



HAL
open science

Extraction quantitative de l'acide folique (application à son dosage dans les aliments)

Magali Novovitch Lagarde

► **To cite this version:**

Magali Novovitch Lagarde. Extraction quantitative de l'acide folique (application à son dosage dans les aliments). Sciences pharmaceutiques. 1988. dumas-01969595

HAL Id: dumas-01969595

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01969595>

Submitted on 4 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2^e exemplaire

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

UFR de PHARMACIE

Domaine de la Merci La Tronche

Année 1988

N° d'ordre

7012

EXTRACTION QUANTITATIVE DE L'ACIDE FOLIQUE

(Application à son dosage dans les aliments)

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Mme NOVOVITCH Magali née LAGARDE

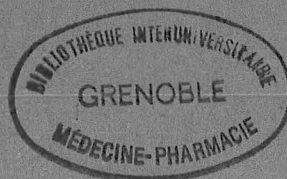
[Données à caractère personnel]

Cette Thèse sera soutenue publiquement le 3 Mars 1988

devant Mlle le Professeur J. ALARY , Président du Jury

M. B. HERVE , Pharmacien

M. M. FAWAZ , Pharmacien



UNIVERSITE SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

UFR de PHARMACIE

Domaine de la Merci La Tronche

Année 1988

N° d'ordre

EXTRACTION QUANTITATIVE DE L' ACIDE FOLIQUE

(Application à son dosage dans les aliments)

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Mme NOVOVITCH Magali née LAGARDE

[Données à caractère personnel]

Cette Thèse sera soutenue publiquement le 3 Mars 1988

devant Mlle le Professeur J. ALARY , Président du Jury

M. B. HERVE , Pharmacien

M. M. FAWAZ , Pharmacien



A MES PARENTS , qui m'ont donné la possibilité
d'entreprendre de telles études

A ERIC , qui a su partager les bons et les mauvais
moments et dont le soutien , tout au long de ces années
m'a été très précieux

En témoignage de ma reconnaissance et de mon affection

A MA FAMILLE ET BELLE FAMILLE , en témoignage de mon
affection

A CHRISTINE , en souvenir de ces années universitaires
qui ont vu naître une profonde amitié

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Mademoiselle le Professeur J. ALARY
Professeur de chimie analytique et de bromatologie à
l'UFR de pharmacie de Grenoble

Elle a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire dès le début de nos études . Durant ces années, elle a su , à travers son enseignement et ses précieux conseils , nous faire découvrir et aimer la chimie analytique .

Nous la remercions d'avoir accepté la présidence de ce jury .

A Monsieur B. HERVE , qui a toujours su nous faire profiter de son expérience et nous a aidée dans la réalisation technique de ce travail .

Nous le remercions d'avoir eu la gentillesse d'accepter de nous juger .

A Monsieur M. FAWAZ , nous avons pendant près de deux ans travaillé à ses côtés . Il a toujours su faire preuve de patience et de gentillesse et nous a fait bénéficier de son expérience tout au long de ce travail .

Nous le remercions d'avoir accepté de nous juger .

INTRODUCTION

L'acide folique ou vitamine B9 et ses dérivés constituent une famille de composés chimiques regroupés sous le nom de folates. Tous les animaux supérieurs sont auxotrophes vis à vis de cette vitamine et actuellement, les folates sont responsables chez l'homme de nombreuses carences qui atteignent même les pays dits industrialisés. Ceci est la conséquence d'une part de la modification des habitudes alimentaires qui favorisent de plus en plus la consommation de viande et de laitages au détriment des aliments riches en folates, et d'autre part de l'évolution des techniques industrielles qui appliquées aux aliments, affectent la teneur en vitamine B9 de ces derniers.

L'acide folique ayant un rôle biologique important, notamment au niveau de la multiplication cellulaire, ces carences ne sont pas dénuées de graves conséquences. C'est la raison pour laquelle, il est nécessaire de connaître la teneur en folates des aliments pour pouvoir déterminer les apports quotidiens en vitamine B9 et corriger les habitudes alimentaires surtout dans les situations à risques.

La première partie de ce travail est consacrée aux carences en vitamine B9. Les origines de ces carences, les populations à risque ainsi que leurs conséquences y seront exposées.

Les apports recommandés ainsi que la teneur en folates des principaux aliments font l'objet de la seconde partie.

Enfin, dans la dernière partie, nous exposerons nos travaux personnels effectués sur l'extraction et la purification de l'acide folique à partir d'aliments, le dosage final étant réalisé par une technique chromatographique.

I- GENERALITES SUR L'ACIDE FOLIQUE.

L'étude de l'acide folique et de ses dérivés débute aux environs de 1930 par la découverte de la présence d'un facteur de croissance dans le foie et les levures. Des études plus approfondies montrent alors que l'absence d'une telle substance provoque une anémie macrocytaire chez le rat, une anémie chez le singe rhésus et un arrêt de la croissance de Lactobacillus casei et de Streptococcus lactis. Ces constatations sont à l'origine des nombreuses appellations désignant cette substance : vitamine M (comme monkey), vitamine Bc ou Lactobacillus casei factor (68).

Par la suite, il apparaît en fait qu'il ne s'agit non pas d'une seule substance mais de plusieurs composés chimiquement et biologiquement très voisins, dont le substrat est dénommé acide folique parce qu'il a été isolé à partir de feuilles d'épinards par MITCHELL SNELL et WILLIAMS en 1941 (33).

En 1945, la connaissance de sa structure fût acquise et sa synthèse fût réalisée.

I-1) STRUCTURE DE L'ACIDE FOLIQUE.

L'acide folique est une molécule de structure complexe résultant de l'association:

- de la ptérine
- de l'acide para amino benzoïque
- de l'acide glutamique.

Trouvé le plus souvent sous forme de polyglutamates, sa formule est la suivante:

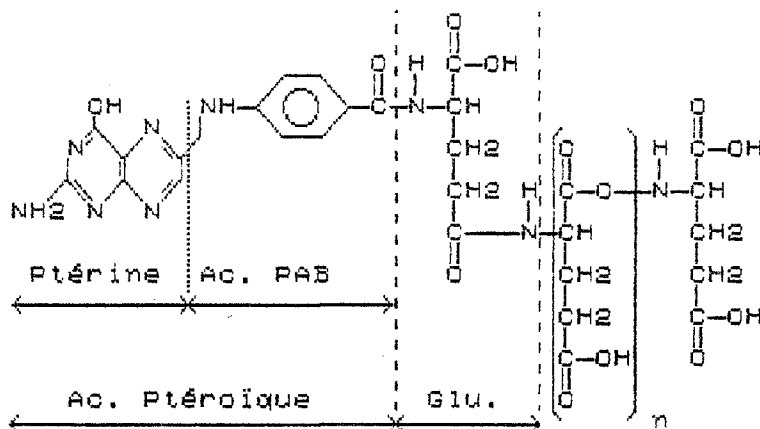


TABLEAU I

I-2) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.

C'est une poudre cristalline jaune à jaune orangée , soluble dans les bases ou les acides dilués , très peu soluble dans l'eau froide et insoluble dans l'alcool , le chloroforme et l'éther. Son poids moléculaire est de 441,4

L'acide folique possède un spectre d'absorption caractéristique dans l'ultra-violet , présentant 3 maximums: à 256 nm , à 283 nm , à 365 nm .

Il appartient au groupe des vitamines hydrosolubles , est sensible à la lumière , à la chaleur et à l'oxygène de l'air .

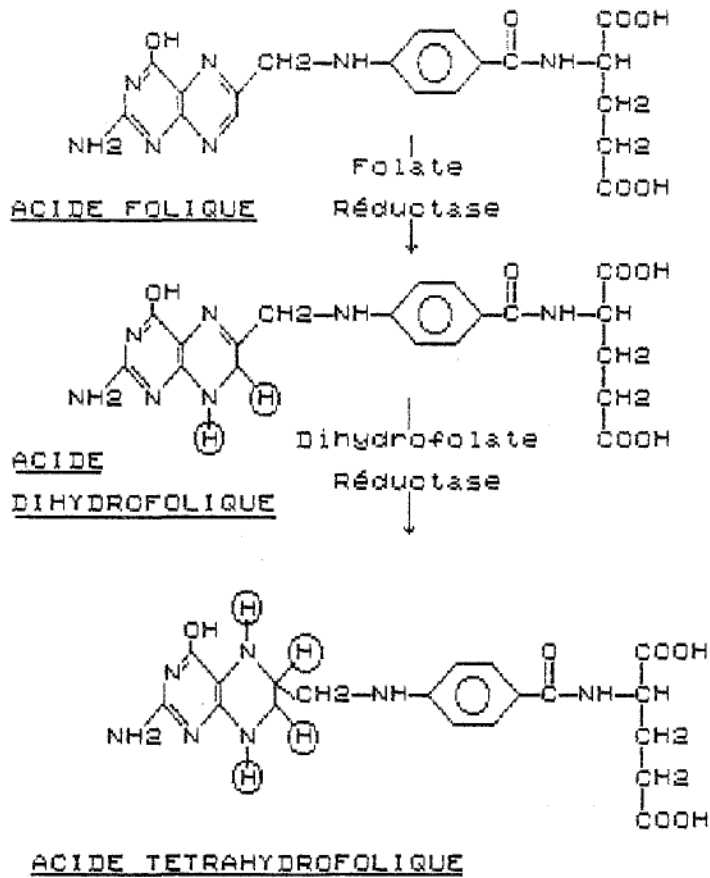
I-3) L'ACIDE FOLIQUE A L'ETAT NATUREL.

L'acide folique se trouve à l'état naturel généralement sous forme de polyglutamates (surtout sous forme d'heptaglutamates) . On le retrouve en particulier dans la levure , les légumes verts , les germes de blé , les produits laitiers , les fruits , le foie de boeuf , les oeufs.

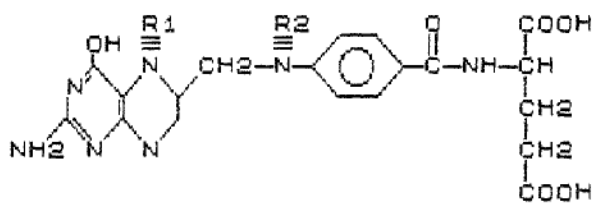
Il est présent sous forme libre dans les épinards.

I-4) ABSORPTION ET METABOLISME DE L'ACIDE FOLIQUE.

La métabolisation de l'acide folique consiste dans un premier temps en une réduction en acide dihydrofolique (ou DHF) puis en acide tétrahydrofolique (ou THF).



A partir de l'acide tétrahydrofolique , se forment plusieurs dérivés dont la structure générale est la suivante :



Selon la nature de R1 et R2 , plusieurs métabolites sont formés:

R1	R2	METABOLITE
-CHO	-H	N5 FORMYL THF
-H	-CHO	N10 FORMYL THF
-CH=NH	-H	N5 FORMIMINO THF
-CH3	-H	N5 METHYL THF
R1 - R2	METABOLITES	
=CH-	N5-10 METHENYL THF	
-CH2-	N5-10 METHYLENE THF	

TABLEAU II

L'absorption de l'acide folique se fait principalement au niveau du jejunum, sous forme de polyglutamates. La conversion des polyglutamates en monoglutamates est nécessaire pour son intégration dans les systèmes enzymatiques . Elle est effectuée par une hydrolase : la ptéroyl glutamate hydrolase encore appelée: **conjugase** présente dans les entérocytes .

L'absorption est rapide puisque l'acide folique apparaît dans le sang porte et dans le sang périphérique respectivement 10 mn et 15 mn après son ingestion (47) .

La répartition s'effectue en partie dans le plasma où il se trouve faiblement lié à une protéine : la "folic acid binding protein" . Il est présent également dans le liquide céphalo-rachidien et dans la bile où les concentrations en folates sont respectivement trois fois et dix fois plus élevées que dans le plasma (47) .

Les réserves de l'organisme , chez l'adulte , correspondent à 5 à 20 mg de folates stockés principalement au niveau hépatique sous forme d'acide méthyl tétrahydro folique (69).

L'élimination s'effectue en partie par les urines .

I-5) ROLE BIOLOGIQUE DE L'ACIDE FOLIQUE.

L'acide folique intervient par l'intermédiaire de ses dérivés . Ces derniers jouent le rôle de coenzymes dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques qui entrent dans la constitution des acides nucléiques de la cellule . Ils interviennent dans le transfert des radicaux monocarbonés grâce à un échange de liaisons covalentes entre l'azote numéro 5 et l'azote numéro 10 de la molécule.

Enfin , ils participent à des réactions d'interconversions des acides aminés telles que : la transformation de la sérine en glycine , de l'homocystéine en méthionine , de l'histidine en acide glutamique .

II LES CARENCES EN ACIDE FOLIQUE :

La connaissance de l'existence des carences en acide folique remonte à 1842 , lorsque Channing évoque des anémies sévères , progressant rapidement , quelques fois mortelles , survenant au cours de la grossesse .

Dans une série d'études entreprises en 1930 , Lucy Wills observe qu'en Inde , les femmes ayant des enfants prématurés ont une alimentation déficiente en une vitamine qui plus tard sera identifiée comme étant de l'acide folique (24).

Actuellement les carences en acide folique affectent aussi les pays dits industrialisés : le statut en vitamine B9 est celui qui souffre le plus aujourd'hui de l'évolution alimentaire de tels pays qui privilégient de plus en plus la consommation de viande et de laitages , au détriment des aliments riches en folates . Une enquête réalisée par ESVITAF (étude du statut vitaminique des français) a montré que les apports en folates , observés dans une population représentative et en bonne santé , étaient presque de moitié inférieurs aux apports recommandés (69) .

II-1) LES TAUX NORMAUX :

Suivant les auteurs , les taux normaux en acide folique sont représentés par des chiffres très variables (46) . Ceci peut être expliqué en partie par l'utilisation de méthodes de dosage différentes dans les diverses expérimentations .

La limite inférieure normale du taux sérique est fixée à :

-6ng/ml pour la commission conjointe FAO-OMS *

-7ng/ml par Walter et Mallin (1961)

-6.5ng/ml par Streiff et Little (1967)

-4.5ng/ml par Hoffbrand et Newcombe (1967)
le dosage étant effectué par voie microbiologique (Lactobacillus Casei) .

* FAO =Food Agricultural Organisation
OMS = Office Mondial de la Santé



-4.5ng/ml par Rothenberg (1976) le dosage étant effectué par une méthode radiobiologique basée sur la propriété d'une protéine du lait de capter l'acide folique.

La limite du taux sérique en dessous de laquelle il existe une carence grave est fixée à :

-3ng/ml par la commission conjointe FAO-OMS , Walter et Mallin , Streiff et Little

-2.5ng/ml par Hoffbrand et Newcombe

-3.7ng/ml par Rothenberg

Le taux normal en folates érythrocytaires varie entre 200 et 600 ng/ml (47) . Ce dernier donne une idée précise de l'état des réserves de l'organisme .

II-2) LES POPULATIONS EXPOSEES AUX CARENCES :

Trois catégories de populations sont particulièrement concernées par les carences en acide folique : les femmes enceintes , les personnes âgées , les alcooliques .

En effet , 60% des femmes enceintes présentent un déficit en fin de grossesse car les besoins sont multipliés par deux ou plus , alors que les apports alimentaires ne changent pas ou sont même diminués .

On estime que dans les pays de haut niveau de vie , 4% des grossesses sont accompagnées d'une carence , ce chiffre pouvant s'élever à 20% dans les pays en voie de développement (52) .

Les personnes âgées sont aussi affectées par les carences en acide folique : 50% présentent un déficit sérique . Les causes sont directement liées aux facteurs socio-économiques , au manque d'information , aux modifications des habitudes alimentaires ou aux problèmes digestifs fréquemment présents .

Enfin , l'alcoolisme représente une des causes fréquentes de carences en vitamine B9 puisque 45% des alcooliques présentent un déficit , l'alcool ayant un retentissement sur le métabolisme des folates ainsi que sur la qualité des apports alimentaires .

Les nourrissons peuvent être exposés à des carences en vitamine B9 notamment au cours d'un allaitement au sein prolongé compte tenu de la fréquence des carences chez la femme en fin de grossesse .

II-3) ORIGINES DES CARENCES :

Les carences en folates ont des origines très

diverses, la principale étant une insuffisance d'apport en vitamine B9, liée à une alimentation mal adaptée, à des conditions socio-économiques défavorables, à des régimes amaigrissants où encore à l'alimentation parentérale. Cependant, l'insuffisance d'absorption due à l'altération de la muqueuse intestinale est une cause fréquente chez les adultes et les enfants. La maladie de CROHN peut dans ses formes étendues provoquer un défaut d'absorption des folates et en déséquilibrer ainsi le statut (47).

Un nombre important de carences sont dues à une augmentation des besoins, notamment au cours de situations pathologiques particulières entraînant une multiplication cellulaire intense, donc des besoins en folates plus importants. Il s'agit plus particulièrement de la grossesse qui en est l'exemple le plus fréquent, mais aussi des maladies inflammatoires, des affections néoplasiques, des états septiques, des maladies ou interventions chirurgicales ou des traumatismes graves.

Des blocages métaboliques peuvent également être responsables de la survenue de carences tels qu'un défaut d'absorption spécifique des folates, un blocage congénital du métabolisme ou des amino acidopathies (51).

Enfin, les carences en vitamine B9 peuvent avoir des origines iatrogènes. En effet, l'alcool et de nombreux médicaments interviennent sur le métabolisme des folates, soit par inhibition enzymatique, soit par blocage métabolique ou encore par diminution de l'absorption.

Les substances responsables de telles conséquences sont :

-les anti épileptiques : la phénytoïne et les hydantoïnes en général, le phénobarbital et l'épidione

-l'isoniazide, le triméthoprime, le méthotrèxate, le triamterène, la cyclosérine, la pyriméthamine, la salazopyrine, la cholestyramine, le glutéthimide.

Les oestroprogestatifs agiraient par inhibition de la folate conjugase (46). D'autre part, une interaction métabolique entre folates et oestrogènes a aussi été suggérée (2). Mais les résultats trouvés dans la littérature sont très controversés puisque certains prétendent que le taux de folates plasmatique serait diminué par la prise concomittante d'oestroprogestatifs alors que d'autres n'y ont trouvé aucune action.

Enfin, un petit nombre de carences peuvent être dues à des pertes excessives, notamment chez les hémodialysés car les folates ont un faible poids moléculaire et passent facilement à travers les filtres de dialyse.

II-4) MECANISME DES CARENCES EN ACIDE FOLIQUE :

II-4-1) Chez les personnes âgées:

Ce sont principalement des carences dues à un apport insuffisant en folates . En effet , le mode de vie , les conditions socio-économiques souvent défavorables mais encore l'anorexie liée à l'âge , les troubles digestifs sont autant de facteurs qui conduisent à une faible absorption quotidienne (50) . A tous ces éléments , viennent s'ajouter l'administration de lourds traitements médicamenteux dont certains composants risquent d'interferer sur le métabolisme des folates .

II-4-2) Chez l'alcoolique:

La consommation excessive d'alcool retentit sur l'absorption ainsi que sur le métabolisme des folates . Chez l'alcoolique , les mécanismes des carences sont multiples . Les apports insuffisants , dûs soit aux troubles digestifs qui poussent l'alcoolique à ne consommer que des aliments très digestes mais pauvres en acide folique , soit à l'indigence provoquée par l'alcoolisme chez les personnes à revenus modestes , constituent une des raisons d'apparition des carences . Les autres mécanismes en cause sont représentés par l'absence de la transformation des polyglutamates alimentaires en monoglutamates par sécrétion insuffisante ou inactivation de la conjugase , un défaut d'absorption des folates ou encore une insuffisance de stockage par diminution de l'affinité du foie pour l'acide folique . Il existe également une perturbation du cycle entérohépatique provoquant l'augmentation de l'excrétion biliaire des folates (31) .

II-4-3) Chez la femme enceinte:

L'augmentation des besoins en acide folique constitue la principale cause d'apparition des carences chez la femme enceinte . En effet , au cours de la grossesse, la multiplication cellulaire est fortement augmentée par la croissance foetale ainsi que par l'accroissement de l'erythropoïèse maternelle (66) : les besoins du foetus multiplient les besoins maternels par six et épuisent les réserves en deux ou trois mois .

