



HAL
open science

L'acide folique : mise au point d'une méthode de dosage par CLHP dans les mélanges polyvitaminiques

Patrick Faure

► To cite this version:

Patrick Faure. L'acide folique : mise au point d'une méthode de dosage par CLHP dans les mélanges polyvitaminiques. Sciences pharmaceutiques. 1993. dumas-03205771

HAL Id: dumas-03205771

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03205771>

Submitted on 23 Apr 2021

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.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

1er exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
GRENOBLE I - SCIENCES . TECHNOLOGIE . MEDECINE.

U.F.R DE PHARMACIE
Domaine de la Merci - La Tronche.

ANNEE 1993

n° D'ORDRE

7031

L'ACIDE FOLIQUE :
MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE
PAR C.L.H.P. DANS LES MELANGES POLYVITAMINIQUES.

THESE

Présentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE I
pour obtenir le grade de : **DOCTEUR EN PHARMACIE**

par

Monsieur **Patrick FAURE**

[Données à caractère personnel]

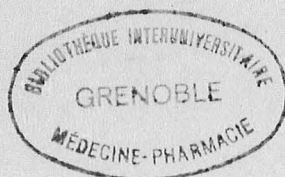
Cette thèse sera soutenue publiquement le **28.06.1993**
devant : Madame le Professeur **J. ALARY**, Président du Jury,

et



115 011965 8

Monsieur **Y. ROCHE**, Docteur en Pharmacie,
Monsieur **M. FAWAZ**, Maître de conférences.



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
GRENOBLE I - SCIENCES . TECHNOLOGIE . MEDECINE.

U.F.R DE PHARMACIE
Domaine de la Merci - La Tronche.

ANNEE 1993

n° D'ORDRE

L'ACIDE FOLIQUE :
MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE
PAR C.L.H.P. DANS LES MELANGES POLYVITAMINIQUES.

THESE

Présentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE I
pour obtenir le grade de : **DOCTEUR EN PHARMACIE**

par

Monsieur **Patrick FAURE**

[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le **28.06.1993**
devant : Madame le Professeur **J. ALARY**, Président du Jury,

et

Monsieur **Y. ROCHE**, Docteur en Pharmacie,
Monsieur **M. FAWAZ**, Maître de conférences.



A mes parents,

A ma famille,

A tous mes amis,

A Madame le professeur J. ALARY,

qui m'a initié et fait apprécier la chimie analytique, qui m'a aidé tout au long de ce travail et qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude.

A monsieur le Docteur Y. ROCHE, Pharmacien, Directeur du Département Contrôle de Qualité des laboratoires PRODUITS ROCHE à Fontenay-sous-Bois,

pour son accueil chaleureux au sein des laboratoires PRODUITS ROCHE, ses conseils opportuns dans l'accomplissement du travail qu'il m'a confié, et qu'il me fait l'honneur de juger. Je le remercie cordialement.

A Monsieur M. FAWAZ, Maître de conférences,

pour l'enthousiasme et la conscience professionnelle avec lesquels il a accepté de participer à ce jury.

A Monsieur le Docteur H. ZUMBIHL, Pharmacien, Responsable de la section "Contrôle de Production" des laboratoires PRODUITS ROCHE, à Monsieur R. DENNER, Responsable du service "Analyse Instrumentale", à Monsieur J. J. BAECHLE, Technicien,

pour leur aimable collaboration, leur grande disponibilité et leur aide précieuse. Je les remercie sincèrement.

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

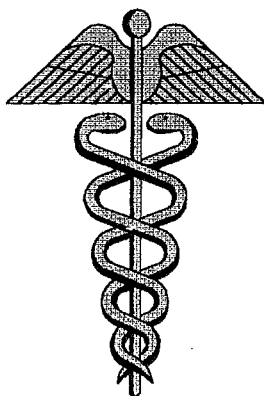
- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement,

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

- de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



SOMMAIRE

SOMMAIRE

	Pages
<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	16
<u>INTRODUCTION</u>	18
<u>A- L'ACIDE FOLIQUE : GENERALITES.</u>	21
I- STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ACIDE FOLIQUE	22
I-1- STRUCTURE	22
I-2- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	24
I-2-1- ASPECT	24
I-2-2- SOLUBILITE	24
I-2-3- POUVOIR ROTATOIRE	24
I-2-4- ABSORPTION DANS L'ULTRA VIOLET	24
I-2-5- STABILITE	24
I-2-6- pH EN SOLUTION	25
I-2-7- CONSTANTE DE DISSOCIATION ACIDE BASE : pKa	25

	Pages
II- ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'ACIDE FOLIQUE	26
II-1 INTERVENTION DE L'ACIDE FOLIQUE EN TANT QUE COENZYME DU METABOLISME DES RADICAUX MONOCARBONES	27
II-1-1- FONCTIONNEMENT DU COENZYME FOLIQUE EN TANT QUE TRANSPORTEUR DE GROUPEMENTS MONOCARBONES	27
II-1-1-1- Première étape	28
II-1-1-2- Deuxième étape	28
II-1-1-3- Troisième étape	28
II-1-2- FONCTIONNEMENT DU COENZYME FOLIQUE EN TANT QUE SUBSTRAT POUR L'OXYDO REDUCTION DE RADI- CAUX MONOCARBONES	29
II-1-3- FONCTIONNEMENT DU COENZYME FOLIQUE DANS LA REDUCTION DES UNITES MONOCARBONEES	29
II-2- ROLE PHYSIOLOGIQUE PROPREMENT DIT	30
II-2-1- ROLE DE L'ACIDE FOLIQUE DANS LE METABOLISME DES ACIDES AMINES	30
II-2-1-1- Transformation de la sérine en glycolle	30
II-2-1-2- Transformation de la S-adosyl-homocystéine en S-adosyl- méthionine	31
II-2-1-3- Dégradation de l'histidine	33
II-2-1-4- Dégradation du tryptophane	33
II-2-2- ROLE DE L'ACIDE FOLIQUE DANS LE METABOLISME DES BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES	34

	Pages
II-2-2-1- Biosynthèse des ribonucléotides puriques	34
II-2-2-2- Action de l'acide folique sur les bases pyrimidiques	38
II-2-3- ROLE DE L'ACIDE FOLIQUE DANS LE METABOLISME DE LA SEROTONINE, LA NORADRENALINE, L'ADRENALINE ET LA DOPAMINE	38
II-3- CONCLUSION	40
III- EVALUATION DES BESOINS EN ACIDE FOLIQUE CHEZ L'HOMME ; DIFFERENTES ETIOLOGIES DE LA CARENCE	41
III-1- CARENCE EN ACIDE FOLIQUE ENGENDREE PAR UNE INSUFFISANCE D'APPORT DANS L'ALIMENTATION ...	43
III-1-1- INFLUENCE DES HABITUDES ALIMENTAIRES SUR LES APPORTS EN FOLATES : GENERALITES	43
III-1-2- LES PERSONNES AGEES	45
III-1-3- LES PERSONNES ALCOOLIQUES	46
III-1-4- LES FEMMES ENCEINTES	46
III-1-5- LES PERSONNES ATTEINTES DE CERTAINES PATHOLO- GIES PSYCHIATRIQUES	47
III-1-6- QUELQUES REGLES DE DIETETIQUE A PROPOSER AUX PERSONNES SOUFFRANT D'UNE CARENCE EN FOLATES	47
III-2- MEDICAMENTS SUSCEPTIBLES DE PERTURBER LE STATUT FOLIQUE	49
III-2-1- LES ANTIEPILEPTIQUES	49

	Pages
III-2-2- LA PYRIMETHAMINE	50
III-2-3- COTRIMOXAZOLE ET TRIMETOPRIME	51
III-2-4- LA SULFASALAZINE	52
III-2-5- LE METHOTREXATE	52
III-2-6- LES CONTRACEPTIFS ORAUX	53
III-3- SITUATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES ENTRAINANT UNE AUGMENTATION DES BESOINS EN VITAMINE B9	54
III-3-1- LA GROSSESSE	54
III-3-2- PATHOLOGIES INTESTINALES	55
III-3-3- CANCER ET SYNDROME HEMATOLOGIQUE	56
III-3-4- MALADIES HEREDITAIRES DU METABOLISME B9 DEPENDANT	56
III-3-5- L'INFECTION PAR LE VIH	56
IV- TRADUCTIONS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES D'UNE CARENCE EN FOLATES	58
IV-1- CARENCE EN FOLATES ET ANEMIES MACROCYTAI- RE MEGALOBLASTIQUE	59
IV-1-1- PHYSIOPATHOLOGIE	59
IV-1-2- MANIFESTATIONS CLINIQUES	60
IV-1-3- MANIFESTATIONS BIOLOGIQUES	61

	Pages
IV-1-4- TRAITEMENT	62
IV-2- CARENCE EN ACIDE FOLIQUE ET AFFECTIONS DU SYSTEME NERVEUX	63
IV-2-1- OBSERVATION CLINIQUES : CARENCES EN FOLATES ET DESORDRES PSYCHOLOGIQUES	63
IV-2-2- EFFETS DE L'ADMINISTRATION D'ACIDE FOLIQUE COM- ME SEUL TRAITEMENT, CHEZ DES PERSONNES CAREN- CEES EN FOLATES ET PRESENTANT DES TROUBLES DU SYSTEME NERVEUX	65
IV-2-3- L'ACIDE FOLIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX : RELA- TIONS METABOLIQUES	68
IV-2-4- CONCLUSION	69
IV-3- AUTRES ANOMALIES POUVANT ETRE INDUITES PAR UNE CARENCE EN ACIDE FOLIQUE	71
IV-3-1- GLOSSITE ET ALTERATIONS DE LA MUQUEUSE INTESTINALE	71
IV-3-2- ALTERATION DE LA MUQUEUSE VAGINALE	72
IV-3-3- IMPLICATION D'UNE CARENCE EN FOLATES DANS LE VITILIGO	73
IV-3-4- CARENCE EN FOLATES ET ALTERATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE	73
IV-3-5- PANCYTOPENIE CARENTIELLE MIMANT UNE LEUCEMIE	74
IV-3-6- CARENCE EN ACIDE FOLIQUE ET ANOMALIE DE FOR- MATION DU TUBE NEURAL PENDANT LA GROSSESSE ...	75
IV-3-7- CARENCE EN ACIDE FOLIQUE ET DYSPLASIES CERVICALES	77

	Pages
V- DOSAGE DE L'ACIDE FOLIQUE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES, L'ALIMENTATION ET LES SPECIALI- TES PHARMACEUTIQUES	80
V-1- LE DOSAGE MICROBIOLOGIQUE	81
V-2- LE DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (C.L.H.P.)	83
 <u>B- MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DE L'ACIDE FOLIQUE PAR C.L.H.P. VALIDATION DE LA METHODE</u>	
I- MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'EXTRAC- TION DE L'ACIDE FOLIQUE PRESENT DANS LES MELANGES POLYVITAMINIQUES	91
I-1- CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	91
I-2- REACTIFS	92
I-3- PREPARATION DE LA SOLUTION TAMPON pH 7,4	93
I-4- PREPARATION DE LA SOLUTION D'ACIDE FOLIQUE DE REFERENCE	93
I-5- PREPARATION DES ECHANTILLONS A ANALYSER	94

	Pages
I-5-1- CHOIX DE LA SOLUTION PERMETTANT LA DISSOLUTION DE L'ACIDE FOLIQUE PRESENT DANS UN MELANGE POLYVITAMINIQUE	94
I-5-2- ELEMENTS PERTURBATEURS DU DOSAGE : LES MINERAUX	96
I-5-3- PREPARATION DES ECHANTILLONS A ANALYSER PROPREMENT DITE	100
I-5-3-1- Préparation des échantillons du groupe A	100
I-5-3-2- Préparation des échantillons du groupe B	101
I-5-3-3- Préparation des échantillons du groupe C	102
II- COMPARAISON DES RESULTATS DU DOSAGE OBTENUS PAR C.L.H.P. AUX RESULTATS OBTENUS PAR LA METHODE MICROBIOLOGIQUE	103
III- VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE DE L'ACIDE FOLIQUE PAR C.L.H.P.	110
III-1- CHROMATOGRAMMES OBTENUS	110
III-2- SPECIFICITE DE LA METHODE	110
III-3- LINEARITE DE LA METHODE EFFECUEE SUR UNE SOLUTION D'ACIDE FOLIQUE PUR	112
III-4- REPETABILITE DE LA METHODE	113
III-5- REPRODUCTIBILITE	114

	Pages
III-5-1- REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE EFFECTUEE SUR UN MELANGE RECONSTITUE	114
III-5-2- REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE EFFECTUEE SUR DEUX MELANGES POLYVITAMINIQUES PROVENANT DE LA PRODUCTION	115
III-5-3- CONCLUSION	116
III-6- LINEARITE ET POURCENTAGE DE RECUPERATION EFFECTUES SUR DEUX MELANGES RECONSTITUES ..	117
III-7- LIMITE DE DETECTION	119
III-8- CONCLUSION	120
IV- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE LA COLONNE ET DU pH DE LA PHASE ELUANTE SUR LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE	120
IV-1- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE LA COLONNE SUR LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE ENTRE L'ACIDE FOLIQUE, LA RIBOFLAVINE ET SON IMPURETE, ET UNE IMPURETE DE LA VITAMINE PP ..	121
IV-2- INFLUENCE DU pH DE LA PHASE ELUANTE SUR LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE ENTRE L'ACIDE FOLIQUE, LA RIBOFLAVINE ET SON IMPURETE, ET UNE IMPURETE DE LA VITAMINE PP	123
IV-3- SPECIFICITE DE LA METHODE , LA PHASE ELUANTE ETANT AJUSTEE A pH = 3,5, LA COLONNE ETANT MAINTENUE A 25° C	125
V- CONCLUSION	126

	Pages
<u>CONCLUSION</u>	128
<u>ANNEXE I</u> : composition qualitative des différents mélanges polyvitaminiques étudiés	131
<u>ANNEXE II</u> : quelques exemples des chromatogrammes obtenus	137
<u>ANNEXE III</u> : spécificité de la méthode (colonne à température ambiante, pH de la phase éluante = 3,3)	141
<u>ANNEXE IV</u> : résolution entre Vit B9 et impureté Vit PP ; Vit B9 et Vit B12	152
<u>ANNEXE V</u> : étude de la régression linéaire sur une solution d'acide folique pur	155
<u>ANNEXE VI</u> : étude de la régression linéaire sur deux mélanges polyvitaminiques reconstitués	158
<u>ANNEXE VII</u> : influence de la température de la colonne sur la séparation chromatographique	163

	Pages
<u>ANNEXE VIII</u> : influence du pH de la phase mobile sur la séparation chromatographique	169
<u>ANNEXE IX</u> : spécificité de la méthode (colonne thermostatée à 25° C, pH de la phase éluante = 3,5	172
<u>ANNEXE X</u> : régression linéaire étudiée sur une solution d'acide folique de concentration comprise entre 200 et 800 ng/ml ; répétabilité de la méthode effectuée sur une solution d'acide folique à 400 ng/ml	182
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	186

LISTE
DES
ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN = acide désoxyribonucléique.

ARN = acide ribonucléique.

BH₄ = tétrahydrobioptérine.

CCMH = concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.

CH₃- THF = acide méthyl- tétrahydrofolique.

CHO- THF = acide formyl- tétrahydrofolique.

DHFR = dihydrofolate réductase.

DOPA = dihydroxy - phénylalanine.

d-TMP = thymidilate monophosphate.

d-UMP = désoxyribouridine.

F = acide folique.

FH₂ = acide 7-8- dihydrofolique.

FH₄ = acide 5-6-7-8- tétrahydrofolique.

5-HIAA = acide 5-hydroxy indole acétique.

5 H-T = 5- hydroxy- tryptamine = sérotonine.

IMP = inosine monophosphate.

I.V.G = interruption volontaire de grossesse.

PNN = polynucléaire neutrophile.

Q.S.P = quantité suffisante pour.

SAM = S- adénosyl méthionine.

SCDSC = subacute combined degeneration of the spinal cord = sclérose combinée de la moelle.

SIDA = syndrome d'immunodéficience acquise.

THF = acide 5-6-7-8- tétrahydrofolique.

U.V = ultra-violet.

VGM = volume globulaire moyen.

VIH = virus de l'immunodéficience humaine.

INTRODUCTION

L'acide folique est une vitamine du groupe B. L'origine de sa découverte remonte à 1931, lorsque Lucy WILLS mit en évidence l'effet curatif d'un extrait de foie ou de levure sur l'anémie macrocytaire survenant lors de la grossesse chez des femmes hindoues de Bombay.

Puis des chercheurs ont successivement découvert dans la levure et l'extrait de foie un facteur antianémique chez le singe ou le poussin qu'ils ont baptisé "vitamine M" [DAY- P (1938)], "facteur U" [STOKSTAD et MANNING (1938)], ou vitamine Bc [HOGAN et PARROTT (1939)].

C'est en 1941 que MITCHELL et al proposent le nom "d'acide folique" pour le facteur qu'ils ont isolé dans des feuilles d'épinard (de folium = feuille en latin).

Enfin la synthèse et la détermination de la structure de l'acide folique sont proposés par ANGIER, en 1945.

Dans la même année, SPIES démontre que l'acide folique est capable de guérir l'anémie mégaloblastique de la grossesse¹.

Aujourd'hui, la carence en acide folique sévit dans tous les pays du globe. C'est même le plus fréquent des déficits vitaminiques observés dans les pays développés, notamment au sein des populations défavorisées, des personnes âgées et des femmes enceintes.

Or l'acide folique jouant un rôle important dans le métabolisme de la plupart des cellules en participant à la synthèse des protéines ou des acides nucléiques, les conséquences d'une carence seront nombreuses et variées :

- ▶ atteinte des lignées sanguines,
- ▶ altération des muqueuses,
- ▶ manifestations neurologiques diverses...

¹ Cet historique est extrait du fascicule édité par les laboratoires PRODUITS ROCHE : Vita Mémo ; l'essentiel sur les vitamines.

Après avoir rappelé le rôle physiologique de l'acide folique, nous nous proposons dans un premier temps de faire le point sur les causes pouvant conduire à une carence en folates, ainsi que sur ses diverses manifestations cliniques.

Puis nous aborderons le problème du dosage de l'acide folique dans les milieux biologiques, l'alimentation ou les spécialités pharmaceutiques. Nous nous attacherons plus particulièrement à la présentation d'une méthode de dosage de l'acide folique par chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P.), ainsi qu'à la comparaison des résultats obtenus par cette technique à ceux du dosage microbiologique.

A- L'ACIDE FOLIQUE :
GENERALITES.

I- STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ACIDE FOLIQUE.

I-1- STRUCTURE.

L'acide folique, encore appelé vitamine M, vitamine Bc, foldine, flavine ou vitamine B₉, se compose de 3 fragments principaux (fig. 1), et répond à la formule C₁₉H₁₉O₆N₇ (M = 441,4), laquelle peut être développée comme suit [LOUISOT- P (1974), LUBETZKI - J et al (1978)] :

- ▶ un noyau PTERIDINE portant :
 - ♦ une fonction amine en 2,
 - ♦ un atome d'oxygène en 4,
- ▶ une molécule d'ACIDE PARA-AMINO-BENZOIQUE reliée au carbone 6 du noyau ptéridine par un chaînon monocarboné [-CH₂],
- ▶ une molécule d'ACIDE GLUTAMIQUE.

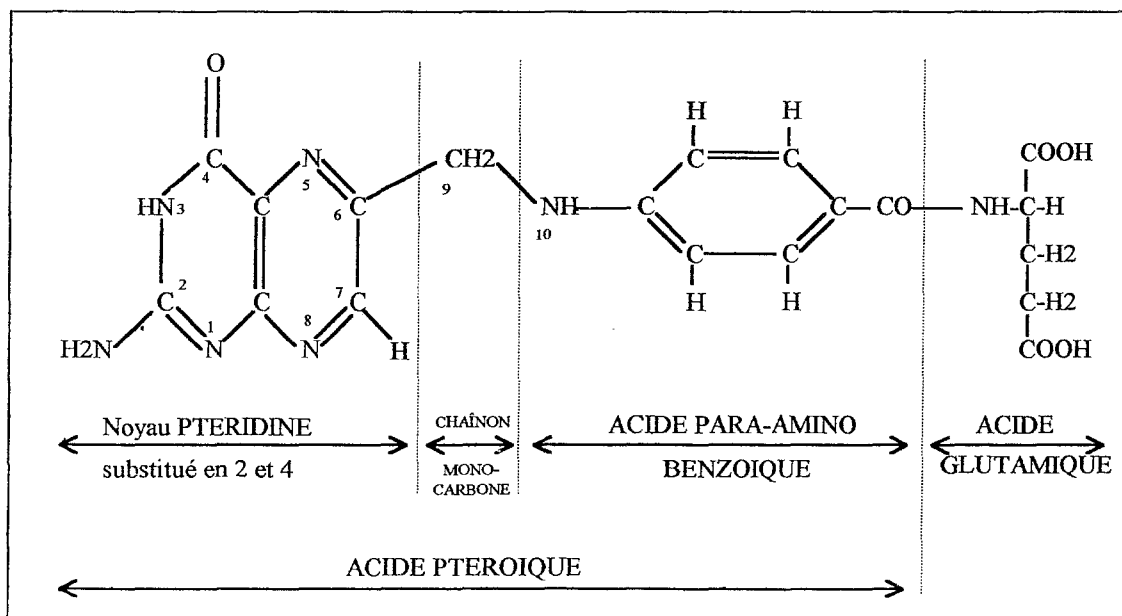


Fig. 1 : structure schématique de l'acide folique [LOUISOT- P (1974)].

L'ensemble : noyau ptéridine substitué + chaînon monocarboné + acide para-amino-benzoïque représente l'ACIDE PTEROIQUE.

L'acide folique est donc l'acide ptéroyl-glutamique. Les nombreux composés qui en dérivent par l'adjonction de nouvelles molécules d'acide glutamique sont les acides ptéroyl-polyglutamiques (chaque acide glutamique se fixe par sa fonction amine sur le C_γ du résidu déjà existant). C'est l'ensemble de ces dérivés que l'on désigne couramment sous le terme de "folates".

Les polyglutamates représentent 90 % des folates présents dans l'alimentation et les milieux biologiques.

Les polyglutamates sont libérés des protéines alimentaires par les protéases digestives puis transformés en monoglutamates, seuls absorbés. Ceux-ci sont absorbés au niveau du jéjunum selon un mécanisme de transport actif. Dans l'entérocyte, ils sont réduits en dihydro- puis tétrahydrofolates, qui sont les composés actifs (fig. 2).

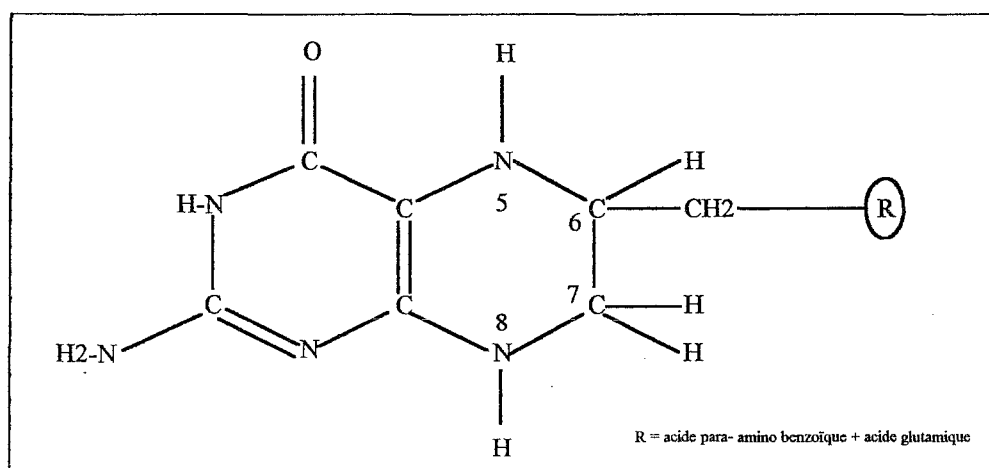


Fig. 2 : structure schématique de l'acide 5-6-7-8- tétrahydrofolique (FH₄ ou THF)

[LOUISOT- P (1974)].

I-2- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.

I-2-1- ASPECT.

L'acide folique se présente sous la forme d'une poudre cristalline, jaunâtre ou orangée.

I-2-2- SOLUBILITE.

Il est pratiquement insoluble dans l'eau (0,0016 mg / ml à 25° C et 1 % dans l'eau bouillante), l'acétone, le chloroforme, l'éther et le benzène. Il est facilement soluble dans le méthanol, les acides dilués et les solutions alcalines.

I-2-3- POUVOIR ROTATOIRE.

$$[\alpha]_d^{25} = + 23^\circ \text{ (C = 0,5 M dans NaOH 0,1 N).}$$

I-2-4- ABSORPTION DANS L'ULTRA VIOLET (U.V).

A pH 13, les maximums d'absorption de l'acide folique dans l'U.V sont respectivement : 256 ; 268 ; et 283 nm.

