

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 129 727**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **21 12678**

⑤1 Int Cl⁸ : **G 01 N 21/69 (2022.01), G 01 N 1/40, 21/76, 33/48**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 29.11.21.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 02.06.23 Bulletin 23/22.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES Etablis-
sment public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : SCORSONE Emmanuel, HAMEL Mat-
thieu et STEWART Samuel.

⑦3 Titulaire(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES Etablis-
sment public.

⑦4 Mandataire(s) : BREVALEX.

⑤4 PROCÉDÉ DE DÉTECTION DU SCATOL DANS UNE SOLUTION AQUEUSE.

⑤7 L'invention se rapporte à un procédé pour détecter la présence de scatol dans une solution aqueuse, qui comprend les étapes consistant à : a) préparer un extrait organique à partir de la solution aqueuse, par : i) mélange de la solution aqueuse avec une matière grasse puis séparation de la solution aqueuse de la matière grasse ; ii) mélange de la matière grasse obtenue à l'issue de i) avec un solvant organique aprotique puis séparation de la matière grasse du solvant organique aprotique ; et iii) ajout d'un sel de fond au solvant organique aprotique obtenu à l'issue de ii) ; b) soumettre l'extrait organique préparé à l'étape a) à une réaction d'électro-chimioluminescence ; etc) mesurer l'intensité de la luminescence pendant l'étape b) et, si l'intensité de luminescence mesurée dépasse une valeur seuil prédéterminée, déduire la présence de scatol dans la solution aqueuse.

Applications : identification avant leur abattage des porcs mâles entiers dont la viande est porteuse de l'odeur de verrat ; outil de recherche, notamment pour étudier les facteurs influençant la production de scatol dans les tissus adipeux des porcs mâles entiers en vue de développer des méthodes permettant de prévenir ou de réduire l'odeur de verrat.

FR 3 129 727 - A1



Description

Titre de l'invention : PROCÉDÉ DE DÉTECTION DU SCATOL DANS UNE SOLUTION AQUEUSE

Domaine technique

- [0001] L'invention relève du domaine de l'agroalimentaire et, en particulier, du domaine de la production et de la distribution de la viande de porc.
- [0002] Plus spécifiquement, l'invention se rapporte à un procédé permettant de détecter la présence de scatol, ou 3-méthylindole (3-MIH), dans une solution aqueuse et, notamment, dans du plasma ou du sérum sanguin et, si celui-ci est présent, d'en déterminer la teneur et ce, avec une très grande sensibilité et une très grande spécificité vis-à-vis des autres composés susceptibles d'être également présents dans cette solution.
- [0003] Le scatol étant, avec l'androstérone, responsable d'une odeur à la fois forte et désagréable, dite « odeur de verrat », qui est dégagée pendant la cuisson de la viande de porcs mâles entiers, l'invention peut, en premier lieu, être mise en œuvre pour identifier, avant qu'ils ne soient conduits à l'abattage, les porcs mâles entiers dont la viande est porteuse de l'odeur de verrat.
- [0004] Elle peut également être mise en œuvre comme outil de recherche, notamment pour étudier les facteurs influençant la production de scatol et son accumulation dans les tissus adipeux des porcs mâles entiers en vue de développer des méthodes permettant de réduire le nombre de porcs susceptibles de développer l'odeur de verrat, par exemple par sélection génétique ou par modification des conditions d'élevage (alimentation, conditions de stabulation, composition des groupes d'animaux en termes d'âge, de sexe, etc.).

État de la technique antérieure

- [0005] L'odeur de verrat découle principalement d'une accumulation du scatol et de l'androstérone et, dans une moindre mesure, de l'indole dans les tissus adipeux des porcs mâles entiers, c'est-à-dire non castrés.
- [0006] Cette odeur, qui se dégage pendant la cuisson de la viande de porc, est généralement considérée comme nauséabonde par les consommateurs.
- [0007] Historiquement, pour prévenir l'odeur de verrat, les porcelets mâles étaient castrés avant qu'ils n'atteignent une maturité sexuelle.
- [0008] Toutefois, depuis une quinzaine d'années, des raisons éthiques, de bien-être animal mais également économiques amènent de plus en plus d'éleveurs à ne plus castrer les porcelets mâles et ce, d'autant plus que seuls 5 % à 10 % des adultes développent l'odeur de verrat.

- [0009] On connaît un certain nombre de procédés permettant d'identifier, sur les chaînes d'abattage, les carcasses de porcs mâles dont la viande est porteuse de l'odeur de verrat. Ces procédés ont tous en commun d'utiliser le tissu adipeux comme source des échantillons soumis à la détection.
- [0010] En particulier, il a été proposé dans la demande internationale PCT WO-A-2021/009438, ci-après référence [1], un procédé permettant de détecter et de doser le scatol présent dans un échantillon de tissu adipeux de porc avec une très grande sensibilité – puisque ce procédé présente une limite de détection de l'ordre de 20 nmol/L d'échantillon – et une très grande spécificité vis-à-vis des autres composés indoliques susceptibles d'être également présents dans ce tissu adipeux. Ce procédé consiste à préparer un extrait organique de l'échantillon de tissu adipeux et à soumettre cet échantillon à une réaction d'électrochimiluminescence.
- [0011] Si la détection du scatol sur les chaînes d'abattage présente un indéniable intérêt puisqu'elle permet d'effectuer un tri entre les carcasses qui peuvent être destinées à la découpe et la vente de viande de porc (parce qu'elles sont exemptes d'odeur de verrat) et celles qui doivent être orientées vers une chaîne de transformation de cette viande (parce qu'elles ont l'odeur de verrat), il serait toutefois souhaitable de pouvoir identifier, avant que les porcs ne soient amenés à l'abattage, ceux dont la viande présente l'odeur de verrat.
- [0012] En effet, compte-tenu de la cadence d'abattage à laquelle sont soumis les abattoirs, il se trouve que le temps qui sépare l'abattage des porcs et l'expédition des carcasses vers les ateliers de découpe et les transformateurs est très court, ce qui laisse très peu de temps pour effectuer les analyses nécessaires à la détection de l'odeur de verrat.
- [0013] Une solution à ce problème serait donc d'effectuer ces analyses chez les porcs mâles vivants dans les jours qui précèdent leur abattage.
- [0014] Toutefois, comme il est inenvisageable de réaliser de telles analyses sur des échantillons de tissu adipeux pour des raisons de bien-être animal, il conviendrait de pouvoir les réaliser sur des échantillons sanguins dont le prélèvement est aisé et quasi indolore.
- [0015] L'une des difficultés que pose le développement d'un procédé de détection du scatol dans des échantillons sanguins est la limite de détection très basse que doit présenter ce procédé.
- [0016] En effet, bien que, chez le porc, la concentration du scatol dans le sang soit proportionnelle à sa concentration dans le tissu adipeux, elle est, toutefois, beaucoup plus faible que cette dernière.
- [0017] Ainsi, le seuil de rejet d'une viande de porc par le consommateur étant fixé à environ 0,2 µg de scatol par gramme de tissu adipeux, cela signifie en termes analytiques que :
- dans le cas d'une détection du scatol dans un extrait organique de tissu adipeux, la

limite de détection doit être au plus de 1,5 µmol par litre d'extrait organique, tandis que - dans le cas d'une détection du scatol dans un échantillon sanguin, la limite de détection du scatol doit être au plus de 100 nmol par litre d'échantillon, ce qui ne peut pas être obtenu avec la plupart des procédés analytiques ayant été proposés à ce jour pour détecter le scatol que ce soit dans des échantillons de tissu adipeux ou des échantillons sanguins (immunoessais, colorimétrie, diode laser à désorption thermique couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LDTD-MS/MS), etc.).