Les taux de folates érythrocytaires et plasmatiques dans le sang du cordon ombilical du nouveau-né sont au moins cinq fois supérieurs aux taux maternels (46) (66) , ce qui prouve que le foetus se comporte comme une " pompe à folates " . Le placenta joue le rôle de réservoir qui protège le foetus en cas de carence légère , mais pas dans les formes graves .

Ainsi , au cours de la grossesse , le taux de folates sériques tombe de 6 à 8 ng/ml au premier trimestre jusqu'à 3.5 à 1.5 ng/ml au troisième trimestre (33) . Il semblerait que , durant les dernières semaines de la grossesse , un transfert accru des folates ait lieu de la mère en direction du foetus (22) .

L'augmentation de la demande en folates ne pose aucun problème pour une femme en bonne santé et présentant une alimentation correcte . Cependant , de nombreux facteurs peuvent modifier le métabolisme normal et entraîner l'apparition d'une balance en folates négative . Parmi ces facteurs , se trouvent l'anorexie aggravée par les vomissements gravidiques très fréquents en début de grossesse , la multiparité puisque les femmes ayant des jumeaux présentent cinq fois plus de risques de développer une carence en vitamine B9 en fin de grossesse (33) , une augmentation de l'élimination urinaire (66) et enfin des modifications de la muqueuse intestinale provoquant une diminution de l'absorption des folates .

Une étude effectuée par ROGOZINSKY sur la nutrition de la femme enceinte (57) a montré que l'apport journalier en folates était d'autant plus faible qu'il s'agissait de femmes provenant de milieux socio-économiques bas , jeunes (moins de 20 ans), fumant plus de dix cigarettes par jour et ayant des vomissements trois fois ou plus par semaine .

La grossesse représente donc une situation favorable à l'apparition de carences en acide folique . Ces dernières ont un retentissement important à la fois sur le déroulement de la grossesse et sur le fœtus .

II-5) CONSEQUENCES DES CARENCES EN ACIDE FOLIQUE :

Compte tenu du rôle biologique des folates , les carences retentissent sur tous les organes à renouvellement cellulaire important et grands consommateurs de groupements monocarbonés , c'est à dire : la moelle osseuse et tout le système hématopoiétique , le système nerveux , les muqueuses digestives , ainsi que le système immunitaire et surtout la grossesse et le fœtus .

II-5-1) Sur la moelle osseuse et le système hématopoiétique

Le principal retentissement chez l'homme , est l'apparition d'une anémie macrocytaire avec mégalo blastose médullaire associée à une neutropénie et une thrombocytopénie dans les formes les plus sévères (69) .

Au cours de l'hématopoïèse , l'acide folique intervient par son rôle au niveau de la synthèse de l'ADN . Ainsi , le déficit en vitamine B9 aura pour conséquence un allongement de la phase S de la mitose et les érythroblastes , incapables de mener à bien leur mitose meurent dans la moelle osseuse .

Les anomalies intéressent donc particulièrement la lignée érythrocytaire . Au niveau de la moelle osseuse , les perturbations de la synthèse d'ADN conduisent à une mégalo blastose et un asynchronisme de maturation nucléocytoplasmique .

L'anémie engendrée par un déficit en vitamine B9 est difficile à distinguer de celle engendrée par un déficit en

vitamine B12 d'où la nécessité de faire appel à des examens complémentaires pour établir le diagnostic .

II-5-2) Sur le système nerveux:

L'acide N5-CH3 THF intervient dans la formation de méthionine donc de S adénosyl méthionine qui intervient dans les réactions de méthylation en fournissant le groupement méthyle . De telles réactions conduisent en particulier à la formation de certains neurotransmetteurs tels que la choline , l'acétyl choline ou l'adrénaline (69) ce qui permettrait d'expliquer le retentissement des carences en vitamine B9 sur le système nerveux . D'autre part , l'acide N5-CHO THF interviendrait sur la synthèse cérébrale de la sérotonine (43) .

Les manifestations neuropsychiatriques sont diverses: baisse des capacités intellectuelles , dépressions , démences , polynévrites , voire syndrome cérébelleux . Ces troubles sont rattachés à la carence en folates après l'élimination de toute autre cause et de leur régression après l'administration de folates .

Le syndrome d'impatience des membres inférieurs au cours de la grossesse s'est avéré lui aussi en relation avec un déficit en folates .

II-5-3) Sur les muqueuses digestives:

Les signes digestifs sont également fréquents . La carence en folates retentit sur la muqueuse de l'intestin grêle entraînant une malabsorption responsable de diarrhées, vomissements et anorexie . Il s'établit ainsi un cercle vicieux , la malabsorption aggravant la carence .

Des stomatites et des glossites ont aussi été observées .

II-5-4) Sur le système immunitaire:

Un déficit en vitamine B9 affaiblit les fonctions immunitaires de l'organisme . En effet , une altération de la fonction lymphocytaire ainsi qu'une inhibition de la phagocytose des polynucléaires neutrophiles ont été observées (47) .

II-5-5) Sur la grossesse et le foetus:

Chez la femme enceinte , les carences en folates ont un retentissement sur le déroulement de la grossesse ainsi que sur le foetus donc sur l'enfant .

Dans le premier cas , les principales conséquences sont les risques d'avortement , les accidents hémorragiques, les accouchements prématurés (66) , les risques de décollement placentaire ainsi que de dépression puerpérale .

En effet , chez les femmes carencées , il existe 14% d'accidents hémorragiques contre 2.5% chez les femmes non

carencées , et 17% d'accouchements prématurés contre 1.3% . L'analyse des avortements survenant avant la 18 ème semaine de gestation a montré que dans la moitié des cas , le taux sérique en folates était inférieur à 4.1 ng/ml et dans 35% des cas , inférieur à 3 ng/ml (52) .

L'explication de tels retentissements , est donnée par le fait que les tétrahydrofolates interviennent d'une part sur toutes les multiplications cellulaires par le biais du métabolisme des purines et des pyrimidines et d'autre part par le rôle que jouerait l'acide tétrahydrofolique dans l'hydroxylation de la progestérone ainsi que par son interférence sur le métabolisme des oestrogènes . Il est donc probable qu'une carence en acide folique profonde empêche les hormones ovariennes d'assurer le cours normal de la grossesse (52) .

Chez l'enfant , les retentissements d'une carence profonde en vitamine B9 au cours de la grossesse se manifestent par un faible poids à la naissance , un retard staturo-pondéral ainsi que par des anomalies telles que : microcéphalie , retard mental , anomalies faciales (strabisme) , rétrécissement palpébral , fente anti mongoloïde et surtout : displasie de la hanche , spina bifida , hypoplasie des phalanges .

La corrélation entre carences en folates et faible poids à la naissance a été montrée dans les travaux de GANDY qui obtient une réaccélération de la courbe staturo-pondérale en administrant aux enfants de la vitamine B9 (27) .

D'autre part , il a été démontré que l'influence sur le poids à la naissance pourrait résulter d'un problème de transfert des folates : il pourrait y avoir , au cours de la grossesse , une augmentation du taux de folates liés (53)

Enfin , la supplémentation en acide folique pendant la grossesse diminuerait les risques de fissure labiale (67) .

II-6) PREVENTION ET TRAITEMENT DES CARENCES :

La prévention des carences en folates passe , en premier lieu , par une information accrue du public ainsi qu'une éducation nutritionnelle : il faut veiller à ce que l'apport quotidien soit riche en aliments contenant des folates . Cependant , une supplémentation médicamenteuse devra être envisagée chez le sujet à risque ou dans les situations à risques .

Le traitement est basé sur l'administration d'acide tétrahydrofolique par voie orale ou parentérale à raison de 5 mg/j chez l'alcoolique ou le sujet âgé , 50 mg/mois chez la femme enceinte , 5 mg/j chez le nourrisson en cas de carence d'apport . Cependant , les auteurs ne sont pas tous d'accord sur les posologies à administrer .

Enfin , les enfants prématurés ou naissant de mères à risques ont une recharge systématique en acide folique durant le premier trimestre de la vie .

III) LES FOLATES ALIMENTAIRES :

Tous les animaux supérieurs sont auxotrophes vis à vis des folates et puisent la quantité nécessaire à leurs besoins dans l'alimentation . Compte tenu des graves conséquences engendrées par les carences en vitamine B9 chez l'homme , il est donc nécessaire de connaître la teneur en folates des principaux aliments pour permettre un apport quotidien suffisant , particulièrement chez les sujets à risques .

De nombreux auteurs se sont intéressés au dosage des folates dans les aliments et ont permis de déterminer quelles sont les principales sources de vitamine B9 .

III-1) LES BESOINS EN ACIDE FOLIQUE :

En 1962 , HERBERT (32) menant l'expérience sur lui-même , montre qu'une déficience en folates peut être obtenue expérimentalement chez l'homme , et que les réserves normales permettent de résister un peu moins d'un mois sans l'apparition de signes . Il fixe alors à 50.µg par jour la quantité devant être apportée par l'alimentation .

Depuis , de nombreuses estimations ont été effectuées mais les résultats obtenus divergent dans de très fortes proportions (3)(58) . En effet , suivant les auteurs , les besoins en folates varient de 50 à 400.µg par jour chez l'adulte , et de 200 à 800 µg par jour chez la femme enceinte . L'explication de telles différences est donnée par le fait qu'il existe une confusion , certaines recommandations étant basées sur le taux de folates libres et d'autres sur le taux de folates totaux , ainsi que par l'évolution des méthodes de dosage .

Cependant , le niveau des apports recommandés est relativement élevé , ceci pouvant être expliqué par quatre raisons :

- les pertes en folates au cours de la préparation culinaire
- la forte teneur des aliments en polyglutamates qui nécessitent une déconjugaison préalable à leur absorption
- les variations individuelles de l'absorption des folates alimentaires
- les variations individuelles des besoins

En 1987 , les chiffres donnés par la FAO sont les suivants:

- adulte: 3µg/kg de poids corporel ce qui équivaut à 200µg/j chez l'homme et à 170µg/j chez la femme
- enfant: 3.6µg/j/kg de poids corporel
- femme enceinte: 300 à 400µg/j

Le tableau suivant montre les recommandations établies dans plusieurs pays dont la France:

	ADULTE (homme)	FEMME ENCEINTE	ALLAITEMENT	ENFANT 4-5 mois
	en µg/j			
AUSTRALIE 1984	200	400	300-350	50
*CANADA 1975	200	250	250	40
FRANCE 1981	400	300	500	-
RFA 1975	400	800	1000	100
ITALIE 1978	200	400	500	40
USA 1980	400	800	500	30
*OMS/FAO 1970	200	400	300	40
OMS/FAO 1987	200	385	275	25

TABLEAU III

*chiffres représentant les folates libres .

III-2) TENEUR EN FOLATES DES PRINCIPAUX ALIMENTS :

De nombreux travaux ont été effectués par différentes équipes pour déterminer la teneur en folates des produits alimentaires . La technique de dosage la plus couramment employée est celle par voie microbiologique utilisant Lactobacillus casei . Ces travaux ont eu pour conséquence, l'établissement de tables indiquant la teneur en folates libres et en folates totaux de nombreux aliments . Cependant , selon certains auteurs , ces dernières feraient preuve d'une sous évaluation des teneurs en folates (55) pouvant être expliquée dans les tables anciennes , par le manque de protection par l'acide ascorbique au cours de l'extraction et du dosage , au conditions de pH , ou à la nature de la conjugase utilisée . Les différences d'origine géographique ou de variétés des aliments ainsi que leur traitement en vue de leur conservation peuvent également être mis en cause.

III-2-1) L'acide folique dans le lait et les produits laitiers :

III-2-1-1) Dans le lait de femme :

Selon TAMURA (65) le lait de femme contient entre 0.3 et 62 ng/ml de folates libres et de 52 à 280 ng/ml de folates totaux . Ces variations sont non seulement dues aux différentes méthodes de dosage employées mais aussi au statut maternel en folates ainsi qu'à la période de lactation . En effet , COOPERMAN (17) dans une étude effectuée en 1982 , compare la teneur en vitamine B9 du lait de femme prélevé à trois périodes différentes :

- de 1 à 5 jours après l'accouchement (colostrum)
- de 5 à 15 jours après l'accouchement (lait de transition)

-après 15 jours (lait mature)

Les résultats (tableau IV) montrent que la teneur en folates augmente au cours de la lactation .

Au cours de cette même étude , il est démontré que le lait de femme se composerait presque exclusivement de monoglutamates puisque le dosage avant et après traitement par la conjugase ne donne pas de différence significative .

	FOLATES AVANT CONJUGASE en ng/ml	FOLATES APRES CONJUGASE en ng/ml
COLOSTRUM	15.2	15.1
LAIT DE TRANSITION	16.3	16.6
LAIT MATURE	33.4	26.2

TABLEAU IV

III-2-1-2) Dans le lait de vache :

La teneur en folates du lait cru est estimée à 55 µg/1.60% , sont sous forme de monoglutamates , les polyglutamates étant constitués de 2 à 7 restes glutamiques. 90 à 95% sont représentés par de l'acide N5 CH3THF.

Une étude entreprise par SCOTT sur du lait pasteurisé montre qu'il existe une variation saisonnière , les taux les plus bas étant rencontrés en mai (0.04.µg/ml) et les plus élevés en novembre (0.073.µg/ml) et février (0.074.µg/ml) (63). Ceci paraît en contradiction avec les résultats d'une autre étude montrant une augmentation de la teneur en folates du lait lorsque la nourriture des troupeaux est constituée d'herbe grasse (20) .

Le lait UHT obtenu par traitement direct contient une teneur en vitamine B9 comparable à celle des laits pasteurisés (respectivement 4.2 ± 0.2µg/100g et 4.7 ±0.2µg/100g).

Cependant , les laits UHT dans leur ensemble (obtenus par traitement direct ou indirect) ont une teneur en folates significativement plus faible (2.9 ± 0.2µg/100g) . Les laits reconstitués à partir de poudre ou de lait concentré ont des teneurs en folates comparables à celle du lait UHT obtenu par traitement direct .

Enfin , la teneur en folates diminue au cours du stockage : les laits UHT conservés 2 à 4 mois ont des teneurs comparables à celles des laits stérilisés (1.7 + 0.4µg/100g) .Celles-ci deviennent même négligeables lorsque le stockage dépasse 4 mois (25) .

III-2-1-3) Dans les produits laitiers :

Le yaourt contient un taux d'acide folique dix fois

supérieur à celui du lait avant fermentation , prouvant ainsi que les microorganismes utilisés pour la fermentation produisent cette vitamine .

Les fromages et notamment les fromages fermentés sont de loin la catégorie de produits laitiers la plus riche en folates .

Les teneurs du beurre et de la crème s'élèvent respectivement à 3 μ g/100g et 13 μ g/100g de folates totaux .

Le lait et les produits laitiers ne constituent pas une source importante de folates . En effet , pour assurer le dixième seulement des apports nutritionnels conseillés , un adolescent ou un adulte devrait ingérer un litre de lait pasteurisé ou trois litre de lait stérilisé par jour .

III-2-2 L'acide folique dans la viande et le poisson :

La viande , en général , apparaît comme étant une faible source en folates . Les viandes crues de boeuf , d'agneau , et de porc contiennent moins de 10 μ g de folates totaux pour 100 g . La volaille en contient peu , le blanc constituant la partie la plus riche .

Le foie est une excellente source de folates (219 μ g/100g) ainsi que les reins (80 μ g/100g dans les reins de boeuf)

Enfin , le poisson constitue une meilleur source de folates que la viande puisqu'il renferme de 9 à 26 μ g de folates totaux pour 100 g .

III-2-3) L'acide folique dans les céréales et les produits céréaliers :

Le tableau suivant représente les teneurs en folates des principales céréales et produits céréaliers selon PERLOFF et BUTRUM (54) :

	FOLATES LIBRES en μ g/100g	FOLATES TOTAUX en μ g/100g
ORGE	9	20
MAIS	15	19
RIZ BLANC	-	10
BLE	39	52
GERMES DE BLE	257	328
FARINE DE BLE	29	32
AVOINE	8	22
PAIN DE SEIGLE	6	23
PAIN BLANC	13	39
PAIN COMPLET	27	58
FATES	4	12

TABEAU V

Les céréales et les produits céréaliers représentent une assez bonne source en folates . La consommation quotidienne de pain couvre 14 % des besoins .

Dans les germes de blé , la forme prédominante est l'acide N5 CHO THF . Ce dernier est retrouvé dans le grain de blé entier aux côtés de l'acide N10 CHO THF .

III-2-4) L'acide folique dans les fruits et les jus de fruits :

Parmi les fruits , l'orange est la source la plus riche en folates totaux : la teneur du jus d'orange s'élève à 500 ng/ml . La pulpe en contient moins et la peau assez peu . Beaucoup sont sous forme monoglutamique et sont de ce fait très bien absorbés . La consommation quotidienne de 100 à 250 ml de jus d'orange peut apporter 50 à 100 μ g de folates ce qui est le minimum recommandé par HERBERT pour un adulte (32) .

Enfin , l'orange représenterait une source stable en folates . en effet , il existe une forte teneur en vitamine C qui stabiliserait la vitamine B9 en la protégeant de l'oxydation (64) .

Les jus de pamplemousse , citron , raisin ont des teneurs respctives de 40 % , 10 % et 5 % de celle retrouvée dans le jus d'orange (21) . Le jus de tomates contient de une à trois fois moins , les jus de pommes et de prunes ont des teneurs proches de celles du jus de raisin .

L'avocat apparaît comme étant une bonne source de folates , sa teneur étant de 51 μ g de folates totaux pour 100g .

La forme prédominante retrouvée dans les jus de citron, orange et pamplemousse est l'acide N5 CH3THF qui représente 95 % des folates totaux .

Dans le jus de raisin , 60 % des folates sont libres dont 14 % sous forme méthylée .

La teneur en folates des fruits augmente avec leur maturation .

III-2-5) L'acide folique dans les légumes :

Les légumes apparaissent comme étant riches en folates. Le tableau suivant donne les teneurs annoncées par PERLOFF et BUTRUM (54) :

	FOLATES LIBRES en µg/100g	FOLATES TOTAUX en µg/100g
ASPERGE	58	64
HARICOT VERT	33	44
CHOU DE BRUXELLES	55	78
CHOU	33	66
CHOU FLEUR	31	55
CELERI	6	12
ENDIVE	-	49
LAITUE ROMAINE	60	179
OIGNON	40	36
POMME DE TERRE	11	19
PETIT POIS	17	52
EPINARDS	119	193
TOMATE	21	39
CAROTTE	14	32
NAVET	17	20
PERSIL	41	116

TABLEAU VI

BATRA montre que les folates dans la laitue romaine sont distribués de la manière suivante (4) :

- 33 % de monoglutamates dont 1 % d'acide N5 CHO THF et 32 % d'acide N5 CH3 THF
- 12 % de formes tétraglutamiques dont 3 % d'acide N5 CHO THF et 9 % d'acide N5 CH3 THF
- 43 % de formes pentaglutamiques dont 13 % de N5 CHO THF et 31 % de N5 CH3 THF .

Dans le chou , on retrouve 32 % d'hexaglutamates , 55% d'heptaglutamates , 7 % d'octaglutamates mais pas de monoglutamates (12) .

III-2-6) L'acide folique dans divers autres produits alimentaires :

Les folates sont présents en quantité importante dans les oeufs , le jaune en contenant beaucoup plus que le blanc .

Les différentes valeurs sont données dans le tableau suivant (54) :

	FOLATES LIBRES en µg/100g	FOLATES TOTAUX en µg/100g
BLANC	3	16
JAUNE	121	152
ENTIER	46	650

TABLEAU VII

Le thé représente une source non négligeable de folates . En effet , la consommation de 5 tasses de thé par jour couvre 25 % des besoins chez un adulte .

Les feuilles de thé vert contiennent une importante teneur en folates totaux ($11.2\mu/g$) alors que dans le thé noir cette dernière diminue , mais la teneur en folates libres augmente . La différence entre thé noir et thé vert est probablement le résultat de la fermentation (13)

La levure est un composé riche en vitamine B9 qui est trouvé surtout sous forme d'heptaglutamates .