I-2-5- STABILITE.

L'acide folique est sensible à la lumière, à la chaleur et à l'oxydation.

I-2-6- pH EN SOLUTION.

Le pH d'une solution aqueuse d'acide folique à 10 % (m/v) est compris entre 4,0 et 4,8.

I-2-7- CONSTANTE DE DISSOCIATION ACIDE BASE : pKa.

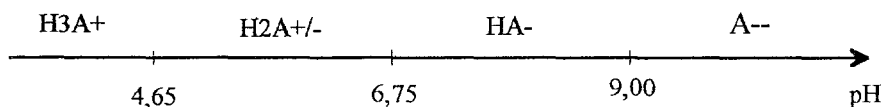
L'acide folique a trois constantes de dissociation acide base [CAUDE- M et al (1989)] :

$$pK_3 = 4,65 ; pK_2 = 6,75 ; pK_1 = 9,00.$$

Les deux premières correspondent à l'ionisation des deux fonctions carboxyliques, et la troisième à la fonction amine de la ptéridine.

Il y a neutralisation interne avec formation d'un zwitterion entre pH 4,65 et pH 6,75.

Si l'on symbolise l'acide folique par H_2A , on a les domaines de prédominance suivants des différentes formes en fonction du pH :



II- ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'ACIDE FOLIQUE.

Par ses différents dérivés agissant comme coenzymes dans le transport des radicaux monocarbonés, l'acide folique est, avec la vitamine B₁₂ et la S-Adénosyl- Méthionine, un cofacteur de plusieurs voies métaboliques importantes dans le foie et la moelle osseuse.

Les radicaux monocarbonés concernés par l'acide folique se répartissent en quatre groupes :

- ▶ le groupement FORMYLE : [-CH=O] et le groupement FORMIMINO : [-CH=NH],
- ▶ le groupement HYDROXYMETHYLE : [CH₂OH],
- ▶ le groupement METHYLE : [-CH₃],
- ▶ le groupement CARBOXYLE : [COO⁻].

Le transfert du CO₂ fait appel à un mécanisme assez particulier qui fait intervenir un coenzyme tout à fait différent : la biotine.

Nous allons donc étudier en détail l'intervention de l'acide folique en tant que coenzyme du métabolisme des radicaux monocarbonés puis nous nous intéresserons à son rôle physiologique proprement dit, à savoir les principales voies métaboliques en relation avec l'acide folique :

- ▶ action sur le métabolisme des acides aminés : transformation de la sérine en glycine, de l'homocystéine en méthionine, de l'histidine en acide glutamique.
- ▶ action sur la biosynthèse des purines : elle s'opère sur les étapes de transformation du glycinamide-ribonucléotide en acide inosinique.
- ▶ action sur les bases pyrimidiques : méthylation de l'uracile aboutissant à la thymine.

II-1- INTERVENTION DE L'ACIDE FOLIQUE EN TANT QUE COENZYME DU METABOLISME DES RADICAUX MONO- CARBONES [LOUISOT- P (1974)].

Comme nous l'avons déjà souligné, la "forme active" de l'acide folique est le dérivé tétrahydrogéné ou acide 5-6-7-8 tétrahydrofolique (FH_4 ou THF) (figure 2 page 23).

FH_4 est utilisé par un ensemble d'enzymes que l'on regroupe sous le nom général de "ptéroprotéines".

Ces ptéroprotéines, et par suite FH_4 , sont les éléments de base du métabolisme des unités monocarbonées.

Les enzymes à coenzyme folique ont une double fonction :

- ▶ elles transfèrent les groupements monocarbonés d'un substrat à un autre substrat,
- ▶ elles catalysent les interconversions mutuelles de ces groupements monocarbonés entre eux.

II-1-1- FONCTIONNEMENT DU COENZYME FOLIQUE EN TANT QUE TRANSPORTEUR DE GROUPEMENTS MONOCAR- BONES.

Il s'agit du transfert des groupements FORMYLE, FORMIMINO et HYDROXYMETHYLE.

Ces transferts se font entre un donneur et un accepteur, sans modification du groupement transféré (en particulier, il n'y a aucun changement de son niveau d'oxydation).

Ce transfert de groupement peut se décomposer en 3 étapes.

II-1-1-1- Première étape.

Le coenzyme accepte le groupement monocarboné cédé par un substrat et forme une "combinaison initiale".

La molécule d'acide folique possède deux sites accepteurs spécifiques : les atomes d'azote en position 5 et 10 (se reporter à la figure 1 page 22).

- ▶ Dans le cas du transfert de FORMYLE ou d'HYDROXYMETHYLE, il y aura possibilité de formation des dérivés suivants :
 - ♦ l'acide N₅-Formyl-Tétrahydrofolique, ou l'acide N₅-Hydroxyméthyl-THF.
 - ♦ l'acide N₁₀-Formyl-Tétrahydrofolique, ou l'acide N₁₀-Hydroxyméthyl-THF.
 - ♦ l'acide N₅-N₁₀-Méthényl-Tétrahydrofolique.
- ▶ Dans le cas du transfert du groupement FORMIMINO, on aura surtout une fixation sur l'azote en 5, donnant naissance à l'acide N₅-Formimino-Tétrahydrofolique.

II-1-1-2- Deuxième étape.

La combinaison initiale est activée par une série de réactions d'isomérisation : c'est "l'intermédiaire actif".

II-1-1-3- Troisième étape.

Le groupement monocarboné est cédé par "l'intermédiaire actif" à un accepteur approprié.

II-1-2- FONCTIONNEMENT DU COENZYME FOLIQUE EN TANT QUE SUBSTRAT POUR L'OXYDO-REDUCTION DE RADICAUX MONOCARBONES.

Dans ce cas, il y a transformation de l'acide hydroxyméthyl- tétrahydrofolique en acide formyl-tétrahydrofolique (et inversement).

Les enzymes qui catalysent cette interconversion fonctionnent avec le NADP^+ comme coenzyme.

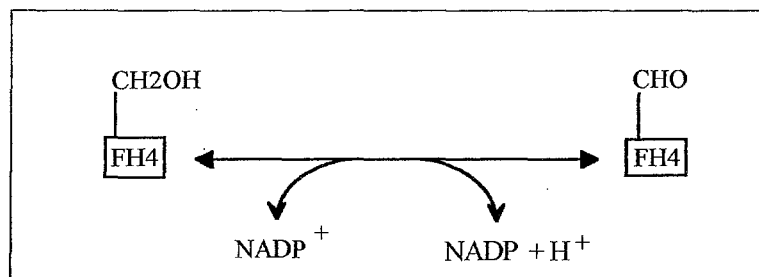


Fig. 3 : fonctionnement du coenzyme folique en tant que substrat pour l'oxydoréduction de radicaux monocarbonés [LOUISOT- P (1974)].

Un processus analogue peut conduire à l'obtention d'un méthyle, la structure porteuse du groupement méthyle (qui sera secondairement cédé à un accepteur) étant généralement l'acide N_5 - Méthyl- Tétrahydrofolique.

II-1-3- FONCTIONNEMENT DU COENZYME FOLIQUE DANS LA REDUCTION DES UNITES MONOCARBONEES.

Dans ce cas, l'acide tétrahydrofolique fonctionne comme un coenzyme de réduction : un substrat porteur d'un groupement hydroxyméthyle est transformé en son homologue porteur d'un groupement méthyle (fig. 4).

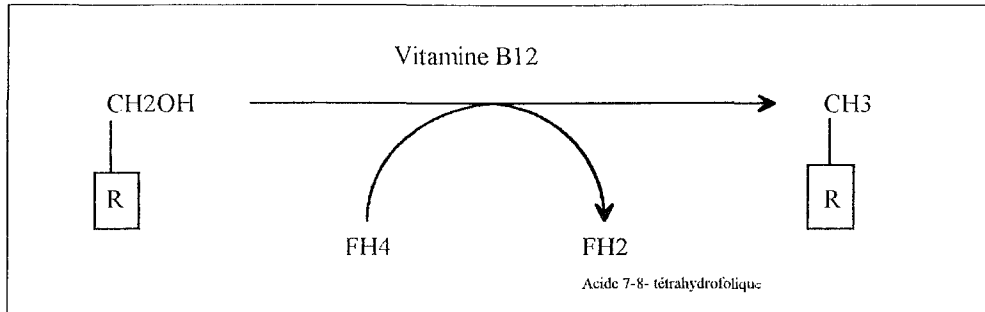


Fig. 4 : fonctionnement du coenzyme folique dans la réduction des unités monocarbonées
[LOUISOT- P (1974)].

Les possibilités de fonctionnement de l'acide folique sont donc multiples. Chacune est induite préférentiellement, suivant l'étape du métabolisme, par l'apoenzyme spécifique qui fonctionne avec l'acide folique comme coenzyme. L'étude du métabolisme intermédiaire, comme nous allons le voir ci-après, nous en fournira quelques exemples.

II-2- ROLE PHYSIOLOGIQUE PROPREMENT DIT [BOREL- J.P et al (1987)].

II-2-1- ROLE DE L'ACIDE FOLIQUE DANS LE METABOLISME DES ACIDES AMINES.

II-2-1-1- Transformation de la sérine en glycolle.

La principale voie de formation endogène des radicaux monocarbonés est réalisée par la transformation de la sérine en glycolle, la sérine étant apportée en abondance par le régime (fig. 5).

Cette réaction permet la fourniture à toutes les cellules des radicaux monocarbonés dont elles ont besoin :

- ▶ Une partie de ces radicaux monocarbonés seront réduits en méthyle (CH_3) et utilisés dans les réactions de méthylation (voir chapitre II-2-1-2 page 31).
- ▶ Le reste est utilisé pour la synthèse du noyau purique (voir chapitre II-2-2-1- page 34) ou du méthyle de la thymine (voir chapitre II-2-2-2- page 38).

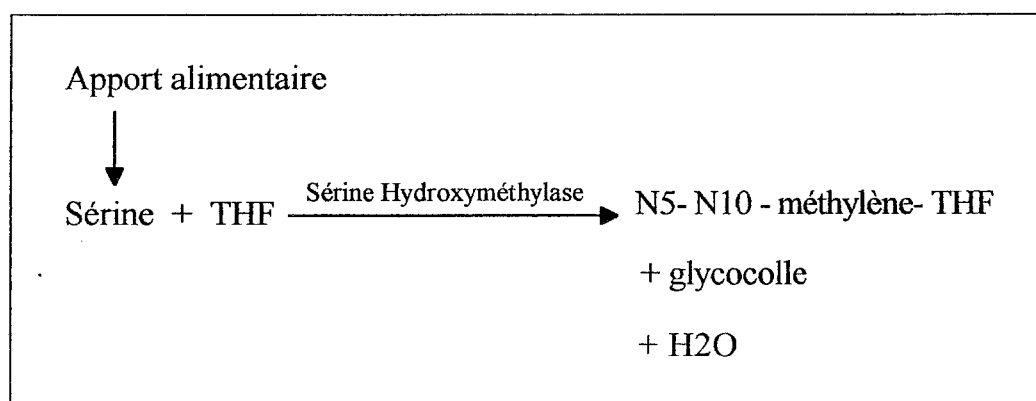


Fig. 5 : transformation de la sérine en glycolle [BOREL- J.P et al (1987)].

II-2-1-2- Transformation de la S- adénosyl-homocystéine en S- adénosyl-méthionine.

La méthionine est un donneur de méthyle. Sa forme active est la S- adénosyl-méthionine, dérivé riche en énergie cédant facilement son méthyle.

Le départ du méthyle donne naissance à la S- adénosyl-homocystéine. Celle-ci peut être retransformée en S- adénosyl-méthionine par fixation d'un radical monocarboné apporté par l'acide N₅- N₁₀- Méthylène- Tétrahydrofolique (fig. 6).

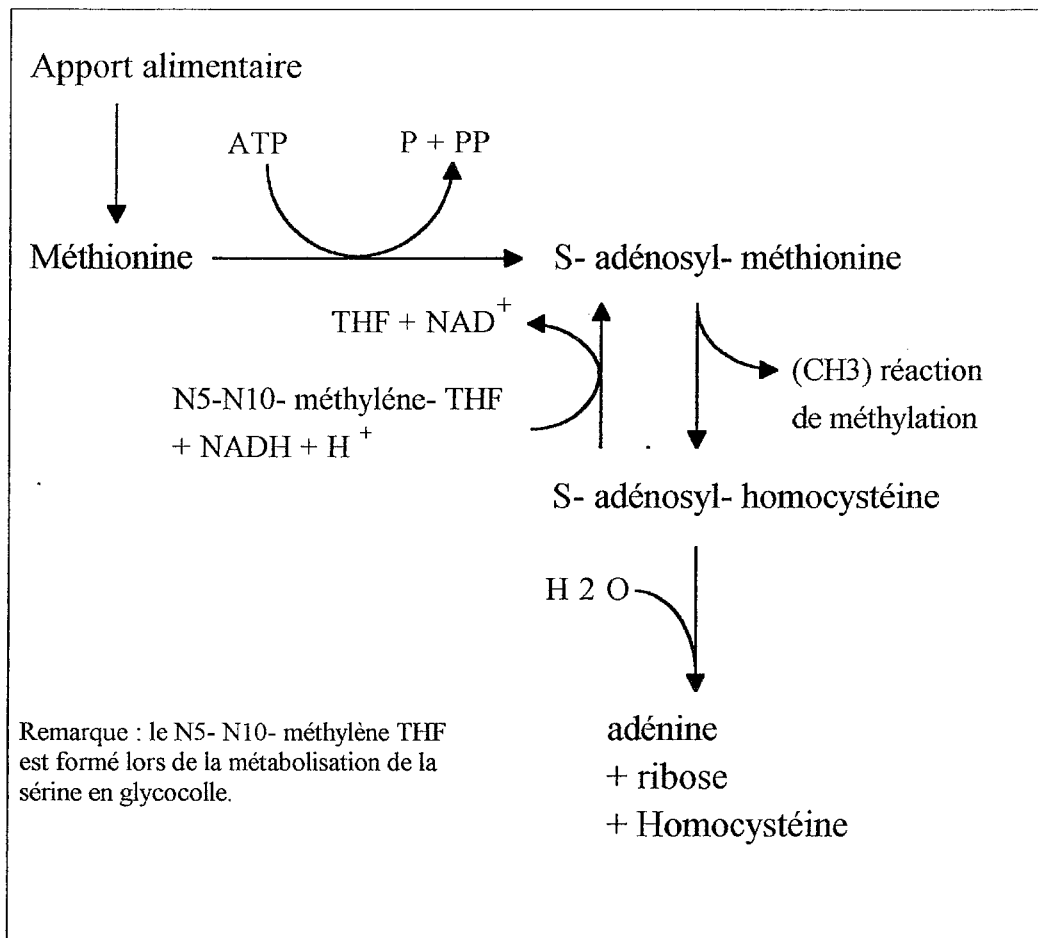


Fig. 6 : Cycle de la S- adénosyl méthionine [BOREL- J.P et al (1987)].

II-2-1-3- Dégradation de l'histidine.

L'histidine est d'abord dégradée par une suite de réactions en chaîne jusqu'à la formation d'acide formiminoglutamique.

Ce dernier fournit un radical formimino emporté par le coenzyme THF, et une molécule d'acide glutamique (Fig. 7).

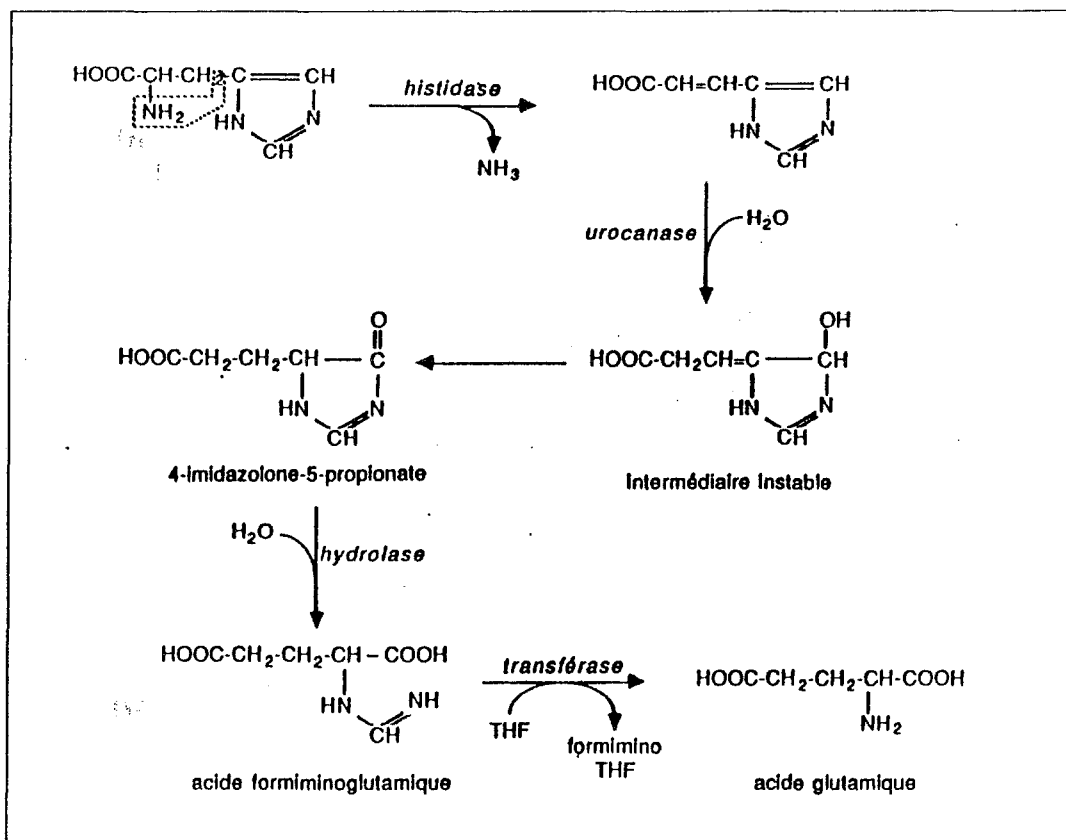


Fig. 7 : dégradation de l'histidine [BOREL- J.P et al (1987)].

II-2-1-4- Dégradation du tryptophane.

Le tryptophane est d'abord transformé en formyl-cynurémine sous l'action d'une enzyme : la tryptophane pyrrolase.

La formyl-cynurénine cède ensuite son formyl au THF sous l'influence d'une transformylase, cette réaction aboutissant à la formation de cynurénine et de formyl-THF.

La cynurénine est ensuite dégradée en deux étapes pour aboutir à la formation d'acide 3-hydroxy-anthranilique (fig. 8).

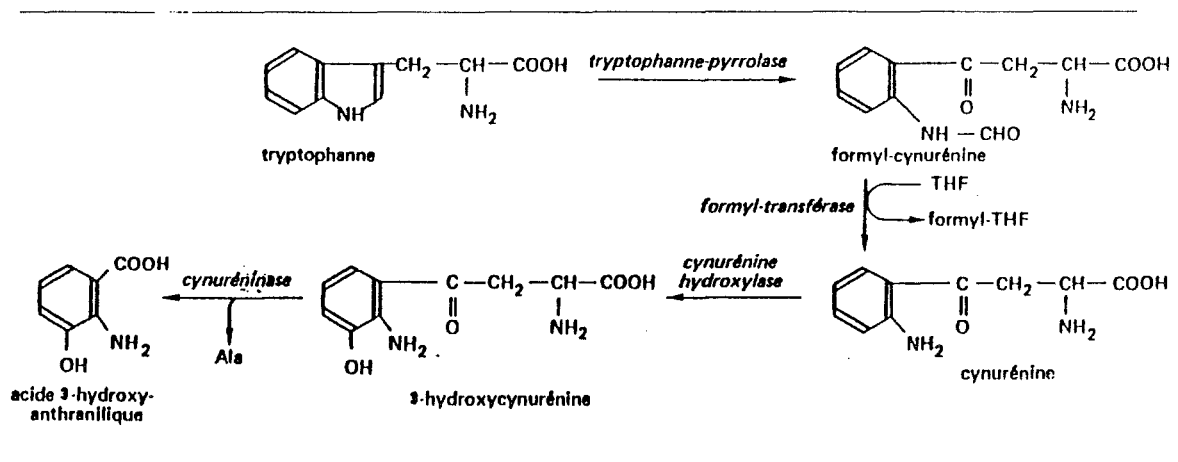


Fig. 8 : dégradation du tryptophane [BOREL- J.P et al (1987)].

II-2-2- RÔLE DE L'ACIDE FOLIQUE DANS LE MÉTABOLISME DES BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES.

II-2-2-1- Biosynthèse des ribonucléotides puriques.

La biosynthèse des ribonucléotides puriques débute par la biosynthèse de l'inosine monophosphate (IMP).

La chaîne de réactions permettant cette biosynthèse à partir du ribose 5- phosphate est décrite sur la figure 10 (10a et 10b).

Lors de cette biosynthèse, le THF intervient donc au niveau de deux étapes :

- ▶ Transformation du glycinamide ribonucléotide en formyl - glycinamide ribonucléotide.
- ▶ Transformation du 5- aminoimidazole- 4-carboxamide- ribonucléotide en 5-formamido-imidazole-4-carboxamide-ribonucléotide.

La figure 9 permet de bien visualiser l'origine des divers éléments constituant l'IMP et de rendre évidente l'importance du THF dans cette synthèse.

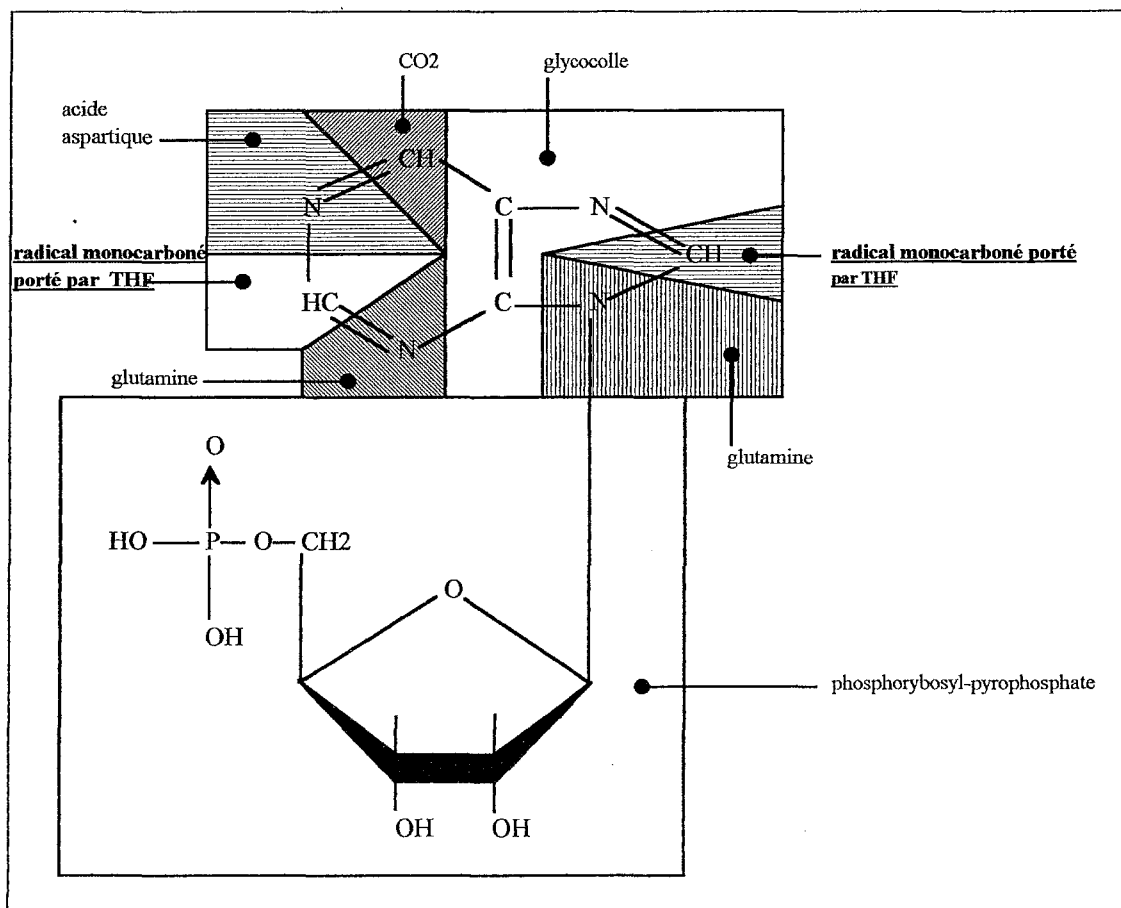


Fig. 9 : origine des divers éléments constituant l'IMP [BOREL- J.P et al (1987)].

