrocytaires. Pour cette raison, les esters méthyliques sont préférés car le dosage peut être effectué aisément par chromatographie en phase gazeuse.

Pour que la réaction d'estérification soit efficace et puisse permettre la formation des esters méthyliques, il a été observé que
10 l'application d'un programme de température prédéterminé a permis de séparer correctement et aisément chaque acide gras érythrocytaire. De plus, la réaction d'estérification doit pouvoir être favorable afin de fournir les espèces devant être dosées. La cinétique de la réaction d'estérification est augmentée par chauffage.

15 Les esters méthyliques doivent de préférence encore être extraits de la solution obtenue après estérification. Pour ce faire, un solvant, de préférence du n-hexane, et de l'eau, de préférence sous forme d'eau bistillée, sont ajoutés à la solution comprenant les esters méthyliques. Une phase organique qui comprend les espèces à doser est
20 obtenue en agitant et centrifugeant la solution précitée. Ainsi, la phase organique est récupérée et mise dans un évaporateur sous vide à température ambiante pour piéger le solvant par condensation refroidie.

Ainsi, les esters méthyliques dérivant des acides gras érythrocytaires peuvent être dosés par chromatographie en phase
25 gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme.

Le dosage selon l'invention permet ainsi la séparation des espèces à doser de type esters méthyliques. Un profil comprenant différents pics caractéristiques de chaque espèce est obtenu. Grace au traitement particulier dans le procédé selon la présente invention, chaque
30 espèce à doser présente un temps de rétention qui lui est propre, ce qui permet de ne pas obtenir des pics qui se chevauchent et qui deviennent

9

illisibles lors de l'interprétation des résultats de dosage. L'identification et la quantification de chaque pic sont réalisées en mesurant la surface sous le pic pour déterminer la quantité d'esters méthyliques présents dans l'échantillon initial tandis que l'ionisation à la flamme permet de détecter
5 les esters méthyliques correspondant aux pics du chromatogramme et donc de déterminer l'acide gras érythrocytaire dont il provient.

Le dosage des acides gras érythrocytaires dans le volume prédéterminé de l'échantillon de sang est réalisé en comparant les quantités mesurées des esters méthyliques avec des valeurs
10 prédéterminées de quantités d'esters méthyliques correspondant à des quantités d'acides gras érythrocytaires.

Le procédé de dosage suivant l'invention permet de mesurer les quantités d'acides gras identifiés en pourcentage en poids et peut être utilisé pour mettre en lumière un déséquilibre pouvant conduire à de
15 nombreuses pathologies humaines. L'utilisation du procédé consiste alors à établir un profil de données issu d'un échantillon de sang d'un individu. L'analyse consiste à comparer le profil de l'individu avec une série de profils d'individus qui sont considérés comme étant sain.

Ainsi, la comparaison des profils permet de mettre en
20 évidence, si le cas se présente, un écart différentiel correspondant entre autres à une augmentation du taux d'acides gras érythrocytaires ou à une augmentation d'un rapport d'acides gras érythrocytaires ou encore à une carence en acides gras érythrocytaires. Cela pouvant être un élément de
25 prévention de diverses pathologies humaines en biologie nutritionnelle et fonctionnelle.

EXEMPLE 1

Un échantillon de sang présentant un volume prédéterminé
30 est centrifugé durant 5 minutes à 3600 tpm en présence d'EDTA et forme ainsi deux phases. La première phase comprend des composants

constitutifs du sang et la deuxième phase comprend des acides gras érythrocytaires.

un volume prédéterminé compris entre 0,2 et 1 ml, en particulier entre 0,3 et 0,8 ml, de préférence de 0,4 ml d'érythrocytes est
5 prélevé et transféré dans un tube en verre (16 x 100 mm) auquel sont ajoutés environ successivement 3 volumes d'une solution de NaCl (8766 mg de NaCl par litre d'eau) pour obtenir une solution. Cette dernière est vortexée durant 20 secondes puis centrifugée durant 5 minutes à 3600 tpm. La phase supérieure est extraite. Ainsi cette opération est répétée
10 jusqu'à l'obtention d'une solution concentrée en acides gras érythrocytaires.