- [0018] Actuellement, la technique la plus couramment utilisée pour détecter le scatol dans des échantillons sanguins est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette technique consiste à faire circuler l'échantillon sanguin, après traitement et dilution, dans une colonne contenant une phase stationnaire permettant de séparer les unes des autres les espèces présentes dans cet échantillon et à les détecter au moyen d'un détecteur. Pour le scatol, le détecteur est soit un spectromètre de masse, qui a l'avantage d'être très sélectif, soit un détecteur UV (en raison du cycle aromatique que comprend le scatol).
- [0019] Si cette technique possède la sensibilité requise pour la détection du scatol dans un échantillon sanguin, elle présente les inconvénients de nécessiter des temps d'analyse longs, des opérateurs hautement qualifiés, un appareillage et des consommables onéreux et un niveau de maintenance élevé. Elle est d'ailleurs essentiellement utilisée à des fins de recherche.
- [0020] Compte-tenu de ce qui précède, les inventeurs se sont fixé pour but de fournir un procédé qui permette de détecter la présence de scatol dans un échantillon sanguin – et, plus généralement, dans un milieu aqueux – avec, d'une part, une très grande sensibilité (au moins équivalente avec celle obtenue avec l'HPLC) et, d'autre part, une haute spécificité de sorte à ce que ce procédé conduise à des résultats extrêmement fiables.
- [0021] Ils se sont, de plus, fixé pour but que ce procédé soit simple à mettre en œuvre et qu'il permette d'analyser des séries d'échantillons sanguins à une cadence compatible avec les contraintes des acteurs (éleveurs et abatteurs) de la filière porcine.
- [0022] Ils se sont en outre fixé pour but que la mise en œuvre ne nécessite pas un appareillage complexe et coûteux.
- [0023] L'invention vise justement à fournir un tel procédé.

Exposé de l'invention

- [0024] L'invention a donc pour objet un procédé pour détecter la présence de scatol dans une solution aqueuse, qui comprend les étapes consistant à :
- a) préparer un extrait organique à partir de la solution aqueuse, par :
 - i) mélange de la solution aqueuse avec une matière grasse puis séparation de la

solution aqueuse de la matière grasse, moyennant quoi, si du scatol est présent dans la solution aqueuse, il est extrait par la matière grasse ;

ii) mélange de la matière grasse obtenue à l'issue de i) avec un solvant organique aprotique puis séparation de la matière grasse du solvant organique aprotique, moyennant quoi, si du scatol est présent dans la matière grasse, il est extrait par le solvant organique aprotique ; et

iii) ajout d'un sel de fond au solvant organique aprotique obtenu à l'issue de ii) ;

b) soumettre l'extrait organique préparé à l'étape a) à une réaction d'électro-chimioluminescence (ECL) ; et

c) mesurer l'intensité de la luminescence pendant l'étape b) et, si l'intensité de luminescence mesurée dépasse une valeur seuil prédéterminée, déduire la présence de scatol dans la solution aqueuse.

[0025] Ainsi, selon l'invention, on prépare un extrait organique propre à être soumis à une réaction d'ECL à partir d'une solution aqueuse en effectuant deux extractions liquide-liquide successives, à savoir : une première extraction qui vise à transférer le scatol susceptible d'être présent dans la solution aqueuse vers une matière grasse, puis une deuxième extraction qui vise à transférer le scatol susceptible d'avoir été extrait par la matière grasse vers un solvant organique aprotique.

[0026] Conformément à l'invention, la matière grasse utilisée à la sous-étape i) peut notamment être :

- un acide gras saturé tel que l'acide caprique, l'acide laurique, l'acide myristique, l'acide palmitique ou l'acide stéarique, ou insaturé tel que l'acide oléique, l'acide linoléique, l'acide myristoléique, l'acide palmitoléique, l'acide linoléique ou l'acide arachidonique, ces acides gras étant disponibles commercialement, par exemple auprès de la société Sigma-Aldrich, à des taux de pureté typiquement supérieurs à 95 %,

- une matière grasse d'origine animale telle que le beurre, la graisse de porc (ou saindoux), la graisse de bœuf ou de mouton (ou suif), la graisse d'oie ou de canard, une huile de poisson, ou encore

- une huile végétale telle que l'huile de colza, l'huile de tournesol, l'huile de soja, l'huile de coprah, l'huile de palme, l'huile de lin, l'huile d'olive ou l'huile de germe de maïs.

[0027] Pour des simplicités de mise en œuvre du procédé, on préfère que la matière grasse, d'une part, ait une teneur en eau la plus faible possible et, d'autre part, soit liquide à température ambiante (20°C-25°C) de sorte à éviter d'avoir à la chauffer pour la liquéfier avant de la mélanger à la solution aqueuse.

[0028] Aussi préfère-t-on utiliser une huile végétale, l'huile de colza convenant particulièrement bien.

[0029] Si une matière grasse contenant de l'eau – ce qui est le cas, par exemple, du beurre –

est utilisée, alors, elle est, de préférence, préalablement déshydratée, par exemple par chauffage à une température inférieure à 100 °C avec un tirage sous vide.