III-3) COMPORTEMENT DES FOLATES AU COURS DE LA CONSERVATION ET DE LA PREPARATION CULINAIRE

La vitamine B9 étant une molécule fragile , les valeurs données dans le paragraphe précédent ne représentent pas la quantité réelle de folates ingérée puisqu'elles correspondent à la teneur des aliments non cuisinés et frais . Or , il a été démontré que la cuisson et la conservation altèrent le taux de folates initialement présent .

En effet , au cours du dosage dans des préparations d'alimentation liquide RISTOW (56) montre que l'acide folique est pratiquement stable au cours du chauffage à $120^{\circ}C$ pendant 20 mn mais que l'acide N5 CH3THF est dégradé à 75 % .

D'autre part , LEICHTER (48) montre que les asperges et le chou-fleur perdent respectivement 22 % et 84 % de leurs folates au cours de la cuisson , et qu'à l'exception des choux de Bruxelles et des asperges , les autres légumes étudiés (chou-fleur , épinards , chou , brocoli) contiennent une fois cuits moins de folates que leur eau de cuisson . Ceci permet de penser que la perte est due à l'extraction de la vitamine par l'eau de cuisson plutôt qu'à sa destruction .

Les méthodes de conservation affectent de la même manière le taux de folates . Une étude effectuée sur la conservation du lait de femme montre que la congélation affecte la teneur en vitamine B9 au bout d'un mois , alors que la réfrigération pendant 24 heures ne semble pas intervenir de façon significative .

Enfin , il a été démontré par une étude menée par HOPNER et LAMPI (35) sur 30 repas congelés et équilibrés que dans 44 % des cas , la teneur en folates totaux du repas entier avant cuisson étaient inférieure à $10\mu/100g$, dans 36 % des cas comprise entre 10 et $15\mu/100g$ et dans 20 % des cas supérieure à $15\mu/100g$, la cuisson diminuant encore de 22 % la teneur en folates libres .

En conclusion , la vitamine B9 est présente dans de nombreux aliments mais généralement en quantité très faible . Les principales sources sont les légumes tels que les épinards , le chou ainsi que le foie ou la levure .

Les teneurs présentent dans les aliments au départ

sont bien souvent affectées par la conservation . Il en résulte que , même pour un régime alimentaire équilibré , les apports restent limités .

Ces constatations permettent de comprendre la raison pour laquelle les carences en folates sont nombreuses même dans nos pays dits industrialisés .

IV) TRAVEAUX PERSONNELS : EXTRACTION ET PURIFICATION DES FOLATES A PARTIR DE PRODUITS ALIMENTAIRES

Le travail qui nous a été confié consistait à mettre au point une méthode d'extraction et de purification de l'acide folique et de ses dérivés à partir de produits alimentaires , le dosage final étant réalisé par chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P.).

Les folates étant présent dans les aliments à de très faibles teneurs , nous avons envisagé une technique de concentration des extraits.

D'autre part , l'acide folique est une molécule très fragile. Sa dégradation est rapide à la lumière , à la chaleur ou encore en présence d'oxygène . Ceci nous a obligé à manipuler en prenant beaucoup de précautions. Dans toutes nos expérimentations nous avons donc respecté les principes suivants :

- ajouter dans chaque solution contenant de la vitamine B9 de l'acide ascorbique qui intervient en tant que protecteur d'oxydation

- conserver dans de la glace toutes les solutions préparées.

- protéger les solutions de la lumière à l'aide de papier aluminium

- refaire les solutions tous les jours.

Notre travail constitue donc une contribution au développement d'une méthode analytique pour le dosage des folates dans les milieux biologiques .

Dans un premier temps , nous avons appliqué la technique de C.L.H.P. sur des solutions témoins de folates . Puis nous avons effectué des essais de couplage de l'acide folique avec des réactifs fluorophores pour augmenter la sensibilité de la détection.

Par ailleurs , nous avons développé des techniques d'extraction et de purification afin de les appliquer aux divers échantillons.

En dernier lieu, nous avons réalisé des dosages sur des échantillons alimentaires.

IV-1) DOSAGE PAR C. L. H. P.

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour le dosage de l'acide folique et de ses dérivés. SASTRY, RAO , REDDY et MURPHY (61) ont envisagé un dosage colorimétrique basé sur la formation d'un composé rouge pourpre issu de la réaction se produisant entre le sulfate de paraméthyl aminophénol et une amine aromatique en présence de N bromosuccinimide .

Des dosages fluorimétriques ont été également exploités basés sur l'oxydation par le permanganate de l'acide ptéroyl glutamique conduisant à la formation de l'acide amino 2 hydroxy 4 ptéridine carboxylique 6 qui est un composé fluorescent (34).

Mais les techniques les plus couramment rencontrées dans la littérature sont les dosages par voie microbiologique utilisant des microorganismes vitamine B9 dépendants tels que Streptococcus faecalis, Pediococcus cerevisiae et surtout Lactobacillus casei (5)(20)(40)(60).

Des dosages par polarographie ont également été proposés(38)(59) .

les différentes méthodes d'analyse précédemment citées ont peu à peu été remplacées par la chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P.) qui permet une meilleure séparation des dérivés de l'acide folique , ainsi que des temps d'analyse plus courts.

Cette technique fait appel , soit à la chromatographie d'échange d'ions , dans laquelle la phase stationnaire est une résine anionique ou cationique et la phase mobile est une solution aqueuse tamponnée(15), soit à la chromatographie de partage à polarité de phase inversée dans laquelle la phase stationnaire est une silice gréffée avec des radicaux apolaires (le plus souvent des hydrocarbures en C18) , la phase mobile étant polaire (mélange eau-méthanol ou eau-acétonitrile)(18)(30)(35). Cette dernière utilise parfois la technique du contre-ion ajouté dans la phase mobile pour l'obtention d'une paire d'ions plus apolaire, donc plus retenue sur le support (8)(62).

La détection est généralement effectuée par absorption dans l'ultra-violet mais des détection par fluorimétrie(18)(30) ou par électrochimie (6)(37)(42)(45) ont été envisagées.

Nous avons fait appel , au cours de notre travail à la chromatographie à polarité de phase inversée avec ou sans contre-ion. La détection est faite par absorption dans l'U.V.

Nous avons tout d'abord été confrontés au problème du choix de la colonne . Pour permettre un dosage valable des folates , la colonne utilisée doit permettre une bonne séparation des dérivés de la vitamine B9 . En effet, dans les aliments , on retrouve en même temps que l'acide folique , de l'acide tétrahydrofolique (THF) , de l'acide dihydrofolique (DHF) , de l'acide formyl tétrahydrofolique (N-5 CHO THF) et surtout , de l'acide méthyl tétrahydrofolique (N-5 CH3 THF)

Deux colonnes de type différents ont été utilisées:

- une colonne phényl
- une colonne en C18

IV-1-1) Utilisation d'une colonne phényl:

IV-1-1-1) Matériel utilisé :

Colonne : hypersil phényl
diamètre intérieur : 4.6 mm.
longueur : 150 mm
granulométrie : 5 μ m

Injecteur : injecteur à boucle de 10 μ l.

Pompe : SHIMADZU LC-6A à débit constant.

Détecteur U.V : SHIMADZU SPD-6A.

Enregistreur : SHIMADZU CR-1B.

IV-1-1-2) Conditions opératoires:

La phase mobile est constituée d'un mélange de tampon phosphate de K 0.005 M pH = 7 et de méthanol dont les proportions sont respectivement de 99% et de 1%.

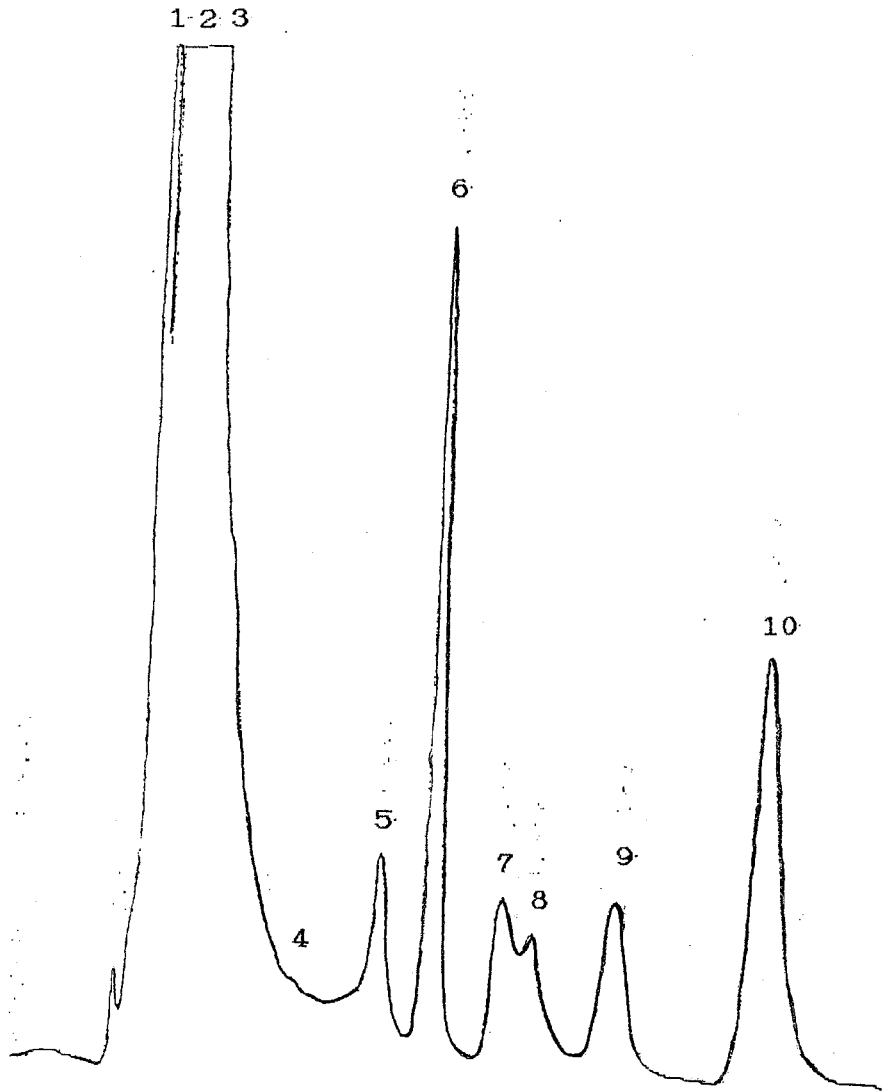
Le débit est fixé à 0.4 ml/mn.

La détection U.V se fait à la longueur d'onde de 280nm.

IV-1-1-3) Résultats obtenus:

Ils sont illustrés par le chromatogramme N°1 .

CHROMATOGRAMME N°1



Séparation en C.L.H.P du mélange folates - produits de
dégradation - acide ascorbique

colonne Hypersil phényl

Les temps de rétention de chaque produit sont représentés dans le tableau VIII :

PRODUIT	Temps de rétention	N°
PABG	3.55 mn	1
AC. ASCORBIQUE	3.97 mn	2
PAB	4.73 mn	3
PTERINE-6 COOH	4.73 mn	3
AC. THF	7.60 mn	4
AC. N5-CHOTHF	9.86 mn	5
AC. FOLIQUE	9.86 mn	5
OH METHYL PTERINE	11.31 mn	6
AC. DHF	12.30 mn	7
PTERINE	14.05 mn	8
AC. N5-CH3THF	16.32 mn	9
AC. PTEROIQUE	20.20 mn	10

TABLEAU VIII

Les acides THF , DHF , N-5 CHO THF , N-5 CH3 THF sont les dérivés de l'acide folique , rangés sous le nom général de folates .

Les acides para amino benzoïque (PAB) , para amino benzoyl glutamique (PABG) , ptéroïque , ptérine 6 carboxylique , ainsi que la ptérine et l'hydroxy méthyl ptérine sont les produits de dégradation de l'acide folique

Il est intéressant de connaître leur comportement en C.L.H.P. pour pouvoir détecter éventuellement leur présence simultanée avec les folates dans les aliments.

L'acide THF est une molécule extrêmement fragile , ce qui explique le faible pic qui lui correspond sur le chromatogramme . Nous avons pu identifier ce dernier grâce à l'injection d'acide THF seul en solution . D'autre part, les acides N5 CHO THF et folique sont élués en même temps . Il en est de même pour l'acide PAB et la ptérine 6 COOH . Les pics correspondant l'acide DHF et à la ptérine ne sont pas complètement séparés

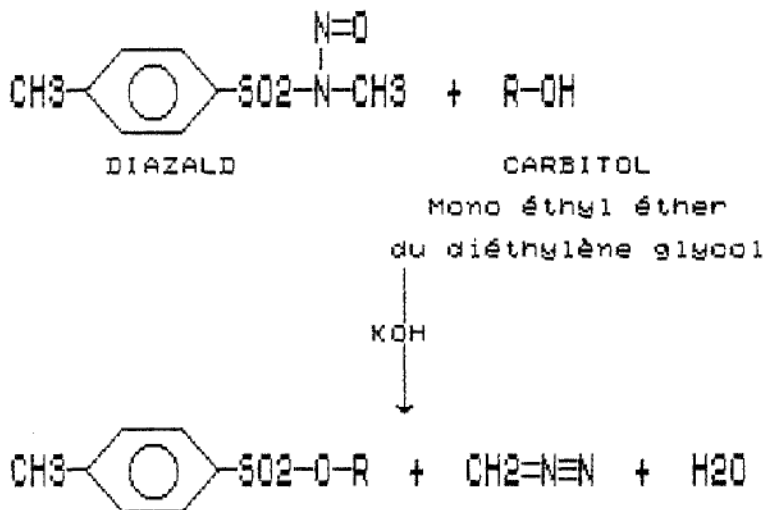
En conclusion , la séparation des folates en présence de certains produits de dégradation qui accompagnent la vitamine B9 soit en tant qu'impuretés d'origine soit prenant naissance lors de la dégradation, n'étant pas parfaite , nous avons pensé à une élution par gradient de polarité . Or , la proportion eau-méthanol du solvant (99-1) ne le permet pas puisqu'une augmentation du pourcentage du méthanol dans le mélange diminuerait les temps de rétention et défavoriserait la résolution .

Ainsi , nous avons envisagé une méthylation de l'acide folique par le diazométhane , afin d'augmenter son affinité pour la colonne . Appliquée aux autres folates , cette technique donnerait naissance à des composés plus apolaires

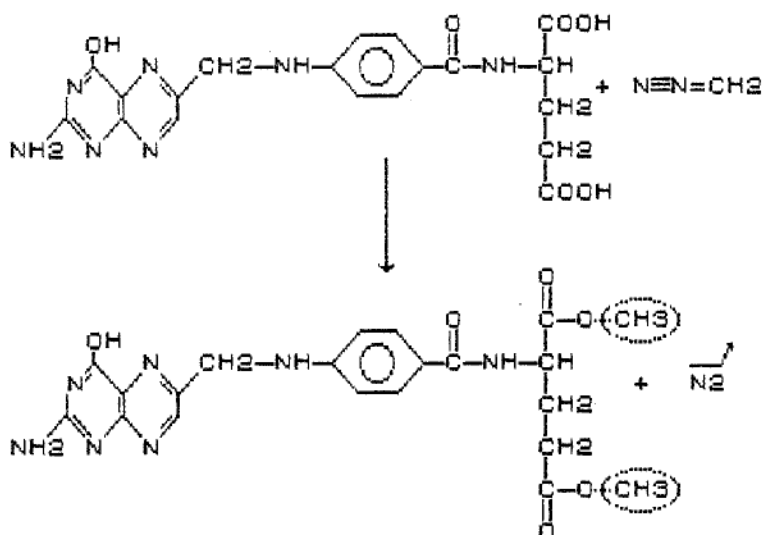
dont le temps de rétention serait supérieur . Nous pourrions alors établir un gradient d'éluion pour améliorer la séparation .

IV-1-1-4) Méthylation par le diazométhane :

Le diazométhane est préparé extemporanément au laboratoire selon la réaction suivante :



Réaction de méthylation de l'acide folique :



Le groupement carboxylique sur lequel le méthyl vient se fixer n'est pas bien défini . En effet , la méthylation peut se faire sur les deux groupements .

Nous avons injecté en C.L.H.P. d'une part l'acide folique traité , d'autre part l'acide folique non traité.

Résultats : Le pic obtenu pour le produit de condensation a le même temps de rétention que celui correspondant à la vitamine B9 non traitée .

Ceci laisse supposer que la méthylation n'a pas eu lieu .

Nous avons alors envisagé d'utiliser la technique de la formation de paire d'ions en choisissant une phase apolaire greffée en C18 pour améliorer la séparation des folates .

IV-1-2) Utilisation d'une colonne en C18 et de la technique de la paire d'ions:

La vitamine B9 en solution aqueuse est un composé très polaire , son coefficient de partage est donc favorable à la phase mobile : la molécule est peu retenue sur la colonne en C18 .La formation d'une paire d'ions entre l'acide folique et un contre ion (phosphate de tétrabutyl ammonium) va permettre de diminuer la polarité du premier et d'augmenter par conséquent son affinité pour la phase stationnaire . Les temps de rétention seront ainsi augmentés entraînant une meilleure séparation des dérivés .

IV-1-2-1) Matériel utilisé :

Colonne : Novapack C18
diamètre intérieur : 3.9 mm
longueur : 150 mm
granulométrie : 5 μ m

Injecteur : injecteur à boucle de 20 μ l.

Le détecteur , la pompe et l'enregistreur sont les mêmes que ceux utilisés avec la colonne Hypersyl phényl .

IV-1-2-2) Conditions opératoires :

La phase mobile est constituée du mélange d'une solution aqueuse de phosphate de tétrabutyl ammonium 0.005 M préparée à partir d'une solution commercialisée par WATERS (Pic A) et de méthanol dont les proportions sont respectivement de 75% et de 25% , le pH est ajusté à 6.5 avec de l'acide phosphorique dilué .

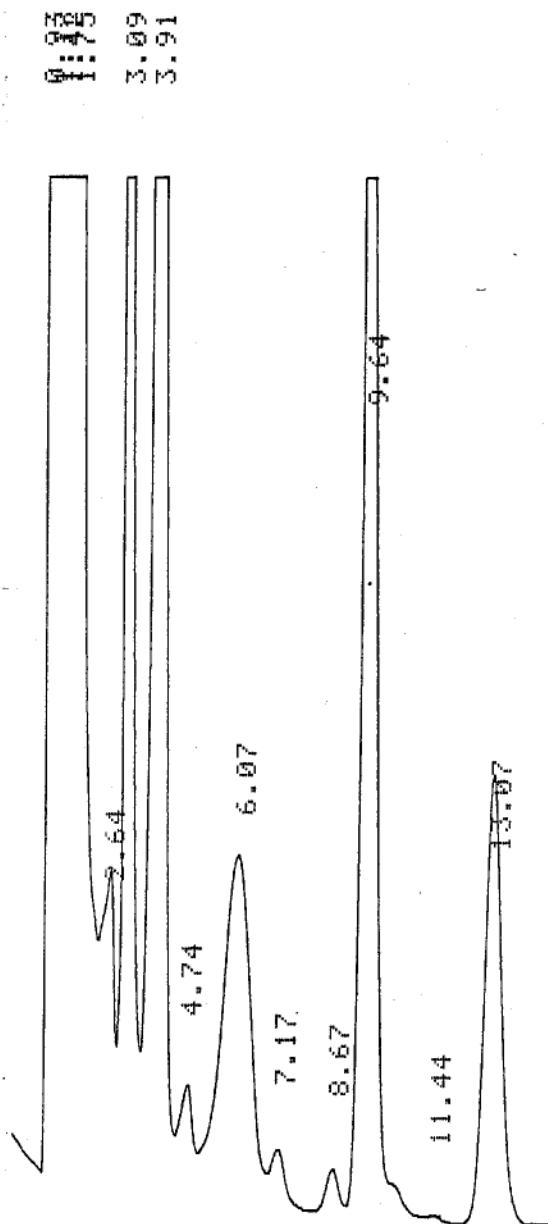
Le débit est fixé à 1 ml/mn .

La longueur d'onde de détection est toujours de 280 nm .