La solution concentrée en acides gras érythrocytaires est estérifiée en mélangeant 1 volume, de préférence 40 µl, de la solution concentrée en acides gras érythrocytaires avec 10 volumes, de préférence
15 400 µl, de n-hexane et 10 volumes, de préférence 400 µl, d'une solution d'estérification qui comprend de l'acide chlorhydrique à 37 % et du méthanol (par exemple, 12,33 ml d'HCl à 37 % dans un jaugé de 100 ml en présence de méthanol). La solution ainsi obtenue est fermée hermétiquement dans un tube, mélangée et mise à l'étuve durant 2 heures
20 à 95 °C. Le tube est agité toutes les 30 minutes jusqu'à obtenir un mélange estérifié dans lequel les acides gras érythrocytaires ont été transformés en esters méthyliques.

L'extraction des esters méthyliques est réalisée en ajoutant audit mélange estérifié 20 volumes, de préférence 800 µl, d'une solution
25 de NaHCO₃ saturé, et 100 volumes, de préférence 4 ml, d'un mélange de n-hexane et d'eau (75-25), de préférence sous forme d'eau bidistillée. Le mélange ainsi obtenu est vortexé plusieurs fois durant 5 minutes et ensuite centrifugé durant 5 minutes à 4000 tpm à 6 °C. Cela conduit à la formation notamment d'une phase organique qui est récupérée et évaporée à l'aide
30 d'un évaporateur sous vide, par exemple de type Labconco RapidVap (Chrom0125). Cet évaporateur sous vide est muni d'une pompe qui

permet de piéger le n-hexane à froid et ainsi permettre le traitement d'un grand nombre d'échantillon (69 tubes) de sang sans atteindre à la qualité du dosage. Les conditions de l'évaporateur sont les suivantes : 80 tpm, température inférieure à 30 °C et 37 mbar.

5 Lorsque l'évaporation est terminée, l'échantillon est resuspendu dans 0,5 ml de n-hexane et vortexé durant 3 secondes.

Le dosage peut alors avoir lieu et consiste à analyser la solution par chromatographie en phase gazeuse qui va permettre de séparer les esters méthyliques qui présenteront différents temps de rétention dans la colonne. Cette dernière peut être une colonne Supelco
10 SP 2560 (0,18 mm x 75 m x 0,14 µm).

Les conditions de températures de chromatographie consistent à appliquer une température initiale de 60 °C qui est maintenue durant 4 minutes. Ensuite, la température est augmentée de
15 6°C/minute jusqu'à 120 °C durant 1 minute. Enfin, la température est à nouveau augmentée de 8 °C/minute durant 8,5 minutes. Enfin, la température est augmentée de 20 °C par minutes jusqu'à 250 °C.

Une fois la séparation terminée, l'identification des esters méthyliques est réalisée par détection à ionisation de flamme.

20 Les résultats obtenus après dosage de l'échantillon d'urine sont repris dans le tableau 1.

TABLEAU 1

La limite de détection est généralement de 0,015 % et la limite de quantification est de 0,03 %.

5

Formule	Nom	(% en poids)
C14 :0	acide myristique	0.16 - 0.40
C15 :0	acide pentadécanoïque	0.15 - 0.45
C16 :0	acide palmitique	21.16 - 23.53
C16:1 9t	acide palmitoléidique	0.100 - 0.180
C16 :1n7	acide palmitoléique	0.180 - 0.490
C17	acide margarique	0.04 - 0.06
C18 :0	acide stéarique	13.43 - 17.17
C18 :1n7	acide cis-vaccénique	0.67 - 0.96
C18 :1n7t	acide trans-vaccénique	0.04 - 0.19
C18 :1n9	acide oléique	12.00 - 14.70
C18 :1n9t	acide trans-élaïdique	0.02 - 0.08
C18 :2n6	acide linoléique	8.49 - 11.15
C18 :3n3	acide α -linoléique	0.08 - 0.17
C18 :3n6	acide γ -linoléique	0.04 - 0.09
C20 :1n9	acide gadoléique	0.15 - 0.21
C18:2 9c 11t	acide ruménique	0.07 - 0.15
C20 :3n6	acide dihomogammalinoléique	1.28 - 2.20
C20 :4n6	acide arachidonique	11.00 - 13.44
C24:0	acide lignocérique	5.18 - 6.06
C20 :5n3	acide éicosapentaénoïque	0.75 - 2.34
C24:1 15c	acide nervonique	5.00 - 6.54
C22:4	acide adrénique	1.84 - 3.72
C22 :5n6	acide docosapentaénoïque	0.17 - 0.37
C22 :6n3	acide docosahexaénoïque	5.59 - 6.40

Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées.