- [0030] De préférence, à la sous-étape ii), la solution aqueuse est mélangée avec la matière grasse dans un rapport volumique solution aqueuse/matière grasse inférieur à 1, ce rapport étant typiquement compris entre 0,1 et 0,5 et, mieux encore, entre 0,2 et 0,3.
- [0031] De préférence également, la solution aqueuse est ensuite séparée de la matière grasse par centrifugation.
- [0032] Dans ce qui précède et ce qui suit, le terme « aprotique », lorsqu'il est appliqué à un solvant organique, est pris dans son acception habituelle, à savoir qu'il désigne un solvant organique dont la molécule est exempte d'atome hydrogène acide, c'est-à-dire lié à un hétéroatome comme un atome d'azote, d'oxygène ou de soufre.
- [0033] Conformément à l'invention, le solvant organique aprotique utilisé à la sous-étape ii) est avantageusement un solvant aprotique polaire, c'est-à-dire présentant un moment dipolaire non nul, comme l'acétonitrile, le diméthylsulfoxyde, le carbonate de propylène ou la γ -butyrolactone, préférence étant donnée à l'acétonitrile.
- [0034] De préférence, la matière grasse obtenue à l'issue de la sous-étape i) est mélangée avec le solvant organique aprotique dans un rapport volumique matière grasse/solvant organique inférieur à 1, ce rapport étant typiquement compris entre 0,1 et 0,5 et, mieux encore, entre 0,2 et 0,3.
- [0035] De préférence également, la matière grasse est ensuite séparée du solvant organique aprotique par centrifugation, éventuellement après avoir maintenu, par exemple pendant 1 heure, le mélange matière grasse/solvant organique à une température inférieure ou égale à 4°C mais supérieure à la température de solidification du solvant organique de sorte à figer la matière grasse sans que le solvant organique ne solidifie.
- [0036] Le sel de fond, qui est ajouté au solvant organique obtenu à l'issue de la sous-étape ii), peut être choisi parmi de très nombreux sels étant entendu qu'il doit être, d'une part, soluble dans le solvant organique aprotique, et d'autre part, chimiquement et électrochimiquement inerte de sorte à ne pas perturber la réaction d'ECL ni induire une réaction indésirable avec le scatol.
- [0037] Comme bien connu des électrochimistes, ce sel peut notamment être un tétrafluoroborate, un hexafluorophosphate ou un perchlorate de tétraalkylammonium dont le groupe alkyle comprend de 1 à 6 atomes de carbone, tel que le tétrafluoroborate de tétrabutylammonium ou l'hexafluorophosphate de tétrabutylammonium, ce type de sel présentant, en effet, une stabilité remarquable en milieu organique.
- [0038] Par ailleurs, le sel de fond est ajouté au solvant organique en une quantité telle que sa concentration dans l'extrait organique soit typiquement comprise entre 0,01 mol/L et 1 mol/L, de préférence entre 0,05 mol/L et 0,5 mol/L, et, mieux encore, égale à 0,1 mol/L.

- [0039] Conformément à l'invention, il est préférable que l'extrait organique préparé à l'étape a) soit anhydre, c'est-à-dire qu'il comprenne au plus 1 % massique d'eau.
- [0040] Aussi est-il possible d'ajouter de plus au solvant organique obtenu à l'issue de la sous-étape ii) un agent de séchage tel qu'un sel hygroscopique non soluble dans le solvant organique aprotique du type sulfate de sodium ou de magnésium anhydre, ou un tamis moléculaire (par exemple, de 3 ou 4 angströms) pour éliminer les éventuelles traces d'eau susceptibles d'avoir été extraites par la matière grasse à la sous-étape i) puis par le solvant organique aprotique à la sous-étape ii).
- [0041] Si tel est le cas, cet agent de séchage est ensuite éliminé avant de procéder à l'étape b).
- [0042] Comme connu en soi, la réaction d'ECL est, de préférence, réalisée dans une cellule électrochimique, les termes « cellule électrochimique » désignant ici l'ensemble formé par un contenant de type cuvette ou analogue, dans lequel est placé l'extrait organique pour la réaction d'ECL, et au moins deux électrodes, à savoir une électrode de travail et une contre-électrode.
- [0043] Conformément à l'invention, on préfère :
- que la réaction d'ECL soit initiée par l'application d'un potentiel cathodique à une électrode de travail, qui est plongée dans l'extrait organique, de sorte à induire la formation d'ions superoxydes par réduction du dioxygène dissous dans cet extrait, puis la formation de la base conjuguée du scatol et de radicaux hydroperoxydes, et
 - que l'application d'un potentiel cathodique soit suivie de l'application d'un potentiel anodique de sorte à oxyder la base conjuguée du scatol qui, une fois oxydée, va réagir avec les radicaux hydroperoxydes pour conduire à la formation de *N*-(2-acétyl-phényl)formamide à l'état excité, lequel, par désexcitation (ou, autrement dit, par retour à son état fondamental), émet une luminescence mesurable.
- [0044] Pour des détails sur ce processus, le lecteur est invité à se référer à la référence [1] ainsi qu'à l'article publié par T. Okajima et T. Ohsaka dans *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2002, 523, 34-39, ci-après référence [2].
- [0045] L'application à l'électrode de travail d'un potentiel cathodique puis d'un potentiel anodique peut être réalisée selon différents protocoles électrochimiques et, notamment, par :
- un balayage en potentiel, auquel cas on applique à l'électrode de travail un balayage vers les potentiels négatifs puis un balayage vers les potentiels positifs ;
 - un saut de potentiel, auquel cas on applique à l'électrode de travail un potentiel négatif constant, pendant une durée suffisante pour saturer la surface de cette électrode en ions superoxydes, puis un potentiel positif constant, également pendant une durée suffisante pour saturer la surface de l'électrode de travail en scatol oxydé ; ou
 - par une série d'impulsions de potentiel alternativement cathodique et anodique.

- [0046] Toutefois, dans le cadre de l'invention, on préfère que l'application à l'électrode de travail d'un potentiel cathodique puis d'un potentiel anodique soit réalisée par saut de potentiel car il s'agit du protocole électrochimique qui permet de réaliser la réaction d'ECL le plus rapidement.
- [0047] À titre d'exemple, pour une cellule électrochimique munie d'une électrode de travail et d'une contre-électrode en diamant dopé au bore ainsi que d'une électrode de pseudo-référence en platine, d'excellents résultats ont été obtenus en appliquant à l'électrode de travail un potentiel négatif constant inférieur à -1,5 V (*versus* Pt), par exemple de -1,8 V (*versus* Pt), pendant de 10 secondes à 60 secondes, puis un potentiel positif constant supérieur à 0,5 V (*versus* Pt), par exemple de +0,8 V (*versus* Pt), pendant de 1 à 15 secondes.
- [0048] Le choix du contenant de la cellule électrochimique n'est pas critique en soi.
- [0049] Toutefois, il est souhaitable que ce contenant soit en un matériau résistant aux solvants organiques, aux milieux salins et, si une base forte est utilisée, aux milieux alcalins.
- [0050] Par ailleurs, il convient que ce contenant soit en un matériau optiquement transparent dans la gamme des longueurs d'onde d'émission de la luminescence ou qu'il présente au moins une paroi en un matériau présentant une telle transparence si la détection des photons émis est réalisée par un détecteur optique situé en vis-à-vis de l'une de ses parois.
- [0051] Le choix des électrodes de la cellule électrolytique n'est pas critique non plus.
- [0052] Si la réaction d'ECL est basée sur la formation d'ions superoxydes, alors l'électrode de travail peut être constituée de tout matériau d'électrode permettant la formation de tels ions comme du carbone (graphite, carbone vitreux, diamant dopé, par exemple au bore ou à l'azote, etc.), un métal noble (or, platine, palladium, iridium, etc.) ou un alliage de métaux nobles.
- [0053] La contre-électrode peut être constituée d'un matériau d'électrode différent ou du même matériau d'électrode que celui qui constitue l'électrode de travail.
- [0054] Dans le cadre de l'invention, on préfère que l'électrode de travail et la contre-électrode soient en diamant dopé, notamment au bore, en raison de ce que ce matériau est hautement conducteur, présente une très grande stabilité, une résilience naturelle à l'encrassement due à la forte densité atomique du diamant. Cette résilience à l'encrassement est particulièrement intéressante compte-tenu que l'extrait organique peut comprendre un certain nombre de composés issus du tissu adipeux de porc, dont des acides gras, qui peuvent encrasser rapidement la surface des électrodes. De plus, en cas d'encrassement, ce type d'électrode peut être aisément décrassé par voie électrochimique, par exemple par le procédé décrit dans le brevet US 9,121,107 B2, ci-après référence [3]. Enfin, ce type d'électrode présente une grande fenêtre de potentiel qui

permet d'appliquer des potentiels élevés sans venir électrolyser le solvant présent dans l'extrait organique.