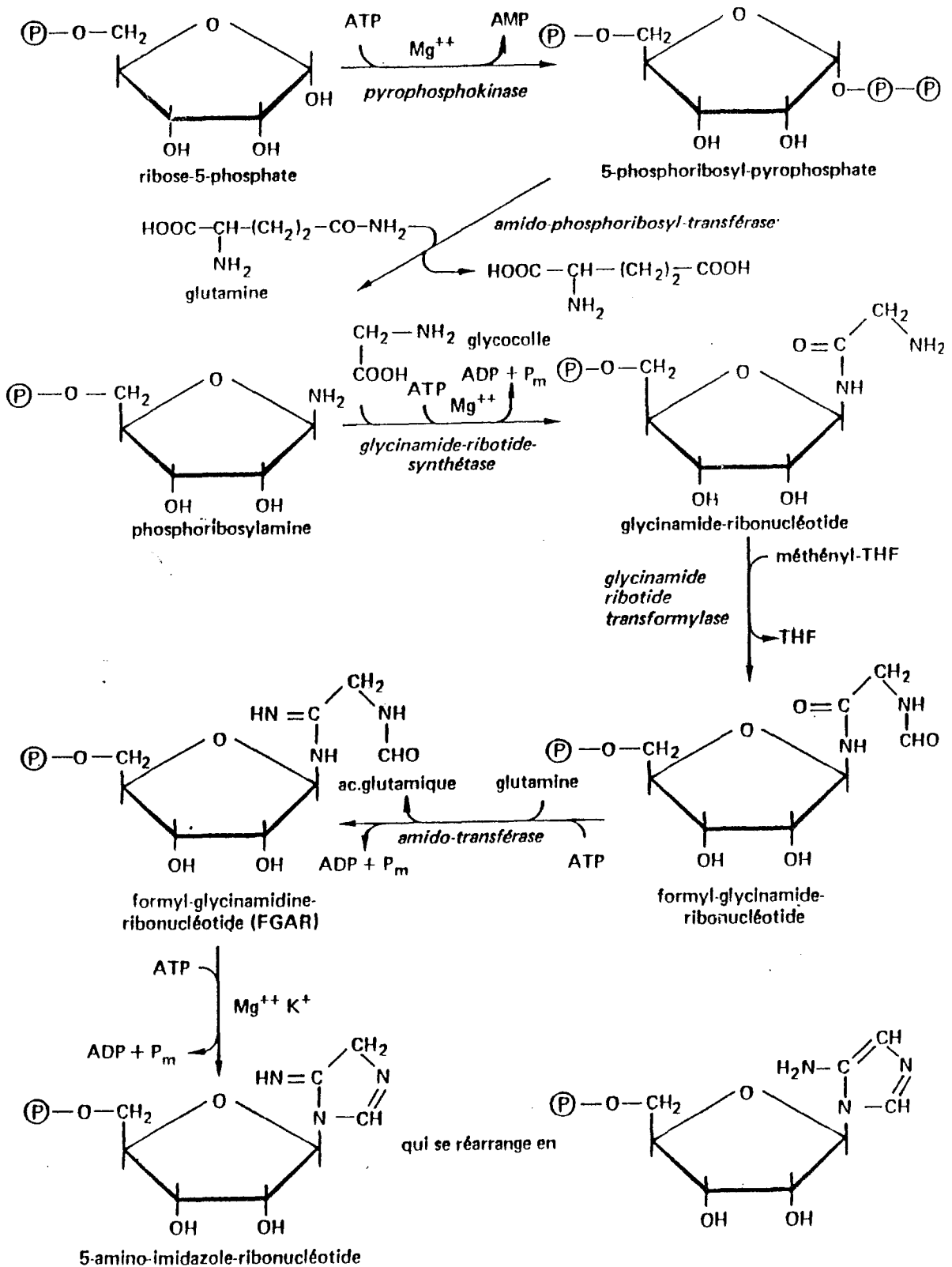


Fig. 10a : étapes de la transformation du ribose- 5- phosphate en 5- amino- imidazole- ribonucleotide

[BOREL- J.P et al (1987)].

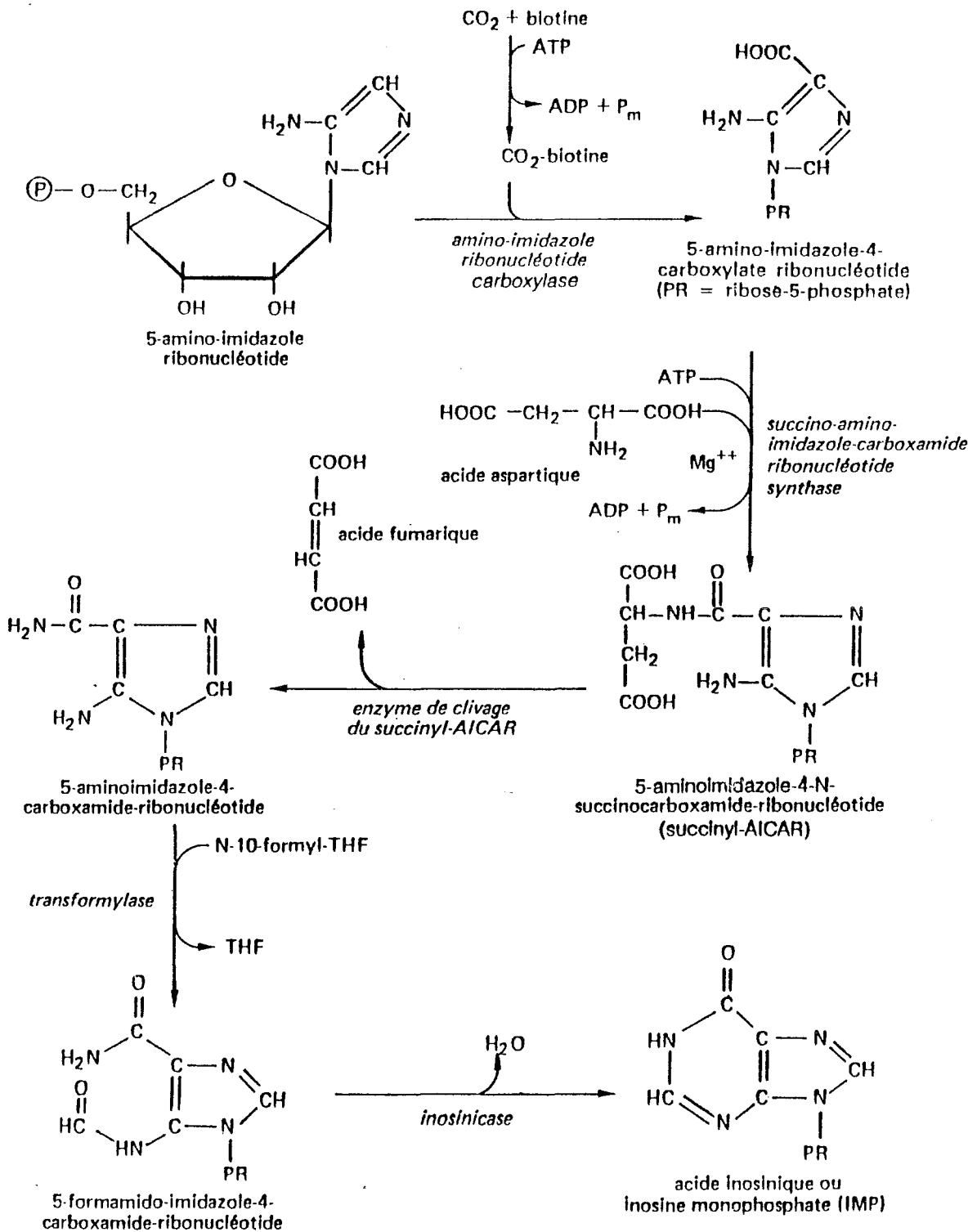


Fig. 10 b : étape de la transformation de l'amino-imidazole ribonucléotide en IMP.

[BOREL- J.P et al (1987)]

II-2-2-2- Action de l'acide folique sur les bases pyrimidiques.

Le THF intervient au niveau de la méthylation du désoxyribo-uridine monophosphate (d-UMP) qui se transforme en thymidilate sous l'action d'une thymidilate synthétase.

Le coenzyme transporteur du méthyle est le N₅-N₁₀-Méthylène- Tétrahydrofolate. Ce coenzyme fournit CH₂ au carbone 5 de l'uracile qui porte déjà un atome d'hydrogène, lequel va saturer le CH₂ en méthyle.

Le coenzyme subit un réarrangement de ses atomes d'hydrogène de façon à saturer l'azote 10, ce qui équivaut à une oxydation du THF en DHF (fig. 11).

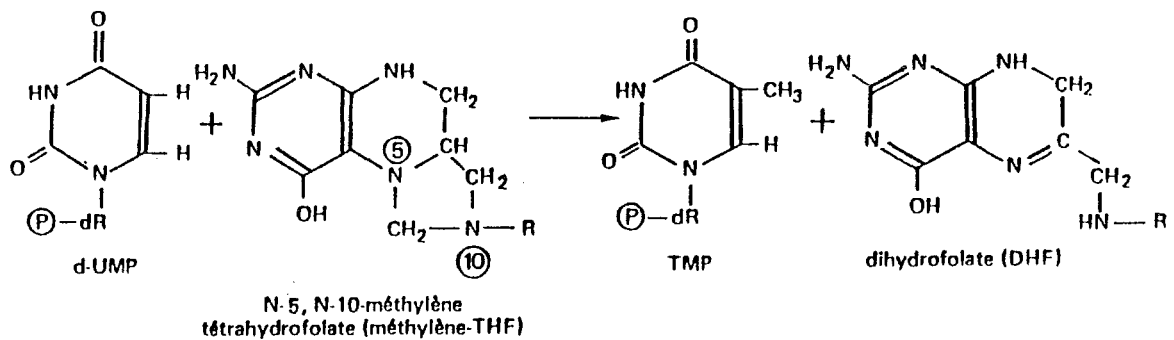


Fig. 11 : formation du désoxyribo thymidilate monophosphate (d- TMP), à partir du désoxyribo- uridine- monophosphate [BOREL- J.P et al (1987)].

II-2-3- ROLE DE L'ACIDE FOLIQUE DANS LE MÉTABOLISME DE LA SEROTONINE, LA NORADRENALINE, L'ADRENALINE ET LA DOPAMINE.

L'acide folique interviendrait indirectement dans le métabolisme de la sérotonine, la noradrénaline et la dopamine en participant à la synthèse de la tétrahydro-bioptérine (BH₄) [ANDERSON- D et al (1992), BOTEZ- M.I et al (1990)].

La BH_4 est le coenzyme de deux enzymes qui interviennent dans la formation :

- ▶ de la sérotonine (ou 5-hydroxy-tryptamine ou 5-HT) à partir du tryptophane sous l'action de la tryptophane-5-hydroxylase (fig. 12).
- ▶ de la dihydroxy-phénylalanine (DOPA) à partir de la tyrosine sous l'action de la tyrosine-3-hydroxylase. La DOPA est le précurseur de la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline (fig. 13).

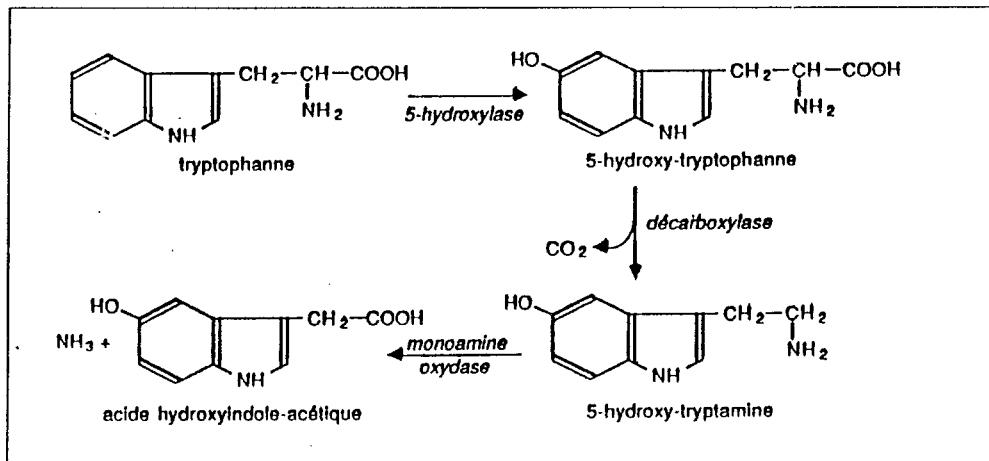


fig. 12 : métabolisme de la sérotonine [BOREL- J.P et al (1987)].

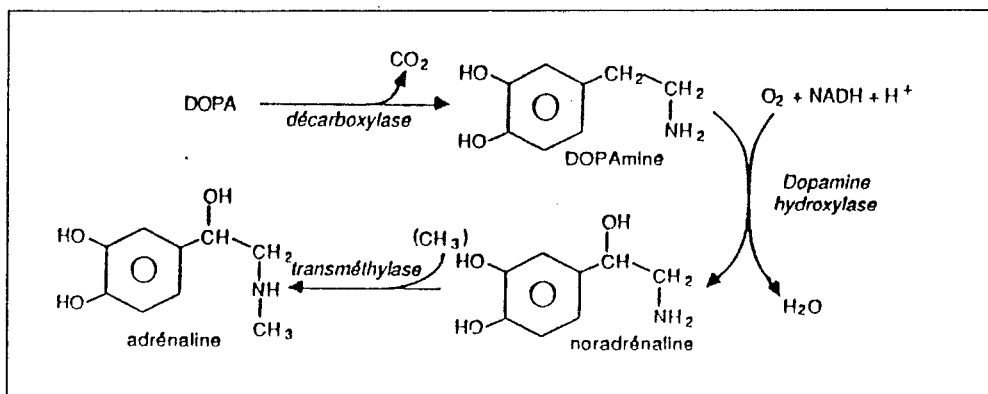


Fig. 13 : formation de la dopamine, l'adrénaline, et la noradrénaline à partir de la Dihydroxy- PhényléthylAmine (DOPA).

[BOREL- J.P et al (1987)]

II-3- CONCLUSION.

Les réactions utilisant des radicaux monocarbonés ont donc une importance évidente en raison de leur participation au métabolisme de certains acides aminés (sérine, glycolle, histidine, méthionine et tryptophane), ainsi qu'à la biosynthèse de la thymidine et du noyau purique.

La formation des acides nucléiques dépend de ces synthèses. Comme elle est plus active dans le système de maturation des globules rouges qu'ailleurs, il en résulte que la carence en acide folique provoque d'abord un ralentissement de la formation des globules rouges, qui se traduit par une anémie.

De plus, par son action sur la synthèse des neuromédiateurs des systèmes sérotoninergique et noradrénergique, une carence en acide folique pourrait avoir des répercussions sur la thymie.

Après avoir rappelé les différentes étiologies de la carence en acide folique, nous nous proposons donc d'en étudier les traductions cliniques et biologiques.

III - EVALUATION DES BESOINS EN ACIDE FOLIQUE CHEZ L'HOMME ; DIFFERENTES ETIOLOGIES DE LA CARENCE.

La vitamine B₉, ou acide folique, a été ainsi nommée à cause de sa présence en quantité abondante dans les feuilles sombres des végétaux.

Dans l'alimentation, on la trouve donc surtout dans les légumes verts, mais aussi dans la levure et le foie.

La figure 14 résume la teneur moyenne de différentes catégories d'aliments en acide folique [LE GRUSSE- J (1991)].

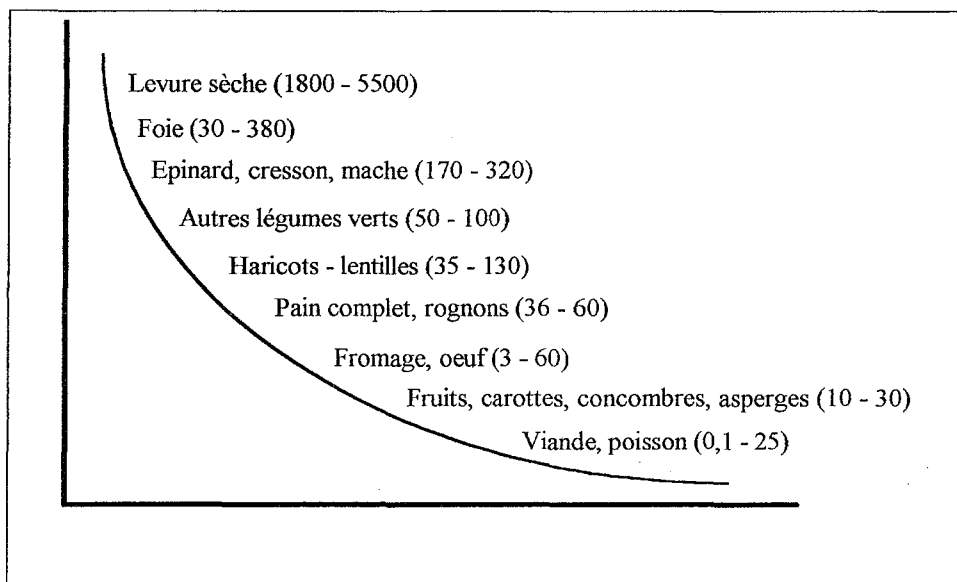


Fig. 14 : sources alimentaires d'acide folique exprimée en µg/100g.

[LE GRUSSE- J (1991)].

Les apports quotidiens conseillés varient de 30 à 800 µg/j suivant les périodes de la vie (tableau I) mais il semble y avoir un consensus pour dire

que les besoins en acide folique doivent être supérieurs ou égaux à 3 µg/kg [ZITTOUN- J et al (1990)].

Vitamine (unité)	Nourrisson < 6 mois	Enfants 6 - 12 mois	Enfants 1 - 3 ans	Enfants 4 - 9 ans	Enfants 10 - 12 ans	Adolescents 13 - 19 ans	Adolescente 13 - 19 ans	Homme	Femme	Femme enceinte	Allaitement	Personne âgée
B ₉ (µg)	30	50	100	300	300	400	400	400	400	800	500	400

Tableau I : apports quotidiens conseillé en vitamine B₉ en fonction de l'âge

[LE GRUSSE- J (1991)].

Du point de vue biologique, les folates sériques doivent être compris entre 9 et 41 nmol/l (soit 4 à 18 µg/l) et les folates intraérythrocytaires entre 340 et 1600 nmol/l (soit 150 à 700 µg/l).

On considère que les folates intraérythrocytaires sont assez représentatifs du pool tissulaire.

Cependant, la détermination du seuil à partir duquel une carence en acide folique sera diagnostiquée est encore assez floue puisqu'il varie de 3 à 5 µg/l pour les folates sériques et de 140 à 250 µg/l pour les folates intraérythrocytaires selon les auteurs [VELLAL- B et al (1988), BAILEY- L.B et al (1990), SCHLIENGER- J.L et al (1991), MIRGEL- C et al (1990)].

Ceci est une raison pour laquelle il est assez difficile de comparer les différentes études cliniques se rapportant à une carence en acide folique.

Il serait donc intéressant, comme le propose PIETRZIK- K.F (1990), de mettre au point un schéma permettant une approche universelle standardisée pour quantifier la carence vitaminique.

Il est important de rappeler que l'acide folique est présent dans l'alimentation en très grande majorité sous forme de polyglutamates.

Or, ces derniers sont très sensibles à la chaleur [THOULON- C.M (1989)] et leurs produits de dégradation ne sont pas assimilables : les légumes verts consommés crus sont donc l'une des sources les plus importantes.

Ceci explique en partie que, malgré la répartition assez large des folates dans l'alimentation, les habitudes alimentaires ou la malnutrition (chez les personnes âgées ou les alcooliques en particulier) font que la carence en cette vitamine est la plus fréquente des carences vitaminiques dans les pays développés [LE GRUSSE- J (1991)].

Il est à noter qu'à côté du facteur alimentaire, certaines pathologies ou la prise de certains médicaments favorisent encore l'apparition de cette carence.

III-1- CARENCE EN ACIDE FOLIQUE ENGENDREE PAR UNE INSUFFISANCE D'APPORT DANS L'ALIMENTATION.

III-1-1- GENERALITES CONCERNANT L'INFLUENCE DES HABITUDES ALIMENTAIRES SUR LES APPORTS EN FOLATES.

Comme nous l'avons déjà souligné, les folates étant sensibles à la chaleur, la cuisson prolongée des aliments entraîne une perte importante d'activité de cette vitamine [THOULON- J.P et al (1989), ZITTOUN- J et al (1990)].

A titre d'exemple, la stérilisation du lait par la chaleur est responsable de la dégradation de 50 % de la vitamine B₉.

De plus, l'ébullition prolongée des légumes augmente encore la perte d'activité des folates puisque, outre l'action de la chaleur, la majorité des folates passent dans l'eau de cuisson et celle-ci n'est généralement pas consommée : les pertes peuvent alors atteindre 95 % [ZITTOUN- J et al (1990), ANONYME (1991)].

Il est également intéressant de noter que la biodisponibilité des folates peut être différente selon l'état des aliments (crus ou cuits), et selon leur association avec d'autres aliments.

Ainsi, 60 % des folates contenus dans le chou cuit correspondraient à une fraction polyglutamylée n'étant pas biologiquement disponible alors que les folates contenus dans le chou cru sont entièrement biodisponibles.

Nous rappelons que les folates alimentaires sont en fait sous forme de polyglutamates qui, pour être absorbés, doivent être transformés en monoglutamates sous l'effet d'une conjugase.

Or, certains aliments tels la levure, les haricots verts et certaines légumineuses sont inhibiteurs de cette conjugase.

De même, il a été remarqué que l'acide folique contenu dans certains aliments enrichis en cette vitamine (riz, pain, maïs) était absorbé plus lentement que l'acide folique isolé [ZITTOUN- J et al (1990)].

Ces notions sont importantes à prendre en compte car ces produits peuvent correspondre à la nourriture de base de nombreux pays ou de populations ayant un faible niveau de vie.

Dans nos pays industriels, la carence en acide folique engendrée par une insuffisance d'apport dans l'alimentation va donc toucher principalement quatre catégories de personnes :

- ▶ les personnes âgées,
- ▶ les personnes alcooliques,
- ▶ les femmes enceintes,
- ▶ les personnes atteintes de certaines pathologies psychiatriques.

III-1-2- LES PERSONNES AGEES.

De nombreuses études ont été effectuées pour déterminer le statut folique des personnes âgées [BAILEY- L.B et al (1990), EGUILEOR- I et al (1990), LECERF- J.M et al (1990), LODS- J.C et al (1990), NAJEAN- Y et al (1989), THOULON-C.M (1989), VELLAL- B et al (1988), ZITTOUN- J et al (1990)].

Il en ressort qu'au moins un quart des personnes âgées de plus de 65 ans vivant à domicile serait carencé en folates, ou en état de subcarence (folates sériques inférieurs à 5 ng/ml).

Ce chiffre s'élève à 60 voire 80 % lorsqu'il s'agit de sujets âgés hospitalisés.

Cette fréquence élevée de carence en acide folique chez la personne âgée peut être due à de multiples facteurs qui sont souvent associés :

- ▶ alimentation réduite (anorexie, édentation),
- ▶ habitudes alimentaires : peu de légumes, peu de viande,
- ▶ bas niveau socio-économique,
- ▶ alcoolisme,
- ▶ usage fréquent de médicaments pouvant perturber le statut folique.

Les signes de carence en folates chez la personne âgée sont souvent peu spécifiques : la classique anémie macrocytaire est rare et tardive.

Il s'agirait plutôt de troubles du système nerveux : perte de mémoire, insomnie, démence etc...

En tout état de cause, la supplémentation de l'alimentation en acide folique chez la personne âgée nous semble recommandée, mais non sans avoir au préalable évalué le statut folique des patients.

Etant donnée la bonne corrélation entre les folates sériques et les folates érythrocytaires chez la personne âgée, l'évaluation de la carence sera simple puisqu'il suffira de doser les folates sériques.

Le seuil en dessous duquel un traitement pourra être envisagé sera situé à 5 ng/ml pour des folates sériques dosés par microbiologie [BROCKER- P (1991)].

III-1-3- LES PERSONNES ALCOOLIQUES.

Certains auteurs considèrent que la carence en acide folique toucherait 45 % des alcooliques [THOULON- C.M (1989)].

Cette carence est provoquée d'une part parce que les alcooliques ont souvent un régime déséquilibré, et d'autre part à cause d'une malabsorption de l'acide folique induite par l'alcool [ZITTOUN- J et al (1990), BAILEY- L.B (1990)].

Chez la personne alcoolique, la carence touche également d'autres vitamines du groupe B, carence qu'il conviendra de traiter par une supplémentation appropriée et adaptée à chaque cas.

III-1-4- LES FEMMES ENCEINTES.

Chez les femmes enceintes, les besoins en folates sont multipliés par 2 ou 3 (voir tableau I page 42) et une alimentation "normale" ne suffit plus à subvenir aux besoins en acide folique.

Nous reviendrons plus en détail sur ce problème dans le chapitre III-3-1, page 54.

III-1-5- LES PERSONNES ATTEINTES DE CERTAINES PATHOLOGIES PSYCHIATRIQUES.

Dans les états dépressifs et l'anorexie, il semble évident que la diminution de la prise de nourriture ne permet plus d'apporter une ration quotidienne suffisante en acide folique.

Il en est de même dans certains cas de schizophrénie ou de démence.