IV-1-2-3) Résultats obtenus :

Ils sont illustrés par les chromatogrammes N° 2 et 3 .

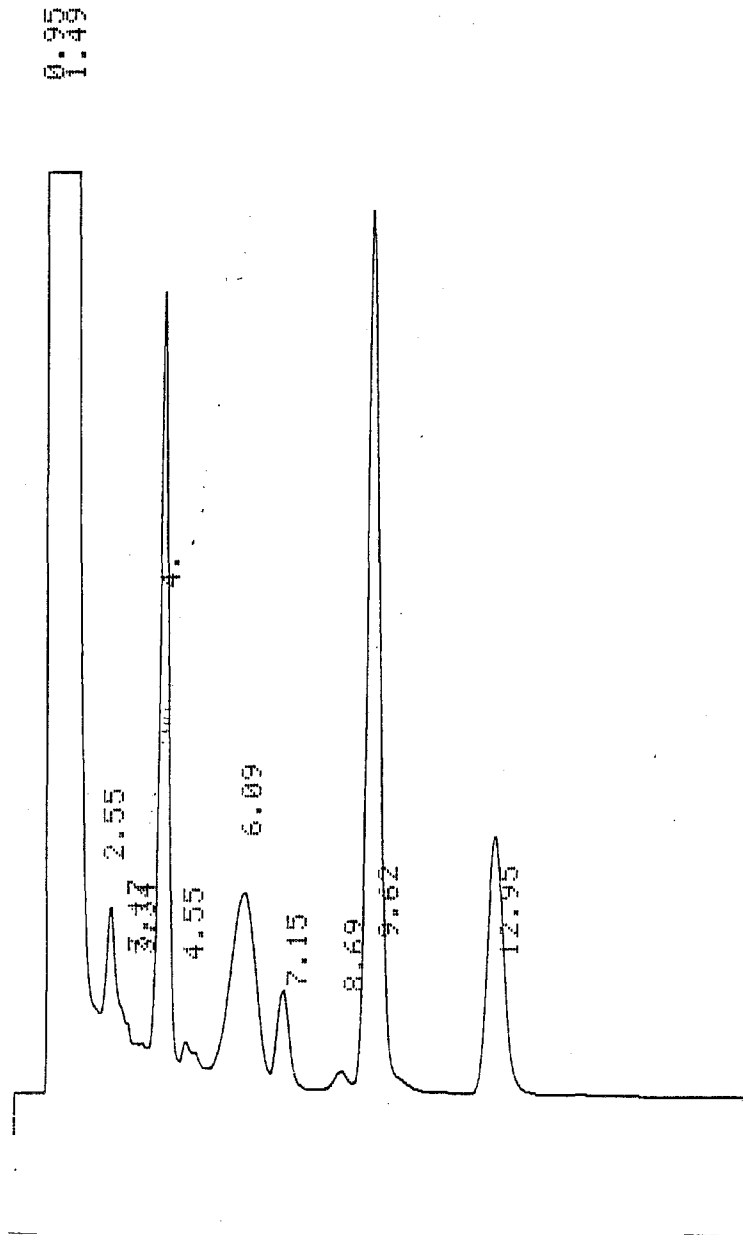
CHROMATOGRAMME N°2



Séparation en C.L.H.P du mélange folates - produits de dégradation - acide ascorbique

colonne Novapack C18

CHROMATOGRAMME N°3



Séparation en C.L.H.P du mélange folates - acide ascorbique

colonne Novapack C18

Les temps de rétention sont présentés dans le tableau IX :

PRODUIT	Temps de rétention
THF	4.740 mn
PABG	3.910 mn
PAB	1.750 mn
AC. ASCORBIQUE	1.420 mn
OH METHYL PTERINE	0.930 mn
PTERINE 6 COOH	2.640 mn
AC. FOLIQUE	9.640 mn
DHF	7.170 mn
CHOTHF	6.070 mn
CH3THF	13.070 mn
AC. PTEROIQUE	3.090 mn
PTERINE	1.170 mn

TABLEAU IX

Nous pouvons remarquer sur les deux chromatogrammes obtenus dans ces conditions que la séparation des folates est meilleure que celle obtenue avec la colonne phényl .

Par ailleurs , nous pouvons identifier d'éventuels produits de dégradation à l'aide de cette technique .

Le dosage de l'acide folique et de ses dérivés , dans ces conditions chromatographiques , est donc possible .

Nous avons retenu cette méthode pour la suite de notre travail .

IV-1-2-4) Validation de la méthode C.L.H.P. :

Pour qu'une méthode soit applicable en toute sécurité, il faut qu'elle ait fait l'objet d'une validation.

La validation d'une méthode C.L.H.P. comporte l'étude:

- de la linéarité
 - de la reproductibilité-répétabilité
- ainsi que l'évaluation de la limite de détection .

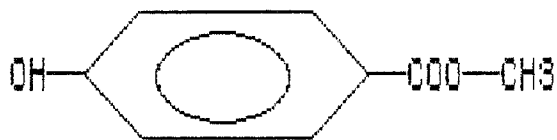
IV-1-2-4-1) Recherche d'un étalon interne :

Les études de linéarité et de reproductibilité répétabilité font appel à la technique de l'étalon interne.

Le choix de l'étalon interne n'est pas une chose facile : il faut que le produit absorbe dans l'U.V à la même longueur d'onde que l'acide folique , qu'il soit stable , et que le pic correspondant n'interfère pas avec les pics des folates .

Après avoir testé plusieurs molécules , notre choix s'est porté sur le parahydroxybenzoate de méthyle (

nipagine) dont la formule est la suivante :



IV-1-2-4-2) Etude de la linéarité :

Nous avons préparé pour chacune des molécule suivantes acide folique , N-5 CHO THF , N-5 CH3 THF , DHF , THF , des solutions de concentrations croissantes contenant une même quantité de nipagine , et nous les avons analysées en C.L.H.P.

Pour chaque dérivé , nous avons calculé les rapports suivants :

- concentration en folates/concentration en nipagine
- surface du pic des folates/ surface du pic de la nipagine

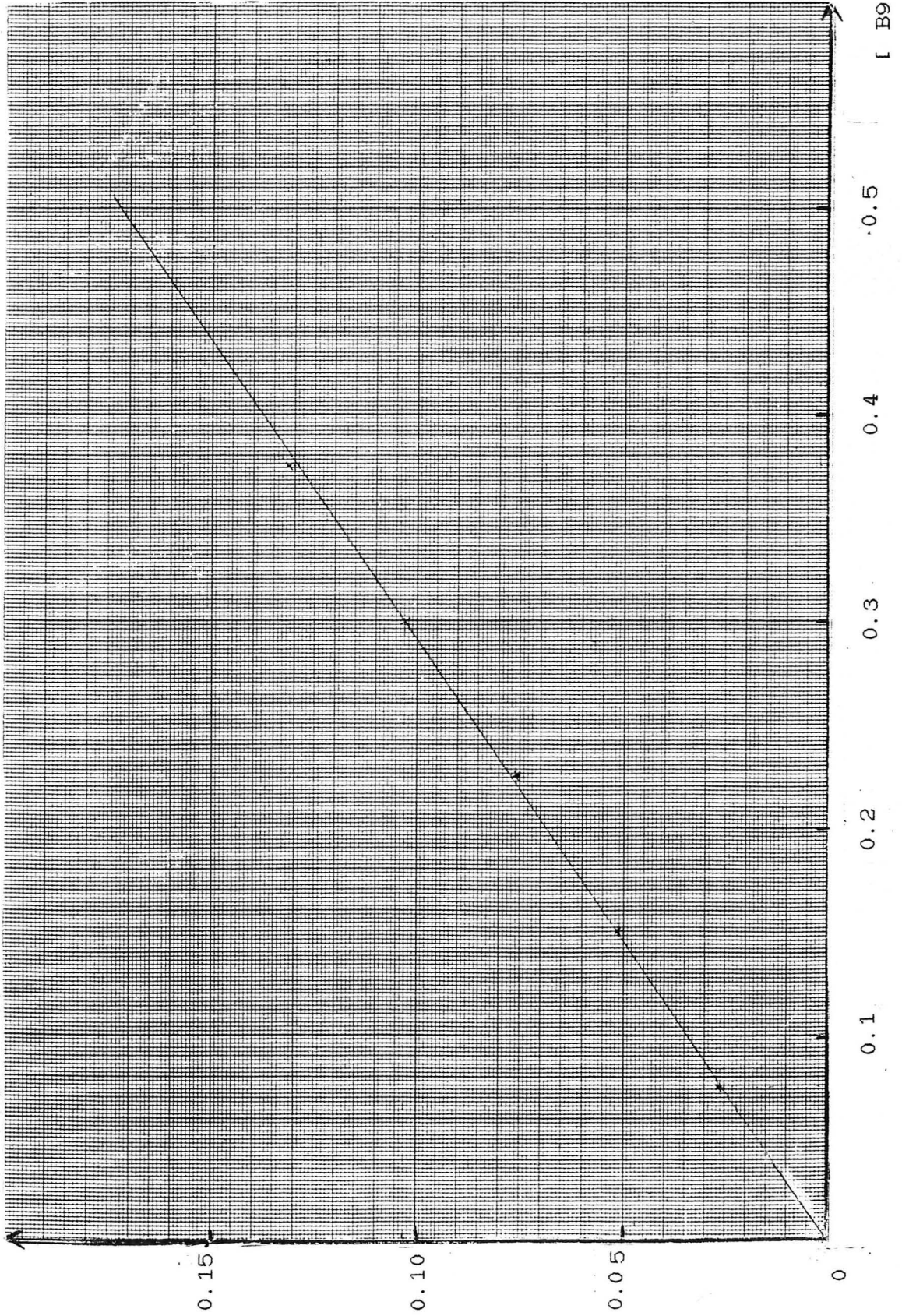
Nous avons ensuite tracé les courbes représentant le rapport des surfaces en fonction du rapport des concentrations .

Sauf pour le DHF , la méthode présente une bonne linéarité.

COURBE DE LINEARITE DE LA VITAMINE B9

Surface pic B9

Surface pic nipagine

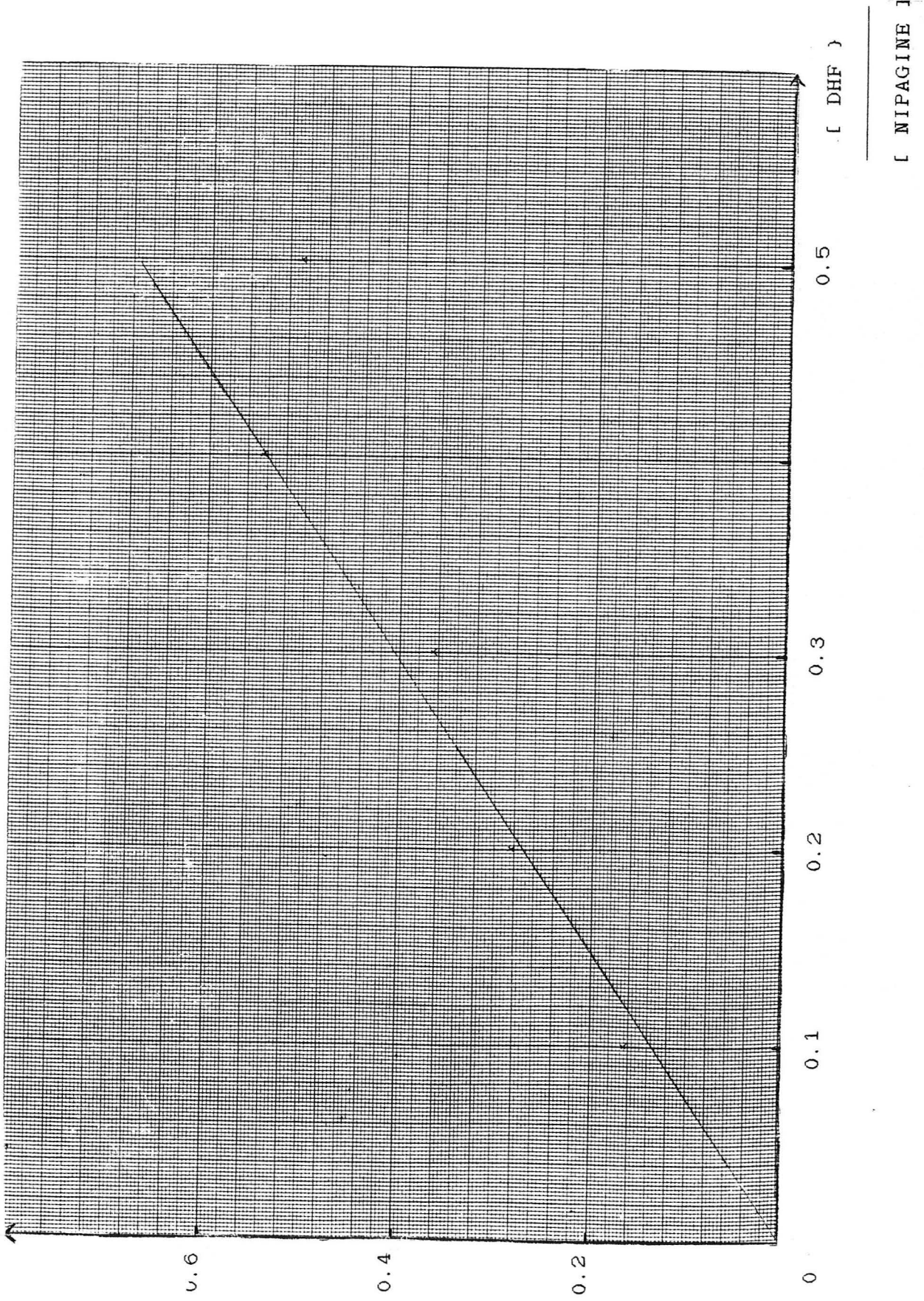


[NIPAGINE]

COURBE DE LINEARITE DU DHF

Surface pic DHF

Surface pic nipagine



IV-1-2-4-3) Etude de la reproductibilité - répétabilité :

a- reproductibilité :

La reproductibilité tient compte des résultats obtenus sur plusieurs jours , les réactifs et solvants étant renouvelés chaque jour .

Nous avons donc effectué 5 injections par jour des solutions de chacun des dérivés , et ce pendant 3 jours .

b- répétabilité :

La répétabilité tient compte des résultats obtenus pendant une journée , les réactifs et solvants sont les mêmes tout au long de la journée .

Nous avons injecté les solutions de chacun des dérivés 10 fois au cours de la même journée .

Pour chacun des folates , nous avons calculé les valeurs moyennes et les écarts-types correspondants , ainsi que le coefficient de variation des temps de rétention .

Les résultats obtenus pour chacune des deux études sont bons sauf en ce qui concerne la reproductibilité de l'acide THF et la répétabilité pour les surfaces des pics , ceci pouvant être expliqué par la dégradation rapide des molécules .

IV-1-2-4-4) Limite de détection :

La limite de détection est exprimée par la concentration de l'échantillon qui donne un signal équivalent à trois fois le bruit de fond .

Pour les folates , nous obtenons les résultats suivants :

dérivés	limites de détection
	-6
THF	10 M
	-7
DHF	10 M
	-7
CH3 THF	10 M
	-8
CHO THF	7.5 10 M
	-8
B9	7.5 10 M

TABLEAU X

Nous avons cherché à diminuer la limite de détection en faisant des couplages de l'acide folique avec des molécules fluorophores .

IV-2) ESSAIS DE FLUORESCENCE :

Des essais de fluorescence ont été envisagés afin d'améliorer la sensibilité de la détection en C.L.H.P.

Dans une étude menée sur le dosage des folates dans les aliments par C.L.H.P. , DAY ET GREGORY (18) proposent une détection fluorimétrique basée sur l'emploi d'une colonne d'hypochlorite placée en sortie de colonne C.L.H.P. permettant d'oxyder les folates et de les transformer en dérivés fluorescents .

Au cours de notre travail , deux solutions s'offraient à nous :

-soit exploiter une éventuelle fluorescence directe de l'acide folique

-soit envisager un couplage de l'acide folique avec un fluorophore

En fait , l'acide folique présente une faible fluorescence (utilisée dans la révélation en chromatographie sur couche mince sous U.V à 365 nm , pharmacopée française) .

Mais l'intensité de cette dernière n'est pas suffisante pour pouvoir être exploitée .

De ce fait , nous avons essayé de coupler la vitamine B9 avec plusieurs molécules fluorescentes , afin d'obtenir:

-soit une augmentation de l'intensité de fluorescence après couplage

-soit un déplacement des longueurs d'onde d'excitation et d'émission du fluorophore , pour le dérivé de condensation , permettant ainsi la détection de l'acide folique aux nouvelles longueurs d'onde obtenues .

Les molécules testées sont les suivantes :

- l'orthophtalaldéhyde
- le chlorure de dansyl
- le fluorényl méthyl-9 chloroformate
- la parabenzoquinone

Ces produits ont la caractéristique de pouvoir réagir avec un groupement amine primaire des acides aminés et de donner ainsi des dérivés fluorescents .

Nous avons supposé qu'ils se comporteraient de la même manière avec le groupement amine primaire de l'acide folique

Pour tous les essais de couplage , la mesure de l'intensité de fluorescence du dérivé obtenu est effectuée sur un spectrofluorimètre JOBIN-YVON J-Y 3D .La

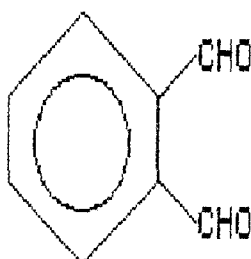
0.5

détermination des longueurs d'onde d'excitation et d'émission est faite , dans un premier temps sur une solution du fluorophore seul , puis dans un deuxième temps sur le mélange B9-fluorophore , pour mettre en évidence s'il y a eu déplacement des longueurs d'onde ou non .La lecture de l'intensité de fluorescence est ensuite effectuée .

IV-2-1) Couplage avec l'orthophtalaldéhyde (OPT)

Cette réaction de condensation a été utilisée pour le dosage fluorimétrique de l'histidine (16) .

formule de l'orthophtalaldéhyde :



Mode opératoire :

Nous avons ajouté 1 ml d'une solution d'OPT à 1% dans le méthanol à 20 ml d'une solution de vitamine B9 à 125 µg/l au préalablement ajustée à pH = 12.45 avec une solution de NaOH 1N .

4 minutes après , nous avons ajouté de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH = 2.3 pour arrêter la réaction .

Résultats :

- λ maximale d'émission = 450 nm
- λ maximale d'excitation = 360 nm

-intensité de fluorescence :

dérivé	I
B9	0
OPT	0.560
B9+OPT	0.718

TABLEAU XI

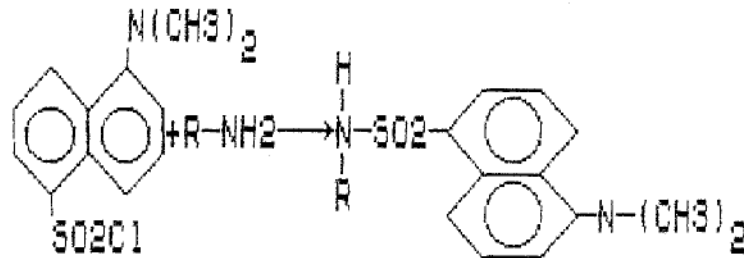
L'intensité de fluorescence obtenue pour le couplage

B9-OPT est supérieure à celle de l'OPT seul . Ceci prouve que la condensation entre les deux réactifs a bien eu lieu .

Cependant , l'application de cette technique au dosage des folates par C.L.H.P. a montré que le dérivé obtenu après couplage était fortement fixé sur la colonne en C18 , son élution étant impossible dans les conditions chromatographiques déterminées précédemment .

III-2) CHLORURE DE DANSYL (DNS) :

réaction du chlorure de dansyl avec un groupement aminé :



1ère méthode : (1)

* mode opératoire :

solutions utilisées :

-NaHCO₃ 0.1M

-vitamine B9 dans NaHCO₃ 0.1 M : 1 µmole/ml

-DNS dans l'acétone : 1 mg/ml

Nous avons préparé les solutions suivantes :

SOLUTION	TEMOIN	B9	DNS	B9+DNS
acétone	5 ml	5 ml	-	-
NaHCO ₃ 0.1M	5 ml	-	5 ml	-
B9	-	5 ml	-	5 ml
DNS	-	-	5 ml	5 ml

TABLEAU XII

La fin de la réaction est marquée par la disparition de la coloration jaune .