- [0055] Si une électrode de référence est utilisée, alors celle-ci peut notamment être une électrode au calomel saturé (ECS) ou une électrode au chlorure d'argent (Ag/AgCl), éventuellement à double jonction, telles que traditionnellement utilisées en électrochimie. Toutefois, dans le cadre de l'invention, on préfère utiliser une électrode de pseudo-référence en un métal noble tel que le platine parce que ce type d'électrode peut également être aisément dégrassé, par exemple par passage à la flamme.
- [0056] Avantageusement, la cellule électrochimique (i.e. contenant et électrodes) sont réalisés dans des matériaux à bas coûts (contenant en plastique, électrodes à pâte de carbone, etc.) de sorte à être à usage unique, ce qui permet, d'une part, de s'affranchir des problèmes d'encrassement des électrodes et, d'autre part, d'assurer une traçabilité des échantillons de tissus adipeux analysés, par exemple en référencant chaque cellule électrochimique par rapport à une carcasse de porc.
- [0057] Quant au détecteur optique, il peut s'agir d'un photomultiplicateur couplé à une photocathode en bialkali, super-bialkali ou ultra-bialkali, d'une photodiode à avalanche, d'un photomultiplicateur à photocathode en silicium, d'un spectromètre et, notamment, un spectrofluorimètre, d'un détecteur à capteur CCD (de « Charged Coupled Device »), d'un détecteur à capteur CMOS (de « Complementary Metal-Oxide-Semiconductor »), etc.
- [0058] Conformément à l'invention, la valeur seuil utilisée à l'étape c) est, de préférence, au moins égale à 150 % de la valeur moyenne de l'intensité de la luminescence correspondant au bruit de fond du détecteur optique.
- [0059] Comme précédemment indiqué, le procédé de l'invention permet aussi, si du scatol est présent dans l'extrait organique préparé à l'étape a), d'en déterminer la concentration.
- [0060] Ainsi, si la présence de scatol a été déduite à l'étape c), le procédé comprend avantageusement de plus une quantification du scatol présent dans l'extrait organique par comparaison de l'intensité maximale de luminescence mesurée au cours de l'étape c) avec une courbe d'étalonnage, cette quantification étant réalisée au cours de l'étape c) ou postérieurement à l'étape c).
- [0061] Conformément à l'invention, la solution aqueuse est, de préférence, du plasma ou du sérum de sang de porc mâle et, en particulier, du plasma de sang de porc mâle.
- [0062] À cet égard, on rappelle que le plasma est la partie liquide du sang qui est obtenue par centrifugation de ce sang dans un tube en présence d'un anticoagulant et, donc, sans coagulation, tandis que le sérum est la partie liquide du sang qui est obtenue en laissant le sang coaguler dans un tube en l'absence de tout anticoagulant. Ainsi, contrairement au plasma, le sérum est débarrassé des facteurs de coagulation et du fi-

brinogène.

- [0063] Comme mis en évidence par les expérimentations rapportées ci-après, le procédé de l'invention permet de détecter la présence de scatol dans une solution aqueuse avec une grande sensibilité puisqu'une limite de détection autour de 37 nmol de scatol par litre de solution aqueuse a pu être obtenue.
- [0064] Par ailleurs, comme également mis en évidence par les expérimentations rapportées ci-après, la détection du scatol par le procédé de l'invention est hautement spécifique puisque d'autres composés indoliques présents dans les tissus adipeux de porcs comme l'indole et leur précurseur, le tryptophane, ne sont quasiment pas détectés avec ce procédé.
- [0065] D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront du complément de description qui suit, qui se rapporte à des expérimentations ayant permis de valider le procédé de l'invention et qui est donné en référence aux figures annexées.
- [0066] Il va de soi toutefois que ce complément de description n'est donné qu'à titre d'illustration de l'objet de l'invention et ne doit en aucun cas être interprété comme une limitation de cet objet.

Brève description des figures

- [0067] [Fig.1] illustre le chronoampérogramme obtenu en soumettant, à une réaction d'ECL par saut de potentiel, une solution synthétique comprenant 1 $\mu\text{mol/L}$ de scatol et 0,1 mol/L d'hexafluorophosphate de tétrabutylammonium (TBAHFP) dans l'acétonitrile ; sur cette figure, l'axe des ordonnées correspond à l'intensité, notée I et exprimée en microampères (μA), du courant mesuré à l'électrode de travail tandis que l'axe des abscisses correspond au temps, noté t et exprimé en secondes (s).
- [0068] [Fig.2] illustre le signal de luminescence mesuré simultanément à l'enregistrement du chronoampérogramme montré sur la [Fig.1] ; sur cette figure, l'axe des ordonnées correspond au nombre de coups émis, noté Nc et exprimé en unités arbitraires (u.a.), tandis que l'axe des abscisses correspond au temps, noté t et exprimé en secondes (s).
- [0069] [Fig.3] illustre l'intensité maximale du signal de luminescence obtenu en soumettant, à une réaction d'ECL par saut de potentiel, trois solutions synthétiques comprenant respectivement 1 $\mu\text{g/L}$ de scatol, 1 $\mu\text{g/L}$ de tryptophane et 1 $\mu\text{g/L}$ d'indole, ainsi que 0,1 mol/L de TBAHFP dans l'acétonitrile ; sur cette figure, l'axe des ordonnées correspond au nombre maximal de coups émis, noté Nc et exprimé en unités arbitraires (u.a.), tandis que les lettres S, T et I portées sur l'axe des abscisses désignent respectivement le scatol, le tryptophane et l'indole.
- [0070] [Fig.4] illustre une courbe d'étalonnage établie en soumettant, à une réaction d'ECL par saut de potentiel, sept extraits organiques ayant été obtenus à partir d'un seul et même plasma provenant d'un porc mâle non contaminé par du scatol mais auxquels a

été ajouté de 0 nmol/L à 1 μ mol/L de scatol d'origine commerciale ainsi que 0,1 mol/L de TBAHFP ; sur cette figure, l'axe des ordonnées correspond au nombre maximal de coups émis, noté N_c et exprimé en unités arbitraires (u.a.), tandis que l'axe des abscisses correspond à la concentration du scatol, notée $[C]$ et exprimée en nmol/L, dans les extraits organiques.

[0071] [Fig.5] illustre les résultats d'un test visant à comparer le dosage par ECL du scatol dans des extraits organiques ayant été obtenus à partir du plasma de 24 porcs mâles avec le dosage par HPLC du scatol dans le tissu adipeux de ces mêmes porcs ; sur cette figure, l'axe des ordonnées correspond à la concentration de scatol trouvée par ECL, notée $[C]_{ECL}$ et exprimée en ng/g, tandis que l'axe des abscisses correspond à la concentration de scatol trouvée par HPLC, notée $[C]_{HPLC}$ et exprimée en ng/g ; les concentrations symbolisées par des triangles correspondent aux concentrations supérieures au seuil de rejet fixé à 0,2 μ g de scatol/g de tissu adipeux, tandis que les concentrations symbolisées par des cercles correspondent aux concentrations inférieures à ce seuil.