Mais il a été également suggéré que le stress ou le changement d'humeur qui se produisent au cours des désordres psychiatriques pourraient altérer les fonctions gastro-intestinales et diminuer ainsi l'absorption des folates.

Aucune donnée précise ne prouve ces hypothèses [SIMON- N et al (1989)].

De même, les tensions émotionnelles pourraient augmenter la demande de cofacteurs enzymatiques comme les folates, mais là encore, rien n'a été prouvé [SIMON- N et al (1989)].

Nous évoquerons le traitement de ce type de patients dans le chapitre IV-2, page 63.

III-1-6- QUELQUES REGLES DE DIETETIQUE A PROPOSER AUX PERSONNES SOUFFRANT D'UNE INSUFFISANCE D'APPORT EN FOLATES DANS L'ALIMENTATION.

Devant un cas de carence en folates, médecins et pharmaciens devront questionner leurs patients sur leurs habitudes alimentaires, et leurs proposer

de suivre quelques règles simples de diététique :

- ▶ augmenter la consommation d'aliments riches en folates :
 - ♦ légumes verts consommés crus, éventuellement accompagnés d'une levure diététique du type "Superlevure" et/ou de germes de blé,
 - ♦ légumes verts cuits : épinards, haricots, lentilles,
 - ♦ foie,
 - ♦ pain complet,
 - ♦ oeuf,
 - ♦ fromages,
 - ♦ jus d'oranges "maison",
- ▶ pour une personne âgée présentant des problèmes d'édentation, lui conseiller de se nourrir de potages à base de légumes verts, toujours enrichis d'une levure diététique,
- ▶ préférer les légumes frais aux conserves.

De même, les maisons de retraite et les hôpitaux psychiatriques devraient veiller à donner à leurs pensionnaires une alimentation variée à base des produits déjà cités ci-dessus.

Les industriels de l'agro-alimentaire semblent avoir bien compris ce problème puisque l'on trouve déjà sur le marché de nombreux aliments enrichis en acide folique tels les céréales, boissons pour petit déjeuner et aliments pour bébés [ANONYME (1991)].

Mais peut-être devraient-ils penser à élargir la gamme de leurs produits enrichis en vitamine B₉, notamment les conserves ou plats cuisinés dont la consommation dans nos pays industrialisés ne cesse d'augmenter.

III-2- MEDICAMENTS SUSCEPTIBLES DE PERTURBER LE STATUT FOLIQUE.

Certains médicaments peuvent perturber le statut folique :

- ▶ les antiépileptiques,
- ▶ certains antibiotiques ou antiparasitaires : triméthoprime, cotrimoxazole, pyriméthamine,
- ▶ la sulfasalazine (antiinflammatoire colique),
- ▶ les antinéoplasiques cytostatiques du groupe des antifolates : le méthotrexate,
- ▶ les contraceptifs oraux.

III-2-1- LES ANTIEPILEPTIQUES.

Tous les antiépileptiques sont susceptibles d'entraîner des carences en folates par inhibition de l'action de la Bc-conjugase, enzyme qui libère l'acide folique de ses dérivés conjugués.

Les antiépileptiques inhiberaient donc l'absorption de l'acide folique [LUBETZKI- J et al (1978)] .

Cependant, il semblerait que les associations :

- ▶ phénytoïne - phénobarbital,
- ▶ primidone - autre antiépileptique,

soient les plus propices à entraîner cette carence [DANSKY- L et al (1992)].

La supplémentation en acide folique parallèlement à la prise d'antiépileptiques n'est pas systématique, car on a longtemps incriminé l'acide folique

comme facteur susceptible de déclencher des crises d'épilepsie [BOTEZ- M.I et al (1990)].

III-2-2- LA PYRIMETHAMINE.

La pyriméthamine est un antiparasitaire utilisé dans le traitement des toxoplasmoses graves, notamment au cours du SIDA.

Théoriquement, elle inhibe la seule dihydrofolate réductase (D.H.F.R.) des protozoaires.

Cependant, une action sur la D.H.F.R. humaine est possible et lors du traitement par cet antiparasitaire, les effets indésirables suivants peuvent apparaître [ZITTOUN- J et al (1990)] :

- ▶ anémie mégaloblastique classique,
- ▶ thrombopénie aiguë,
- ▶ aplasie médulaire.

Il est donc recommandé d'associer au traitement par la pyriméthamine une supplémentation en vitamine B₉ (VIDAL 1992) :

- ▶ 50 mg / semaine d'acide folinique chez l'adulte,
- ▶ 5 mg tous les 2 à 4 jours chez l'enfant.

Pour le traitement de la toxoplasmose au cours du SIDA, il est même recommandé [NIYON GABO- T et al (1991)] :

- ▶ 10 à 20 mg / j d'acide folinique dans la phase aiguë de la thérapie,
- ▶ 5 à 10 mg / j dans la phase de maintenance.

REMARQUE :

Le rôle tératogène de la pyriméthamine est possible chez l'homme mais ce n'est pas prouvé.

Chez la rate, ce médicament induit des malformations foetales telles la micrognathie, l'agnathie, l'entépalatine [RAYNAUD- F (1990)].

D'après cette étude, la teneur en acide folique du sang et du foie maternel n'est pas du tout altérée après une injection intrapéritonéale de pyriméthamine de 25 mg/kg le soir du 11^{ème} jour de gestation.

Par contre, la concentration en acide folique dans les tissus embryonnaires est fortement diminuée dès le lendemain de l'injection.

La chute des folates embryonnaires n'est donc pas imputable à une carence en acide folique chez la mère, mais plutôt à un mauvais transport de la vitamine à travers le placenta.

De plus, en franchissant le placenta maternel, la pyriméthamine pourrait également exercer une action locale directe sur la DHFR embryonnaire.

Etant donnée l'importance de l'acide folique dans le développement foetal, ceci pourrait expliquer le mécanisme de tératogénicité de la pyriméthamine.

III-2-3- COTRIMOXAZOLE ET TRIMETOPRIME.

Ces deux antibiotiques agissent, comme pour la pyriméthamine, en inhibant la DHFR des micro-organismes [GIRARD- P.M et al (1991), ZITTOUN- J et al (1990)].

Ils sont donc capables de provoquer les mêmes effets indésirables que la pyriméthamine, mais la prophylaxie par l'acide folinique n'est pas systématiquement adoptée en raison d'une possible interférence de ce dernier sur l'effet antibactérien des antibiotiques.

Ainsi, pour le cotrimoxazole, la supplémentation en acide folinique lors du traitement de la pneumocystose au cours du SIDA ne sera effectuée que si les doses de cotrimoxazole dépassent 2400 mg par jour en trois prises, et chez les patients malnutris.

Il est important de noter que l'acide folinique doit être ajouté au traitement dès le déclenchement d'une cytopénie [NIYON GABO- T et al (1991)]. Il sera administré à raison de 7 mg par semaine.

III-2-4- LA SULFASALAZINE.

La sulfasalazine est avant tout un anti-inflammatoire possédant une action anti-infectieuse accessoire. Elle diminue l'absorption de l'acide folique.

Chez les malades souffrant de maladie de Crohn ou de réctocolite hémorragique et traités par ce médicament au long cours, la supplémentation en acide folique devrait être systématique, notamment pour prévenir les complications par dysplasie ou cancer [LASHNER- B.A et al (1989 et 1990), ZITTOUN-J et al (1990)].

III-2-5- LE METHOTREXATE.

Le méthotrexate est un antinéoplasique cytostatique du groupe des antifolates. Il agit comme antimétabolite en inhibant la dihydrofolate réductase (inhibiteur compétitif).

Il est utilisé dans le traitement de certains cancers (choriocarcinome, leucémies aiguës lymphoblastiques ...), mais aussi dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis [MORGAN- S.L et al (1990), STEWART- K.A et al (1991)].

Lorsque le méthotrexate est prescrit dans le traitement d'un cancer, "l'administration codifiée d'acide folinique est conseillée au décours de l'administration du méthotrexate à doses moyennes et hautes" (Vidal 1992).

Pour ce qui est de l'utilisation du méthotrexate dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, il y a consensus pour une administration systématique d'acide folinique pour diminuer la toxicité du méthotrexate : diminution des diarrhées, nausées et vomissement en particulier [MORGAN- S.L et al (1990), STEWART- K.A et al (1991), ZITTOUN- J et al (1990)].

III-2-6- LES CONTRACEPTIFS ORAUX.

De nombreuses publications rapportent que les contraceptifs oraux pourraient être la cause de carences en folates [BUTTERWORTH- C.E et al (1992a et 1992b), DAVIS- R.E et al (1991), SCHLIENGER- J.L et al (1991), THOÛLON- C.M (1989)]. Nous n'avons pas rencontré d'étude approfondie détaillant ces faits.

Ceci est même contesté par certains auteurs [ZITTOUN- J et al (1990)].

Toutefois, étant donnée l'implication possible de la carence en acide folique dans les dysplasies cervicales² [BERGER- I et al (1988)], ne serait-il pas envisageable de recommander une supplémentation en vitamine B₉ à toutes les femmes sous contraceptifs oraux ?... ou tout au moins ne devrait on pas leur donner quelques conseils de diététique de façon à ce qu'elles augmentent leurs apports en folates dans l'alimentation³ ?...

² Voir également le chapitre IV-3-7- page 77.

³ Voir chapitre III-1-6- page 47.

III-3- SITUATIONS PHYSIO-PATHOLOGIQUES ENTRAINANT UNE AUGMENTATION DES BESOINS EN VITAMINE B₉.

III-3-1- LA GROSSESSE.

Durant la grossesse, le fœtus se présente comme une véritable "pompe à folates", et augmente ainsi considérablement les besoins en cette vitamine chez la mère : en général, les besoins sont doublés mais peuvent être multipliés jusqu'à 6 fois...[THOULON- C.M (1989)].

Cette augmentation des besoins en acide folique chez la femme enceinte est d'autant plus importante que les facteurs suivants sont réunis :

- ▶ gémélliparité,
- ▶ multiparité,
- ▶ femme issue d'un milieu défavorisé,
- ▶ consommation excessive de tabac ou d'alcool,
- ▶ femme ayant consommé pendant une période prolongée des contraceptifs oraux,
- ▶ âge inférieur à 20 ans ou supérieur à 35 ans.

Pour estimer le statut folique chez la femme enceinte, il sera préférable de se baser sur les résultats du dosage intraérythrocytaire.

En effet, l'augmentation du volume plasmatique durant la grossesse entraîne une hémodilution qui fausse les résultats du dosage plasmatique [BAILEY- L.B et al (1990)].

En cas de dépistage d'une carence en folates durant la grossesse, le schéma thérapeutique suivant pourra être envisagé [MULLOY- W.P et al (1990)] :

- ▶ dose de charge de 5 mg / j d'acide folique pendant une semaine,
- ▶ dose de maintenance de 1 mg / j d'acide folique jusqu'au terme et durant l'allaitement.

III-3-2- PATHOLOGIES INTESTINALES.

De nombreuses pathologies intestinales, en limitant l'absorption des nutriments, pourront perturber le statut folique.

C'est le cas en particulier de [LE GRUSSE- J (1991), LOUISOT- P (1974)] :

- ▶ la sprue tropicale : cette maladie pourra même être révélée par une anémie mégaloblastique sévère [HUTIN- Y (1992), KLOTZ- F (1991)],
- ▶ la maladie coeliaque,
- ▶ la maladie de Crohn,
- ▶ un défaut d'absorbction congénital,
- ▶ personne gastrectomisée,
- ▶ entéropathie chronique...

Il conviendra d'adapter au cas par cas les posologies d'acide folique en fonction des taux sériques.

III-3-3- CANCER ET SYNDROME HEMATOLOGIQUE.

Dans tous les cas de cancers, hémopathie maligne, anémie hémolytique, sidéroblastose, hémorragies répétées..., la carence en acide folique sera provoquée par une consommation excessive de la vitamine par les cellules en multiplication accélérée, et ce malgré un apport correct et une absorption normale [LE GRUSSE- J (1991), LUBETZKI- J et al (1978), SCHLIENGER- J.L et al (1991), THOULON- C.M (1989)].

Là aussi, il conviendra d'adapter les posologies en acide folique au cas par cas en fonction des besoins.

III-3-4- MALADIES HEREDITAIRES DU METABOLISME B₉ DEPENDANT.

Les malabsorptions congénitales en folates sont rares et sont caractérisées par une incapacité sélective des folates à traverser la barrière gastrointestinale [STEINSCHNEIDER- M et al (1990)].

Les principaux déficits enzymatiques congénitaux peuvent porter sur la formimino-transférase, la N₅-méthyltétrahydrofolate-méthyl-transférase ou l'acide folique réductase [LUBETZKI- J et al (1978)].

III-3-5- L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH).

La carence en folates est nette chez les personnes infectées par le VIH [BOUDE- P et al (1990)].

Ceci n'est pas étonnant chez les malades ayant atteint le stade du SIDA puisque ces patients sont souvent affaiblis et dénutris.

Par contre, la carence en folates chez les séropositifs n'est pas encore bien expliquée.

Il existe une hypothèse selon laquelle le métabolisme des folates serait inhibé par la néoptérine synthétisée en excès par les macrophages au cours de l'infection par le VIH, mais ceci n'a pas été vérifié à ce jour [BOUDE- P et al (1990), PARTISANI- M et al (1991), SURTEES- R et al (1990)].

Cette hypofolatémie est importante à prendre en considération car elle pourrait jouer un rôle dans les dommages neurologiques produits par le VIH, notamment chez l'enfant.

IV- TRADUCTIONS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES D'UNE CARENCE EN FOLATES.

Comme nous l'avons décrit dans un précédent chapitre, l'acide folique intervient comme coenzyme indispensable dans la synthèse de l'acide glutamique, la glycine, la méthionine, la thymine et les purines.

La carence en acide folique a donc pour conséquence un ralentissement de synthèse des acides nucléiques qui retentit très nettement sur l'ADN.

La carence en ADN explique le retard de la formation des chromosomes, donc la réduction du nombre des mitoses.

La synthèse de l'ARN étant relativement respectée, le cytoplasme se développe.

L'association de ces deux faits rend compte de la réduction du nombre des cellules à division rapide, notamment au sein de la moelle osseuse et des cellules de la muqueuse intestinale, et de l'augmentation de leur volume [LUBETZKI- J et al (1978)].

Les principales manifestations cliniques de la carence en acide folique sont donc [LUBETZKI- J et al (1978), THOULON- C.M (1989)] :

- ▶ Une anémie mégalo-blastique et macrocytaire.
- ▶ Une glossite et des altérations de la muqueuse intestinale.
- ▶ Une leucopénie.

Mais la carence en acide folique pourrait également être responsable de manifestations neurologiques variées, allant de la neuropathie périphérique aux troubles cérébelleux et psychiques, avec modification du caractère et trouble du sommeil et de la mémoire [THOULON- C.M (1989)].

IV-1- CARENCE EN FOLATES ET ANEMIE MACROCYTAIRE MEGALOBLASTIQUE [LONGPRE- B et al (1983)].

Les anémies macrocytaires mégalo-blastiques sont bien connues depuis longtemps. Elles résultent presque toujours d'une déficience en vitamine B₁₂ ou en acide folique, déficience qui conduit aux troubles de maturation notés au niveau du sang et de la moelle osseuse.

Les signes d'hypercatabolisme de l'hémoglobine (hyperbilirubinémie) proviennent d'un raccourcissement de la durée de vie des macrocytes.

Nous ne traiterons ici que des anémies macrocytaires mégalo-blastiques résultant d'un déficit en acide folique.

IV-1-1- PHYSIOPATHOLOGIE.

L'anémie macrocytaire mégalo-blastique résulte d'un défaut de synthèse de l'ADN au niveau des cellules médullaires (érythroblastes, cellules de la série myéloïde, mégacaryocytes), et des cellules qui se différencient rapidement, soit celles des muqueuses du tube digestif et celles de l'appareil urogénital.

Ce défaut de synthèse entraîne alors :

- ▶ un allongement de la phase S,
- ▶ une réduction du nombre des mitoses,
- ▶ l'apparition du gigantisme cellulaire notée surtout au niveau de la lignée érythrocytaire : les mégalo-blastes,
- ▶ une augmentation du rapport ARN/ADN par production exagérée de cytoplasme avec retard de maturation du noyau, ce qui produit l'asynchronisme nucléo-cytoplasmique,

- ▶ une érythropoïèse plus active, mais inefficace,
- ▶ une déglobulisation précoce des globules rouges.

Les manifestations hématologiques régressent rapidement après l'administration de vitamine B₁₂ ou d'acide folique. La mégalo-blastose notée au niveau de la moelle peut disparaître 24 à 48 heures après le début du traitement.

IV-1-2- MANIFESTATIONS CLINIQUES.

Une anémie, même sévère, peut être bien tolérée⁴; les signes révélateurs, en dehors de la pâleur, sont souvent discrets.

Notons cependant les symptômes et les signes propres à ce groupe d'anémies :

- ▶ la pâleur accompagnée de subictère observée surtout au niveau des sclérotiques,
- ▶ une hyperpigmentation, accompagnée ou non de vitiligo,
- ▶ une fièvre modérée possiblement reliée au phénomène hémolytique,
- ▶ des troubles digestifs causés par une modification de la muqueuse digestive : anorexie, nausée, diarrhée, stomatite, glossite,
- ▶ une atteinte du système nerveux (troubles psychiques, neuropathies périphériques sensitivo-motrice).

Nous développerons ces deux derniers points dans les chapitres IV-2 page 63 et IV-3-1 page 71.

⁴ Le système cardio-vasculaire s'adapte fort bien à l'anémie qui s'installe insidieusement.

IV-1-3- MANIFESTATIONS BIOLOGIQUES.

Par des carences induites expérimentalement chez l'homme, des précisions ont pu être apportées sur les différents stades rencontrés lors de l'installation d'une telle anémie [LUBETZKI- J et al (1978)] :

- ▶ après 3 semaines : abaissement des folates sériques en dessous de 3 ng/ml (= 9 nmole/l), les valeurs normales se situant entre 9 et 41 nmole/l,
- ▶ après 7 semaines : hypersegmentation des noyaux des polynucléaires (5 à 6 lobes),
- ▶ après 13 semaines : augmentation de l'élimination urinaire de Fighu sous charge en histidine,
- ▶ après 4 mois : abaissement des folates érythrocytaires à 20 ng/ml ou 340 nmole/l (les valeurs normales se situant entre 340 et 1600 nmole/l),
- ▶ après 4 mois et demi : mégaloblastose médullaire, puis anémie mégalocytaire,

Ainsi, le phénomène responsable de la mégaloblastose et de la mégalocytose dans la lignée érythrocytaire touche également les cellules hématopoïétiques de la lignée granuleuse (d'où diminution du nombre relatif des formes jeunes avec augmentation du pourcentage des polynucléaires polysegmentés) et la lignée mégacariocytaire.

L'anémie mégalocytaire est caractérisée par une augmentation du VGM qui doit être supérieur à $104 \mu\text{m}^3$ (la valeur normale étant d'environ $80 \mu\text{m}^3$), l'indice CCMH restant normal (32 à 35 % ; le volume érythrocytaire reste proportionnel au taux d'hémoglobine).

Le frottis sanguin révèle une anémie macrocytaire normochrome.

On note les anomalies morphologiques suivantes : macroovalocytose, poikilocytose, polychromatophilie, corps de Howell-Jolly, anomalies qui sont d'autant plus marquées que l'anémie est sévère.

Le nombre de granulocytes est normal ou diminué. Leur noyau peut se segmenter en 5 ou 6 prolongements. Comme nous l'avons déjà souligné, le phénomène peut se voir précocement sur le frottis sanguin.

Le nombre des plaquettes est souvent abaissé.

La diminution du nombre des réticulocytes témoigne de l'inefficacité de l'érythropoïèse.

IV-1-4- TRAITEMENT.

Il est généralement recommandé de donner par voie buccale 5 mg d'acide folique par jour pendant deux semaines pour reconstituer les réserves, on double cette dose s'il existe des troubles d'absorption.

Comme l'anémie résulte le plus souvent d'un défaut d'apport, il conviendra également de corriger les déficiences alimentaires [SHLIENGER- J.L et al (1991)].

Le traitement prophylactique s'impose dans quelques rares conditions :

- ▶ dans l'hémodialyse chronique,
- ▶ dans les maladies de l'intestin grêle ou après une résection de l'intestin grêle ,
- ▶ dans les cas d'anémie hémolytique constitutionnelle.

Il conviendra alors d'adapter les posologies d'acide folique au cas par cas, en se basant sur les dosages sériques de la vitamine.

IV-2- CARENCE EN ACIDE FOLIQUE ET AFFECTIONS DU SYSTÈME NERVEUX.

C'est en 1962 que HERBERT, en étudiant les effets d'une carence expérimentale en acide folique sur lui même, a montré le premier l'importance de l'acide folique pour le bon fonctionnement du système nerveux.

En effet, après 20 semaines d'un régime carencé en acide folique, il décrit des troubles du sommeil et de la mémoire, ainsi qu'une certaine irritabilité.

Ces troubles disparaissent après deux jours de traitement par l'acide folique.

Par la suite, de nombreuses études ont été conduites de manière à mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre une carence en acide folique et la présence de troubles du comportement.

IV-2-1- OBSERVATIONS CLINIQUES : CARENCES EN FOLATES ET DESORDRES PSYCHOLOGIQUES.

REYNOLD et al (1973) ont montré que l'incidence des désordres mentaux d'origine organique était de 39 % (n = 21) chez des personnes non carencées en folates, mais de 71 % (n = 24) chez des patients carencés en folates (folates sériques < 3,0 mg/ml).

En 1980, SHORVON et al se sont intéressés à 34 patients présentant une anémie mégaloblastique ayant pour origine une carence en acide folique (folates sériques < 2,5 ng/ml). A peu près un tiers ne présentait pas d'anomalies mentales (35 %), mais un peu plus de la moitié présentait des désordres affectifs évidents (56 %), et un quart avait des modifications mentales d'origine organique (27 %).

En 1982, MERYL et al montrent que chez des personnes alcooliques (étude portant sur 41 patients), le taux de dépression est significativement plus élevé chez les personnes pour lesquelles le taux plasmatique de folates est inférieur à 7 ng/ml.

DEL SER QUIJANO et al, en 1983, constatent que chez des patients atteints d'épilepsie, les taux sériques de folates sont significativement plus bas chez les malades présentant des troubles mentaux, notamment des dépressions ou psychoses de type schizophrénique.

Une étude similaire menée par TRIMBLE et al (1980), sur 312 enfants atteints d'épilepsie conduit aux mêmes résultats.

Enfin, d'autres études menées au sein d'hôpitaux psychiatriques [RENVOISE-E.B et al (1985), YOUNG- S.M et al (1989)] montrent également qu'une carence en folates est fréquemment associée à de nombreuses pathologies psychiatriques (démence, dépression, schizophrénie, anorexie...).

Mais, si ces études montrent bien l'existence d'une corrélation entre une carence en acide folique et certaines pathologies du système nerveux, elles ne permettent pas de conclure au rôle étiologique de l'acide folique dans l'apparition de ces symptômes : ne serait-ce pas plutôt l'état pathologique qui serait à l'origine de la carence en acide folique ?

Seules les études montrant une amélioration des symptômes de certaines pathologies psychiatriques ou troubles nerveux chez des personnes carencées en folates, après traitement par de l'acide folique seul, permettront de répondre à cette question.

IV-2-2- EFFETS DE L'ADMINISTRATION D'ACIDE FOLIQUE COMME SEUL TRAITEMENT, CHEZ DES PERSONNES CARENCEES EN FOLATES ET PRESENTANT DES TROUBLES DU SYSTEME NERVEUX.

Nous avons déjà cité, au début de ce chapitre, l'expérience réalisée par HERBERT (1962), dans laquelle des troubles du sommeil et de la mémoire ainsi qu'une certaine irritabilité, apparus après 20 semaines d'un régime carencé en folates, disparaissent après deux jours de traitement par l'acide folique.

Le syndrome de "Subacute combined degeneration of the spinal cord" (SCDSC) peut être induit par une carence en folates ou en vitamine B₁₂ : 35 à 40 cas sont reportés dans la littérature [BOTEZ- M.I et al (1990)].

L'amélioration de ce syndrome par une administration de vitamine B₉ est rapide et la rémission quasi complète.

BOTEZ- M.I et al (1990), rapportent également le cas d'une étude portant sur quatre patients traités de façon chronique par un antibiotique (trimétoprine + sulfaméthoxazole).

Le trimétoprine est un inhibiteur sélectif de la dihydrofolate réductase bactérienne, enzyme qui réduit l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique.

Les taux sériques et intraérythrocytaires de folates étaient normaux chez deux patients ; pour les deux autres, les concentrations sériques en folates étaient diminuées.

Pour le premier patient, les paresthésies ont disparu après deux semaines de traitement oral par l'acide folique.

Pour les trois autres patients, l'effet bénéfique d'un traitement par l'acide folique a été prouvé par un essai clinique mené en double aveugle contre placebo.

Il aurait été intéressant toutefois, pour augmenter la crédibilité de cette étude, que le nombre de patients étudiés soit plus important.