La détermination des longueurs d'onde maximales d'émission et d'excitation est effectuée , ainsi que la mesure de l'intensité de fluorescence .

*Résultats :

- λ maximale d'excitation = 312 nm
- λ maximale d'émission = 503 nm

Intensité de fluorescence :

- DNS seul : 0.302
- DNS + B9 : 0.308

Les résultats obtenus montrent que le couplage n'a pas eu lieu .

2ème méthode : (11)

*mode opératoire :

Nous avons préparé les solutions suivantes :

SOLUTION	TEMOIN	B9	DNS	B9+DNS
Na ₂ CO ₃ 0.5M	15 gtes	15 gtes	15 gtes	15 gtes
Acétone	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
B9	-	5 mg	-	5 mg
DNS	-	-	50 mg	50 mg

TABLEAU XIII

Les tubes sont laissés 1 heure à 45 °c .

Le solvant est éliminé par évaporation au rotavapor et le résidu est repris par 20 ml de toluène . Une centrifugation et une filtration sont effectuées avant la mesure fluorimétrique .

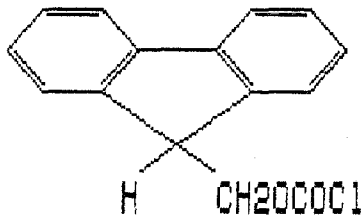
* Résultats :

- λ maximale d'excitation = 312 nm
- λ maximale d'émission = 503 nm

Nous n'avons obtenu de fluorescence ni pour le DNS seul ni pour le mélange DNS-B9 .

Le couplage entre l'acide folique et le chlorure de dansyl n'ayant donné aucun résultat avec les deux variantes de la méthode, nous avons envisagé le couplage avec un nouveau fluorophore.

IV-2-3) Fluorényl méthyl-9 chloroformate (FMOC):



*mode opératoire :

solutions utilisées :

-Vitamine B9 dans NaCO₃ 10% : 158 mg/ml

-FMOC dans du dioxanne : 100 mg/ml

Les solutions suivantes ont été préparées :

SOLUTION	TEMOIN en µl	B9	FMOC	B9+FMOC
Dioxanne	600	400	200	-
Na ₂ CO ₃ 10%	1400	1400	1400	1400
B9	-	200	-	200
FMOC	-	-	400	400

TABLEAU XIV

Les tubes sont laissés 4 heures dans de la glace puis 8 heures à température ambiante (20° C) .

3.5 ml d'eau sont ensuite rajoutés et une extraction par de l'ether est effectuée .La couche aqueuse est acidifiée par HCl concentré et gardée une nuit au réfrigérateur pour favoriser la cristallisation du produit de condensation .

*Résultats :

Seules les solutions de B9 et de B9+FMOC présentent un louche .Les spectres UV obtenus après redissolution dans

une solution de NaOH 1N , montrent qu'il s'agit de la vitamine B9 . Le couplage n'a donc pas eu lieu .

IV-2-4) Parabenzquinone (PBQ) :



La parabenzquinone est utilisée pour doser la cyclosérine par spectrofluorimétrie , par formation d'un dérivé de condensation fluorescent entre les deux molécules (6) .

En effet , la parabenzquinone réagit avec le groupement aminé de la cyclosérine en formant une base de Schiff .

L'acide folique possédant aussi un groupement aminé, nous avons tenté son couplage avec la parabenzquinone.

*mode opératoire :

solutions utilisées :

-3
-Vitamine B9 2.10⁻³ M en tampon borate 0.05M
pH = 8.2

-PBQ à 0.6% dans de l'éthanol

Nous avons effectué la gamme suivante :

SOLUTION	TEMOIN	1	2	3	4	5
		en ml				
B9	-	1	2	3	4	5
PBQ	1	1	1	1	1	1
Tampon borate	2	2	2	2	2	2
Eau q. s. p.	10	10	10	10	10	10

TABLEAU XV

- agitation des tubes
- bain marie pendant une demi-heure à 100°C
- ajustement à 50 ml avec du tampon borate
- dilution au 1/10^{ème} dans le tampon borate

*Résultats :

Les longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission sont respectivement de 381 nm et 467 nm . Mais quelle que soit la quantité de vitamine B9 présente , les spectres d'émission et d'excitation ont toujours le même aspect que ceux de la parabenzoquinone seule (même intensité de fluorescence aux mêmes longueurs d'onde).

La mesure de la fluorescence montre qu'elle est identique dans tous les tubes et est égale à celle de la solution de parabenzoquinone seule .

Nous avons alors voulu vérifier si le couplage avait eu lieu . Nous avons donc préparé les solutions suivantes

	B9	PBQ	B9 + PBQ
B9	5 ml	-	5 ml
PBQ	-	1 ml	1 ml
Tampon P	2 ml	2 ml	2 ml
Eau dist. q. s. p.	10 ml	10 ml	10 ml

TABLEAU XVI

Nous avons ensuite réalisé une chromatographie sur couche mince dans les conditions décrites par la pharmacopée française dans la monographie de l'acide folique :

-Solvant :

éthanol-propanol-ammoniaque concentrée (60 -20 - 20)

-Plaque : silice G de 300 μm

-Révélation : U.V 365 nm

-Dépôts : 10 μl de :

-Vitamine B9

-Parabenzquinone

-Mélange vitamine B9 parabenzquinone

-Résultats :

Le dépôt correspondant au mélange B9-PBQ présente deux taches de même intensité de fluorescence dont les Rf correspondent respectivement à ceux de la parabenzquinone seule et la vitamine B9 seule . Ceci est en faveur de l'hypothèse selon la quelle le couplage n'a pas eu lieu . Il est probable que l'encombrement stérique autour du groupement aminé gêne la réaction .

En conclusion de ce chapitre réservé aux essais de fluorescence , seul le couplage de l'acide folique avec l'orthophtalaldéhyde a eu lieu et pourrait être exploité en vue d'une détection fluorimétrique au cours du dosage des folates par C.L.H.P. mais dans des conditions différentes de celles fixées précédemment .

Nous avons donc pour l'instant , retenu la méthode C.L.H.P. avec une détection U.V. , pour l'appliquer au dosage de l'acide folique dans les échantillons alimentaires .

Les aliments constituent un milieu biologique assez complexe. Des étapes d'extraction et de purification des folates sont donc nécessaires et doivent être effectuées avant l'analyse proprement dite .

IV-3) EXTRACTION -PURIFICATION :

Les folates alimentaires se trouvent en fortes proportions sous forme polyglutamique . Ainsi , au cours de cette étape , il paraît nécessaire de disposer d'une enzyme capable d'hydrolyser les polyglutamates d'acide folique , pour effectuer l'analyse sous forme monoglutamique .

IV-3-1) Utilisation d'une enzyme :

La transformation des polyglutamates en monoglutamates est généralement effectuée par une enzyme spécifique des folates : la conjugase . Cette enzyme est une carboxypeptidase : elle coupe la liaison peptidique des restes glutamiques .

Dans la littérature , la conjugase utilisée au cours du dosage des folates a plusieurs origines : elle peut être obtenue par extraction à partir de pancréas de poulet (14)(19)(28)(48)(49) ou de reins de porc (4)(30). LAKSHMAIAH et RAMASASTRI (44) utilisent la conjugase provenant de plasma humain . Enfin , HOPNER et LAMPI emploient une autre enzyme : la papaïne (35).

Il est à noter que certains produits alimentaires possèdent une conjugase endogène . Cependant , cette dernière n'est pas suffisante pour hydrolyser tous les polyglutamates présents et les auteurs préfèrent ainsi utiliser une conjugase exogène et inactiver la précédente par la chaleur (48) .

La conjugase n'étant pas commercialisée , deux solutions nous étaient offertes :

- soit son remplacement par une autre carboxypeptidase
- soit son extraction à partir de reins de porc .

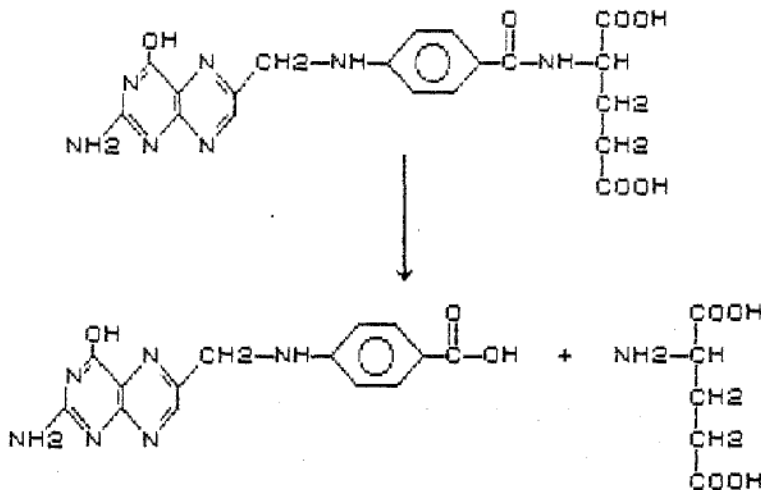
IV-3-1-1) Utilisation de la carboxypeptidase B :

Les polyglutamates de l'acide folique n'étant pas commercialisés , nous n'avons pas pu étudier la capacité de cette enzyme à hydrolyser les liaisons peptidiques qui lient les restes glutamiques .

Pour cela , un autre artifice pouvait être employé et consistait à envisager la libération , par cette enzyme , du reste glutamique de la forme monoglutamique de l'acide folique .

L'obtention de l'acide ptéroïque , qui peut être analysé par C.L.H.P. , témoignerait ainsi de l'activité enzymatique recherchée .

IV-3-1-1-1) Schéma de la réaction :



IV-3-1-1-2) Mode opératoire :

La carboxypeptidase B possède un maximum d'activité à:

-pH = 7.65

-T° = 25°C

Une unité d'enzyme hydrolyse 1 μ mole de substrat/mn. Le poids moléculaire de l'acide folique étant de 441.4 g, 1 unité d'enzyme hydrolysera 0.4414 mg de vitamine B₉ /mn, donc 100 unités d'enzyme agiront sur 44.14 mg de vitamine B₉ / mn.

Le mode opératoire est le suivant :

-dilution de 44.14 mg d'acide folique dans 50 ml de tampon phosphate 0.01 M pH = 7.65.

-introduction de 0.2 ml de solution de carboxypeptidase correspondant à 100 unités.

-bain marie à 25 °C pendant 10 minutes.

-précipitation de l'enzyme en excès par HCl N.

-Centrifugation.

-récupération et filtration du surnageant.

-analyse en C.L.H.P.

IV-3-1-1-3) Résultats :

Le chromatogramme obtenu ne comporte aucun pic correspondant à l'acide ptéroïque . La carboxypeptidase B n'a donc pas hydrolysé la vitamine B9 , et ce , quel que soit le temps d'incubation de l'enzyme .

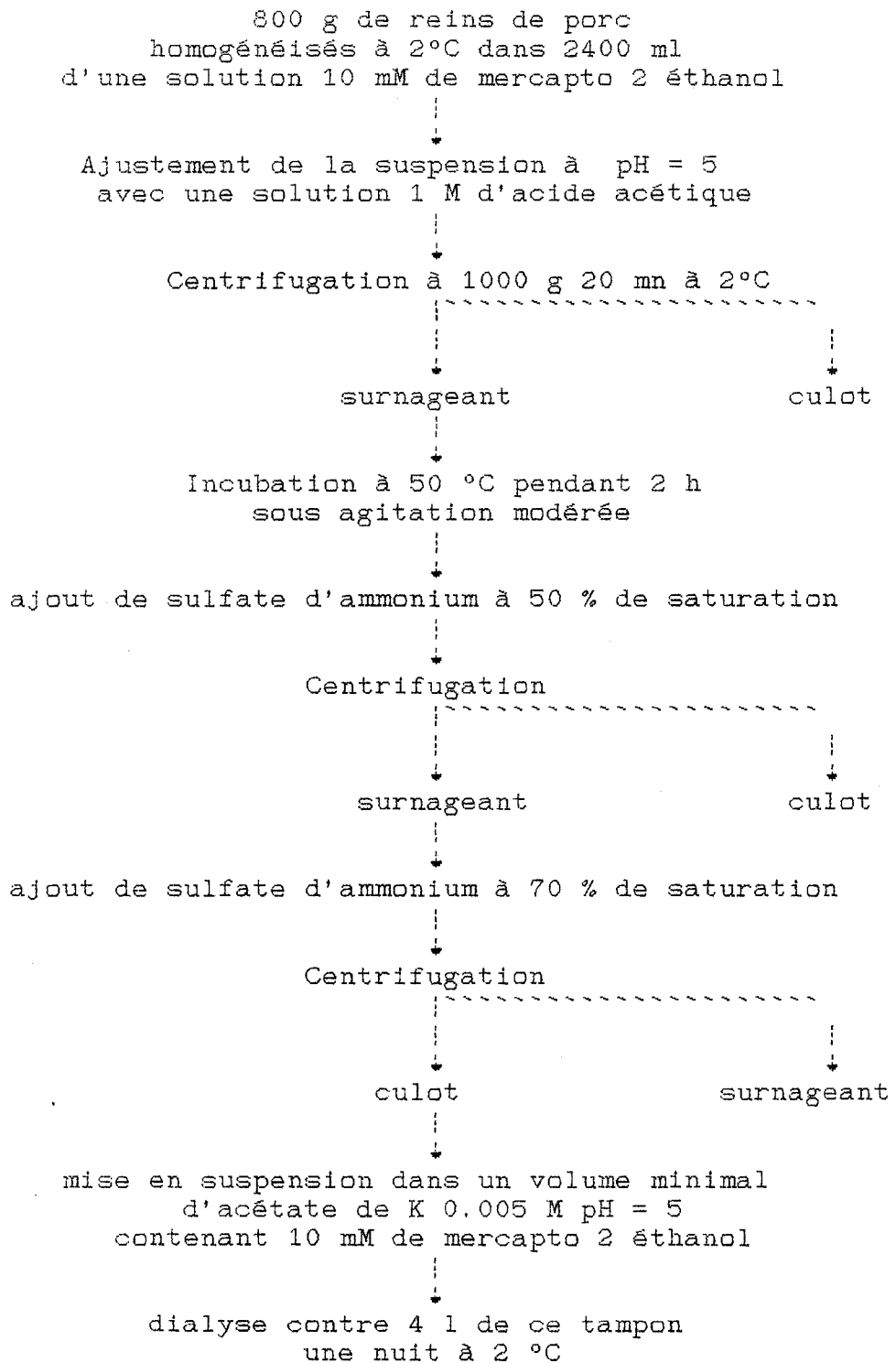
IV-3-1-2) Utilisation de la conjugase:

Nous avons alors choisi la deuxième alternative : celle de l'extraction de l'enzyme à partir de reins de porc.

IV-3-1-2-1) Extraction de la conjugase :

Nous avons adopté la technique décrite par GREGORY , SARTAIN et DAY (30) :

L'extraction se fait à partir de reins de porc frais (prélevés aux abattoirs de Grenoble et transportés dans de la glace), selon le schéma suivant:



Cette préparation est conservée à -35 °C jusqu'à utilisation . Elle est théoriquement stable pendant dix mois.

IV-3-1-2-2) Vérification de l'activité de la
préparation enzymatique :

Ne disposant pas de témoins polyglutamates d'acide folique du commerce , comme nous l'avons dit précédemment , nous avons extrait les folates à partir d'épinards et traité une partie de l'extrait avec la conjugase obtenue à partir des reins de porc. L'analyse de la fraction traitée et de celle non traitée devrait nous renseigner sur l'action effective de l'enzyme .

IV-3-1-2-2-1) Extraction de l'acide folique et de ses dérivés:

La méthode d'extraction utilisée est celle proposée par GREGORY , SARTAIN , et DAY (7) .

- 5 g d'échantillon sont mélangés à 20 ml de tampon acétate de sodium 0.05 M pH = 4.9 contenant 0.1 % d'acide ascorbique .

- 100 µl d'octanol-1 , jouant le rôle d'antimousse, sont rajoutés .

- Le mélange est soumis à un courant d'azote , plongé dans un bain marie à 100 °C pendant 60 minutes puis refroidi dans de la glace et centrifugé pendant 15 minutes.

- deux solutions témoins sont traitées en parallèle, contenant respectivement de l'acide N5- CH3 THF et de l'acide N5-CHO THF à raison de 4 µg / ml de tampon acétate 0.05 M pH = 4.9 .

IV-3-1-2-2-2) Traitement enzymatique :

Le traitement enzymatique n'est effectué que sur une partie des échantillons .

0.8 ml de la préparation enzymatique sont rajoutés à 10 ml de surnageant.

Après un barbotage d'azote , les solutions sont placées dans un bain marie à 37 °C pendant 60 minutes et ajustées à pH = 7 avec NaOH 0.1 N .

IV-3-1-2-2-3) Purification sur colonne échangeuse d'ions :

La purification s'effectue sur des colonnes de DEAE cellulose . La préparation des colonnes et la technique de purification seront développées ultérieurement .

IV-3-1-2-2-4) Analyse en C.L.H.P.

IV-3-1-2-2-5) Résultats :

Les chromatogrammes obtenus d'une part pour les échantillons traités par la conjugase et d'autre part pour les échantillons non traités, ont le même profil. Cependant, les surfaces des pics obtenus pour les échantillons traités sont supérieures à celles des échantillons non traités.

L'hypothèse de l'activité de la conjugase extraite n'est donc pas à exclure, elle pourrait être insuffisante ce qui expliquerait des profils chromatographiques voisins avec des surfaces de pics différentes, entre les échantillons traités et les échantillons non traités.

N'étant pas certains de l'activité de l'enzyme préparée, nous avons voulu le vérifier par un autre moyen. Pour cela, nous avons traité de façon équivalente divers échantillons alimentaires : yaourt, chocolat, orange, avocat, levure.

Les chromatogrammes obtenus pour les échantillons traités par l'enzyme, comportent un pic dont le temps de rétention correspond à l'acide N5 CHOTHF. Ceci est donc en faveur de l'activité effective de l'enzyme, dans la mesure où les folates ne se trouvent que sous forme de polyglutamates dans les échantillons utilisés.

IV-3-2) Amélioration de la méthode d'extraction:

L'acide folique étant une vitamine du groupe B donc hydrosoluble, son extraction se fera par une solution aqueuse tamponnée. Dans la littérature, sont proposées des solutions diverses telles que : tampon acétate, tampon phosphate-citrate, tampon phosphate (18)(29) (30) (39)(41)(48).

Nous avons cherché à déterminer les meilleures conditions d'extraction de l'acide folique. Pour cela, deux paramètres ont été étudiés : dans un premier temps, la nature du tampon extractif puis le pH de la solution choisie.

IV-3-2-1) Nature de la solution extractive :

Nous avons voulu comparer l'extraction de l'acide folique par les différentes solutions tampons proposées dans la littérature : acétate, phosphate-citrate, phosphate qui sont les plus communément employées.

Nous avons donc préparé :

-une solution tampon phosphate de K 0.1 M

-une solution tampon phosphate-citrate de K 0.1 M

-une solution tampon acétate de K 0.1 M

A ces trois solutions sont rajoutés 0.1% de acide ascorbique .

Chacune d'elle est ajustée à pH = 7 de manière à tester uniquement l'influence de la nature du tampon .

L'extraction est effectuée à partir de comprimés contenant de l'acide folique , qui constituent un milieu plus simple que les produits alimentaires ne contenant donc pas de constituants qui puissent gêner l'extraction, et qui ne nécessitent pas l'utilisation préalable de la conjugase.

Après avoir calculé le poids moyen de dix comprimés, l'extraction est réalisée sur deux prises d'essai pour chacune des solutions tampons .

L'analyse des extraits en C.L.H.P. est ensuite réalisée , comparativement à une solution témoin d'acide folique de même concentration .

Les résultats sont présentés dans le tableau XVII :

Tampon	extrait
Phosphate	99.47 %
Citrate-phosphate	98.20 %
Acétate	96.27 %

TABLEAU XVII

Le meilleur milieu extractif est donc la solution tampon phosphate , pour laquelle nous obtenons un rendement extractif de 99.47 % .