Description des modes de réalisation

[0072] Les expérimentations qui sont décrites ci-après sont réalisées en utilisant :

- soit des extraits organiques préalablement obtenus à partir de plasmas sanguins de porcs conformément à l'invention ;
- soit des solutions, dites ci-après « solutions synthétiques », qui comprennent du scatol, du tryptophane ou de l'indole, tous trois d'origine commerciale (Sigma-Aldrich).

[0073] I - Préparation des extraits organiques et des solutions synthétiques

I.1 – Extraits organiques :

[0074] Les extraits organiques sont préparés en suivant, pour chaque extrait, le protocole opératoire suivant.

[0075] 1 mL de plasma sanguin, préalablement obtenu en soumettant du sang total de porcs à une centrifugation standard en présence d'un anticoagulant (EDTA), est introduit dans un premier tube de 15 mL, conjointement avec 4 mL d'huile de colza.

[0076] Après fermeture, le tube est soumis à une agitation (au vortex) pendant 10 minutes puis à une centrifugation pendant 5 minutes à 4 000 rpm, moyennant quoi sont obtenues une phase huileuse et une phase aqueuse.

[0077] Après ouverture du tube, 2 mL de la phase huileuse surnageante sont prélevés et introduits dans un deuxième tube de 15 mL, conjointement avec 8 mL d'acétonitrile.

[0078] Après fermeture, le tube est soumis à une agitation (au vortex) pendant 10 minutes. Le tube est ensuite placé dans un congélateur pendant 1 heure pour figer la phase huileuse puis il est soumis à une centrifugation pendant 5 minutes à 4 000 rpm,

moyennant quoi sont obtenues une phase huileuse et une phase d'acétonitrile.

[0079] Le passage du tube au congélateur permet de garantir qu'une bonne séparation des phases huileuse et d'acétonitrile sera obtenue lors de la centrifugation à laquelle est ensuite soumis ce tube.

[0080] 8 mL de la phase d'acétonitrile surnageante sont prélevés et introduits dans un troisième tube de 15 mL, conjointement avec 309,9 mg de TBAHFP en tant que sel de fond, et 900 mg de sulfate de sodium en tant qu'agent desséchant pour éliminer les éventuelles traces d'eau susceptibles d'avoir été extraites par l'huile de colza puis par l'acétonitrile.

[0081] Le tube est retourné plusieurs fois pour garantir une totale absorption de ces traces d'eau par le sulfate de sodium qui, contrairement au TBAHFP, ne se dissout pas dans l'acétonitrile.

[0082] Puis, les 8 mL de la phase acétonitrile surnageante sont prélevés.

I.2 – Solutions synthétiques :

[0083] Les solutions synthétiques sont préparées en dissolvant, sous agitation, soit du scatol soit du tryptophane soit de l'indole dans l'acétonitrile, puis en ajoutant aux solutions résultantes du TBAHFP pour leur conférer une concentration en sel de fond de 0,1 mol/L.

II – Détection du scatol

II.1 – Appareillage expérimental :

[0084] Les réactions d'ECL sont réalisées au moyen d'une cellule électrochimique de 10 mL de contenance, de forme parallélépipédique, munie d'une fenêtre en verre optique.

[0085] Deux électrodes se présentant sous la forme de sections en diamant dopé au bore sur un substrat de silicium et servant respectivement d'électrode de travail et de contre-électrode sont positionnées sur les deux parois opposées de cette cellule qui présentent la plus grande surface mais de manière décalée l'une par rapport à l'autre en sorte que ces électrodes sont disposées parallèlement l'une à l'autre mais sans se faire face.

[0086] L'électrode de travail mesure 10 x 10 mm tandis que la contre-électrode mesure 15 x 15 mm. Le contact électrique est assuré *via* le substrat en silicium constituant la face arrière de ces électrodes au moyen d'une bande de cuivre.

[0087] La cellule est, de plus, munie d'un fil de platine servant d'électrode de pseudo-référence.

[0088] Pour les mesures de l'émission lumineuse totale, des mesures électrochimiques et d'ECL sont effectuées à l'aide d'un potentiostat/galvanostat Autolab™ PGSTAT128N (Autolab) ou d'un module photodétecteur PDM03-9107-USB (ET-Enterprises).

[0089] Pour l'obtention des données spectrales, les mesures d'ECL sont effectuées à l'aide d'un potentiostat portable PalmSens4™ (PalmSens) et d'un spectrofluorimètre

Fluoromax™ 4P (Horiba Jobin Yvon) qui permet de suivre en temps réel l'évolution de la luminescence grâce à un logiciel intégré.

[0090] Au début de chaque session de mesures, les électrodes sont soigneusement nettoyées par activation électrochimique en les immergeant dans une solution comprenant 0,1 mol/L de TBAHFP dans de l'acétonitrile et en appliquant des impulsions de 0,5 seconde de 2 mA et -2 mA pendant 200 cycles.

[0091] Pendant les réactions d'ECL, la cellule électrochimique est placée dans le noir absolu pour limiter le bruit de fond du photodétecteur ou du spectrofluorimètre.

II.2 – Protocole expérimental :

[0092] Comme précédemment indiqué, la réaction d'ECL qui est privilégiée dans le cadre de l'invention comprend l'application d'un potentiel cathodique à l'électrode de travail de la cellule électrochimique pour induire la formation d'ions superoxydes, suivie de l'application d'un potentiel anodique à cette même électrode pour induire l'oxydation de la base conjuguée du scatol si celui-ci est présent dans l'extrait organique.

[0093] Comme également précédemment indiqué, on préfère que ceci soit réalisé par un saut de potentiel, c'est-à-dire en appliquant à l'électrode de travail un potentiel négatif constant, pendant une durée suffisante pour saturer la surface de cette électrode en ions superoxydes, puis en lui appliquant un potentiel positif constant, également pendant une durée suffisante pour saturer la surface de l'électrode de travail en scatol oxydé.

[0094] C'est donc ce type de protocole qui est retenu pour toutes les expérimentations décrites ci-après.

[0095] En l'espèce, ces expérimentations sont réalisées en appliquant à l'électrode de travail un potentiel négatif constant de -1,8 V (*versus* Pt) pendant 40 secondes puis un potentiel positif constant de +0,8 V (*versus* Pt) pendant 5 secondes.

[0096] La mesure de la luminescence émise est lancée dès le début de l'application du potentiel négatif à l'électrode de travail.

[0097] À titre d'exemple, le chronoampérogramme obtenu dans ces conditions pour une solution synthétique comprenant 1 µmol/L de scatol est illustré sur la [Fig.1] tandis que le signal de luminescence mesuré simultanément à l'enregistrement du chrono-ampérogramme est illustré sur la [Fig.2].