Enfin, YOUNG et al (1989), ont étudié les résultats obtenus lors de 16 études cliniques différentes menées sur des patients carencés en acide folique et présentant des troubles neurologiques ou psychiatriques.

L'amélioration de ces symptômes après traitement par l'acide folique apparaît probant dans 10 des études considérées.

D'après les auteurs, les échecs seraient dus à l'utilisation de doses d'acide folique trop élevées⁵, les symptômes de carence en acide folique étant remplacés par les symptômes d'un surdosage, ce qui soulève deux problèmes :

- ▶ le problème de la toxicité de l'acide folique⁶,
- ▶ le problème des doses d'acide folique à utiliser en thérapeutique. YOUNG et al (1989), suggèrent notamment qu'une supplémentation en folates inférieure à 1 mg/jour serait appropriée dans la majorité des cas.

LORDS et al (1990) ont effectué une étude sur 50 patients carencés en acide folique, tirés au sort, et présentant des troubles du comportement.

L'état cérébral des malades s'améliore de manière significative après un traitement par l'acide folinique (50 mg par voie intramusculaire tous les jours, pendant 20 jours) : notamment, quatre dépressifs et trois "déments" redeviennent entièrement autonomes.

⁵ 15 à 20 mg d'acide folique per os par jour pendant une durée supérieure à 11 semaines.

⁶ L'existence de doses toxiques de vitamine B₉ semble controversée.

Si de nombreuses publications font état de l'absence d'hypervitaminose [ANONYME (1991), LE GRUSSE (1991), LUBETZKI- J et al (1978), ZAZZO- J.F (1988)], d'autres en revanche soulignent quelques effets indésirables imputables à l'utilisation de doses d'acide folique élevées (voir note 5) : irritabilité, excitabilité, perturbation du sommeil et problèmes gastrointestinaux [YOUNG- S.N et al (1989)].

En outre, l'acide folique est convulsivant et neurotoxique chez l'animal [SCOTT- J.M et al (1991)].

STEINSHNEIDER et al (1990), rapportent que des enfants souffrant d'une malabsorption congénitale en folates, et traités pendant un mois par l'association :

- ▶ acide folique per os : 40 mg/j,
 - ▶ acide folinique intramusculaire : 5 mg, deux fois par semaine,
- deviennent moins apathiques, acquièrent une plus grande force et une démarche plus sûre.

Ces différentes études tendent donc bien à prouver qu'une carence en acide folique peut avoir pour conséquence l'apparition de certains symptômes neurologiques tels que :

- ▶ SCDSC,
- ▶ neuropathies périphériques,
- ▶ troubles de la mémoire, apathie, irritabilité,
- ▶ dépression,
- ▶ démence.

Ces pathologies pouvant être améliorées, ou même guéries, par l'administration d'acide folique, nous suggérons qu'une supplémentation systématique en vitamine B₉ devrait être entreprise dans tous les cas où des troubles du système nerveux sont accompagnés d'une carence en folates.

Grâce à l'analyse des différentes publications étudiées, il nous paraît raisonnable de recommander une supplémentation en acide folique de l'ordre de 1 mg/jour pendant 1 à trois mois.

Parallèlement à cette supplémentation médicamenteuse, l'établissement d'un régime apportant une ration quotidienne d'acide folique adéquate (soit 400 µg/jour pour l'adulte ou la personne âgée) est indispensable afin d'éviter les rechutes.

IV-2-3- L'ACIDE FOLIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX : RELATIONS METABOLIQUES.

Une carence en acide folique peut induire de nombreux symptômes neurologiques différents.

Ceci peut être dû, en partie, à la grande variété de processus métaboliques dans lesquels entre en jeu l'acide tétrahydrofolique (voir chapitre II page 26).

Ainsi, la relation entre le THF et la S-adénosyl-méthionine (SAM) est d'un grand intérêt puisque la SAM semble montrer des propriétés antidépressives [CARNEY- M.W.P et al (1986)].

Les effets sur l'humeur d'une carence en folates et l'effet antidépresseur de la SAM peuvent être tous deux mis en relation avec leur influence dans le métabolisme des monoamines.

L'administration de SAM à des rats augmente les taux de sérotonine au niveau du cerveau [CURCIO- M et al (1978)] alors que chez l'homme, elle augmente le taux de 5-HIAA (acide 5-hydroxy-indole acétique) dans le liquide cérébro-spinal [BOTTIGLIERI- T et al (1984)].

Chez l'homme, de faibles taux de 5-HIAA dans le liquide cérébro-spinal sont retrouvés chez les patients qui présentent des troubles neuropsychiatriques s'améliorant lors de l'administration d'acide folique, mais pas chez les patients carencés en folates ne présentant aucun trouble du système nerveux [BOLTEZ- M.I et al (1982)].

Le lien entre une carence en folates et de faibles taux de sérotonine est renforcé par le fait que, chez les patients atteints de dépression, il existe une corrélation positive entre les taux de 5-HIAA dans le liquide cérébro-spinal et la concentration en folates dans les hématies [BOTTIGLIERI- T et al (1986 et 1990)].

De plus, une carence en folates pourrait avoir une influence sur le métabolisme des monoamines, et notamment de la sérotonine, par ses effets sur la

synthèse de la tétrahydrobioptérine (voir chapitre II-2-3 page 38), cofacteur enzymatique qui semble bien jouer un rôle important au niveau des désordres affectifs [COPPEN- A et al (1989)].

Certains auteurs [LEEMING- R.I et al (1982)], ont même constaté que les concentrations sériques de tétrahydrobioptérine sont augmentées lors du traitement d'une dépression par les antidépresseurs tricycliques.

Dans les cas de dépression, une forte corrélation existe entre les taux sériques d'acide folique et les concentrations de tétrahydrobioptérine dans le liquide cérébro-spinal [BOTTIGLIERI- T et al (1990)].

Ces données peuvent expliquer en partie le rôle que joue l'acide folique sur l'humeur.

Par contre, le fait qu'une carence en acide folique puisse être la cause de démence ou de psychoses s'explique moins facilement.

Peut-être qu'un déficit en acide folique diminuerait la méthylation des phospholipides présents au niveau de la membrane neuronale, ce qui pourrait avoir des conséquences sur la transmission du signal au niveau du neurone [YOUNG- S.N et al (1989)].

IV-2-4- CONCLUSION.

Les études que nous avons décrites suggèrent que de nombreux troubles du système nerveux peuvent être accompagnés d'une carence en folates. Ceci peut être dû à une diminution des apports en folates alimentaires (chez certaines personnes déprimées ou anorexiques par exemple), ou à une diminution de l'absorption de l'acide folique (alcoolisme ou traitement antiépileptique).

Chez les sujets qui deviennent carencés en folates, des symptômes neurologiques préexistants peuvent être exacerbés, ou, chez des sujets préalablement sains, des symptômes neurologiques peuvent apparaître.

Tous les patients atteints de symptômes neurologiques accompagnés d'une carence en folates ne verront pas leurs symptômes améliorés par l'administration d'acide folique.

Cependant, compte tenu du pourcentage de réussite d'un tel traitement, de son innocuité (si les doses d'acide folique sont inférieures ou égales à 1 mg/jour pendant 1 à 3 mois), de sa simplicité et de son faible coût, il paraît indispensable de généraliser l'emploi de l'acide folique dans de nombreuses pathologies ou une carence est constatée ou susceptible d'apparaître et notamment :

- ▶ certaines maladies psychiatriques : démence, schizophrénie, anorexie,
- ▶ personnes atteintes d'épilepsie et traitées par des antiépileptiques,
- ▶ alcoolisme,
- ▶ dépression,
- ▶ certaines neuropathies [PARRY- T.E (1990)] .

De plus, l'institution d'un régime à base d'aliments riches en folates, ainsi que l'enrichissement des aliments en vitamine B₉, paraît un bon moyen de limiter l'apparition de cette carence (voir chapitre III-1-6- page 47).

IV-3- AUTRES ANOMALIES POUVANT ETRE INDUITES PAR UNE CARENCE EN ACIDE FOLIQUE.

A coté de l'anémie macrocytaire mégaloblastique et des troubles du système nerveux, de nombreuses anomalies sont décrites comme pouvant être induites par une carence en acide folique :

- ▶ modifications des muqueuses digestive et urogénitale,
- ▶ dysplasie cervicale,
- ▶ certaines affections cutanées,
- ▶ altération du système immunitaire,
- ▶ pancytopénie carencielle,
- ▶ malformations congénitales touchant plus particulièrement le tube neural.

Nous développerons plus particulièrement ce dernier point qui, à l'heure actuelle, est à l'origine de nombreuses controverses.

IV-3-1- GLOSSITE ET ALTERATIONS DE LA MUQUEUSE INTESTINALE.

Les cellules des muqueuses digestives, dont le renouvellement est rapide à l'état normal, sont touchées au même titre que les cellules sanguines, comme le montrent les études biologiques faites sur des prélèvements biopsiques : diminution du nombre des mitoses dans les cryptes, élargissement de celles-ci, atrophie des villosités dont les cellules sont agrandies [LUBETZKI- J et al (1978)].

Les troubles digestifs causés par une telle modification des muqueuses sont nombreux (anorexie, nausée, diarrhée, stomatite, glossite, troubles de l'absorption), et tendent à aggraver encore la carence vitaminique [LONGRE- B et al (1983)].

Il est important de noter que les changements survenant au niveau de la bouche, et surtout de la langue qui devient rouge, lisse et douloureuse (les papilles s'atrophient) sont un signe très évocateur de l'anémie macrocytaire mégaloblastique.

IV-3-2- ALTERATIONS DE LA MUQUEUSE VAGINALE.

Les cellules vaginales, elles aussi, subissent une différenciation anormale et montrent une atypie morphologique en présence d'un déficit en acide folique [BUREAU-J.P et al (1973)].

Les modifications principalement décrites sont :

- ▶ une augmentation du diamètre moyen du noyau,
- ▶ une vacuolisation du cytoplasme,
- ▶ des noyaux multinucléés,
- ▶ des noyaux anormaux présentant des mottes de chromatine et un plissement exagéré de la membrane nucléaire.

Ces modifications cytologiques semblent apparaître plusieurs semaines avant la franche déficience en vitamine B₉, sensiblement à la même période ou apparaissent les modifications des noyaux des PNN dans le sang.

Cette cytologie pourrait constituer un test diagnostique précoce et simple de la déficience vitaminique au cours de la grossesse.

IV-3-3- IMPLICATION D'UNE CARENCE EN FOLATES DANS LE VITILIGO.

Le vitiligo est une affection caractérisée par des zones au niveau desquelles la peau est complètement blanche, entourées de zones hyperpigmentées.

L'étiologie de cette pathologie est encore mal connue mais il semblerait que les patients atteints de vitiligo présentent souvent une carence en folates.

MONTES-L.F et al (1992), ont montré qu'une administration orale prolongée d'acide folique et d'acide ascorbique, associée à un traitement parentéral avec la vitamine B₁₂ entraîne une repigmentation sans apparition d'effets indésirables.

IV-3-4- CARENCE EN FOLATES ET ALTERATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE.

Comme pour les autres lignées sanguines, la carence en folates perturbant la synthèse de l'ADN entrave l'intense activité de synthèse et de réplication des lymphocytes stimulés par un antigène.

De nombreux travaux ont objectivé, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, un déficit de l'immunité cellulaire au cours des carences en folates.

DAS- K et al (1970), ont signalé des anomalies morphologiques "mégaloïdes" des lymphocytes stimulés par la phytohémagglutinine au cours de l'anémie mégaloïde.

NAUS- K.M et al (1982), puis JACOBSON- W et al (1987), montrent que la résistance aux infections diminue en cas de carence folique.

DHUR- A et al (1991), montrent qu'une carence sévère chez la souris entraîne une perte de poids du thymus et une diminution des thymocytes matures helper et suppresseur qu'il contient.

Cette possible altération du système immunitaire lors d'une carence en folates est importante à prendre en compte, notamment lorsqu'elle survient chez des sujets déjà immunodéprimés.

Par exemple, ne serait il pas intéressant d'étudier les effets d'une supplémentation systématique en acide folique des personnes atteintes par le virus VIH, puisqu'il semblerait que cette affection entraîne une diminution du statut folique (voir chapitre III-3-5 page 56).

IV-3-5- PANCYTOPENIE CARENTIELLE MIMANT UNE LEUCEMIE.

CACOUB- P et al (1991), rapportent trois observations de pancytopenie centrale par carence en folates et/ou vitamine B₁₂ survenant chez des sujets âgés (avec un aspect trompeur du myélogramme du fait de formes jeunes très dystrophiques en proportion importante dans deux des observations).

Les carences en vitamine B₁₂ et/ou en folates, habituellement évoquées devant une anémie macrocytaire et une mégalo blastose médullaire, peuvent poser des problèmes diagnostiques quand les trois lignées sanguines sont touchées et que l'aspect du médullogramme évoque une leucémie aiguë.

Il faut donc savoir évoquer une origine carentielle devant une pancytopenie centrale survenant chez un sujet âgé, en dehors de tout contexte infectieux ou de toute prise médicamenteuse, et ne pas s'orienter trop rapidement vers une affection maligne.

IV-3-6- CARENCE EN ACIDE FOLIQUE ET ANOMALIE DE FORMATION DU TUBE NEURAL PENDANT LA GROSSESSE.

Les anomalies de formation du tube neural, représentées essentiellement par une anencéphalie ou un spina-bifida, sont les malformations majeures les plus fréquemment rencontrées aux Etats Unis et dans beaucoup d'autres pays [WALTER- C et WILLET- M.D (1992)].

Bien sur, des facteurs génétiques doivent intervenir dans ces malformations mais, dès 1959, SMITHELLS- R.W et al ont montrés que chez des mères ayant eu une grossesse présentant une anomalie de formation du tube neural, les taux sériques d'acide folique étaient particulièrement faibles.

Depuis, de nombreuses études ont été entreprises afin de mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre l'apparition de malformations congénitales (et surtout d'anomalies de formation du tube neural) et une éventuelle carence en folates chez la mère durant la grossesse.

Toute ces études n'ont pas abouti aux mêmes conclusions, ces différences de résultats pouvant provenir d'une variation des protocoles expérimentaux entrepris, mais aussi et surtout de la période de la grossesse où la détermination en folates a été faite [BAIJAL- E et al (1991), DANSKY- L et al (1992), ECONOMIDES- D.L et al (1992), HOLZGREVE- W et al (1991), JAMES- L et al (1992), LETTERS (1991), MILUNSKY- A et al (1989), MRC Vitamin Study Reaserch Group (1991), SMITHELLS- R.W et al (1959), TAGUCHI- H (1991), WALTER- C et al (1992)].

Par exemple, ECONOMIDES- D.L et al (1992) ont déterminé les taux de folates dans :

- ▶ le sérum et les globules rouges de la mère,
- ▶ le sérum et les globules rouges du fœtus,

► le liquide amniotique,

de 32 femmes venues consulter pour I.V.G.

Huit d'entre elles présentaient un fœtus ayant soit une anencéphalie, soit un spina-bifida.

Ces dosages ont été effectués entre la 14^{ème} et la 21^{ème} semaine de grossesse, donc après la période majeure d'organogenèse.

Aucune différence n'a été trouvée entre les femmes ayant présenté une grossesse normale (n = 24) et les autres (n = 8).

Aucune précision sur l'éventuelle supplémentation vitaminique de ces patientes avant ou pendant leur grossesse ne sont données.

MILUNSKY- A et al (1989), grâce à une étude sous forme de questionnaire portant sur 24491 femmes enceintes, montrent que le risque de malformation du tube neural est diminué par trois s'il y a eu supplémentation en acide folique pendant les six premières semaines de grossesse.

Les doses d'acide folique permettant cette diminution significative des malformations du tube neural sont comprises entre 100 et 1000 µg / j.

WALTER- C et al (1992), montrent que chez les femmes ayant eu des antécédents de grossesse avec malformation du tube neural, la prise d'acide folique durant les six premières semaines réduirait de 3 à 4 fois le risque de voir leur progéniture à nouveau atteinte de malformation.

Mais la plus claire évidence de la relation carence en acide folique / malformation du tube neural nous vient d'une étude randomisée en double aveugle effectuée dans 5 pays européens, Israël et le Canada [Medical Research Council's Vitamin Research Group (1991)].

Cette étude a montré qu'une dose de 4 mg d'acide folique par jour, prise pendant une période proche de la conception, permettrait de réduire de 72 % la prévalance d'apparition de malformations du tube neural chez les enfants de femmes non

atteintes d'épilepsie et ayant eu antérieurement une grossesse avec malformation du tube neural.

Sur la base de cette étude, "l'United Centers for Disease Control in Atlanta" recommande l'administration de 4 mg d'acide folique par jour au moins quatre semaines avant, et pendant trois mois après la conception, chez les femmes ayant déjà présenté une grossesse avec malformation du tube neural [DANSKY- L et al (1992)].

D'autre part, WALTER-C et al (1992), supposent qu'une supplémentation systématique de 200 à 400 µg par jour pendant toute la durée de la grossesse apparaîtrait adéquate pour réduire très fortement le risque de grossesse présentant des malformations du tube neural dans la population générale.

Ainsi, nous pouvons espérer que, grâce à l'enrichissement de plus en plus fréquent des aliments en vitamine B₉ et à l'administration de spécialités polyvitaminées pendant la grossesse dans les pays industrialisés, la prévalance des malformations du tube neural tendra à diminuer encore dans les décennies à venir⁷.

IV-3-7- CARENCE EN ACIDE FOLIQUE ET DYSPLASIES CERVICALES.

Nous avons des raisons de penser qu'une carence en acide folique pourrait jouer un rôle dans un certain nombre de cancers, en particulier les cancers du col de l'uterus, du colon, des bronches et du système hématopoïétique [BUTTERWORTH-C.E et al (1992)].

⁷ La prévalance des malformations foetales du tube neural est actuellement de 2/1000 [WALTER- C et al (1992)].

Actuellement, les études se portent plutôt sur la relation : carence en acide folique / dysplasies cervicales pour trois raisons :

- ▶ l'incidence des dysplasies cervicales est élevée,
- ▶ une carence en acide folique est capable de modifier les caractéristiques cytologiques des muqueuses cervicales,
- ▶ les contraceptifs oraux, dont l'utilisation est très largement répandue, pourraient induire une carence en acide folique.

L'étiologie des dysplasies cervicales est encore mal connue mais il est désormais acquis que le tabac et une infection par le papillomavirus de type 16 sont des facteurs de risque importants quant à l'apparition d'une telle pathologie.

Or, une carence en acide folique pourrait favoriser l'infection par le virus HPV-16 [BUTTERWORTH- C.E et al (1992a et 1992b)].

L'acide folique (ou plutôt la carence en acide folique) jouerait donc le rôle de co-carcinogène durant la phase d'initialisation des dysplasies cervicales.

Lorsque la dysplasie est déclarée, un traitement par l'acide folique n'a pas montré d'amélioration dans l'évolution de cette pathologie.

Une étude menée par LASHNER- B.A et al (1989, 1990 et 1991) montre également que chez des patients atteints de colite ulcéraire chronique (donc chez qui les carences en folates sont fréquentes), les dysplasies cervicales sont fréquentes.

Une supplémentation en folates chez ces patients permet de réduire de près de 60% l'incidence des dysplasies par rapport à des témoins n'ayant reçu aucune supplémentation en vitamine B₉.

Dans cette étude, aucune donnée sur l'infection par le virus HPV-16 n'est fournie.

Bien que la relation carence en acide folique / dysplasie cervicale soit encore mal connue, il semblerait bien qu'une carence en acide folique soit un facteur de risque supplémentaire quant au développement de ce type de cancer.

Si les contraceptifs oraux sont capable d'entraîner une carence en folates, ne serait-il pas souhaitable de suivre le statut folique des femmes sous contraception orale, ou ne serait-il pas bon d'associer à la contraception orale une supplémentation systématique en acide folique adaptée en fonction des habitudes alimentaires (100 à 400 µg d'acide folique par jour associés aux contraceptifs oraux) ?

Pour ce qui est du suivi du statut en folates des femmes sous contraception orale, il faudrait être prudent car BUTTERWORTH- C.E et al (1992), avancent qu'une carence locale au niveau des muqueuses urogénitales pourrait survenir avant l'apparition d'une carence au niveau sérique. Cette carence locale en acide folique pourrait suffire à l'initialisation d'une dysplasie cervicale...

V- DOSAGE DE L'ACIDE FOLIQUE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES, L'ALIMENTATION ET LES SPECIALITES PHARMACEUTIQUES.

Le dosage de l'acide folique dans des milieux complexes tels que le sérum, les aliments ou les médicaments, est effectué à l'heure actuelle principalement selon trois types de techniques :

- ▶ le dosage microbiologique en utilisant des cultures de *Lactobacillus casei*, de *Streptococcus faecalis*, ou de *Pediococcus cerevisiae*,
- ▶ la Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.),
- ▶ le dosage radioimmunologique.

Nous verrons dans la partie expérimentale de ce travail la mise au point d'une méthode de dosage de l'acide folique par C.L.H.P, et la comparaison des résultats ainsi obtenus à ceux du dosage microbiologique. Ce sont donc ces deux méthodes que nous nous proposons de décrire ici.

Dans la plupart des cas, l'échantillon à analyser devra subir une étape de purification, voire de préconcentration, avant le dosage proprement dit [CAUDE- M et al (1989)] :

- ▶ filtration,
- ▶ digestion enzymatique,
- ▶ extraction liquide - liquide,
- ▶ extraction solide - liquide :
 - ◆ utilisant le phénomène de partage,
 - ◆ utilisant le phénomène d'échange d'ion.

Nous n'aborderons pas dans ce chapitre cette étape de préparation des échantillons qui doit être adaptée au cas par cas au produit analysé, pour ne nous attacher qu'aux techniques de dosage proprement dites.

V-1- LE DOSAGE MICROBIOLOGIQUE [ADRIAN- J et al (1959), GREGORY- J.F et al (1982), KEAGY- P.M et al (1986), NEWMAN- E.M et al (1986), TAMURA- T et al (1972)].

Par opposition aux méthodes physico-chimiques, la détermination microbiologique utilise la physiologie métabolique de micro-organismes déterminés (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis* ou *Pediococcus cerevisiae* dans le cas du dosage de l'acide folique).

Elle repose sur l'observation suivante : des espèces particulières de bactéries, de levures et de champignons, ne peuvent se développer qu'en présence d'une vitamine spécifique (acide folique par exemple).

Si l'on transfère, comme organisme test pour ces vitamines, de tels micro-organismes dans des bouillons de culture définis contenant tous les composants essentiels pour une croissance optimale à l'exception de la vitamine à déterminer, toute augmentation démontrable du germe cesse.

En revanche, si l'on ajoute la vitamine ou un substrat qui la contient, on peut constater le début d'une croissance qui dépend de la quantité de vitamine.

Cela permet de dénombrer la quantité de vitamine présente en mesurant la turbidité du milieu, fonction de la croissance du germe test.

Une préparation pure, d'une activité connue, mise en place parallèlement, sert d'étalon de référence.

La turbidité (% de transmission) est mesurée à 570 nm sous 1 cm (par exemple).

Pour ce qui est du dosage de l'acide folique dans les spécialités pharmaceutiques ou les MELANGES POLYVITAMINIQUES, les résultats obtenus sont traités grâce à un test statistique décrit par la Pharmacopée Française X^{ème} édition.

Les dosages microbiologiques ont l'avantage de permettre le dosage de quantités très faibles de vitamine (de l'ordre du nanogramme/ml), mais ont trois inconvénients majeurs :

- ▶ ils sont relativement longs puisqu'ils nécessitent un certain délai de culture,
- ▶ l'exactitude des résultats implique que l'on maîtrise parfaitement les divers paramètres dont peut dépendre le développement bactérien (pH du milieu, température, mutation ...) [CAUDE- M et al (1989)],
- ▶ on dose une activité vitaminique globale [NEWMAN- E.M et al (1986), TAMURA- T et al (1972)].

Ces inconvénients ont motivé la mise au point de nouvelles techniques de dosage de la vitamine B₉, notamment dans le domaine de la chromatographie liquide haute performance.

V-2-LE DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (C.L.H.P.).

Cette technique, de par sa plus grande souplesse, sa rapidité et sa plus grande précision par rapport aux méthodes microbiologiques, s'avère la méthode de choix pour le dosage de routine de l'acide folique dans les spécialités pharmaceutiques, les mélanges polyvitaminiques ou les produits diététiques.

La technique de C.L.H.P. la plus fréquemment décrite dans la littérature pour le dosage de l'acide folique est une technique chromatographique utilisant des colonnes à polarité de phase inversée mettant en jeu le phénomène de partage (soit "directement", soit après formation d'une paire d'ions entre l'acide folique et un "contre ion").

Le tableau II résume les conditions chromatographiques des quelques méthodes que nous avons répertoriées.