IV-3-2-2) Détermination du pH de la solution extractive :

Ayant choisi la solution tampon phosphate de K 0.1 M comme solution extractive , nous avons ensuite déterminé le pH qui nous donnait le meilleur rendement .

Pour cela , cinq solutions d'acide folique de même concentration ont été préparées dans un tampon phosphate 0.1M . Les pH ont été ajustés respectivement à 4 , 5 , 6, 7 et 8 . Pour chacune des solutions préparées , nous avons traité deux prises d'essai de comprimés et effectué deux injections en C.L.H.P. par prise d'essai.

Le pH de la solution extractive qui donne le meilleur rendement est fixé à 8 .

En conclusion , nous retiendrons pour l'extraction de l'acide folique à partir d'aliments ou de milieux biologiques , une solution tampon phosphate de K 0.1M pH = 8 .

IV-3-3) Purification des extraits :

L'acide folique étant présent dans les aliments aux côtés de nombreuses autres molécules hydrosolubles , notamment d'autres vitamines , des techniques de purification des extraits ont dû être envisagées . Nous nous proposons , dans ce chapitre d'étudier et de comparer deux méthodes de purification :

-sur colonne de DEAE cellulose

-sur cartouche de SEP PAK C18

IV-3-3-1) Fixation sur colonne de DEAE cellulose :

La fixation est effectuée sur des colonnes préparées au laboratoire à raison de 0.2 g de DEAE cellulose en poudre par colonne (capacité de fixation : 1 mEq / g).

Le mode opératoire généralement employé est le suivant(35) :

-Mise en suspension de la poudre dans 10 ml d'eau distillée

-Conditionnement de la colonne avec 10 ml d'une solution tampon phosphate de K 0.005M pH=7

-Introduction de la prise d'essai d'acide folique : 5 ml d'une solution à 50 $\mu\text{g/ml}$.

-Lavage par 10 ml d'une solution tampon phosphate 0.05 M pH =7

-Elution par 5 ml d'une solution tampon phosphate 0.1 M pH =7 , contenant 0.5 M de NaCl .

La fraction éluée est recueillie et filtrée sur filtre Millipore (0.25 μm) puis analysée en C.L.H.P.

Les résultats sont donnés par rapport à une solution témoin d'acide folique (50 $\mu\text{g/ml}$) non traitée .

IV-3-3-1-1) Influence du pH de la solution de vitamine B9 sur la fixation:

Nous avons calculé le pourcentage de fixation pour des solutions dont le pH varie de 4 à 8 .

* mode opératoire :

5 ml d'une solution de vitamine B9 (50 $\mu\text{g/ml}$) contenant 0.1% d'acide ascorbique sont introduits dans la colonne .

La fraction liquide recueillie en sortie de colonne constitue la fraction A . Elle permet d'évaluer le pourcentage de fixation .

Après lavage par 5 ml de tampon phosphate 0.05 M , la fraction recueillie constitue la fraction B . Elle peut servir à calculer la perte éventuelle due au lavage .

Enfin , la fraction C recueillie après élution permet de calculer le taux de récupération .

Ces diverses fractions sont filtrées sur filtre Millipore puis analysées en C.L.H.P.

*Résultats obtenus :

Le pourcentage de fixation de la vitamine B9 aux différents pH est représenté dans le tableau XIII :

pH	4	5	6	7	8
% fixation	99,2	99,5	100	100	100

TABLEAU XVIII

-Quel que soit le pH , nous obtenons une excellente fixation de la vitamine B9 .

Dans la suite de notre travail , nous nous placerons à pH = 7 pour minimiser une éventuelle dégradation .

-Le lavage , par le tampon phosphate 0.05 M , élue l'acide ascorbique presque totalement mais l'acide folique est très peu affecté par ce traitement , puisque le chromatogramme ne présente qu' un très faible pic au temps

de rétention de ce dernier.

-Enfin , l'élution de l'acide folique n'est pas complète . Pour remédier à ce problème , il faudrait :

-Soit , augmenter le volume d'élution mais ceci entrainerait une dilution qui est à éviter car la vitamine B9 étant contenue en très petite quantité dans les aliments , la détection lors de l'analyse en C.L.H.P. ne serait plus possible .

-Soit , augmenter la force ionique de l'éluant c'est à dire la quantité de NaCl .

IV-3-3-1-2) Influence de la force ionique de l'éluant

Les conditions opératoires sont identiques aux précédentes , sauf pour l'élution qui est réalisée par une solution tampon phosphate de K 0.1 M contenant du NaCl dont la concentration varie de 0.5 M à 4 M . Le pH est fixé à 7.

Seules les fractions éluées sont récupérées , filtrées et analysées en C.L.H.P.

*Résultats obtenus :

concentration en NaCl	% élué
0.5 M	78.12
1 M	91.75
1.5 M	97.88
2 M	99.64
2.5 M	98.44
3 M	73.08
3.5 M	65.32
4 M	52.19

TABLEAU XIX

La courbe représentant le pourcentage de vitamine B9 en fonction de la concentration en NaCl de l'éluant est présentée en page 58 .

La quantité d'acide folique éluée , augmente pour des concentrations de NaCl allant de 0.5 M à 2 M puis décroît

de 2 M à 4M .

La solution éluante qui donne les meilleurs résultats est celle dont la concentration en NaCl est égale à 2 M .

Deux remarques sont à faire concernant l'analyse en C.L.H.P. de la fraction élue de la colonne de DEAE cellulose :

-D'une part , nous observons , sur le chromatogramme, un dédoublement du pic relatif à l'acide folique : le premier pic dont la surface est plus élevée à été pris comme base de calcul bien que le temps de rétention qui lui correspond soit inférieur à celui de la solution témoin .

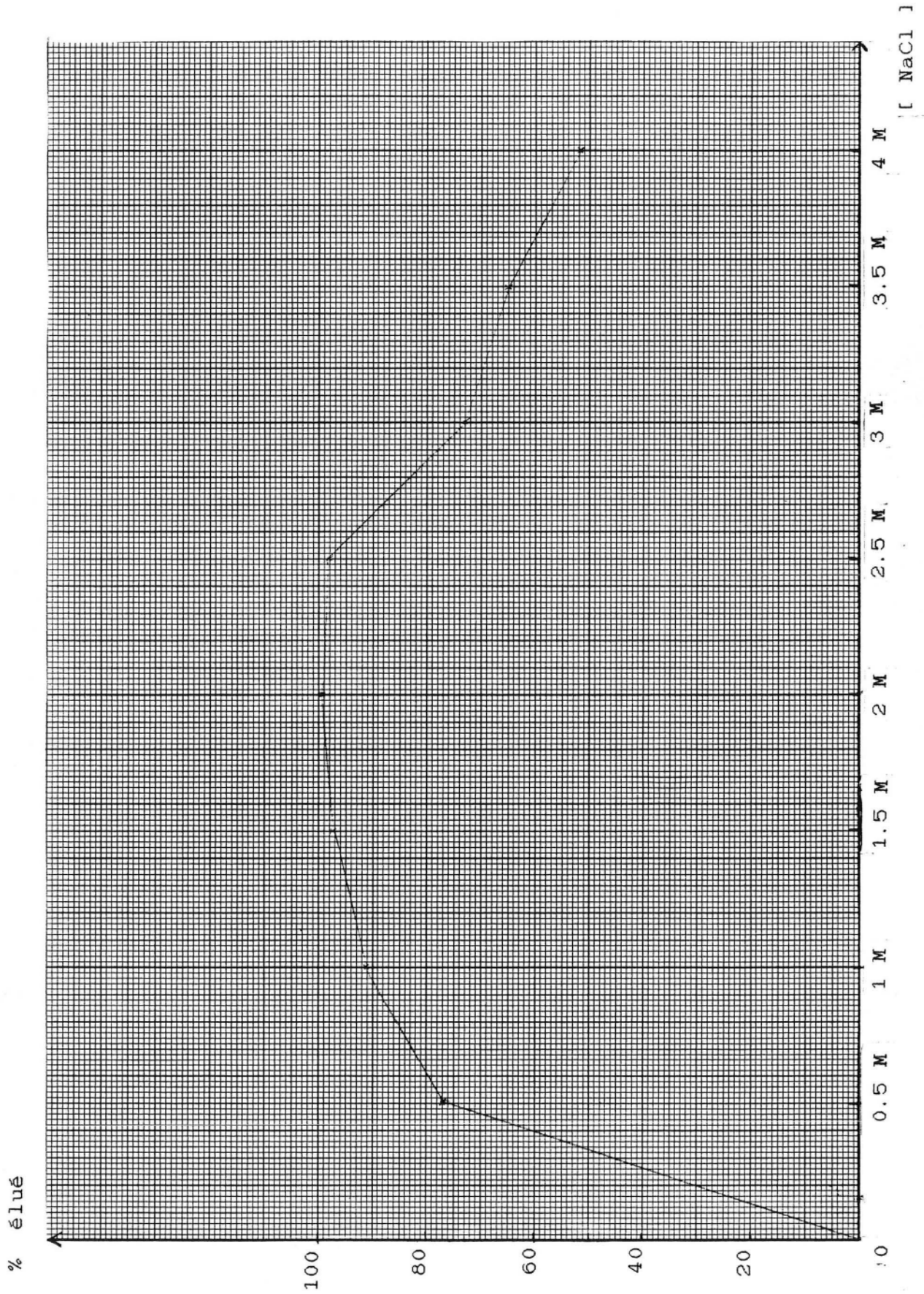
Le deuxième pic possède un temps de rétention égal à celui du témoin .

-Par ailleurs , le temps de rétention du pic qui à servi à faire les calculs diminue au fur et à mesure que la quantité de NaCl augmente .

La comparaison des chromatogrammes obtenus pour des solutions d'acide folique faites d'une part dans un tampon phosphate 0.1 M pH = 7 et d'autre part dans le même tampon contenant du NaCl , montre que ce dernier est responsable du dédoublement observé .

En effet , la présence indispensable du NaCl augmente la force ionique de l'éluant et gêne la formation complète de la paire d'ion entre l'acide folique et le phosphate de tétrabutyl ammonium. On observe donc un pic correspondant à l'acide folique libre et un autre correspondant à la paire d'ions .

COURBE REPRESENTANT LE POURCENTAGE D'ELUTION DE LA VITAMINE B9 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN NaCl



IV-3-3-1-3) Comparaison entre un éluant contenant NaCl 2M et un éluant contenant de l'acétate d'ammonium 2 M

Nous avons remplacé le chlorure de sodium par de l'acétate d'ammonium en concentration équivalente pour tester une éventuelle amélioration des résultats .

En fait , sur le chromatogramme , le dédoublement du pic persiste et la quantité de vitamine B9 éluée est inférieure à celle obtenue avec l'éluant contenant du chlorure de sodium .

En conclusion , l'élution sera effectuée par une solution tampon phosphate de K 0.1 M pH = 7 contenant 2M de NaCl .

IV-3-3-2) fixation sur cartouche de SEP PAK C18 :

La fixation s'effectue sur des cartouches de SEP PAK C18 commercialisées par **WATERS** . Ces cartouches contiennent une phase de même nature que la phase stationnaire utilisée lors de l'analyse en C.L.H.P. (26).

Le mode opératoire général est le suivant :

-Conditionnement des cartouches par 2 ml de méthanol puis par 5 ml d'eau distillée .

-Introduction de l'échantillon

-Lavage par du tampon phosphate 0.1 M pH = 7

-Elution de l'acide folique par du méthanol

Les résultats sont calculés par rapport à une solution témoin d'acide folique (50 µg/ml) non traitée .

IV-3-3-2-1) Influence du pH de la solution de vitamine B9 sur la fixation :

Nous avons fait passer , sur des cartouches de SEP PAK C18 , des solutions d'acide folique (50 µg/ml) contenant 0.1 % d'acide ascorbique et dont le pH varie entre 4 et 8

*Résultats obtenus :

pH	4	5	6	7	8
% fixé	94.34	81.73	87.48	96.50	79.71

TABLEAU XX

Les meilleurs résultats sont obtenus pour la solution de pH = 7 .

Cependant , l'élution par le méthanol seul provoque l'apparition d'un pic supplémentaire en C.L.H.P. dont le temps de rétention est inférieur à celui de la solution témoin .Ce phénomène peut être attribué à l'interférence du méthanol sur la formation de la paire d'ions .

Il nous faudra donc trouver un meilleur solvant éluant.

IV-3-3-2-2) Détermination du nombre de passages successifs de l'échantillon pour obtenir une fixation maximale :

Une solution de vitamine B9 est fixée trois fois successivement sur la même cartouche .Après chaque passage la fraction recueillie est filtrée et analysée en C.L.H.P.

*Résultats :

éluat	I	II	III
% retenu	96.24	98.65	99.09

TABLEAU XXI

Trois passages successifs sur la cartouche seront effectués pour obtenir une bonne fixation .

IV-3-3-2-3) Influence de la paire d'ions :

Cette manipulation a pour but de mettre en évidence si la formation de la paire d'ions avant passage sur la cartouche de SEP PAK C18 améliore la fixation .

Pour cela , nous avons préparé deux solutions de vitamine B9 l'une dans un tampon phosphate , l'autre dans une solution aqueuse de phosphate de tétrabutyl ammonium.

Nous les avons traitées parallèlement sur une cartouche de SEP PAK C18 et nous avons analysé en C.L.H.P. les fractions obtenues après le passage de chaque solution sur la cartouche pour déterminer le pourcentage de fixation de l'acide folique .

Les résultats sont exprimés par rapport à des solutions témoins non traitées :

	VIT. B9 dans pic A	vit. B9 dans tampon
% fixation	100.00 %	99.06 %

TABLEAU XXII

Nous obtenons une fixation légèrement supérieure lorsque la vitamine B9 est en solution dans le phosphate de tétrabutyl ammonium

Ceci s'explique par le fait que sous forme de paire d'ions, l'acide folique est plus apolaire et a donc plus d'affinité pour la phase en C18. Cependant, cette différence n'étant pas très significative (< 1%) nous n'avons pas utilisé le contre ion à ce stade, pour la suite de notre travail.

IV-3-3-2-4) Détermination du système éluant :

L'éluion par le méthanol seul comporte un inconvénient. En effet, comme nous l'avons déjà dit, on observe un pic supplémentaire sur les chromatogrammes. Par conséquent, nous avons cherché un mélange éluant plus approprié. Nous avons testé deux types de mélange :

-PIC A /méthanol (70-30)

-Tampon phosphate 0.1 M pH = 7 / méthanol (70-30)

*Résultats :

éluant	méthanol / pic A	méthanol / tampon
% élué	64.7	92.39

TABLEAU XXIV

Le mélange tampon phosphate - méthanol donne un meilleur rendement d'éluion.

D'autre part, dans les deux essais, le pic supplémentaire a disparu, confirmant l'hypothèse que le méthanol en trop grande proportion, gêne la formation de la paire d'ions, car il perturbe l'ionisation.

IV-3-3-2-5) Détermination des proportions du mélange éluant choisi :

L'élution est effectuée par le mélange tampon phosphate 0.1 M pH = 7 / méthanol dans cinq proportions différentes : 70/30 , 60/40 , 50/50 , 40/60 , 30/70 .

La concentration en acide folique de la solution témoin utilisée est de 50 µg/ ml .

*Résultats :

éluant	70/30	60/40	50/50	40/60	30/70
% élué	92.7	93.2	70.5	22.3	16.1

TABLEAU XXV

Le meilleur résultat est obtenu pour le mélange 60/40 C'est cet éluant que nous utiliserons pour la suite de notre travail .

D'autre part , les chromatogrammes présentent à partir de l'élution par le mélange 50/50 , un dédoublement du pic correspondant à l'acide folique .

IV-3-3-2-6) Etude de l'influence du volume de la prise d'essai sur la fixation :

Nous avons fait varier le volume de la prise d'essai contenant 250 µg de vitamine B9 , de 5 ml à 50 ml .

*Résultats :

volume de la prise d'essai	% élué
5. ml	92.84
10. ml	90.56
20 ml	90.43
30 ml	89.29
40 ml	88.87
50 ml	80.76

TABLEAU XXVI

Nous considérons que la prise d'essai peut atteindre un volume de 40 ml , ce qui correspond à 4 % de perte par rapport à une prise d'essai de 5 ml . Nous pourrions donc à la fois purifier et concentrer notre échantillon .

IV-3-3-2-7) Influence du lavage de la cartouche de SEP PAK C18 sur la fixation :

Nous avons procédé à quatre essais : après fixation de 250 µg de vitamine B9 sur quatre cartouches différentes de SEP PAK C18 , un lavage par du tampon phosphate 0.1 M pH = 7 est effectué sur chacune des cartouches respectivement avec 2 ml , 5 ml , 10 ml et 15 ml .

Après élution par le mélange déterminé précédemment, les fractions recueillies sont filtrées et analysées en C.L.H.P.

Les résultats sont calculés par rapport à une solution témoin d'acide folique fixée sur SEP PAK C18 et éluee sans lavage préalable .

* Résultats

volume de	2 ml	5 ml	10 ml	15 ml
tampon P				
% défixé	0.08	0.46	1.23	4.87

TABLEAU XXVII

Nous considérons que le volume de lavage peut atteindre 10 ml sans provoquer une perte trop importante .

IV-3-3-2-8) Détermination de la quantité maximale de vitamine B9 fixée sur SEP PAK C18 :

Nous avons fixé des solutions contenant de 50 µg à 1000 µg d'acide folique et nous les avons éluées selon les conditions déterminées préalablement .

*Résultats :

quantité de B9 contenue dans la P.E. en μg	% d'élution
1000	90.68
500	92.23
250	93.40
200	93.86
150	94.58
100	95.85
50	97.42

TABLEAU XXVIII

Compte tenu de nos résultats , nous pouvons considéré que la quantité maximale pouvant être fixée sur SEP PAK C18 et de 500 μg ..

IV-3-3-2-9) Détermination du volume minimal d'élution:

Après fixation de 500 μg d'acide folique sur SEP PAK C18 , l'élution est réalisée avec un volume de mélange tampon phosphate /méthanol (60 / 40) allant de 0.5 ml à 5 ml .

* Résultats :

volume	0.5	1	2	3	4	5
d'élution	ml	ml	ml	ml	ml	ml
% élué	10.57	14.25	92.16	92.47	92.38	92.51

TABLEAU XXIX

Les résultats précédents montrent que le volume minimal qui permet d'obtenir une élution convenable est de 2 ml .

IV-3-3-2-10) Récapitulatif des conditions de purification de l'acide folique sur cartouche de SEP PAK C18 :

- pH de la solution de vitamine B9 : pH = 7
- Volume maximal de la prise d'essai : 40 ml
- Quantité maximale de vitamine B9 fixée : 500 µg
- Eluant : tampon phosphate de K 0.1 M pH = 7 /méthanol 60/40 .
- Volume minimal d'élution : 2 ml

Le volume maximal de la prise d'essai étant de 40 ml, et le volume minimal d'élution étant de 2 ml , cette technique de purification sur SEP PAK C 18 peut servir de moyen de concentration des échantillons .

Ceci représente un avantage dans le domaine alimentaire où la teneur en acide folique est très faible.

IV-3-3-3- Comparaison DEAE cellulose / SEP PAK C18 :

	DEAE cellulose	SEP PAK C18
% de fixation	100	99
% d'élution	99.6	93.4

TABLEAU XXX

La comparaison entre les deux méthodes de purification étudiées , montre que la technique sur colonne de DEAE cellulose est la plus performante .En effet , la fixation de la vitamine B9 y est totale et l'élution est presque complète

Mais cette technique présente un inconvénient majeur : la présence indispensable du chlorure de sodium dans l'éluant influe sur la formation de la paire d'ions obtenue lors de l'analyse en C.L.H.P.

C'est pour cette raison que nous retiendrons , pour la suite de notre travail , la purification sur cartouche de SEP PAK C18 .

IV-3-4) Concentration:

Après la purification des extraits , une étape de concentration est nécessaire car d'une part , la teneur des aliments en acide folique est très faible et d'autre part , pour être la plus complète possible , l'extraction nécessite l'utilisation d'un volume de tampon extractif qui entraîne une dilution , rendant la détection en C.L.H.P. difficile .