[0098] Comme le montre la [Fig.2], un pic intense de luminescence est observé lors du saut du potentiel négatif au potentiel positif. Ce pic peut être relié à la présence de scatol dans la solution standard et son amplitude peut, elle, être reliée à la quantité de scatol présent dans ladite solution.

II.3 – Spécificité de la détection du scatol par ECL :

[0100] Afin de vérifier la spécificité de la détection du scatol par ECL, 3 solutions synthétiques comprenant respectivement 1 µg/L de scatol, 1 µg/L de tryptophane et 1 µg/L d'indole, sont soumises chacune à une réaction d'ECL par saut de potentiel.

[0101] Les intensités maximales des signaux de luminescence émis au cours de ces réactions sont illustrées sur la [Fig.3] sous forme d'un diagramme en bâtonnets, le bâtonnet noté S correspond au scatol, le bâtonnet noté T correspondant au tryptophane et le bâtonnet noté I correspondant à l'indole.

[0102] Comme le montre cette figure, un signal de luminescence très élevé est obtenu pour le scatol alors qu'un signal de luminescence très faible est obtenu pour le tryptophane et l'indole, l'intensité maximale de ce signal étant respectivement 200 fois et 170 fois plus faible que celle du signal de luminescence obtenu pour le scatol.

[0103] **II.4 – Test d'étalonnage :**

[0104] Afin de vérifier qu'il est possible de doser de manière fiable par ECL le scatol présent dans des extraits organiques obtenus à partir de plasmas sanguins de porcs, un test d'étalonnage est réalisé en soumettant 7 extraits organiques – dont 6 comprennent du scatol à des concentrations variables et 1 est exempt de scatol (extrait « témoin ») – à une réaction d'ECL par saut de potentiel.

[0105] Tous les extraits organiques ont été préparés à partir d'un seul et même plasma provenant d'un porc non contaminé par du scatol. Puis 6 d'entre eux ont été additionnés de scatol d'origine commerciale à hauteur de 25 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L, 250 nmol/L, 500 nmol/L et 1 μ mol/L.

[0106] L'évolution de l'intensité maximale de luminescence obtenue en fonction de la concentration du scatol dans les extraits organiques est illustrée sur la [Fig.4].

[0107] Cette figure montre une relation quasi linéaire ($R^2 = 0,9948$) entre l'intensité maximale de luminescence et la concentration du scatol. Une courbe d'étalonnage est ainsi obtenue.

[0108] Compte-tenu qu'une partie du scatol initialement présent dans un plasma est perdu lors de la préparation d'un extrait organique à partir de ce plasma, il est possible de calculer la limite de détection du scatol en utilisant [Blanc + 3*Déviati on Standard (Blanc)].

[0109] Cette limite de détection est de 37 nmol de scatol/litre de plasma sanguin, soit 4,84 ng de scatol/g de plasma sanguin.

II.5 – Analyse de plasmas sanguins :

[0110] Afin de vérifier que le dosage du scatol par le procédé de l'invention est bien corrélé à celui qui serait obtenu si le scatol était dosé dans du tissu adipeux de porc, on soumet des extraits organiques préparés à partir du plasma de 24 porcs mâles entiers à une réaction d'ECL par saut de potentiel et on détermine la concentration du scatol dans ces extraits au moyen d'une courbe d'étalonnage du type de celle montrée sur la [Fig.4].

[0111] Les concentrations ainsi obtenues sont comparées à celles préalablement obtenues en dosant par HPLC la concentration du scatol dans le tissu adipeux de ces 24 porcs.

[0112] Les résultats sont illustrés sur la [Fig.5] qui représente la concentration de scatol trouvée par ECL en fonction de la concentration de scatol trouvée par HPLC.

[0113] Cette figure montre qu'il existe une corrélation quasi parfaite ($R^2 = 0,9222$) entre les concentrations du scatol obtenues à partir de plasma sanguin par le procédé de l'invention et les concentrations du scatol obtenues par HPLC à partir de tissu adipeux.

[0114] Elle montre également que le procédé selon l'invention permet de détecter des concentrations plasmatiques de scatol qui correspondent à des concentrations de scatol dans le tissu adipeux bien inférieures au seuil de rejet de $0,2 \mu\text{g}$ de scatol/g de tissu adipeux (concentrations symbolisées par des cercles).

[0115] Le procédé de l'invention est donc parfaitement adapté à la détection de l'odeur de verrat chez les porcs mâles vivants.

Références citées

[0116] [1] WO-A-2021/ 009438

[2] T. Okajima et T. Ohsaka, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2002, 523, 34-39

[3] US 9,121,107 B2

Revendications

- [Revendication 1] Procédé pour détecter la présence de scatol dans une solution aqueuse, qui comprend les étapes consistant à :
- a) préparer un extrait organique à partir de la solution aqueuse, par :
 - i) mélange de la solution aqueuse avec une matière grasse puis séparation de la solution aqueuse de la matière grasse, moyennant quoi, si du scatol est présent dans la solution aqueuse, il est extrait par la matière grasse ;
 - ii) mélange de la matière grasse obtenue à l'issue de i) avec un solvant organique aprotique puis séparation de la matière grasse du solvant organique aprotique, moyennant quoi, si du scatol est présent dans la matière grasse, il est extrait par le solvant organique aprotique ; et
 - iii) ajout d'un sel de fond au solvant organique aprotique obtenu à l'issue de ii) ;
 - b) soumettre l'extrait organique préparé à l'étape a) à une réaction d'électrochimiluminescence ; et
 - c) mesurer l'intensité de la luminescence pendant l'étape b) et, si l'intensité de luminescence mesurée dépasse une valeur seuil prédéterminée, déduire la présence de scatol dans la solution aqueuse.
- [Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, dans lequel la matière grasse est un acide gras saturé ou insaturé, une matière grasse d'origine animale ou une huile végétale.
- [Revendication 3] Procédé selon la revendication 2, dans lequel la matière grasse est une huile végétale, de préférence l'huile de colza.
- [Revendication 4] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel la solution aqueuse est mélangée avec la matière grasse dans un rapport volumique solution aqueuse/matière grasse inférieur à 1, de préférence compris entre 0,1 et 0,5.
- [Revendication 5] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le solvant organique aprotique est l'acétonitrile, le diméthylsulfoxyde, le carbonate de propylène ou la γ -butyrolactone, de préférence l'acétonitrile.
- [Revendication 6] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la matière grasse obtenue à l'issue de i) est mélangée avec le solvant organique aprotique dans un rapport volumique matière grasse/solvant organique aprotique inférieur à 1, de préférence compris entre 0,1 et 0,5.
- [Revendication 7] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le

sel de fond est un tétrafluoroborate, un hexafluorophosphate ou un perchlorate de tétraalkylammonium dont le groupe alkyle comprend de 1 à 6 atomes de carbone, de préférence le tétrafluoroborate de tétrabutylammonium ou l'hexafluorophosphate de tétrabutylammonium.