Parmi les méthodes décrites, certaines ont l'avantage de pouvoir séparer différents dérivés de l'acide folique (F ; THF ; DHF ; CH₃-THF ; CHO-THF) ce qui est particulièrement intéressant :

- ▶ dans le cas du dosage des folates alimentaires ou biologiques pour certaines études de diététique ou de pharmacologie,
- ▶ pour étudier la dégradation de l'acide folique présent dans une spécialité pharmaceutique (date de péremption),
- ▶ pour l'analyse de l'acide folique en tant que matière première,
- ▶ pour l'analyse de routine de spécialités à base de vitamine B₉ (on dose l'acide folique uniquement et non pas une activité vitaminique globale pouvant inclure certains produits de dégradation).

AUTEURS	PRE-COLONNE	COLONNE	λ (nm)	PHASE ELUANTE	DEBIT (ml/mn)	REMARQUES															
ALLEN- B.A. et NEWMAN- R.A. (1980)	7 x 0,2 cm Co : Pell ODS 25 - 37 μ m Whatmas, Clifton, N ₃ , USA	0,46 x 25 cm ODS 5 μ m Spectra Physics	285	<p style="text-align: center;"><u>Gradient :</u></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Temps</th> <th>% eau*</th> <th>% méthanol*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table> <p>* contenant 0,005 M de phosphate de tétrabutyl ammonium</p>	Temps	% eau*	% méthanol*	0	85	15	10	65	35	15	60	40	20	30	70		<p>Doage des folates dans le matériel biologique.</p> <p>Le sérum peut être injecté directement.</p> <p>Permet de séparer l'acide folique, le DHF, le THF, le 5- CH₃ THF, le 5- CHO THF.</p>
Temps	% eau*	% méthanol*																			
0	85	15																			
10	65	35																			
15	60	40																			
20	30	70																			
BRIGGS- D.R. et al (1982)	C ₁₈ Corasil 37 - 50 μ m	0,46 x 25 cm C18 (10 μ m)	280	<p>Méthanol : 28 %.</p> <p>Solution aqueuse 0,005 mole/l de phosphate de tétrabutyl ammonium : 72 %.</p>	1	<p>Dosage des folates dans l'alimentation</p> <p>Permet de séparer l'acide folique, le DHF, le THF, le 5- CH₃ THF, le 5- CHO THF, l'acide para aminobenzoylglutamique.</p>															
CAUDE- M. et ROSSET- R. (1989)	Précolonne SCX (silice greffée sulfonate)	0,41 x 15 cm PRP-1 5 μ m Hamilton, Touzart et Matignon	282	<p>Acétate de sodium 0,1 M, pH = 7,5 : 95 %.</p> <p>Méthanol : 5 %.</p>	1	<p>Dosage de l'acide folique dans les produits diététiques.</p> <p>Dosage de l'acide folique uniquement.</p>															
FAWAZ- M. et al (1988)	DEAE cellulose ou Sep Pak C ₁₈	0,46 x 15 cm C ₁₈ Novapak Waters	280	<p>Méthanol : 25 %.</p> <p>Solution aqueuse de phosphate de tétrabutyl ammonium ajustée à pH 6,5 par H₃PO₄ : 75 %</p>	1	<p>Devrait permettre le contrôle des folates dans les formes pharmaceutiques et leur dosage dans des échantillons biologiques.</p> <p>Permet de séparer l'acide folique, le DHF, le THF, le 5- CH₃ THF, le 5- CHO THF.</p>															

Tableau II : conditions chromatographiques de quelques méthodes de dosage de l'acide folique par C.L.H.P.

AUTEURS	PRE-COLONNE	COLONNE	λ (nm)	PHASE ELUANTE	DEBIT (ml/mn)	REMARQUES
JENKINS-C. (1982)	Pas de pré-colonne	μ -Bondapak C ₁₈ Waters Associates	280	Acide hexane sulfonique : 0,05 M. Acide acétique : 1 %. Méthanol : 20 %. Eau : 79 %.	1,3	Dosage de l'acide folique dans des préparations pharmaceutiques. Cette méthode permet de séparer six vitamines : acide folique, acide ascorbique, niacinamide, pyridoxine HCl, thiamine, riboflavine.
SCHIEFFER- G.W. et al (1984)	Pas de pré-colonne	μ -Bondapak C ₁₈ Waters Associates	365	Acétonitrile : 6 %. Solution aqueuse d'acétate de sodium 0,1 M ajustée à pH 5,7 : 94 %.	2	Dosage de l'acide folique dans les aliments.
TAFOLA- W.H. et al (1981)	Pas de pré-colonne	0,4 x 30 cm C ₁₈ (10 μ m)	280	Solution aqueuse à 40 % d'hydroxyde de tétrabutyl ammonium : 7,5 ml. Phosphate de potassium monobasique : 2,04 g. Acide phosphorique 3,0 N : 7,0 ml. Méthanol : 240 ml. Eau Q.S.P 1000 ml puis ajuster à pH 7,0 avec de l'acide phosphorique.	?	Dosage de l'acide folique dans des préparations pharmaceutiques.
TANI- M. et IWAI- K. (1983)	0,36 x 4 cm Lichrosorb PP-2 30 μ m Merk	0,36 x 15 cm Cosmosil 5-Ph 5 μ m Nakarai chemicals	280	Solution tampon de phosphate de potassium à 10 mmole/l pH 7,0 : 99 %. Méthanol : 1 %.	1	Dosage des folates dans les liquides physiologiques. Permet de séparer presque tous les types de folates physiologiques.

Tableau II : conditions chromatographiques de quelques méthodes de dosage de l'acide folique par C.L.H.P.

AUTEURS	PRE-COLONNE	COLONNE	λ (nm)	PHASE ELUANTE	DEBIT (ml/mn)	REMARQUES
VANDEMARK-F.L. et al (1981)	Pas de pré colonne	0,46 x 25 cm C ₈ (0 μ m) Perkin-Elmer RP-2	272	Gradient : la composition de la phase éluante reste assez floue.	2	Dosage de l'acide folique dans des préparations pharmaceutiques. Permet la séparation de sept vitamines : acide folique, acide ascorbique, niacine, niacinamide, pyridoxine, riboflavine, thiamine. Dosage de l'acide folique uniquement (ne permet pas la séparation des différents types de folates).
WEGNER-C. et al (1986)	0,46 x 4 cm Nucléosil C ₁₈ 5 μ m	0,46 x 25 cm Spherisorb ODS-2 (5 μ m)	280	Solution tampon de phosphate de potassium à 25 mmole/l pH 7,0 : 95 %. Méthanol : 5 %.	1	Dosage des folates dans le plasma par injection directe de celui-ci dans la pré-colonne. Permet de séparer l'acide folique, le DHF, le THF, le 5- CH ₃ THF, le 5- CHO THF.
WOOLARD- D.C. (1984)	Pas de pré-colonne	μ Bondapack C ₁₈ (10 μ m)	280	Diocylsulfosuccinate de sodium : 1g. Méthanol : 170 ml. Acide formique concentré : 10 ml. Eau Q.S.P 1000 ml puis ajuster à pH 2,5 avec une solution molaire d'hydroxyde de potassium.	1,5	Permet le dosage simultané des vitamines du groupe B dans des préparations pharmaceutiques. Dosage de l'acide folique uniquement (ne permet pas la séparation des différents types de folates).

Tableau II : conditions chromatographiques de quelques méthodes de dosage de l'acide folique par C.L.H.P.

Nous allons maintenant aborder plus précisément la mise au point d'une technique de dosage par C.L.H.P. de l'acide folique présent dans des MÉLANGES POLYVITAMINIQUES, ainsi que la comparaison des résultats obtenus à ceux du dosage par une méthode microbiologique classique.

B- MISE AU POINT
D'UNE METHODE DE
DOSAGE DE L'ACIDE
FOLIQUE PAR C.L.H.P.

VALIDATION DE LA
METHODE.

LABORATOIRES PRODUITS ROCHE.

Au sein des laboratoires PRODUITS ROCHE, le dosage de l'acide folique dans les spécialités ou les MELANGES POLYVITAMINIQUES est effectué par une méthode microbiologique en utilisant les souches de *Streptococcus faecalis* ou *Lactobacillus casei* [ADRIAN- J (1959)].

Cette méthode de dosage est très sensible puisqu'elle permet de doser des teneurs en acide folique allant de 5 à 20 ng/ml, mais elle a l'inconvénient d'être longue (plusieurs heures de préparation des échantillons) et, du fait du délai nécessaire au développement des micro-organismes, ne permet pas de rendre des résultats en urgence.

De plus, si cette méthode donne de bons résultats dans la plupart des cas, elle pose des problèmes lorsque les mélanges contiennent certains minéraux (fer notamment) et/ou certains excipients (maltodextrine, etc.), ce qui est parfois le cas dans les MELANGES POLYVITAMINIQUES. La raison de ces interférences n'est pas connue.

Il est donc intéressant d'envisager le dosage de l'acide folique par C.L.H.P dans les MELANGES POLYVITAMINIQUES, cette technique tendant à devenir une méthode d'analyse de choix dans l'industrie pharmaceutique.

Durant la mise au point de cette technique, nous devons nous appliquer à tout mettre en oeuvre pour que les trois points suivants soient respectés :

- ▶ la technique devra avoir une sensibilité suffisante pour permettre le dosage de l'acide folique dans l'ensemble des MELANGES POLYVITAMINIQUES commercialisés par les laboratoires PRODUITS ROCHE,
- ▶ le temps nécessaire au rendu des résultats devra être inférieur à celui du dosage microbiologique,
- ▶ enfin, cette méthode d'analyse devra permettre de doser l'acide folique quelle que soit la composition du MELANGE POLYVITAMINIQUE.

C'est sur ce dernier point en particulier qu'il faudra travailler puisque ces mélanges présentent de grandes variations quant à leur composition tant quantitative que qualitative.

Parmi les nombreuses publications concernant le dosage de l'acide folique par C.L.H.P [ALLEN- B.A et al (1980), BRIGGS- D.R et al (1982), CAUDE- C et al (1989), FAWAZ- M et al (1988), JENKINS- C (1982), SCHIEFFER- G.W et al (1984), TAFOLA- W.H et al (1981), TANI- M et al (1983), VANDEMARK- F.L et al (1981), WEGNER- C et al (1986), WOOLARD- D.C (1984)], nous avons choisi de nous inspirer d'une publication interne aux laboratoires PRODUITS ROCHE concernant le dosage de l'acide folique dans une spécialité polyvitaminique⁸.

En effet, dans un premier temps nous avons conservé les conditions chromatographiques de la méthode décrite tout en essayant d'adapter la technique d'extraction de l'acide folique à l'ensemble des MELANGES POLYVITAMINIQUES. Puis nous avons comparé les résultats obtenus par cette méthode à ceux obtenus avec la méthode microbiologique sur un échantillon de 53 MELANGES POLYVITAMINIQUES différents prélevés au hasard. Enfin, nous avons validé la méthode et étudié l'influence de deux paramètres (température de la colonne et pH de la phase éluante) sur la séparation chromatographique.

⁸ Pour des raisons de confidentialité, nous ne pouvons rendre public ce document.

I- MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'EXTRACTION DE L'ACIDE FOLIQUE PRESENT DANS LES MELANGES POLYVITAMINIQUES.

Comme nous l'avons déjà souligné, nous nous sommes largement inspiré d'une publication interne aux laboratoires PRODUITS ROCHE, mais nous allons décrire ici la méthode que nous avons utilisée, adaptée au matériel que nous possédons.

Il s'agit d'une technique de C.L.H.P. en phase inverse, basée sur les phénomènes de partage.

Cette méthode permet le dosage de l'acide folique jusqu'à la concentration de 2 µg/ml au moins⁹, ce qui est suffisant pour permettre son dosage dans l'ensemble des MELANGES POLYVITAMINIQUES que nous avons répertoriés (environ 160).

I-1- CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES¹⁰.

- ▶ Pompe Varian 9010 à débit constant associée à un injecteur automatique Varian 9100.
- ▶ Détecteur U.V Varian 9050 dont la longueur d'onde est fixée à 280 nm.

⁹ Nous verrons à la fin de cette étude qu'il sera même possible de doser l'acide folique jusqu'à des concentrations de l'ordre de 0,2 µg/ml.

¹⁰ Nous n'avons pas mentionné certaines précisions techniques pour des raisons de confidentialité.

ERRATUM

Page 92, chapitre I- 2- REACTIFS.

- ▶ Tétrahydrofurane Lichrosolv® Merck.
- ▶ Hydrogénophosphate de di-sodium dihydraté Merck.

- ▶ Pompe, passeur d'échantillons et détecteur sont pilotés par le logiciel STAR, sous WINDOWS. Ce logiciel assure également la fonction d'intégration.
- ▶ Colonne en C₈.
- ▶ Injecteur à boucle.
- ▶ Eluant : tétrahydrofurane - acétonitrile - solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H₃PO₄ concentré.
- ▶ Débit : 1ml/mn.
- ▶ Temps d'analyse : 20 minutes.

I-2- REACTIFS.

- ▶ Acide folique pur conforme à la Pharmacopée¹¹.
- ▶ Acétonitrile R.V Riedel - de Haën.
- ▶ Tétrahydrofurane de di-sodium dihydraté Merk.
- ▶ Dihydrogénophosphate de potassium Fluka.
- ▶ Acide orthophosphorique à 84 % R-P normapur[®] Prolabo.
- ▶ Acide ascorbique pur conforme à la Pharmacopée¹¹.
- ▶ Eau bidistillée.

¹¹ Pharmacopée Française X^{ème} édition.

I-3- PREPARATION DE LA SOLUTION TAMPON pH 7,4.

Dissoudre 35,6 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ et 5 g de KH_2PO_4 dans de l'eau bidistillée Q.S.P. 1000 ml.

I-4- PREPARATION DE LA SOLUTION D'ACIDE FOLIQUE DE REFERENCE.

Cette solution, dont la teneur en acide folique sera voisine de 4 $\mu\text{g/ml}$, est préparée extemporanément.

Dans une fiole jaugée brune¹² de 250 ml, pesez exactement une prise d'essai voisine de 100 mg d'acide folique de référence de teneur connue, et environ 100 mg d'acide ascorbique¹³. Ajoutez 220 ml de tampon pH 7,4¹⁴ et placez la fiole dans un bain à ultrasons pendant 20 mn en agitant de temps en temps.

Laissez refroidir, complétez au volume avec le même solvant et agitez vigoureusement au moins 30 secondes.

Prélevez 5 ml de cette solution et diluez-la au 1/10 avec le tampon pH 7,4 dans une fiole jaugée brune de 50 ml.

Faites une seconde dilution au 1/10 avec du tampon pH 7,4 contenant 0,2 % (m/v) d'acide ascorbique, toujours dans une fiole jaugée brune de 50 ml.

C'est la solution à injecter.

¹² L'acide folique est sensible à la lumière [ELMER de RITTER (1982)].

¹³ L'acide ascorbique est utilisé à titre d'antioxydant [FAWAZ- M et al (1988), TAFOLA-W.H et al (1981)].

¹⁴ c'est à un pH proche de la neutralité que l'acide folique est le plus stable [ELMER de RITTER (1982), TAFOLA- W.H et al (1981)].

I-5- PREPARATION DES ECHANTILLONS A ANALYSER.

Ayant préparé une solution témoin d'acide folique pur à 4 µg/ml, il faudra que la solution finale préparée à partir des MELANGES POLYVITAMINIQUES ait une concentration en acide folique voisine de 4 µg/ml.

L'analyse de l'ensemble des MELANGES POLYVITAMINIQUES fabriqués par les laboratoires PRODUITS ROCHE nous permet de constater que la teneur en acide folique de ces mélanges varie de 0,1 à 20 mg par gramme de mélange (nous avons répertorié environ 160 MELANGES POLYVITAMINIQUES).

Nous prélèverons donc une prise d'essai de mélange comprise entre 1 et 4 mg que nous mettrons dans une fiole jaugée brune de 100 ml.

Les critères de choix de la solution permettant la dissolution de l'acide folique sont indiqués ci-après.

Si cela est nécessaire, une dilution sera ensuite effectuée de façon à amener la solution finale à une teneur en vitamine B₉ voisine de 4 µg/ml.

I-5-1- CHOIX DE LA SOLUTION PERMETTANT LA DISSOLUTION DE L'ACIDE FOLIQUE PRESENT DANS UN MELANGE POLYVITAMINIQUE.

L'acide folique est très faiblement soluble dans l'eau¹⁵.

Dans leur publication interne, les laboratoires PRODUITS ROCHE nous proposent de reprendre la prise d'essai d'échantillon par de l'eau, puis d'effectuer une dilution dans de l'eau additionnée de KOH plus la solution pH 7,4.

¹⁵ La solubilité de l'acide folique dans l'eau à 25° C = 1,6 µg/ml (Merk Index).

Mais cette façon de procéder pose 3 problèmes :

- ▶ Lors de la reprise de l'échantillon de MELANGE POLYVITAMINIQUE par de l'eau, l'acide folique n'est pas totalement dissous : une grande partie reste en suspension et le facteur "homogénéité de la suspension" pourra nuire à la reproductibilité du dosage.
- ▶ Certains MELANGES POLYVITAMINIQUES ayant une teneur très faible en acide folique (inférieure à 0,4 mg/g), il ne sera pas nécessaire de les diluer et il faudra donc traiter ces mélanges d'une façon différente des autres, ce qui multiplie les manipulations.
- ▶ Le fait de manipuler plusieurs solvants différents complique le dosage et nuit à la rapidité de son exécution.

Nous avons donc choisi, comme pour la préparation de la solution témoin, d'essayer de reprendre la prise d'essai d'échantillon par la solution tampon pH, 7,4 (dans ce tampon, la solubilité de l'acide folique est supérieure à 0,5 mg/ml à 25°C). Les résultats du dosage sur plusieurs mélanges, en procédant de cette façon, ont été concluants (% de récupération compris entre 95 et 105 %).

La plupart des MELANGES POLYVITAMINIQUES contiennent déjà de l'acide ascorbique qui fait office de protecteur d'oxydation mais certains n'en contiennent pas.

Pour simplifier les manipulations, nous ajouterons donc dans la solution tampon pH 7,4 de l'acide ascorbique à raison de 0,2 % (m/v).

Dans la suite de cette étude, nous désignerons cette solution par "solution A".

Si une dilution doit être effectuée, elle sera réalisée avec cette solution A.

Pour faciliter la dissolution de l'acide folique, et pour être assuré que cette dissolution est bien complète, nous préconisons de mettre la fiole jaugée

de 100 ml contenant la prise d'essai de MELANGE POLYVITAMINIQUE plus la solution A dans un bain à ultrasons pendant 20 mn.

Dans ces conditions, le résultat du dosage de certains MELANGES POLYVITAMINIQUES est bon (% de récupération compris entre 95 et 105 %), mais environ 20 % des mélanges donnent des résultats aberrants (% de récupération < 80 %).

I-5-2- ELEMENTS PERTURBATEURS DU DOSAGE : LES MINERAUX.

Une étude des différents mélanges nous a permis de constater que les MELANGES POLYVITAMINIQUES intégrant des minéraux dans leur composition représentaient le groupe des mélanges dont la teneur retrouvée en acide folique était faible.

Ceci peut s'expliquer par deux mécanismes que nous avons découverts dans la littérature [ELMER de RITTER (1982), JENKINS- J (1982), TAFOLA- W.H et al (1981)] :

- ▶ certains ions métalliques (en particulier Cu^{2+} et Fe^{2+}) catalysent la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique en présence d'oxygène. Or, si l'acide ascorbique lui-même est bien protecteur d'oxydation de l'acide folique, la dégradation oxydative de l'acide ascorbique donne naissance à des dérivés tel que l'acide oxalique qui est un puissant réducteur pouvant dégrader l'acide folique,
- ▶ les ions métalliques, par leur propriété de catalyseur des réactions d'oxydation, peuvent être responsables de la dégradation de l'acide folique.

Pour éviter l'action de ces ions métalliques, nous avons choisi de les complexer avec de l' EDTA disodique que nous avons rajouté à la prise d'essai

d'échantillon à raison d'une mole d'EDTA disodique par mole d'ion métallique présent.

Les résultats obtenus dans ces conditions sont répertoriés dans le tableau III (tous les mélanges analysés contiennent des minéraux).

La complexation des ions métalliques présents en solution est bénéfique dans la plupart des cas mais trois mélanges font exception à cette règle et l'ajout d'EDTA est même contre indiqué dans ce cas.

Pour le mélange n° 44, nous ne pouvons expliquer ce phénomène car sa composition est proche de celle des autres mélanges.

En revanche, les mélanges n° 38 et 39 contiennent du fer réduit (Fe^0), ce qui n'est pas le cas des autres mélanges.

Pour ces mélanges, les résultats obtenus sont très mauvais et nous pensons que le fort pouvoir réducteur du fer réduit (Fe^0) entraîne la dégradation de l'acide folique.

La seule méthode chimique que nous connaissons pour éliminer ce fer réduit consisterait à se placer en milieu acide fort, ce qui entraînerait sa dissolution sous forme de Fe^{2+} mais cette façon de procéder serait néfaste pour l'acide folique qui serait dégradé.

Nous avons donc pensé à retirer le fer par une méthode physique en le capturant à l'aide d'une baguette aimantée.

Les résultats des dosages ainsi obtenus sont présentés dans le tableau n° IV.

Cette façon de procéder permet d'obtenir des résultats acceptables et bien meilleurs que ceux obtenus lors d'un dosage microbiologique, comme le confirme le tableau n° V.

n° mélange	EDTA rajouté	Pourcentage de récupération
41	non	30,5 %
41	oui	99,5 %
42	non	58,7 %
42	oui	81,5 %
38	non	81,5 %
38	oui	5,2 %
39	non	70,5 %
39	oui	20,2 %
44	non	105,9 %
44	oui	84,9 %
43	non	93,9 %
43	oui	98,3 %
46	non	83,6 %
46	oui	92,4 %
45	non	96,2 %
45	oui	100,8 %
47	non	4,4 %
47	oui	92,8 %

Tableau III : résultats du dosage de l'acide folique dans 9 MELANGES POLYVITAMINIQUES différents, avec ou sans ajout d' EDTA. Calcul du pourcentage de récupération obtenu dans chaque cas.

n° du mélange	fer réduit retiré à l'aide d'une baguette aimantée	pourcentage de récupération
38	non	74,6 %
38	oui	93,2 %
39	non	70,5 %
39	oui	81,5 %

Tableau IV : résultat du dosage de l'acide folique dans des MELANGES POLYVITAMINIQUES contenant du fer réduit (Fe^0), après avoir retiré le fer à l'aide d'une baguette aimantée.

	Pourcentage de récupération	
	C L H P	MICROBIOLOGIE
Mélange n° 37a	87,2 %	< 85 %
Mélange n° 37b	89,2 %	< 85 %
Mélange n° 38	93,2 %	88,0 %
Mélange n° 39a	90,2 %	< 85 %
Mélange n° 39b	95,2 %	< 85 %
Mélange n° 40	93,9 %	94,6 %

Tableau V : dosage de l'acide folique dans les MELANGES POLYVITAMINIQUES contenant du fer réduit. Comparaison du dosage par C.L.H.P. et par la méthode Microbiologique.

Cette étude nous permet de dire qu'il n'est pas possible de traiter tous les MELANGES POLYVITAMINIQUES de la même manière.

Nous devons donc classer ces MELANGES POLYVITAMINIQUES en trois groupes, la méthode de préparation des échantillons pour chacun de ces trois groupes étant légèrement différente :

- ▶ Groupe A : MELANGES POLYVITAMINIQUES contenant de l'acide folique, des vitamines, avec ou sans fer¹⁶ (autre que sous forme de fer réduit), avec ou sans iode. Les mélanges de ce groupe sont traités selon une méthode "classique".
- ▶ Groupe B : MELANGES POLYVITAMINIQUES contenant de l'acide folique, des vitamines, du fer réduit, avec ou sans iode. le fer réduit devra être retiré à l'aide d'une baguette aimantée.
- ▶ Groupe C : MELANGES POLYVITAMINIQUES contenant de l'acide folique, des minéraux autre que du fer, avec ou sans fer autre que sous forme de fer réduit, avec ou sans iode. Dans ce cas, il faudra rajouter de l' EDTA disodique si nécessaire.

¹⁶ Le groupe A comprend les mélanges contenant du fer sous forme de lactate ferreux, fumarate ferreux ou sulfate de fer car il a été remarqué que le fer sous cette forme n'influençait pas sur les résultats du dosage. Seul le fer réduit est néfaste au dosage.



I-5-3- PREPARATION DES ECHANTILLONS A ANALYSER PROPREMENT DITE.

La teneur en acide folique des MELANGES POLYVITAMINIQUES doit être supérieure à 0,1 mg par gramme de mélange.

I-5-3-1- Préparation des échantillons du groupe A.

Ces mélanges peuvent contenir :

- ▶ de l'acide folique,
- ▶ des vitamines,
- ▶ du fer autre que sous forme de fer réduit,
- ▶ de l'iode,
- ▶ un excipient : lactose, glucose, maltodextrine, amidon,
- ▶ de la taurine,
- ▶ du β carotène.

Dans une fiole jaugée brune de 100 ml, pesez une prise d'essai de MELANGE POLYVITAMINIQUE comprise entre 1 et 3 grammes, de manière à ce que la teneur en acide folique de cette prise d'essai soit supérieure à 0,3 mg.