Nous avons , dans un premier temps , envisagé la concentration des extraits par lyophilisation mais les manipulations effectuées ont conduit à des échecs .

Nous avons vu précédemment que la purification sur cartouche de SEP PAK C18 pouvait simultanément conduire à la concentration des extraits .C'est cette méthode que nous retiendrons.

IV-4) APPLICATIONS A DES ECHANTILLONS ALIMENTAIRES :

Avant l'analyse des échantillons alimentaires , nous avons étudié le comportement des autres vitamines hydrosolubles en C.L.H.P. pour déterminer les éventuelles interférences de ces dernières avec l'acide folique et ses dérivés .

Ces vitamines sont , en effet , présentes dans la plupart des aliments .

IV-4-1) Etude du comportement des autres vitamines hydrosolubles:

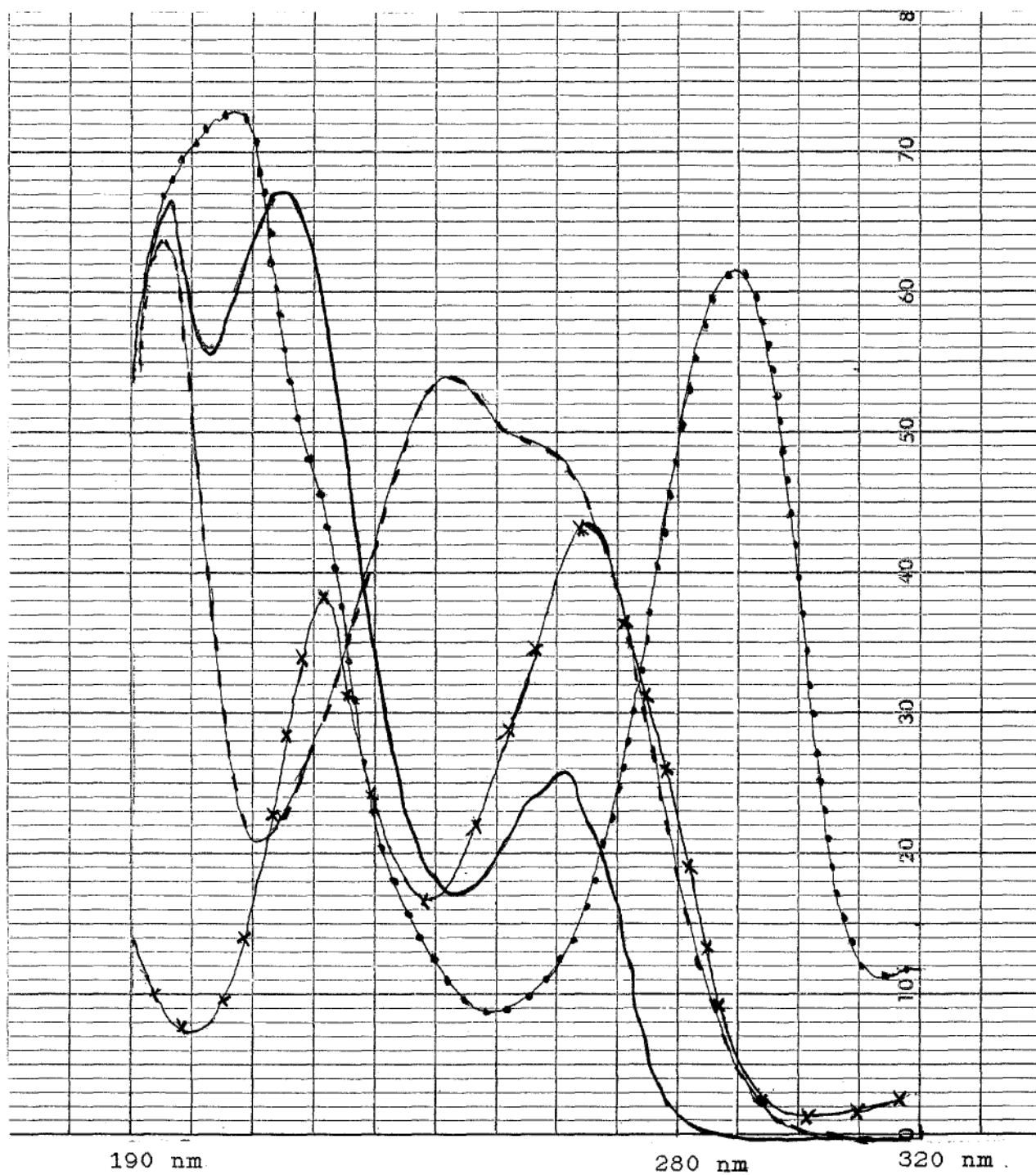
IV-4-1-1 Spectre U.V. des vitamines hydrosolubles :

Nous avons , dans un premier temps , tracé le spectre d'absorption dans l'U.V. de chacune des vitamines suivantes:

B1 , B2 , B6 , PP dans le but de déterminer si elles présentent une absorption dans l'U.V. à 280 nm auquel cas, elles seraient détectées lors de l'analyse en C.L.H.P. et pourraient interférer au cours du dosage des folates .

Les spectres d'absorption obtenus sont représentés en page 67. Nous pouvons remarquer que les vitamines B1, B2 , B6 et PP absorbent dans l'U.V. à 280 nm et par conséquent seront détectées en même temps que l'acide folique .La technique de C.L.H.P. doit donc impérativement les séparer des folates .

SPECTRE U.V DES VITAMINES B1 , B2 , B6 , PP.



x x x VIT. B2

••••• VIT. B1

••••• VIT. B6

———— VIT. PP

IV-4-1-2) Etude du comportement des vitamines B1 , B2, B6 , PP en C.L.H.P. :

Notre étude s'est poursuivie par l'analyse en C.L.H.P. des différentes vitamines en solution dans un tampon phosphate 0.1 M pH = 7 de façon à déterminer leur temps de rétention dans les conditions chromatographiques fixées précédemment .

Les résultats sont représentés dans le tableau XXXI :

VITAMINE	TEMPS DE RETENTION en mn
B1	1.05
B2	5.35
B6	1.37
PP	1.41
B9	9.13

TABEAU XXXI

Les vitamines B1 , B6 , et PP ne sont pas retenues sur la colonne .Seule la vitamine B2 présente un temps de rétention de 5.35 mn .Elle pourrait donc interférer avec certains dérivés de l'acide folique tels que : l'acide N5 - CHO THF dont le temps de rétention, dans les mêmes conditions chromatographiques , est de 6.07 mn ; et l'acide THF dont le temps de rétention est de 4.74 mn.

Par contre , aucune interférence ne devrait se produire entre les vitamines B2 et B9 .

Cependant , en pratique , cette interférence existe car la vitamine B2 se trouve fréquemment dans les produits alimentaires à une teneur largement supérieure à celle de l'acide folique .Par conséquent , le pic lui correspondant étant très large , chevauche ou dans certains cas , masque celui de la vitamine B9 .

De plus , la vitamine B2 possède le même comportement que l'acide folique sur la cartouche de SEP PAK C18 utilisée pour la purification des extraits : sa fixation y est presque totale , le lavage de la cartouche avec le volume fixé de tampon n'en élimine que très peu et son élution est obtenue avec le mélange tampon phosphate / méthanol (60 / 40) .

Par conséquent , l'élimination de la vitamine B2 ne

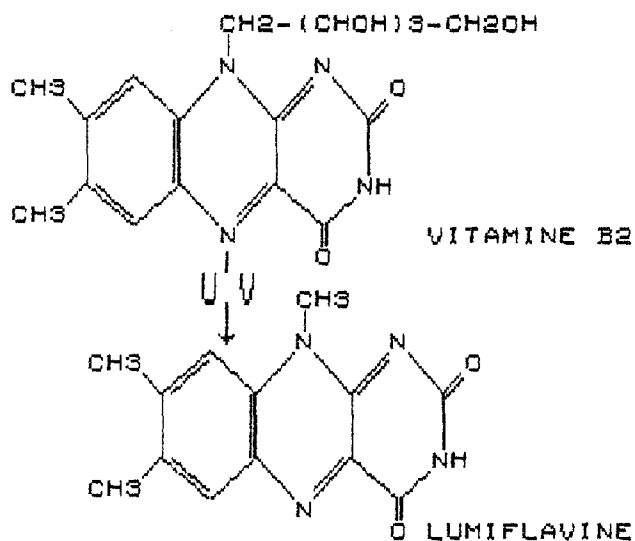
pourra pas se faire au cours de l'étape de purification .

Nous avons alors recherché une méthode permettant d'éliminer ou , au moins , de réduire la quantité de vitamine B2 présente dans les échantillons .

IV-4-1-3) Elimination de l'interférence de la vitamine B2 :

IV-4-1-3-1) Par irradiation U.V. :

Le but de cette manipulation consiste à irradier la vitamine B2 sous U.V. pour la transformer en lumiflavine . Cette dernière étant extractible par le chloroforme , ceci permettrait l'analyse des folates alimentaires .



Pour cela , trois solutions ont été préparées :

- de vitamine B9
- de vitamine B2
- de vitamine B9 et B2

dans du tampon phosphate 0.1 M pH = 7.

Chacune de ces trois solutions est divisée en quatre fractions aliquotes :

-la première sert de témoin

-la deuxième est irradiée sous U.V. pendant une demi-heure à 365 nm

-la troisième subit une extraction par trois fois 10 ml de chloroforme .La phase aqueuse est récupérée .

-la quatrième est irradiée puis extraite dans les mêmes conditions que précédemment .

Après filtration , les différentes fractions sont analysées en C.L.H.P.

* Résultats :

L'acide folique seul en solution ne semble pas être affecté par les différents traitements : les pics obtenus en C.L.H.P. sont semblables au pic témoin .

La vitamine B2 seule présente une diminution de 14 % au cours de l'irradiation , de 24 % au cours de l'extraction et de 45 % lorsque les deux traitements sont effectués .

Enfin , dans le mélange contenant les deux vitamines B2 et B9 , une diminution de 65 % pour la vitamine B2 et de 66 % pour l'acide folique est obtenue lorsque l'irradiation est suivie de l'extraction par le chloroforme.

Nous constatons que l'acide folique n'est influencé par les traitements évoqués que s'il est en présence de vitamine B2 .

Nous avons tenté d'expliquer ce phénomène par une interférence se produisant entre la lumiflavine formée par irradiation à partir de la vitamine B2 et la vitamine B9 , la lumiflavine formée pourrait peut-être réagir chimiquement avec la vitamine B9 ou bien encore intervenir par son émission de fluorescence dont le maximum se situe à 560 nm .

Nous avons donc procédé , dans le but de vérifier les hypothèses émises :

- d'une part à l'irradiation de la vitamine B2 seule pour la transformer en lumiflavine puis à l'addition d'acide folique dans la solution irradiée .

-d'autre part à l'irradiation de l'acide folique pendant trois heures à la longueur d'onde d'émission de la lumiflavine (560 nm)

*Résultats :

Dans les deux cas , la teneur en acide folique n'est pas affectée .La lumiflavine n'est donc pas responsable de

la dégradation .

En conclusion , l'irradiation suivie de l'extraction de la lumiflavine formée permet d'éliminer une partie de la vitamine B2 présente dans l'échantillon mais ce traitement affecte aussi l'acide folique , ce qui rend la méthode inapplicable .

Nous avons alors cherché d'autres artifices .

IV-4-1-3-2) Extraction par le mélange éluant utilisé en C.L.H.P. :

Pour obtenir une extraction sélective de l'acide folique à partir d'aliments , nous avons utilisé comme milieu extractif le mélange constituant la phase stationnaire en C.L.H.P. c'est à dire , le mélange : solution aqueuse de phosphate de tétrabutyl ammonium 0.005 M pH = 6.5 / méthanol dont les proportions respectives sont de 75 % et 25 % .

Nous avons donc effectué deux extractions en parallèle, l'une avec le tampon phosphate , l'autre avec le solvant de C.L.H.P.

Les résultats ne montrent pas de différence entre les deux solvants extractifs .

N'ayant pas obtenu l'élimination de la vitamine B2 par la méthode précédente , nous avons étudié le comportement de cette dernière sur colonne de DEAE cellulose , dans l'espoir d'obtenir la séparation des deux vitamines .

IV-4-1-3-3) Etude du comportement de la vitamine B2 sur colonne de DEAE cellulose

Nous avons , dans un premier temps , effectué notre analyse avec une solution témoin de vitamine B2 (10 µg / ml) dans un tampon phosphate 0.1 M pH = 7 contenant 0.1 % d'acide ascorbique .

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans le paragraphe réservé à la purification sur colonne de DEAE cellulose c'est à dire :

-conditionnement de la colonne par 5 ml de tampon phosphate 0.005 M pH = 7

-introduction de 5 ml d'échantillon .Récupération de la fraction A pour déterminer le pourcentage de fixation sur la colonne

-lavage par 10 ml de tampon phosphate 0.005 M pH = 7 Récupération de la fraction B pour déterminer l'effet du lavage

-élution par 5 ml de tampon phosphate 0.1 M + 2 M NaCl
Récupération de la fraction C pour déterminer le
pourcentage d'élution .

Les fractions recueillies sont filtrées et analysées
en C.L.H.P. .

*Résultats :

-La vitamine B2 présente une fixation de 38.4 % sur la
colonne de DEAE cellulose ce qui est très inférieur à la
fixation de l'acide folique .

-28.3 % sont éliminés au cours du lavage

-La fraction correspondant à l'élution ne contient
plus de vitamine B2 décelable en C.L.H.P. : les 10.1 %
restant doivent se trouver dans l'éluat mais il
correspondent à une teneur en vitamine B2 située en dessous
des limites de détection .

Devant ces résultats encourageants (élimination de 90
% de la vitamine B2) , nous avons recommencé la
manipulation sur une solution contenant de la vitamine B2
(10µg / ml) et de la vitamine B9 (20µg/ ml) .

Les résultats sont les suivants

	B9	B2
% de fixation	96.1	36.2
% élué par le lavage	-	16.0
% élué	89.1	-

TABLEAU XXXII

En conclusion , la purification sur colonne de DEAE
cellulose peut représenter un moyen permettant la
séparation entre la vitamine B2 et la vitamine B9 .
Cependant , cette technique de purification a été
abandonnée dans les chapitres précédents au profit de
l'utilisation des cartouches de SEP PAK C18 puisque le
chlorure de sodium contenu dans le milieu éluant
interférait sur la formation de la paire d'ions au cours de
l'analyse en C.L.H.P. .Il serait donc intéressant de pouvoir
coupler la fixation sur colonne de DEAE cellulose , qui
permettrait d'éliminer en grande partie la vitamine B2 ,
avec la fixation sur cartouche de SEP PAK C18 qui
permettrait d'une part d'éliminer l'influence du NaCl et
d'autre part de concentrer les extraits .

Cette technique sera envisagée ultérieurement .

IV-4-2) Applications:

Nous nous limiterons à l'application sur des produits à teneur garantie en acide folique .

IV-4-2-1) Dosage de la vitamine B9 dans les germes de blé:

Les germes de blé utilisés sont un produit GERBLE dont la teneur en acide folique annoncée est de 200.µg / 100g .

* Mode opératoire :

L'extraction est effectuée sur des prises d'essai de 3 g , par 20 ml de tampon phosphate 0.1 M pH = 8 contenant 0.1 % d'acide ascorbique .

Après passage aux ultra-sons pendant dix minutes et homogénéisation , les échantillons sont centrifugés . Le surnageant est récupéré , purifié sur cartouche de SEP PAK C18 , filtré puis analysé en C.L.H.P. , comparativement à une solution témoin contenant la même quantité de vitamine B9 que celle présumée des extraits .

*Résultats :

Les chromatogrammes obtenus ne possèdent aucun pic correspondant à l'acide folique ou à l'un de ses dérivés .

Pensant être en dessous des limites de détection , au cours de la manipulation précédente , nous avons tenté d'augmenter la quantité de germes de blé contenue dans chaque prise d'essai et nous avons enrichi les échantillons en acide folique .

Pour cela , nous avons préparé quatre solutions :

-S.mère : 20 mg de vitamine B9 + 1 g d'acide ascorbique + 100 ml de tampon phosphate 0.1 M pH = 8 .
([vit.B9] = 200µg / ml)

-S.fille : 5 ml de S.mère +tampon phosphate 0.1 M pH =8 Q.S.P. 100 ml .([vit. B9] = 10µg / ml)

-S1 : 10 ml de S.fille + tampon phosphate 0.1 M pH = 8 Q.S.P. 100 ml . ([vit. B9] = 1µg / ml)

-S2 : 2 ml de S.fille + tampon phosphate 0.1 M pH =8 Q.S.P. 100 ml ([vit. B9] = 2µg / ml)

S1 contient la quantité d'acide folique théoriquement présente dans les échantillons , S2 en contient le double.

Nous avons ensuite préparé les solutions suivantes :

1) Témoins :

	S1	S2	Teneur en vit. B9
A	20 ml	-	20 µg
B	-	20 ml	40 µg
C	-	30 ml	60 µg

TABLEAU XXXIII

Après fixation sur SEP PAK C18 , l'élution est effectuée par 2 ml du mélange méthanol / tampon phosphate (40 / 60) .

2) Essais :

	Germes de blé	Tampon P	S1	S2	Teneur en vit. B9
1	10g	20 ml	-	-	20 µg
2	10g	-	20 ml	-	40 µg
3	10g	-	-	20 ml	60 µg

TABLEAU XXXIV

Chaque échantillon est purifié sur cartouche de SEP PAK C18, l'élution étant effectuée , comme précédemment , par 2 ml du mélange méthanol / tampon phosphate (40 / 60) .

Après filtration , les six préparations sont analysées en C.L.H.P. dans le but de comparer les profils chromatographiques et les surfaces des pics obtenus entre les échantillons A et 1 , B et 2, C et 3 .

En fait , la manipulation n'a pu être effectuée dans sa totalité car les germes de blé ont absorbé le tampon extractif , provoquant ainsi leur gonflement . De ce fait , il ne nous a pas été possible , même après une centrifugation , de récupérer un surnageant qui aurait permis de poursuivre le dosage .

L'augmentation du volume de tampon extractif comme alternative aurait un effet de dilution et risque de poser des difficultés de détection .

Nous nous sommes donc tournés vers d'autres applications .

IV-4-2-2) Dosage de l'acide folique dans une préparation d'alimentation liquide (SHAK) :

Nous avons tenté l'extraction et le dosage de l'acide folique et de ses dérivés à partir d'une préparation diététique destinée à l'alimentation liquide chez les personnes dénutries .

La teneur en vitamine B9 annoncée est de 40 µg pour 100 g de liquide .

* Mode opératoire :

-prise d'essai : 50 ml

-extraction de l'acide folique par 50 ml de tampon phosphate 0.1 M pH = 8 contenant 0.1 % d'acide ascorbique

-filtration sur filtre plissé

-extraction des matières grasses restant dans le filtrat avec trois fois 10 ml d'hexane

-récupération de la phase aqueuse

-30 ml de cette dernière sont fixés sur cartouche de SEP PAK C18 .Lavage par 10 ml de tampon phosphate

-élution par 5 ml de mélange méthanol / tampon phosphate (40 /60)

-filtration sur filtre Millipore et analyse en C.L.H.P. par rapport à une solution témoin contenant de l'acide folique en même quantité .

*Résultat :

Nous avons été confrontés à deux problèmes :

-Une émulsion s'est formée entre la prise d'essai et le tampon extractif .

-La vitamine B2 étant présente en quantité importante dans l'échantillon (0.147 mg pour 100 g de produit) , lors de l'analyse en C.L.H.P. , le pic correspondant masque celui de la vitamine B9 .

L'émulsion formée étant due à la présence d'acides aminés en grande quantité , nous avons envisagé d'effectuer une défécation préalable de la prise d'essai .

a) Défécation par : acétate de Zn / ferrocyanure de K:

La prise d'essai est mélangée avec 2 ml d'acétate de

Zn et 2 ml de ferrocyanure de K puis avec le tampon extractif de façon à obtenir un volume total de 100 ml .Après agitation , filtration sur filtre plissé , une solution limpide est recueillie permettant de poursuivre la manipulation comme nous l'avons décrite précédemment .