10

REVENDEICATIONS

1. Procédé de dosage d'acides gras érythrocytaires, comprenant les étapes de :
- 5 - amenée d'un volume prédéterminé d'un échantillon de sang humain contenant des acides gras érythrocytaires et des composants constitutifs du sang,
 - obtention d'une solution concentrée desdits acides gras érythrocytaires,
 - 10 - estérification desdits acides gras érythrocytaires pour former une solution contenant des esters méthyliques dérivant desdits acides gras érythrocytaires en présence d'un solvant,
 - extraction desdits esters méthyliques desdits acides gras érythrocytaires dudit solvant, ladite étape d'extraction
 - 15 comprenant notamment une étape d'évaporation à condensation refroidie du solvant,
 - dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme desdits esters méthyliques extraits pour obtenir une mesure de la
 - 20 quantité desdits esters méthyliques,
 - comparaison desdites quantités mesurées desdits esters méthyliques avec des valeurs prédéterminées de quantités d'esters méthyliques correspondant à des quantités d'acides gras érythrocytaires pour doser lesdits
 - 25 acides gras érythrocytaires dans ledit volume prédéterminé de l'échantillon de sang.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'étape d'évaporation est réalisée en appliquant un vide de 37 mbar à température ambiante durant 10 minutes à 80 tpm pour piéger le solvant à froid.
- 30 3. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans lequel ladite étape de dosage par chromatographie en phase

gazeuse est réalisée en appliquant une température initiale de 60 °C durant 4 minutes, puis en augmentant successivement la température de 6 °C/minutes jusqu'à 120 °C durant 1 minutes et de 8 °C/minutes jusqu'à 240 °C durant 8,5 minutes pour séparer les esters méthyliques en fonction de leur temps de rétention et une augmentation de 20 °C par minute jusqu'à 250 °C.

4. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ladite étape d'obtention d'une solution concentrée desdits acides gras érythrocytaires comprend les étapes de :

- 10 - mélange dudit volume prédéterminé dudit échantillon de sang avec des anticoagulants,
- centrifugation du mélange jusqu'à la formation de deux phases, la première phase comprenant les composants constitutifs du sang, la deuxième phase contenant les
- 15 acides gras érythrocytaires,
- séparation desdites deux phases pour isoler lesdits acides gras érythrocytaires desdits composants constitutifs dans une phase liquide, et
- lavage, agitation, centrifugation et isolation de la phase
- 20 liquide constituée desdits acides gras érythrocytaire jusqu'à l'obtention d'une solution concentrée en acides gras érythrocytaires.

5. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ladite étape d'estérification des acides gras érythrocytaires comprend les étapes de :

- 25 - addition à ladite solution concentrée en acides gras érythrocytaires d'un solvant et d'une solution d'estérification contenant de l'acide chlorhydrique et du méthanol pour obtenir un mélange,
- mise à l'étuve dudit mélange durant 2 heures à 95°C,
- 30 - agitation dudit mélange toutes les 30 minutes, et

- refroidissement dudit mélange estérifié pour former des esters méthyliques dérivant desdits acides gras érythrocytaires.

5 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite étape d'extraction desdits esters méthyliques desdits acides gras érythrocytaires comprend, avant l'étape d'évaporation, de plus les étapes de :

- 10 - addition d'une solution contenant de l'hydrogénocarbonate de sodium saturé à ladite solution dérivée contenant les esters méthyliques,
- addition d'un solvant en présence d'eau, de préférence de l'eau bidistillé,
- agitation et centrifugation de la solution pour former une phase organique,
- 15 - récupération de ladite phase organique,
- addition d'un solvant, de préférence du n-hexane, à ladite phase organique, et
- extraction desdits esters méthyliques desdits acides gras érythrocytaires.

20 7. Procédé selon la revendication 4, dans lequel les anticoagulants sont choisis dans le groupe constitué d'EDTA, d'héparine, de dérivés fluorés.

25 8. Procédé selon la revendication 4 ou 7, dans lequel ladite étape de lavage est réalisée en présence d'une solution de lavage qui contient un mélange constitué de NaCl dissout dans de l'eau ultra pure caractérisé par une résistivité de 18,2 MΩ.cm à 25°C correspondant à une conductivité de 0,055 μS/cm à 25°C, qui présente une valeur en carbone organique total (COT) inférieure à 5 ppb.

30 9. Procédé selon la revendication 5, dans lequel la solution d'estérification contient de l'acide chlorhydrique concentré, en particulier

de grade pour analyse, plus particulièrement de l'acide chlorhydrique à 37 %.

5 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel chaque étape de centrifugation est réalisée durant une période de 5 minutes pour une rotation comprise entre 3400 et 4000 tpm, de préférence 3600 tpm.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la durée de chaque étape d'agitation est choisie dans la plage allant de 3 à 300 secondes, de préférence 20 secondes.