Attention : tenir compte à ce niveau de la dilution qu'il y aura peut-être à effectuer (voir ci-après).

Ajoutez 80 ml de solution A¹⁷ et placez les fioles dans un bain à ultra-sons pendant 20 minutes en agitant de temps en temps.

¹⁷ Rappel : solution A = tampon phosphate pH 7,4 + acide ascorbique à raison de 0,2 % (m/v).

Laissez refroidir et compléter à 100 ml avec le même solvant. Agitez vigoureusement les fioles pendant 30 secondes. Filtrez sur un filtre 0,45 μm (Millipore par exemple).

Si nécessaire, effectuez une dilution de la solution obtenue de manière à amener l'acide folique à une concentration comprise entre 3 et 5 $\mu\text{g/ml}$. Cette dilution sera effectuée avec la solution A.

C'est la solution à injecter.

I-5-3-2- Préparation des échantillons du groupe B.

Il s'agit des mélanges contenant du fer réduit.

Nous les traiterons exactement de la même manière que les échantillons du groupe A, mis à part qu'il faudra retirer la totalité du fer réduit à l'aide d'une baguette aimantée avant le passage dans le bain à ultra-sons :

- ▶ dans une fiole jaugée brune de 100 ml, pesez la prise d'essai de mélange requise,
- ▶ ajoutez 20 ml de tampon pH 7,4 et plongez immédiatement la baguette aimantée dans la fiole,
- ▶ agitez légèrement la fiole et rincez la baguette aimantée avec 20 ml de solution A (ces 20 ml sont récupérés dans la fiole), essuyez la baguette aimantée,
- ▶ répétez l'opération une seconde, puis une troisième fois,
- ▶ portez aux ultra-sons, filtrez, diluez si nécessaire comme indiqué au paragraphe I-5-3-1.

I-5-3-3- Préparation des échantillons du groupe C.

Il s'agit des mélanges contenant des minéraux autres que du fer¹⁸.

Pour certains échantillons de ce groupe, il est nécessaire d'ajouter une certaine quantité d'EDTA disodique à la prise d'essai de l'échantillon.

Cette quantité d'EDTA disodique à rajouter sera calculée en fonction du nombre de moles de minéraux que l'on apportera avec la prise d'essai.

Il faut apporter autant de moles d'EDTA disodique qu'il y a de moles de minéraux. Pour faciliter les calculs, voici les masses molaires des différents éléments rencontrés :

- ▶ Fe : 55,85 g/mole,
- ▶ Cu : 63,55 g/mole,
- ▶ Mn : 54,94 g/mole,
- ▶ Zn : 65,38 g/mole,
- ▶ Ca : 40,08 g/mole,
- ▶ Pantothenate de Ca : 476,54 g/mole,
- ▶ EDTA (sel disodique) : 372,94 g/mole.

La quantité d'EDTA (sel disodique) nécessaire est rajoutée dans la fiole au même moment que la prise d'essai de mélange puis l'échantillon est traité de la même manière que pour les échantillons du groupe A (voir paragraphe I-5-3-1).

Une fois cette mise au point terminée, nous allons comparer les résultats obtenus par cette technique de C.L.H.P. aux résultats obtenus grâce à la méthode microbiologique.

¹⁸ Ces mélanges peuvent contenir du fer mais celui-ci doit être accompagné d'autres minéraux.

II- COMPARAISON DES RESULTATS DU DOSAGE OBTENUS PAR C.L.H.P. AUX RESULTATS OBTENUS PAR LA METHODE MICROBIOLOGIQUE.

Cette étude a porté sur 53 MELANGES POLYVITAMINIQUES prélevés au hasard parmi les 160 que fabriquent les laboratoires PRODUITS ROCHE.

La technique de C.L.H.P. employée est celle décrite précédemment.

La technique de dosage microbiologique est une méthode classique, la souche de microorganisme-test utilisée étant une souche de *Streptococcus faecalis* [ADRIAN- J (1959)].

La composition qualitative de tous les mélanges étudiés est décrite en annexe I.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont reportés dans les tableaux VI à X.

Afin de vérifier l'influence potentielle de la nature de l'excipient (lactose pulvérisé, glucose anhydre ou maltodextrine glucidex 12) sur les résultats du dosage, nous avons classé les mélanges du groupe A en fonction du dit excipient.

Numéro du mélange	Teneur théorique en acide folique (mg/g)	DOSAGE PAR C.L.H.P.	DOSAGE MICROBIOLOGIQUE
		Pourcentage de récupération calculé à partir de la moyenne de trois dosages (%)	Pourcentage de récupération calculé à partir de la valeur du dosage indiquée sur le bulletin de contrôle du produit (%)
1	0,21	92,5	95,2
2	0,079	107,2	90,5
3	0,21	96,2	< 85
4	2,98	96	99,3
5	2,2	97,1	95,3
6	1,1	95,2	98,2
7	6,95	97,3	89,2
8	7,5	96,4	< 85
9	5,6	99,8	91,1
10	0,653	90,7	92,8
11	2	100,8	87
12	1,6	97,5	95,8
13	2	92,6	< 85
14	1,2	94,6	< 85
15	0,14	96,8	104,5

Tableau VI : comparaison du dosage de l'acide folique par C.L.H.P. et par une méthode MICROBIOLOGIQUE.

MELANGES POLYVITAMINIQUES du groupe A
(des vitamines, avec ou sans fer, avec ou sans iode).

EXCIPIENT = Maltodextrine

Numéro du mélange	Teneur théorique en acide folique (mg/g)	<u>DOSAGE PAR C.L.H.P.</u>	<u>DOSAGE MICROBIOLOGIQUE</u>
		Pourcentage de récupération calculé à partir de la moyenne de trois dosages	Pourcentage de récupération calculé à partir de la valeur du dosage indiquée sur le bulletin de contrôle du produit
16	0,12	100,3	91,7
17	0,2504	99,7	92,7
18	2,667	96,2	101,6
19	0,1307	90,3	106,3
20	0,1638	96,2	103,8
21	0,53	94,4	94,2
22	7,3875	97,8	93,5
23a	5,25	95,2	< 85
23b	5,25	95	< 85
24	0,05	111,4	115
25	1,625	96,6	97,3
26	9,176	91,8	< 85
27	0,21	98,6	92,4
28	0,9	97,4	97
29	2,667	98	98,2
30	0,39	96,7	100,5
31	0,2504	97,3	94,9

Tableau VII : comparaison du dosage de l'acide folique par C.L.H.P.
et par une méthode MICROBIOLOGIQUE.

MELANGES POLYVITAMINIQUES du groupe A
(des vitamines, avec ou sans fer, avec ou sans iode).

EXCIPIENT = Lactose Pulvérisé Codex.

Numéro du mélange	Teneur théorique en acide folique (mg/g)	<u>DOSAGE PAR C.L.H.P.</u>	<u>DOSAGE MICROBIOLOGIQUE</u>
		Pourcentage de récupération calculé à partir de la moyenne de trois dosages	Pourcentage de récupération calculé à partir de la valeur du dosage indiquée sur le bulletin de contrôle du produit
32a	12,5	100,5	101,6
32b	12,5	97,5	89,6
33	8,5	97,8	91,9
34	10	100,1	85,2
35	4,8	98,1	95,8
36*	1	94,1	< 85

Tableau VIII : comparaison du dosage de l'acide folique par C.L.H.P.
et par une méthode MICROBIOLOGIQUE.

MELANGES POLYVITAMINIQUES du groupe A
(des vitamines, avec ou sans fer, avec ou sans iode).

EXCIPIENT = Glucose Anhydre.

(* sauf mélange n° 36 : excipient = saccharose).

Numéro du mélange	Teneur théorique en acide folique (mg/g)	<u>DOSAGE PAR C.L.H.P.</u>	<u>DOSAGE MICROBIOLOGIQUE</u>
		Pourcentage de récupération calculé à partir de la moyenne de trois dosages	Pourcentage de récupération calculé à partir de la valeur du dosage indiquée sur le bulletin de contrôle du produit
37a	4,8	87,2	< 85
37b	4,8	89,2	< 85
38	9,32	93,2	88
39a	2	90,2	< 85
39b	2	95,2	< 85
40	5,6	93,9	94,6

Tableau IX : comparaison du dosage de l'acide folique par C.L.H.P.
et par une méthode MICROBIOLOGIQUE.

MELANGES POLYVITAMINIQUES du groupe B
(des vitamines, du fer réduit Fe⁰, avec ou sans iode).

Numéro du mélange	Teneur théorique en acide folique (mg/g)	<u>DOSAGE PAR C.L.H.P.</u>	<u>DOSAGE MICROBIOLOGIQUE</u>
		Pourcentage de récupération calculé à partir de la moyenne de trois dosages	Pourcentage de récupération calculé à partir de la valeur du dosage indiquée sur le bulletin de contrôle du produit
41	0,1	98,5	95,5
42a	0,24	91	95,4
42b	0,24	< 85	93,8
43	6,765	96,1	89
44a	0,88	106,1	89,8
44b	0,88	94,6	90,9
45	2,1	100,8	104,8
46	4	92,4	97,5
47	4	92,8	100

Tableau X : comparaison du dosage de l'acide folique par C.L.H.P.
et par une méthode MICROBIOLOGIQUE.

MELANGES POLYVITAMINIQUES du groupe C

(des vitamines, des minéraux divers, avec ou sans fer, avec ou sans iode).

L'analyse de ces résultats nous permet d'apporter deux types de conclusions :

- ▶ Pour la technique de dosage par CLHP, le type de support n'a pas d'influence significative sur la qualité du dosage.
- ▶ Le dosage de l'acide folique par CLHP donne globalement de meilleurs résultats que la méthode de dosage microbiologique, comme le montre le tableau XI.

	CLHP	Microbiologie
Pourcentage des mélanges dont la teneur en acide folique retrouvée est égale à la théorie +/- 15 %	98 %	77 %
Pourcentage des mélanges dont la teneur en acide folique retrouvée est égale à la théorie +/- 10 %	94 %	62 %

Tableau XI : comparaison du dosage de l'acide folique par la méthode Microbiologique et par la méthode chromatographique (C.L.H.P).

Non seulement cette méthode de dosage de l'acide folique par C.L.H.P permet le dosage de mélanges qui, par la méthode microbiologique, sont indosables suite à des interférences, mais elle est aussi plus précise.

En effet, parmi les mélanges dont la teneur en acide folique retrouvée est égale à la théorie +/- 15 %, 96 % des mélanges dosés par C.L.H.P entrent également dans la fourchette +/- 10 %, contre 80 % seulement lors du dosage microbiologique.

Ceci étant, nous pouvons procéder à la validation de la méthode de dosage de l'acide folique par C.L.H.P.

III- VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE DE L'ACIDE FOLIQUE PAR C.L.H.P.

III-1- CHROMATOGRAMMES OBTENUS.

Les chromatogrammes obtenus avec l'acide folique de référence et dans différents mélanges représentatifs de l'ensemble sont présentés en annexe II. La composition qualitative de ces mélanges est présentée en annexe I.

III-2- SPECIFICITE DE LA METHODE.

Etant donné le nombre de mélanges (nous en avons répertorié environ 160), et leurs grandes différences tant qualitatives que quantitatives, il est bien entendu impossible de recréer un "placebo" pour chaque mélange.

Nous avons donc choisi d'une part de passer dans les conditions de l'analyse tous les constituants que l'on a pu rencontrer dans les différents mélanges, et ce à une concentration égale au double de la concentration maximale à laquelle nous avons eu l'occasion de les rencontrer au cours des dosages, et d'autre part de reconstituer les "placebos" des mélanges n° 30, 32 et 37.

Les chromatogrammes ainsi obtenus sont présentés en annexe III.

Il s'agit des chromatogrammes obtenus avec : l'acide folique, le tampon pH 7,4, la vitamine B₁, la vitamine B₂, la vitamine B₆, la vitamine B₁₂, la vitamine PP, la vitamine C, le pantothénate de Ca, la vitamine A, la vitamine D₃, la vitamine E, la vitamine K, la biotine, la taurine, les excipients (glucose anhydre + lactose pulvérisé + maltodextrine + amidon de maïs), les minéraux (fumarate ferreux + lactate de fer + fer réduit + sulfate ferreux + gluconate de cuivre + sulfate de cuivre + sulfate de zinc + sulfate de manganèse + carbonate de calcium + iodure de potassium). Les concentrations utilisées de chacun de ces composés sont indiquées sur les chromatogrammes.

De tous les produits analysés, seulement deux pourraient présenter une interférence avec le dosage de l'acide folique :

- ▶ une impureté de la vitamine PP dont le pic sort avant celui de l'acide folique,
- ▶ la vitamine B₂ dont le pic sort juste après celui de l'acide folique.

Afin de calculer la résolution entre ces différents pics, ce qui nous permettra d'apprécier correctement la séparation chromatographique, nous avons réalisé les chromatogrammes respectivement d'acide folique + vitamine PP et d'acide folique + vitamine B₂.

Les chromatogrammes obtenus sont présentés en annexe IV, ainsi que le détail du calcul de la résolution entre ces pics :

- ▶ la résolution entre le pic de vitamine B₉ et celui de l'impureté de la vitamine PP est égale à 2,04,
- ▶ la résolution entre le pic de vitamine B₉ et celui de la vitamine B₂ est égale à 2,36.

Dans les deux cas, la résolution est supérieure à 1,5, ce qui est considéré comme bon.

Il est à noter que la vitamine B₂ présente une impureté dont le temps de rétention est égal à celui de l'acide folique. La surface de ce pic par rapport au pic d'acide folique étant de l'ordre de 1,5 % dans le pire des cas, et le nombre de MELANGES POLYVITAMINIQUES ayant un rapport vitamine B₂ / vitamine B₉ élevé étant inférieur à 5 %, nous avons dans un premier temps considéré cette interférence comme négligeable et continué la validation.

Nous verrons dans le chapitre IV comment éliminer totalement cette interférence grâce à la modification de certains paramètres chromatographiques.

III-3- LINEARITE DE LA METHODE EFFECTUEE SUR UNE SOLUTION D'ACIDE FOLIQUE PUR.

Une gamme d'étalonnage en cinq points est réalisée, chaque point représentant deux mesures.

L'équation de la droite a été calculée par la méthode des moindres carrés. Elle est de la forme $y = ax + b$, "a" représente la pente, "b" l'ordonnée à l'origine, "y" la surface du pic et "x" la concentration en acide folique.

Le coefficient de corrélation "r" a été calculé, de même que le coefficient de variation du facteur de réponse, c'est à dire le rapport surface des pics / concentration.

Ces quatre paramètres sont présentés dans le tableau XII. La droite de régression linéaire est présentée en annexe V.

Droite de régression [surface du pic = f (concentration en acide folique)]	Coefficient de corrélation (r)	Coefficient de variation du facteur de réponse	F- Test F (0,95 - 3 - 5)	
			F	F'
$y = 29620 x - 945,8$	0,9999	1,08 %	5,41	1,05

Tableau XII : étude de la linéarité de la méthode sur une solution d'acide folique pur.

Le coefficient de corrélation est supérieur à 0,99 ; F' est inférieur à F : la linéarité est donc bonne.

III-4- REPETABILITE DE LA METHODE.

Le calcul du coefficient de variation a été effectué à partir de douze injections dans la même journée, d'une même solution de référence, sur le même appareil.

Le tableau XIII représente les coefficients de variation obtenus :

- ▶ pour la mesure du temps de rétention (Tr),
- ▶ pour la mesure de la surface des pics (S).

Coefficient de variation (%)	
Tr	S
0,49	0,52

Tableau XIII : étude de la répétabilité de la méthode sur la solution d'acide folique de référence.

Tr = temps de rétention.

S = surface des pics.

Les coefficients de variation ainsi obtenus sont nettement inférieurs à 5 % : la répétabilité de la méthode est bonne.

III-5- REPRODUCTIBILITE.

La reproductibilité de la méthode a été testée de deux manières différentes :

- ▶ D'une part nous avons étudié cette reproductibilité sur un mélange reconstitué sans l'acide folique ; nous avons rajouté ce dernier directement dans la fiole du dosage en quantité exactement pesée. Cette façon de procéder nous permet d'étudier la reproductibilité de la méthode sans tenir compte du facteur "homogénéité" du mélange.
- ▶ D'autre part, nous avons étudié la reproductibilité du dosage sur deux MELANGES POLYVITAMINIQUES différents représentatifs de l'ensemble des mélanges. Cette façon de procéder, plus proche de la réalité du dosage lorsqu'il sera effectué en routine, tient compte de l'homogénéité des mélanges.

III-5-1- REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE EFFECTUEE SUR UN MELANGE RECONSTITUE (MELANGE N° 32).

Pour déterminer la reproductibilité, douze analyses ont été réalisées, à raison de quatre analyses par jour, pendant trois jours consécutifs, avec deux appareils différents, et deux opérateurs différents (tableau XIV).

La reproductibilité obtenue pour le pourcentage de récupération est bonne (coefficient de variation inférieur à 5 %).

La reproductibilité obtenue sur le temps de rétention n'est pas très bonne.

Ceci peut s'expliquer par les légères variations de pH de la phase, de sa teneur en phase organique, des différences d'appareillage, et surtout des variations de température au niveau de la colonne.

Cette mauvaise reproductibilité du temps de rétention de l'acide folique n'est pas gênante, ni pour l'analyse, ni pour l'identification, puisque nous injectons une référence avant chaque solution à analyser.

Pourcentage de récupération moyen (%)	Temps de rétention moyen (minutes)	Coefficient de variation (%)	
		Temps de rétention	% de récupération
100,8	13,3	5,5	2,4

Tableau XIV : étude de la reproductibilité de la méthode sur un mélange reconstitué.
(MELANGE POLYVITAMINIQUE n° 32).

III-5-2- REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE EFFECTUEE SUR DEUX MELANGES POLYVITAMINIQUES PROVENANT DE LA PRODUCTION.

Les mélanges choisis, de par leur teneur en acide folique et leur composition, sont assez représentatifs de l'ensemble des MELANGES POLYVITAMINIQUES étudiés. Il s'agit des mélanges n° 11 et 44.

Dix analyses de chacun des deux mélanges ont été effectuées, pendant dix jours consécutifs, avec deux manipulateurs différents et deux types d'appareils différents. Le tableau XV présente les résultats obtenus.

Compte tenu du fait que l'acide folique est le produit présent dans les MELANGES POLYVITAMINIQUES dans les plus faibles proportions, nous pouvons considérer un coefficient de variation du pourcentage de récupération de l'ordre de 5 % comme correct.

Numéro des mélanges	Pourcentage de récupération moyen (%)	Temps de rétention moyen (minutes)	Coefficient de variation (%)	
			% de récupération	Temps de rétention
44	98	12,4	5,4	8,3
11	97,9	12,2	4,7	10

Tableau XV : étude de la reproductibilité de la méthode sur deux MELANGES POLYVITAMINIQUES issus de la production, représentatifs de l'ensemble des mélanges étudiés.
(MELANGES POLYVITAMINIQUES n° 11 et 44).

Les pourcentages de récupération moyen des mélanges n° 11 et 44 sont bons (ils sont supérieurs à 97,5 %).

Comme précédemment, la reproductibilité obtenue sur le temps de rétention n'est pas très bonne et nous en tirerons les mêmes conclusions qu'au chapitre précédent (chapitre III-5-1 page 114).

III-5-3- CONCLUSION.

Compte tenu de ces deux études de la reproductibilité, on peut considérer que la variation dans les résultats obtenus lors du dosage d'un MELANGE POLYVITAMINIQUE issus de la production est due :

- ▶ pour moitié à la méthode de dosage elle même,
- ▶ pour moitié à l'homogénéité du mélange.

Nous pourrions donc améliorer cette reproductibilité en prélevant une prise d'essai d'échantillon plus grande pour réaliser le dosage, mais cette façon de procéder présenterait deux inconvénients :

- ▶ Il faudrait effectuer la dilution de la prise d'essai dans un volume de solution A plus élevé mais :

- ♦ ceci augmenterait le coût de l'analyse,
 - ♦ les manipulations deviendraient plus difficiles lors du dosage d'une grande série de mélanges.
- Si l'on continuait à diluer la prise d'essai dans la même quantité de solution A (100 ml) :
- ♦ la dissolution de l'acide folique et des autres constituants du mélange risquerait d'être mauvaise,
 - ♦ la partie insoluble de la prise d'essai fausserait le dosage.

Devant ces inconvénients, et compte tenu du fait que nous considérons un coefficient de l'ordre de 5 % comme correct pour ce dosage, nous avons choisi de ne rien changer au protocole préalablement établi.

III-6- LINEARITE ET POURCENTAGE DE RECUPERATION EFFECTUES SUR DEUX MELANGES RECONSTITUES (MP N° 32 ET 37).

Ces deux mélanges, dont la composition qualitative est décrite en annexe I, sont reconstitués sans incorporation de l'acide folique.

Une certaine quantité de poudre ainsi obtenue (voir chapitre I-5-3 "préparation des échantillons à analyser proprement dite") est préalablement pesée et introduite dans des fioles brunes de 100 ml.

L'acide folique, exactement pesé, est ensuite incorporé au mélange, directement dans la fiole.

Le tout est homogénéisé et laissé en contact une heure avant dissolution.

Pour chaque mélange, une gamme d'étalonnage en cinq points est réalisée, chaque point représentant trois mesures.

Pour l'évaluation de la linéarité, nous avons procédé exactement comme dans le chapitre III-3 "Linéarité effectuée sur une solution d'acide folique pur".

Les équations des droites de régression linéaire, les coefficients de corrélation, coefficients de variation du facteur de réponse et résultats du F-TEST sont présentés dans le tableau XV.

Les droites de régression linéaires sont présentées en annexe VI.

numéro du mélange	Droite de régression qt retrouvée (mg) = f [qt mise (mg)]	coefficient de corrélation (r)	coefficient de variation du facteur de réponse (%)	F- Test F (95 ; 3 ; 10)	
				F	F'
37	$y = 0,88x + 1,56$	0,9983	3,39	4,46	0,02
32	$y = 0,98x + 0,15$	0,9993	0,69	3,71	1,04

Tableau XV : étude de la linéarité de la méthode effectuée sur deux MELANGES POLYVITAMINIQUES reconstitués (mélanges n° 32 et 37).

Pour chaque point, nous avons également calculé le pourcentage de récupération.

Le pourcentage de récupération moyen, ainsi que le coefficient de variation du pourcentage de récupération sont présentés dans le tableau XVI.

Ces paramètres permettent l'étude de la répétabilité de la procédure.

Numéro du mélange	Pourcentage de récupération moyen (%)	Coefficient de variation du pourcentage de récupération (%)
37	95,6	1,56
32	98,8	0,55

Tableau XVI : étude du pourcentage de récupération sur deux MELANGES POLYVITAMINIQUES reconstitués (répétabilité de la procédure).

Pour le mélange n° 32, la linéarité est bonne, ainsi que la répétabilité de la procédure.

Pour le mélange n° 37, la linéarité est bonne, mais la répétabilité de la procédure n'est pas très bonne (pourcentage de récupération moyen inférieur à 97,5 %).

Nous pouvons expliquer ceci par la manipulation supplémentaire qui consiste à retirer le fer réduit présent dans ce mélange grâce à une baguette aimantée :

- ▶ ce faisant, on enlève également une petite quantité d'acide folique,
- ▶ les traces de fer réduit qui restent en solution entraînent la dégradation d'une faible quantité d'acide folique.

Cependant, l'étude menée en parallèle avec le service de microbiologie nous permet de montrer que pour les MELANGES POLYVITAMINIQUES contenant du fer réduit, le dosage de l'acide folique par C.L.H.P. donne de meilleurs résultats que le dosage microbiologique (voir tableau IX page 107).

III-7- LIMITE DE DETECTION.

Elle a été estimée par l'évaluation du rapport signal / bruit, qui a été choisi comme devant être supérieur ou égal à trois.

Les résultats sont présentés dans le tableau XVII, exprimés en concentration molaire, en mg/l et en quantité absolue injectée.

Concentration (moles / l)	Concentration (ng / ml)	Quantité injectée (ng)
$2,76 \cdot 10^{-8}$	12,2	0,244

Tableau XVII : limite de détection de l'acide folique.

III-8- CONCLUSION.

La méthode proposée permet donc de doser l'acide folique dans la plupart des MELANGES POLYVITAMINIQUES. Mais nous avons vu lors de l'étude de la sélectivité de la méthode qu'une impureté de la riboflavine, dont le temps de rétention est très proche de celui de l'acide folique, pouvait être gênante pour les MELANGES POLYVITAMINIQUES dont le rapport riboflavine / acide folique est élevé.

Nous avons donc cherché à modifier certains paramètres chromatographiques de manière à améliorer la séparation entre l'acide folique et cette impureté de la riboflavine, et nous allons plus particulièrement nous intéresser à l'influence de la température de la colonne et du pH de la phase éluante sur cette séparation.

IV- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE LA COLONNE ET DU pH DE LA PHASE ELUANTE SUR LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE.