Les résultats obtenus après l'analyse en C.L.H.P. montrent que la surface du pic correspondant à l'acide folique contenu dans la prise d'essai est très inférieure à celle du pic de la solution témoin .

Par ailleurs , le traitement d'une solution témoin d'acide folique par de l'acétate de Zn et du ferrocyanure de K confirme l'hypothèse que la défécation par ces deux produits provoque une baisse de la teneur de cette dernière.

Nous avons donc tenté la défécation de la prise d'essai par de l'acide trichloracétique .

b) Défécation par l'acide trichloracétique :

Avant d'appliquer ce procédé à l'extrait alimentaire , nous avons envisagé son influence sur une solution témoin d'acide folique. 15 ml d'acide trichloracétique à 20 % sont ajoutés à 50 ml d'une solution témoin (12 µg /ml) . Le pH de la solution est réajusté à 7 avec NaOH N .

L'analyse en C.L.H.P. montre un dédoublement du pic correspondant à l'acide folique .

Le problème de la défécation n'a donc toujours pas été résolu .

En ce qui concerne l'interférence de la vitamine B2 , nous avons tenté de mettre en application la séparation des deux vitamines sur colonne de DEAE cellulose comme nous l'avons expliqué au début de ce chapitre .

Nous avons envisagé la méthode suivante :

-défécation de 50 ml de prise d'essai par 15 ml d'acide trichloracétique à 20 % (malgré les résultats précédents) .

-filtration , réajustement à pH = 7 avec NaOH 1N

-extraction des matières grasses par trois fois 10 ml d'hexane

-séparation des deux vitamines sur colonne de DEAE cellulose

-concentration sur SEP PAK C18 : 30 ml de la solution recueillie à la sortie de la colonne constituent la prise d'essai , l'élution étant effectuée par 5 ml du mélange méthanol / tampon phosphate (40 / 60)

-filtration sur filtre Millipore

-analyse en C.L.H.P.

En fait , la manipulation n'a pu être réalisée dans sa totalité car les colonnes de DEAE cellulose ont été colmatées lors du passage des extraits .

En conclusion , d'une part , le problème de la défécation se pose toujours , d'autre part , il faudrait éliminer les molécules responsables du colmatage des colonnes de DEAE cellulose .Mais plus les étapes sont nombreuses , plus le temps d'exposition de la vitamine B9 est important , augmentant ainsi les risques de dégradation.

CONCLUSION

Les folates sont actuellement responsables de nombreuses carences qui sévissent même dans les pays dits industrialisés . Trois catégories de personnes sont plus particulièrement concernées : les personnes âgées , les femmes enceintes , les alcooliques . Compte tenu du rôle biologique important que jouent l'acide folique et ses dérivés , ces carences ont des conséquences qui ne doivent pas être négligées .

Les folates sont présents dans de nombreux aliments , mais en quantité très faible . Les plus riches sont représentés par les légumes tels que les épinards ou les choux , certains fruits tels que l'orange , ainsi que le foie et la levure . Cependant les apports quotidiens restent limités, même pour un régime équilibré , la faible teneur contenue dans les aliments ainsi que la fragilité des molécules en sont les principales raisons .

La méthode d'analyse de l'acide folique et des folates par C.L.H.P. que nous avons retenue , permet d'identifier et de doser sélectivement cinq dérivés de la vitamine B9 . Cette technique a été validée .

Les méthodes d'extraction et de purification ont été optimisées .

Les essais de fluorescence entrepris n'ont pas abouti aux résultats escomptés , sauf pour le couplage avec l'orthophthalaldéhyde , qui devra être développé .

Lorsque nous avons envisagé l'application de la méthode à des échantillons alimentaires , nous avons rencontré des difficultés dues à la complexité du milieu .

En effet , des problèmes de défécation des prises d'essai ainsi qu'un colmatage des colonnes de DEAE cellulose dû à la subsistance de grosses molécules dans les échantillons , nous ont empêché de poursuivre l'analyse jusqu'à son terme .

Les méthodes d'extraction et de purification ont été développées sur des solutions témoins de vitamine B9 : il ne se produisait donc pas d'interférences . Mais il n'en est pas de même pour les échantillons alimentaires qui renferment de très nombreuses molécules intervenant dans toutes les étapes .

Le passage de la mise au point d'une méthode sur une solution témoin , à l'application de cette même méthode aux échantillons alimentaires n'est donc pas une chose facile , d'autant plus que la vitamine B9 étant une molécule fragile, plus les étapes sont nombreuses avant l'analyse en C.L.H.P. , plus les risques de dégradation le sont aussi.

Ces difficultés restent à résoudre . D'autres procédés sont à envisager tout en gardant à l'esprit qu'ils ne

doivent en aucun cas trop allonger le temps d'analyse pour minimiser les phénomènes de dégradation .

SOMMAIRE

	Page
<u>INTRODUCTION</u>	4
<u>I) GENERALITES SUR L'ACIDE FOLIQUE</u>	5
I-1) STRUCTURE DE L'ACIDE FOLIQUE.....	5
I-2) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	6
I-3) L'ACIDE FOLIQUE A L'ETAT NATUREL.....	6
I-4) ABSORPTION ET METABOLISME.....	6
I-5) ROLE BIOLOGIQUE.....	8
<u>II) LES CARENCES EN ACIDE FOLIQUE</u>	9
II-1) TAUX NORMAUX.....	9
II-2) POPULATIONS EXPOSEES.....	10
II-3) ORIGINES DES CARENCES.....	10
II-4) MECANISME DES CARENCES.....	11
II-4-1) Chez les personnes agées.....	12
II-4-2) Chez l'alcoolique.....	12
II-4-3) Chez la femme enceinte.....	12
II-5) CONSEQUENSES DES CARENCES EN ACIDE FOLIQUE....	13
II-5-1) Sur la moëlle osseuse et le système hématopoiétique.....	13
II-5-2) Sur le système nerveux.....	14
II-5-3) Sur les muqueuses digestives.....	14
II-5-4) Sur le système immunitaire.....	14
II-5-5) Sur la grossesse et le foetus.....	14
II-6) PREVENTION ET TRAITEMENT DES CARENCES.....	15
<u>III) LES FOLATES ALIMENTAIRES</u>	16

III-1)	LES BESOINS EN ACIDE FOLIQUE.....	16
III-2)	TENEUR EN FOLATES DES PRINCIPAUX ALIMENTS...17	
III-2-1)	Dans le lait et les produits laitiers.....	17
III-2-2)	Dans la viande et le poisson.....	19
III-2-3)	Dans les céréales et les produits céréaliers.....	19
III-2-4)	Dans les fruits et les jus de fruits.....	20
III-2-5)	Dans les légumes.....	20
III-2-6)	Dans divers autres produits alimentaires.....	21
III-3)	COMPORTEMENT DES FOLATES AU COURS DE LA CONSERVATION ET DE LA PREPARATION CULINAIRE.....	22
IV)	<u>TRAVEAUX PERSONNELS</u>	24
IV-1)	DOSAGE PAR C.L.H.P.....	24
IV-1-1)	Utilisation d'une colonne phényl.....	26
IV-1-1-1)	Matériel utilisé.....	26
IV-1-1-2)	Conditions opératoires.....	26
IV-1-1-3)	Résultats obtenus.....	27
IV-1-1-4)	Méthylation par le diazométhane.....	29
IV-1-2)	Utilisation d'une colonne en C18 et de la technique de la paire d'ions.....	30
IV-1-2-1)	Matériel utilisé	30
IV-1-2-2)	Conditions opératoires.....	30
IV-1-2-3)	Résultats obtenus.....	31
IV-1-2-4)	Validation de la méthode C.L.H.P.....	33
IV-1-2-4-1)	recherche d'un étalon interne.....	33

IV-1-2-4-3) Reproductibilité-répétabilité.....	37
IV-1-2-4-4) Limite de détection.....	37
IV-2) ESSAIS DE FLUORESCENCE.....	39
IV-2-1) couplage avec l'orthoptalaldéhyde.....	40
IV-2-2) Couplage avec le chlorure de dansyl.....	41
IV-2-3) Couplage avec le fluorényl méthyl-9 chloroformate.....	43
IV-2-4) Couplage avec la parabenzoquinone.....	44
IV-3) EXTRACTION-PURIFICATION	47
IV-3-1) Utilisation d'une enzyme.....	47
IV-3-1-1) Utilisation de la carboxypeptidase B...47	
IV-3-1-1-1) Schéma de la réaction.....	48
IV-3-1-1-2) Mode opératoire.....	48
IV-3-1-1-3) Résultats.....	49
IV-3-1-2) Utilisation de la conjugase.....	49
IV-3-1-2-1) Extraction de la conjugase.....	49
IV-3-1-2-2) Vérification de l'activité de la préparation enzymatique.....	51
IV-3-2) Amélioration de la méthode d'extraction...52	
IV-3-2-1) Nature de la solution extractive.....	52
IV-3-2-2) Détermination du pH de la solution extractive.....	53
IV-3-3) Purification des extraits.....	54
IV-3-3-1) Fixation sur colonne de DEAE cellulose.....	54
IV-3-3-1-1)Influence du pH de la solution de vitamine B9 sur la fixation.....	55
IV-3-3-1-2)Influence de la force ionique	

IV-3-3-1-2) Influence de la force ionique de l'éluant.....	56
IV-3-3-1-3) Comparaison entre un éluant contenant NaCl 2M et un éluant contenant de l'acétate d'ammonium 2M.....	59
IV-3-3-2) Fixation sur cartouche de SEP PAK C18	59
IV-3-3-2-1) Influence du pH de la solution de vitamine B9 sur la fixation.....	59
IV-3-3-2-2) Détermination du nombre de passages successifs de l'échantillon pour obtenir une fixation maximale.....	60
IV-3-3-2-3) Influence de la paire d'ions.....	60
IV-3-3-2-4) Détermination du système éluant.....	61
IV-3-3-2-5) Détermination des proportions du mélange éluant choisi.....	61
IV-3-3-2-6) Etude de l'influence du volume de la prise d'essai sur la fixation.....	62
IV-3-3-2-7) Influence du lavage de la cartouche de SEP PAK C18 sur la fixation.....	63
IV-3-3-2-8) Détermination de la quantité maximale de vitamine B9 fixée sur SEP PAK C18.....	63
IV-3-3-2-9) Détermination du volume minimal d'élution.....	64
IV-3-3-2-10) Récapitulatif des conditions de purification de l'acide folique sur SEP PAK C18.....	65
IV-3-3-3) Comparaison DEAE cellulose / SEP PAK C18..	65
IV-3-4) Concentration.....	66
IV-4) APPLICATIONS A DES ECHANTILLONS ALIMENTAIRES..	66
IV-4-1) Etude du comportement des autres vitamines hydrosolubles.....	66
IV-4-1-1) Spectre U.V. des vitamines hydrosolubles..	66
IV-4-1-2) Etude du comportement des vitamines B1 , B2 B6 , PP en C.L.H.P.....	68

IV-4-1-3) Elimination de l'interférence de la
vitamine B2.....69

IV-4-1-3-1) Par irradiation U.V.....69

IV-4-1-3-2) Extraction de l'acide folique par le
mélange éluant utilisé en C.L.H.P.....71

IV-4-1-3-3) Etude du comportement de vitamine B2
sur colonne de DEAE cellulose.....71

IV-4-2) Applications.....73

IV-4-2-1) Dosage de la vitamine B9 dans les
germes de blé.....73

IV-4-2-2) Dosage de la vitamine B9 dans une
préparation d'alimentation liquide.....75

CONCLUSION.....78

BIBLIOGRAPHIE

- 1-AIRHART J. , SIBIGA S. , SANDERS H. , KHAIRALLAH E. A.
Anal. Biochem. , 1973 53 132-40
- 2-AUDEBERT M.
C.M. 1980 , 102-42 , 6475-83
- 3-BATES C. J.
Chem. ind. , 1987 16 558-62
- 4-BATRA K.K. , WAGNER J.R. , STOKSTAD E.L.R.
Can. J. biochem. , 1977 55 865-8
- 5-BIRD O.D. , Mc GLOHON V.M. , VAITKUS J.W.
Canad. J. Microbiol. , 1969 15 465-72
- 6-BIRMINGHAM B.K. , GREENE D.S.
J. Pharm.Sci. , 1983 11 1306-9
- 7-BOTEL M.I. , LAMBERT B.
Nutr. Report Int. , 1978 18 143-4
- 8-BRIGGS D.R. , JONES G.P. , SAE EUNG P.
J. Chromatogr. , 1982 246 165-68
- 9-CARPINO L.A. , HAN G.Y.
J. Am. Chem. Soc. , 1970 92 5748-9
- 10-CARPINO L.A. , HAN G.Y.
J. Org. Chem. , 1972 37 30404-9
- 11-CASSIDY R.M. , LEGAY D.S. , FREI R.W.
J. chromatogr. sci , 1974 , 12 , 85
- 12-CHAN C. , SHIN Y. , STOKSTAD E.L.R.
Can. J. Biochem. , 1973 51 1617-23
- 13-CHEN T.S. , LUI K.F. , SMITH C.H.
J. Am. Diet. Assoc. , 1983 82 627-32
- 14-CHRISTIDES J. P. , POTIER DE COURCY G.
Sci. aliments , 1987 7 7-22
- 15-CLIFFORD C.K. , CLIFFORD A.J.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. , 1977 60 1248-51
- 16-COMBAZ D.
Recherche et dosage de l'histamine dans les
aliments .
Thèse de doctorat en pharmacie , 1982 , Grenoble
- 17-COOPERMAN J.M. , DWECK H.S. , NEWMAN L.J. ,
GARBARINO C. , LOPEZ R.
Am. J. Clin. Nutr. , 1982 36 576-80

- 18-DAY B.P.F. , GREGORY J.F.
J. Agric. Food Chem. , 1981 29 374-7
- 19-DAY B.P.F. , GREGORY J.F.
J. Chromatogr. , 1985 318 387-92
- 20-DONG F.M.
J. Agric. Food Chem. , 1975 23 534-8
- 21-DONG F.M. , OACES S.M.
J. Am. Diet. Assoc. , 1973 62 162-66
- 22-EK J.
J. Pediatr. , 1980 97 288-92
- 23-EL SAYED L. , ZEINAB H.M. , WAMBI A.A.M.
Analyst , 1986 111 915-7
- 24-ERBE R.W.
Am. J. Med. Genet. , 1984 17 277-87
- 25-FAVIER J.C. , CHRISTIDES J.P. , POTIER DE COURCY G
Sci. aliments , 1987 7 23-40
- 26-FERRE J. , JACOBSON K.B.
J. Chromatogr. , 1985 350 389-398
- 27-GANDY G. , JACOBSON W.
Arch. Dis. Child. , 1977 52 1
- 28-GRANADE A.W.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. , 1982 65 1491-4
- 29-GREGORY J.F. , DAY B.P.F. , RISTOW K.A.
J. Food Sci. , 1982 47 1568-71
- 30-GREGORY J.F. , SARTAIN D.B. , DAY B.P.F.
J. Nutr. , 1984 114 341-353
- 31-HALSTED C.H. , CRIGGS R.C. , HARRIS J.W.
J. Lab. Clin. Med. , 1967 1 116
- 32-HERBERT V.
Nutr. Rev. , 1982 40 246-48
- 33-HIBBARD B.M. , HIBBARD E.D.
Br. Med. Bull. , 1968 24 10-13
- 34-HLA-PE U. , AUNG-THAN-BATU
Clin. Chim. Acta , 1969 24 381-7
- 35-HOPPNER K. , LAMPI B.
J. Liq. Chromatogr. , 1982 5 953-66
- 36-HOPPNER K. , LAMPI B. , PERRIN D.E.
J. Am. Diet. Assoc. , 1973 63 536-539

- 37-IWAI K. , INOUE K. , KOHASHI M.
Chem. Biol. Clin. Aspects , 1986 8 517-21
- 38-JACOBSEN E. , WIESE BJORNSEN M.
Anal. Chim. Acta , 1978 96 345-51
- 39-KAS J. , CERNA J.
Methods enzymol. , 1980 , 66 , 443-451
- 40-KEAGY P.M.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. , 1986 69 773-7
- 41-KIRSCH A.J. , CHEN T.S.
J. food sci. , 1984 , 49 , 94-98
- 42-KOHASHI M. , INOUE K. , SOTOBAYASHI H. , IWAI K.
J. Chromatogr. , 1986 382 303-7
- 43-KODREVAR W.C. , GREYER M.A. , KNAPP S. , HSU L.L.
MANDELA J.
Lancet , 1960 1 112
- 44-LAKASHMAIAH N. , RAMASASTRI B.U.
Int. J. Vit. Nutr. Res. , 1975 45 262-72
- 45-LANKELMA J. , VAN DER KLEIJN , JANSEN M.J.TH.
J. Chromatogr. , 1980 182 35-45
- 46-LEDERER J.
Louvain Médical , 1979 98 509-21
- 47-LEDERLE (Lab.)
Carences en folates
- 48-LEICHTER J. , LANDYMORE A.F. , KRUMDIECK C.L.
Am. J. Clin. Nutr. , 1979 32 92-5
- 49-LEICHTER J. , SWITZER V.P. , LANDYMORE A.F.
Nutr. report. int. , 1978 18 475-9
- 50-MARCUS D.L.
J. Am. Geriatr. Soc. , 1985 33 552-8
- 51-NAVARRO J.
Rev. prat. , 1975 23 33
- 52-NAVARRO J.
Sci. Med. , 1980 10 86-9
- 53-NAVARRO J. , BOURGEAY CAUSSE M. , DESQUILBET N. ,
HERVE F. , LALLEMAND D.
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. , 1984 3 744-8
- 54-PERLOFF B.P. , BUTRUM R.R.
J. Am. Diet. Assoc. , 1977 70 161-72

- 55-POTIER DE COURCY G.
Sci. aliments , 1987 7 1-5
- 56-RISTOW K.A. , GREGORY J.F. , DAMRON B.L.
J. Agric. Food Chem. , 1982 30 801-6
- 57-ROGOZINSKY H.
Hum. Nutr. Appl. Nutr. , 1983 37 357-64
- 58-ROSENBERG I.H. , OLSON C.
Ala. J. Med. Sci. , 1984 21 394-6
- 59-ROZANSKY L.
Analyst , 1978 103 950-4
- 60-RUDDICK J.E. , VANDERSTOEP J. , RICHARDS J.F.
J. Food Sci. , 1978 43 1238-41
- 61-SASTRY C.S. , RAO B.G. , REDDY B.S. , MURTHY S.S.
J. Indian Chem. Soc. , 1981 58 655-8
- 62-SAXBY M.J. , SMITH D.R. , BLAKE C.J. , COUENEY L.
Food Chem. , 1983 12 115-26
- 63-SCOTT K.J. , BISHOP D.R. , ZECHALKO A. ,
EDWARD WEBB J.D. , JACKSON P.A. , SCUFFAM D.
J. Dairy Res. , 1984 51 37-50
- 64-STREIFF R.R.
Am. J. Clin. Nutr. , 1971 24 1390-2
- 65-TAMURA T. , YOSHIMURA Y. , ARAKAWA T.
Am. J. Clin. Nutr. , 1980 33 193-7
- 66-TCHERNIA G. , BLOT I. , REY A. , KALTWASSER J.P. ,
ZITTOUN J. , PAPERNIK E.
Dev. Pharmacol. Ther. , 1982 4 58-65
- 67-TORALOVA M.
Lancet , 1982 2 217
- 68-WELCH A.D.
Perspect. Biol. Med. , 1983 27 64-75
- 69-ZITTOUN J.
Chemiotherapia , 1985 4 388-92




A U T O R I S A T I O N D ' I M P R E S S I O N

de la Thèse dont l'intitulé est :

candidat : M^{me} NOVOVITCH Magali

VU

GRENOBLE, le 04 janvier 1988

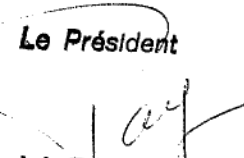

Le Président du Jury
Professeur I. ALARY

VU

GRENOBLE, le 22 janvier 1988

Le Président de l'Université
Scientifique, Technologique
et Médicale de GRENOBLE



Le Président

J.J. PAYAN