10 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel lesdits solvants sont choisis dans le groupe constitué du n-hexane.

13. Utilisation du procédé de dosage selon les revendications précédentes comprenant les étapes de :

- 15 - établissement d'un profil de données à analyser, lesdites données étant obtenues à l'issue du procédé,
- comparaison du profil de données établi avec une série de profils prédéterminés enregistrés dans un espace de stockage de données,
- 20 - détermination d'un écart différentiel entre ledit profil établi et lesdits profils prédéterminés et,
- identification d'un déclin cognitif ou de troubles de l'humeur.

25 14. Utilisation du procédé de dosage selon les revendications 1 à 12, en biologie nutritionnelle et fonctionnelle.

15. Utilisation du procédé de dosage selon les revendications 1 à 12, pour déterminer le fonctionnement des membranes cellulaires et notamment des neurones.

30 16. Utilisation du procédé de dosage selon les revendications 1 à 12, pour identifier des pathologies cardiovasculaires,

des cancers, des dépressions, des inflammations, du diabète de type 2,
des maladies rénales chroniques.

A handwritten mark or signature, possibly a stylized letter 'g' or a similar symbol, located in the bottom right corner of the page.



**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et
complétée par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 39410	Date de dépôt : 29/04/2014
Déposant : LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES ROMAN PAÏS	Date d'entrée en phase nationale : 27/10/2016
Intitulé de l'invention : PROCEDE DE DOSAGE D'ACIDES GRAS ERHYTROCITAIRE	
<p>Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.</p> <p>Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com, et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.</p>	
<p>Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :</p> <p>Partie 1 : Considérations générales</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés</p> <p>Partie 2 : Rapport de recherche</p> <p>Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention</p>	
Examineur: A.MESLOHI	Date d'établissement du rapport : 09/10/2017
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	

Partie 1 : Considérations générales		
Cadre 1 : base du présent rapport		
Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :		
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Description</u> 17 Pages • <u>Revendications</u> 16 		
Partie 2 : Rapport de recherche		
Classement de l'objet de la demande :		
CIB : G01N33/92		
Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :		
EPOQUE, Orbit		
Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X	Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters; K. Eder; Journal of Chromatography B, 671 (15/09/1995) 113-131. Abrégé - Partie 2.1	1-16
Y	EP2597142; Alfa Laval Corporate AB ; 29/05/2013 Abrégé Paragraphe : 2, 6, 9, 13, 20, 22 Revendications 1-7	1-16
<p>*Catégories spéciales de documents cités :</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>-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs</p> <p>-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté</p>		

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité*Cadre 4 : Remarques de clarté*

Le terme « Solution concentrée » employé dans la revendication 1 est vague et imprécis et laisse subsister un doute quant à la signification de la caractéristique technique à laquelle il se rapporte, au point que l'objet de ladite revendication n'est pas clairement défini. Ce qui ne satisfait pas aux exigences de clarté conformément à l'article 35 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté (N)	Revendications 1-16	Oui
	Revendications Aucune	Non
Activité inventive (AI)	Revendications Aucune	Oui
	Revendications 1-16	Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-16	Oui
	Revendications Aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters
D2 : EP2597142

1. Nouveauté (N) :

Aucun des documents cités ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques de la revendication 1, d'où l'objet de ladite revendication est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13. Par la suite, les revendications 2-16 dépendantes sont aussi nouvelles.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 décrit une méthode d'analyse chromatographique en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras (EMAG).

La méthode comprend une étape de transestérification acide et les réactifs utilisés sont l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique et le trifluorure de bore dans du méthanol. Vient ensuite une étape de double extraction par addition d'un mélange de n-hexane et d'eau.

La différence entre l'objet de la revendication 1 et le document D1 réside dans la présence d'une étape d'évaporation à condensation refroidie du solvant.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'une autre méthode de dosage des esters méthyliques d'acides gras.

La solution proposée n'implique pas une activité inventive. En effet, le document D2 divulgue une méthode d'obtention d'acides gras qui comprend une étape de condensation à froid desdits

acides gras. Ainsi, l'homme du métier peut arriver à l'objet de ladite revendication, en combinant simplement les documents D1 et D2, sans faire preuve d'esprit inventif.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 n'implique pas une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications 2-16 n'apportent aucune caractéristique supplémentaire donnant un avantage technique à ladite invention. Ainsi, l'objet desdites revendications n'est pas inventif au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.