- [Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel l'extrait organique comprend de 0,01 mol/L à 1 mol/L, de préférence de 0,05 mol/L à 0,5 mol/L de sel de fond.
- [Revendication 9] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel l'étape b) est réalisée dans une cellule électrochimique comprenant au moins une électrode de travail et une contre-électrode, et la réaction d'électrochimiluminescence comprend l'application à l'électrode de travail d'un potentiel cathodique suivi d'un potentiel anodique.
- [Revendication 10] Procédé selon la revendication 9, dans lequel l'application à l'électrode de travail d'un potentiel cathodique suivi d'un potentiel anodique est réalisée par saut de potentiel.
- [Revendication 11] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans lequel, la présence de scatol ayant été déduite à l'étape c), on réalise de plus une quantification du scatol présent dans l'extrait organique par comparaison de l'intensité maximale de luminescence mesurée au cours de l'étape c) avec une courbe d'étalonnage, la quantification étant réalisée au cours de l'étape c) ou postérieurement à l'étape c).
- [Revendication 12] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel la solution aqueuse est du plasma ou du sérum de sang de porc mâle, de préférence du plasma de sang de porc mâle.

[Fig. 1]

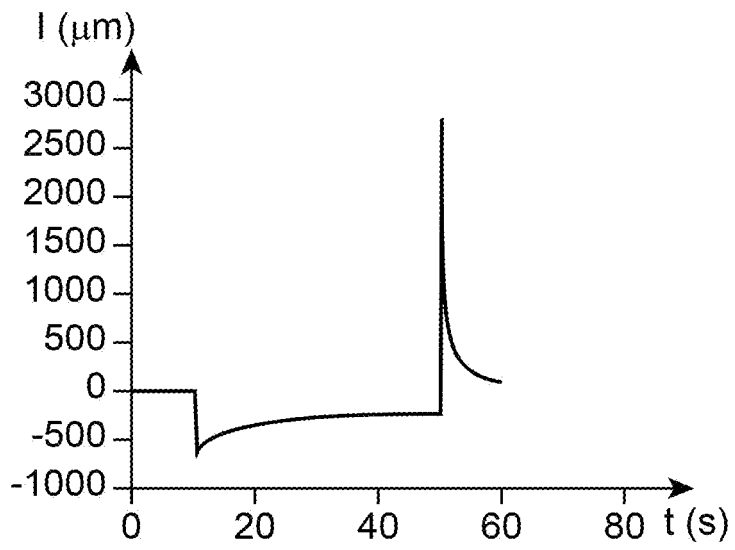


FIG. 1

[Fig. 2]

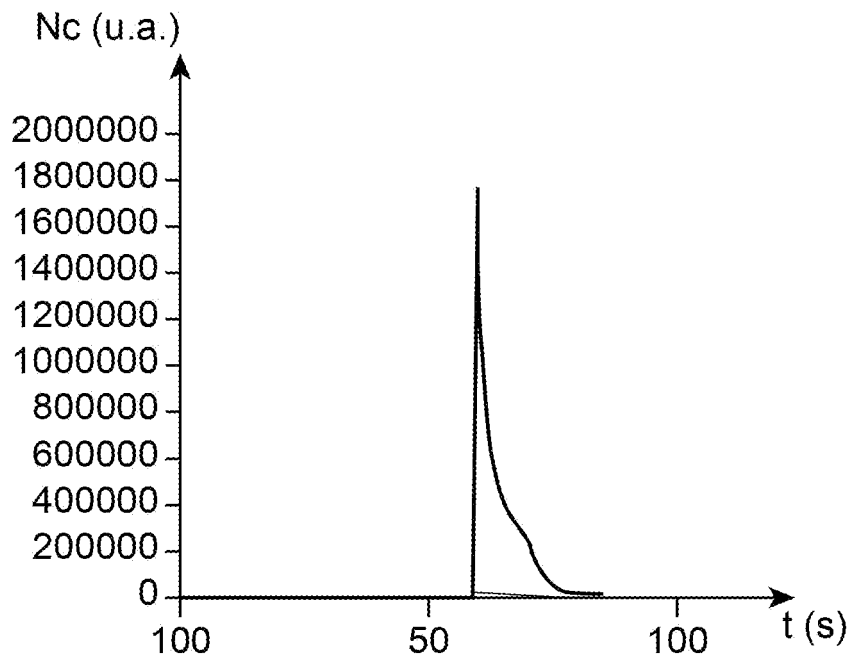


FIG. 2

[Fig. 3]

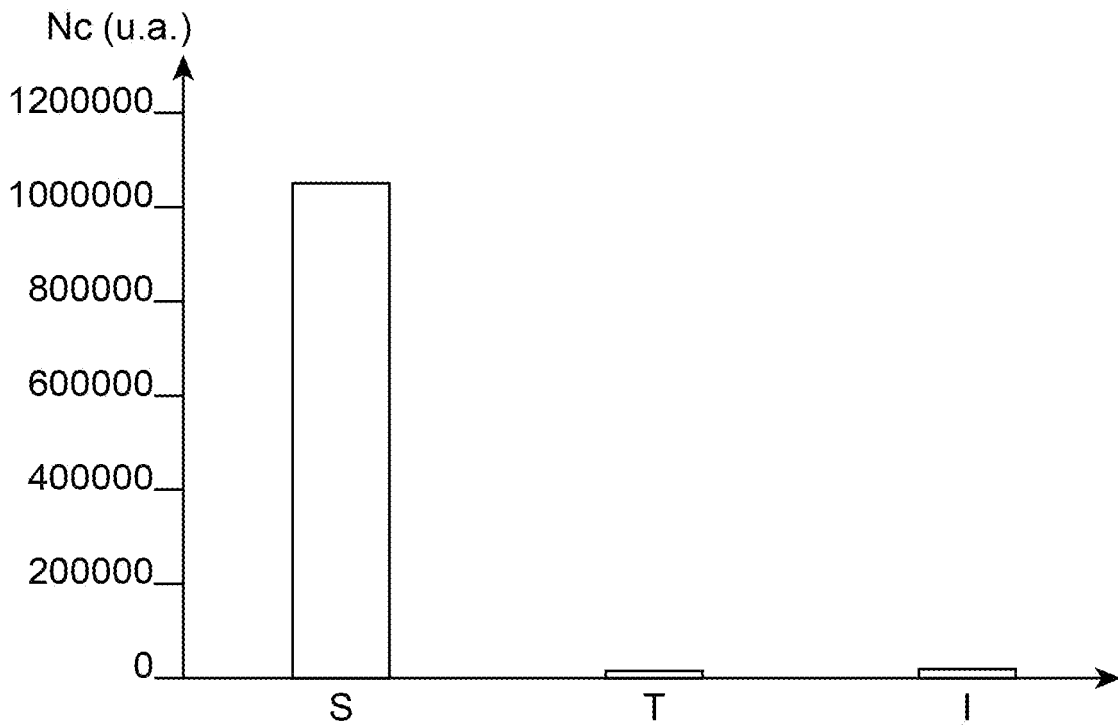


FIG. 3

[Fig. 4]

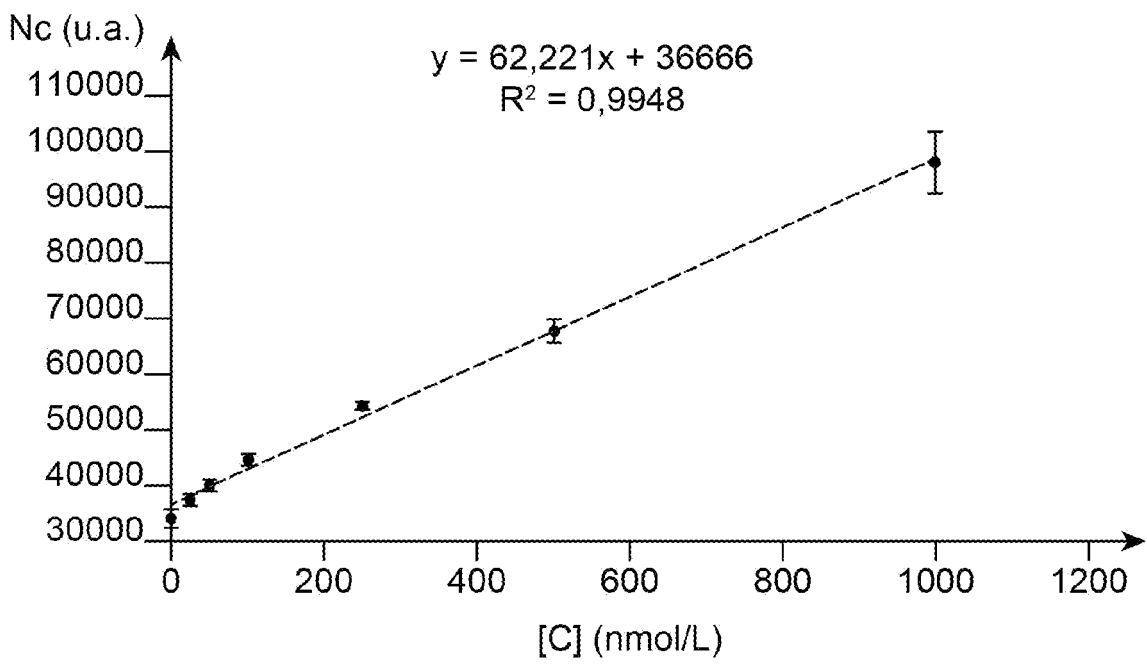
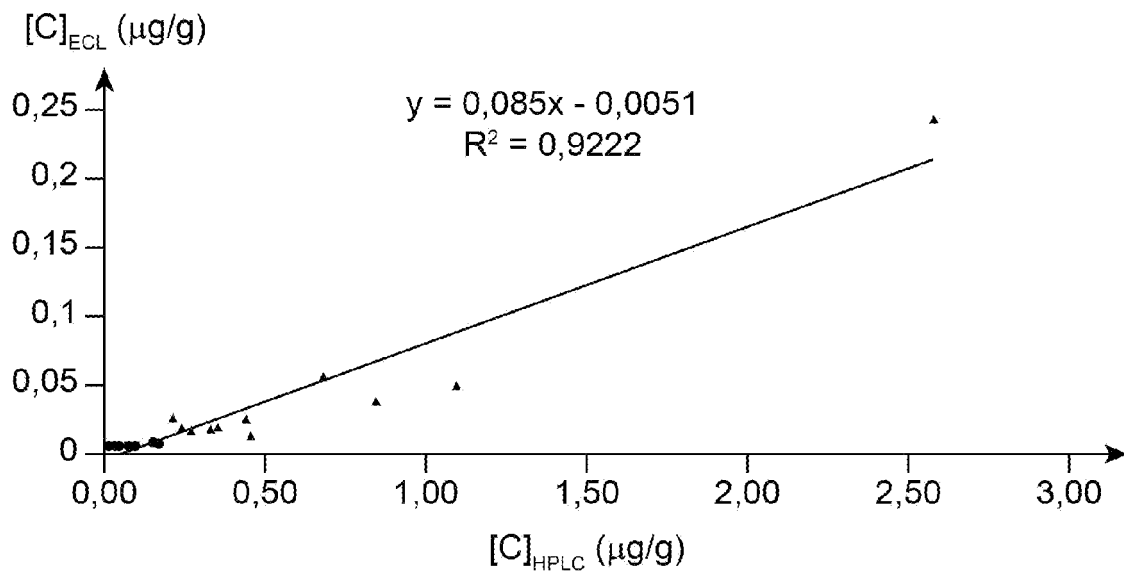


FIG. 4

[Fig. 5]

**FIG. 5**

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 900642
FR 2112678

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	<p>WO 2021/009438 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 21 janvier 2021 (2021-01-21) * Domaine technique; page 1 * * Exposé de l'invention; page 5, ligne 19 - page 7, ligne 17 * * page 8, lignes 16-19 * * page 9, lignes 1-10 * * page 9, ligne 20 - page 10, ligne 6 *</p> <p>-----</p>	1-12	G01N21/69 G01N1/40 G01N21/76 G01N33/48
A	<p>US 2018/045701 A1 (LUND BIRGITTE LANGE WINTHER [DK] ET AL) 15 février 2018 (2018-02-15) * alinéas [0016] - [0025] * * alinéas [0087] - [0096] * * alinéa [0100] *</p> <p>-----</p>	1-12	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</p> <p>G01N H01J</p>
A	<p>US 2012/295363 A1 (CRUNAIRE SABINE [FR] ET AL) 22 novembre 2012 (2012-11-22) * alinéas [0003], [0004] * * alinéas [0013], [0014] * * alinéa [0099] *</p> <p>-----</p>	1-12	
A	<p>US 2007/031837 A1 (SQUIRES E J [CA] ET AL) 8 février 2007 (2007-02-08) * alinéas [0003], [0004] * * alinéas [0029], [0030] * * alinéas [0092], [0093] *</p> <p>-----</p>	1-12	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 juin 2022		Michalitsch, Richard	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2112678 FA 900642**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **29-06-2022**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2021009438 A1	21-01-2021	CN 114402196 A	26-04-2022
		EP 3983783 A1	20-04-2022
		FR 3098597 A1	15-01-2021
		US 2022178833 A1	09-06-2022
		WO 2021009438 A1	21-01-2021

US 2018045701 A1	15-02-2018	AU 2016227638 A1	14-09-2017
		CA 2980483 A1	09-09-2016
		EP 3265798 A1	10-01-2018
		EP 3795995 A1	24-03-2021
		US 2018045701 A1	15-02-2018
		WO 2016139291 A1	09-09-2016

US 2012295363 A1	22-11-2012	EP 2499484 A1	19-09-2012
		FR 2952436 A1	13-05-2011
		JP 5819841 B2	24-11-2015
		JP 2013510185 A	21-03-2013
		US 2012295363 A1	22-11-2012
		WO 2011058066 A1	19-05-2011

US 2007031837 A1	08-02-2007	AT 366322 T	15-07-2007
		AU 781806 B2	16-06-2005
		CA 2383887 A1	05-04-2001
		EP 1218534 A2	03-07-2002
		US 6448028 B1	10-09-2002
		US 2002197663 A1	26-12-2002
		US 2006150263 A1	06-07-2006
		US 2007031837 A1	08-02-2007
		WO 0123601 A2	05-04-2001