Pour modifier la séparation entre l'impureté de la riboflavine et l'acide folique, nous avons le choix entre plusieurs solutions qui consistent à modifier :

- ▶ la température de la colonne,
- ▶ le pH de la phase mobile,
- ▶ la polarité de la phase mobile,
- ▶ le débit de la phase mobile,
- ▶ le type de la colonne.

L'analyse des résultats obtenus lors des manipulations précédentes nous a orienté sur le choix des paramètres à modifier pour améliorer cette séparation chromatographique.

Nous allons donc étudier l'influence de la température de la colonne et du pH de la phase éluante sur la séparation chromatographique.

IV-1- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE LA COLONNE SUR LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE ENTRE L'ACIDE FOLIQUE, LA RIBOFLAVINE ET SON IMPURETE, ET UNE IMPURETE DE LA VITAMINE PP.

Tous les essais précédents ont été réalisés à température ambiante, c'est à dire entre 18 et 25° C.

Or nous avons remarqué que la résolution entre les pics d'acide folique et de riboflavine était meilleure à 25° C qu'à 18° C.

La résolution entre ces deux pics semble donc augmenter avec la température.

Nous avons donc placé la colonne dans un four successivement à 25, 30 et 40° C, et effectué différentes analyses avec l'acide folique et de la riboflavine.

Les résultats sont les suivants :

- ▶ à 25° C, la résolution entre le pic correspondant à l'impureté de la riboflavine et l'acide folique est améliorée par rapport à celle obtenue à 20° C mais n'est pas suffisante ($R = 1,3$). Les chromatogrammes obtenus respectivement avec l'acide folique à 20 et 25° C, la riboflavine à 20 et 25° C, et le mélange de ces deux vitamines à 20 et 25° C sont présentés en annexe VII, ainsi que le détail du calcul de la résolution entre ces différents pics à 25° C.

- ▶ à 30 et 40° C, le temps de rétention de l'acide folique devient trop faible et les chromatogrammes obtenus sont de mauvaise qualité. Il n'est donc pas envisageable de travailler à ces températures.

Le seul autre produit ayant un temps de rétention proche de celui de l'acide folique étant une impureté de la vitamine PP, nous avons également étudié la séparation entre les pics de cette impureté et d'acide folique à 25° C : à cette température, le temps de rétention de l'impureté de la vitamine PP devient quasiment égal à celui de l'acide folique.

Les chromatogrammes obtenus respectivement avec l'acide folique à 20 et 25° C, la vitamine PP à 20 et 25° C, et le mélange de ces deux vitamines à 20 et 25° C sont présentés en annexe VII.

La seule modification de la température ne suffit donc pas à améliorer la séparation entre les vitamines B₉, B₂ et PP : si, à 25° C, la séparation entre les vitamines B₉ et la vitamine B₂ est nettement améliorée par rapport à celle obtenue à 20° C, il apparaît en revanche une interférence entre une impureté de la vitamine PP et la vitamine B₉.

Cette étude nous permet de montrer que la température de la colonne doit être assez rigoureusement fixée si l'on veut que la séparation soit reproductible.

Nous avons choisi, pour la suite de notre étude, de thermostatier la colonne à 25° C.

IV-2- INFLUENCE DU PH DE LA PHASE ELUANTE SUR LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE ENTRE L'ACIDE FOLIQUE, LA RIBOFLAVINE ET SON IMPURETE, ET UNE IMPURETE DE LA VITAMINE PP.

Comme pour l'étude précédente, c'est l'analyse des résultats obtenus précédemment et la mesure régulière du pH de la phase éluante qui nous ont permis de nous rendre compte que de petites variations de pH (de l'ordre de +/- 0,2 unités pH), pouvaient avoir une influence sur la séparation chromatographique.

Nous avons donc étudié plus précisément l'influence du pH de la phase éluante en commençant par l'analyse :

- ▶ d'une part du chromatogramme obtenu avec la référence d'acide folique.
- ▶ d'autre part avec un mélange de six vitamines, mélange dont la composition est donnée ci-dessous :
 - ◆ vitamine B₁ (thiamine HCl) : 25 mg,
 - ◆ vitamine B₂ (riboflavine base) : 20 mg,
 - ◆ vitamine B₆ (pyridoxine HCl) : 45 mg,
 - ◆ vitamine B₁₂ 0,1 % w/s : 125 mg,
 - ◆ vitamine PP (amide nicotinique) : 60 mg,
 - ◆ vitamine C (acide ascorbique cristallisé) : 3,0 g,
 - ◆ solution A Q.S.P 100 ml.

La concentration de chaque vitamine correspond au double de la concentration maximale rencontrée lors des dosages.

Nous avons choisi de n'étudier que ces six vitamines car ce sont les seules qui présentent une absorption dans les conditions de l'analyse (voir annexe III).

Cette étude a été menée pour des pH de la phase éluante respectivement de 3,5 ; 3,3 et 3,1.

Les chromatogrammes obtenus lors de cette étude sont présentés en annexe VIII.

Les résultats de cette étude sont les suivants :

- ▶ Le temps de rétention de l'acide folique diminue légèrement lorsque le pH augmente :
 - ♦ pH = 3,1 : Tr = 10,9 minutes,
 - ♦ pH = 3,3 : Tr = 10,5 minutes,
 - ♦ pH = 3,5 : Tr = 9,3 minutes.

Le temps de rétention de la riboflavine et de son impureté ne varie pratiquement pas avec le pH (Tr impureté de B₂ = 11,5 minutes).

La résolution entre le pic d'acide folique et la riboflavine est donc d'autant meilleure que le pH augmente.

- ▶ A pH 3,5 : aucun pic significatif n'apparaît au niveau de la sortie du pic d'acide folique. Cette petite augmentation du pH (par rapport à pH = 3,3) modifie donc de façon positive le temps de rétention de l'impureté de la vitamine PP.
- ▶ Aux pH 3,3 et 3,1 : un petit pic apparaît au niveau de la sortie du pic de l'acide folique.

Il semblerait donc que l'ajustement à pH 3,5 de la phase éluante, et ce pour une température de la colonne égale à 25° C, permette de lever les interférences dues d'une part à l'impureté de la vitamine PP, et d'autre part à l'impureté de la riboflavine.

Pour vérifier ceci, nous allons étudier la spécificité de la méthode en ajustant le pH de la phase éluante à 3,5, et en thermostatant la colonne à 25° C.

IV-3- SPECIFICITE DE LA METHODE, LA PHASE ELUANTE ETANT AJUSTEE A pH = 3,5, LA COLONNE ETANT MAIN- TENUE A 25° C.

Cette étude a été menée de la même manière que cela est décrit au chapitre III-2- page 110, mais n'a porté que sur les vitamines présentant une absorbance dans les conditions de l'analyse, c'est à dire les vitamines B₁, B₂, B₆, B₉, B₁₂, PP et C ainsi qu'avec le "placebo" du mélange n° 32.

Les chromatogrammes obtenus lors de cette étude sont présentés en annexe IX.

Les résultats de cette étude sont les suivants :

- ▶ Comme nous l'avons vu précédemment, lorsque le pH de la phase éluante est égal à 3,3, le temps de rétention de l'impureté de la vitamine PP est égal à celui de l'acide folique.
A pH 3,5, le temps de rétention de l'impureté la vitamine PP devient supérieur à celui de l'acide folique : il n'y a plus d'interférence entre ces deux vitamines (le pic correspondant à l'impureté de la vitamine PP sort au même niveau que le pic de riboflavine).
- ▶ La résolution entre le pic d'acide folique et le pic correspondant à l'impureté de la riboflavine est bonne: $R = 2,8$.
- ▶ Nous nous apercevons que la vitamine B₆ a un temps de rétention assez long (nous l'avons évalué à 30 minutes environ).
Or l'analyse ne durant que 20 minutes, on la voit apparaître sur le second chromatogramme suivant son injection ... au niveau de la

sortie du pic d'acide folique !

Il faut donc rallonger le temps d'analyse pour faire disparaître cette interférence.

Nous pensons qu'il n'est pas nécessaire d'attendre la sortie du pic de vitamine B₆ pour déclencher une nouvelle injection et nous préconisons donc un temps d'analyse de 25 minutes, ce qui permettra à la vitamine B₆ de sortir avec les autres vitamines dans les 7 premières minutes de l'analyse.

- Les autres vitamines ont un temps de rétention inférieur à 7 minutes et ne donnent aucune interférence avec l'acide folique.

Avec ces nouvelles conditions de pH de la phase mobile (pH = 3,5), de température de colonne ($t^{\circ} = 25^{\circ} \text{C}$), et de temps d'analyse ($t = 25$ minutes), nous avons donc amélioré la spécificité de la méthode par rapport aux conditions précédentes, c'est à dire la colonne étant laissée à température ambiante, le pH de la phase étant égal à 3,3, et le temps d'analyse fixé à 20 minutes.

Cela étant, le dosage et l'identification de l'acide folique deviennent possible dans tous les MELANGES POLYVITAMINIQUES dont la teneur en acide folique est supérieure ou égale à 0,1 mg / g de mélange.

Les paramètres modifiés ne devraient pas influencer sur la linéarité, la répétabilité, la reproductibilité de la méthode.

Cependant en toute rigueur, la validation de la méthode devra être refaite si nous voulons employer ces nouvelles conditions chromatographiques.

V- CONCLUSION.

La méthode proposée permet d'identifier sélectivement et de doser l'acide folique dans les MELANGES POLYVITAMINIQUES et ce pour des teneurs en acide folique supérieures ou égales à 0,1 mg / g de mélange.

Certains mélanges pouvant présenter des teneurs en acide folique inférieures à la valeur précédemment citée, nous avons étudié la linéarité de la méthode pour des concentrations en acide folique variant de 20 à 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ainsi que la répétabilité de la méthode sur une solution d'acide folique pur à 40 ng/ml de tampon phosphate $\text{pH} = 7,4 + 0,2\%$ vitamine C (m/v).

Les résultats de cette étude sont présentés en annexe X.

Dans ces conditions, linéarité et reproductibilité donnent de bons résultats, ce qui permet d'envisager le dosage de l'acide folique dans les MELANGES POLYVITAMINIQUES jusqu'à des teneurs de 10 μg d'acide folique par gramme de mélange.

La sensibilité de la méthode est donc suffisante pour permettre le dosage de l'acide folique dans l'ensemble des MELANGES POLYVITAMINIQUES produits par les laboratoires PRODUITS ROCHE.

Par rapport à la méthode microbiologique, le temps nécessaire à la préparation de 15 échantillons est à peu près équivalent mais le délai nécessaire au rendu des résultats est réduit de un jour.

De plus, la technique instrumentale est beaucoup plus souple et permettra de traiter une série de 5 échantillons très rapidement, ou un MELANGE POLYVITAMINIQUE individuellement en cas d'urgence.

En outre, cette technique instrumentale permet de doser l'acide folique dans des MELANGES POLYVITAMINIQUES pour lesquels la méthode microbiologique était tenue en échec.

Cette technique de dosage de l'acide folique par C.L.H.P. semble donc être une technique de choix pour le dosage et l'identification de cette vitamine au sein des MELANGES POLYVITAMINIQUES et devrait remplacer la méthode de dosage microbiologique jusqu' alors employée par les laboratoires PRODUITS ROCHE.

CONCLUSION

L'acide folique, intervient dans différents processus métaboliques importants :

- ▶ synthèse ou dégradation de certaines protéines (glycocolle, sérine, histidine, méthionine, tryptophane),
- ▶ synthèse des acides nucléiques.

Une carence en folates se traduira donc par diverses manifestations cliniques.

Certaines d'entre elles sont bien connues telles l'anémie macrocytaire mégalo-blastique, l'atteinte des autres lignées sanguines, des muqueuses... mais d'autres font encore l'objet de nombreuses études.

Par exemple, le rôle de l'acide folique dans le bon fonctionnement du système nerveux, le déclenchement de dysplasies cervicales, ou l'apparition de malformations du tube neural semble se confirmer, mais le mécanisme d'action de l'acide folique à ces différents niveaux reste encore assez flou.

En ce qui concerne l'étiologie de la carence, les facteurs les plus importants à prendre en compte sont :

- ▶ la malnutrition, principalement pour les couches défavorisées de la population, les personnes âgées, les alcooliques,
- ▶ la grossesse (les besoins sont généralement doublés, mais peuvent être augmentés jusqu'à six fois),
- ▶ la prise de certains médicaments (antiépileptiques, contraceptifs oraux, méthotrexate...).

De nombreuses spécialités pharmaceutiques existent pour traiter ces carences. La posologie en vitamine B₉ devra être adaptée à la gravité et à la cause de la carence.

Mais, étant donnée l'évolution des habitudes alimentaires (consommation de plus en plus fréquente de conserves, plats cuisinés, potages déshydratés...), nous pensons que l'industrie agro-alimentaire a un rôle à jouer pour faire reculer la fréquence des carences en folates.

Déjà, de nombreux aliments enrichis en vitamine B₉ existent sur le marché (céréales, potages, boissons pour petit déjeuner, aliments pour bébés), mais des progrès pourraient être réalisés en élargissant la gamme des produits enrichis vers les conserves, plats cuisinés, surgelés etc...

Il semblerait d'ailleurs que les choses évoluent dans ce sens car nous avons remarqué, lors de notre stage au sein des laboratoires PRODUITS ROCHE, que la demande des MELANGES POLYVITAMINIQUES contenant de l'acide folique et destinés à l'industrie agro-alimentaire était en nette augmentation.

Il devenait alors intéressant de mettre au point une méthode de dosage plus rapide, plus souple et plus fiable de cette vitamine au sein des MELANGES POLYVITAMINIQUES que la classique méthode microbiologique.

Nous avons donc mis au point une méthode de dosage de la vitamine B₉ au sein des MELANGES POLYVITAMINIQUES par C.L.H.P., cette méthode tendant à devenir la méthode analytique de choix dans l'industrie pharmaceutique ou même agro-alimentaire.

ANNEXE I

**COMPOSITION QUALITATIVE
DES DIFFERENTS
MELANGES POLYVITAMINIQUES
ETUDIES.**

Constituants du mélange	Numéros des MELANGES POLYVITAMINIQUES														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Vit A	X	X	X		X			X	X	X	X	X	X	X	X
VIT B1	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
Vit B2	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Vit B6	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vit B9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vit B12	X		X		X		X			X	X	X		X	X
Vit C	X	X	X	X	X					X	X	X		X	X
Vit D	X	X	X												
Vit E	X	X	X		X			X	X	X	X	X	X	X	X
Vit K															
Vit PP	X	X	X	X	X	X	X				X	X		X	X
Pantoténate de Ca	X		X		X	X	X			X	X	X			X
Biotine	X	X	X		X		X			X	X	X		X	X
Fer	X	X	X												
Iode															

Annexe Ia : Composition qualitative des MELANGES POLYVITAMINIQUES du groupe A.

EXCIPIENT = Maltodextrine

Constituants du mélange	Numéros des MELANGES POLYVITAMINIQUES															
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Vit A	X	X	X	X	X	X			X		X		X	X	X	
Vit B1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vit B2	X		X			X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
Vit B6	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	
Vit B9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vit B12	X		X						X	X	X	X	X	X	X	
Vit C	X	X		X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	
Vit D	X		X	X	X											
Vit E	X	X		X	X			X	X	X	X		X	X	X	X
Vit K	X	X	X		X											
Vit PP	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	
Pantoténate de Ca	X	X		X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	
Biotine	X	X		X	X		X						X		X	
Taurine		X														
Iode		X	X											X		

Annexe Ib : Composition qualitative des MELANGES POLYVITAMINIQUES du groupe A.

EXCIPIENT = Lactose Pulvérisé Codex.

Constituants du mélange	Numéros des MELANGES POLYVITAMINIQUES				
	32	33	34	35	36*
Vit A					
VIT B1	X	X	X	X	X
Vit B2	X	X	X	X	
Vit B6	X	X	X	X	X
Vit B9	X	X	X	X	X
Vit B12	X			X	
Vit C					
Vit D	X				
Vit E	X		X		
Vit K					
Vit PP	X	X	X	X	X
Pantoténate de Ca	X	X	X	X	
Biotine	X			X	
Iode					X

Annexe Ic : Composition qualitative des MELANGES POLYVITAMINIQUES du groupe A.

EXCIPIENT = Glucose Anhydre

(*Sauf n° 36 : saccharose).

Constituants du mélange	Numéros des MELANGES POLYVITAMINIQUES			
	37	38	39	40
Vit A				
VIT B1	X		X	
Vit B2	X	X	X	X
Vit B6	X	X	X	X
Vit B9	X	X	X	X
Vit B12	X		X	
Vit C			X	
Vit D				
Vit E				
Vit K				
Vit PP	X	X	X	X
Pantoténate de Ca	X	X	X	X
Biotine	X			
Fer réduit (Fe ⁰)	X	X	X	X
Excipient	Glucose Anhydre	Glucose Anhydre	Maltodextrine Glucidex 12	Maltodextrine Glucidex 12

Annexe Id : Composition qualitative des MELANGES POLYVITAMINIQUES du groupe B.
Mélanges contenant du fer réduit (Fe⁰)

Constituants du mélange	Numéros des MELANGES POLYVITAMINIQUES						
	41	42	43	44	45	46	47
Vit A	X	X	X	X	X		
VIT B1	X	X		X	X	X	X
Vit B2	X	X	X	X	X	X	X
Vit B6	X	X	X	X	X		X
Vit B9	X	X	X	X	X	X	X
Vit B12	X	X		X	X		X
Vit C	X	X		X			X
Vit D		X					X
Vit E	X	X	X	X	X		X
Vit K		X					
Vit PP	X	X		X	X	X	
Pantoténate de Ca	X	X	X	X	X	X	
Biotine		X	X	X	X		X
Fer		X		X			
Cuivre	X	X	X		X	X	X
Zinc	X	X	X	X		X	
Manganèse		X			X		
Calcium	X						
Iode	X	X		X			
Excipient	Lactose Pulvérisé Codex	Amidon de maïs	Lactose Pulvérisé Codex	Lactose Pulvérisé Codex	Maltodextrine glucidex 12	Glucose Anhydre	Maltodextrine Glucidex 12

Annexe Ie : Composition qualitative des MELANGES POLYVITAMINIQUES du groupe C.

(Mélanges contenant des minéraux)

ANNEXE II

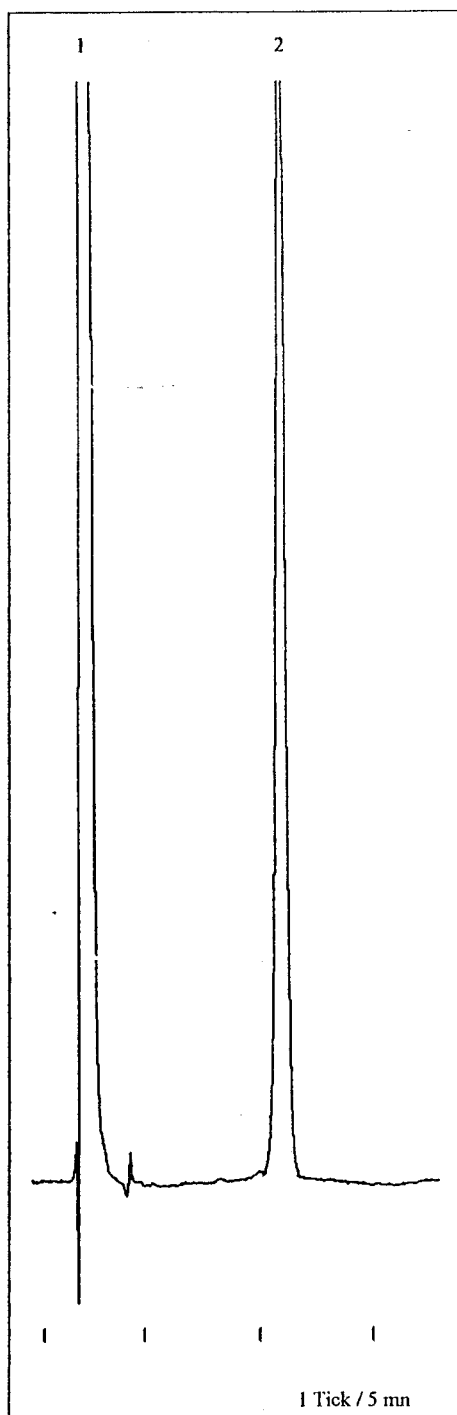
Chromatogrammes obtenus avec :

- la solution d'acide folique de référence,

- 5 MELANGES POLYVITAMINIQUES

représentatifs de l'ensemble des mélanges étudiés.

(Mélanges n° 11, 30, 32, 37, et 44)

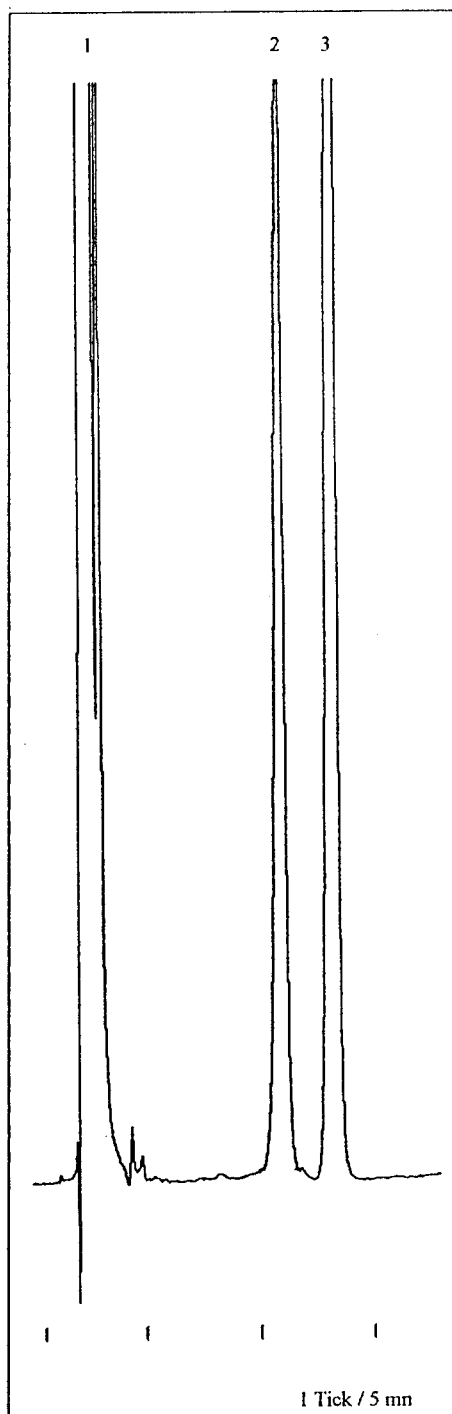


Annexe IIa : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence.

1 = Vit C ; 2 = acide folique.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 , U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.
Débit = 1 ml / mn.

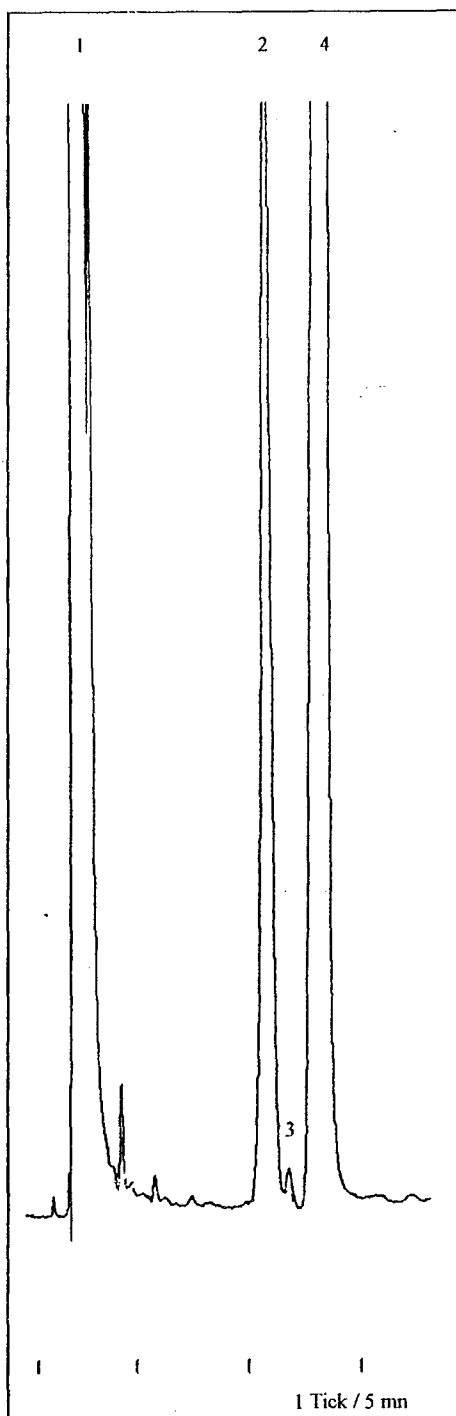


Annexe IIb : chromatogramme obtenu avec le MELANGE POLYVITAMINIQUE n° 11.

1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 2 = acide folique ; 3 = Vit B2.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 , U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.
Débit = 1 ml / mn.

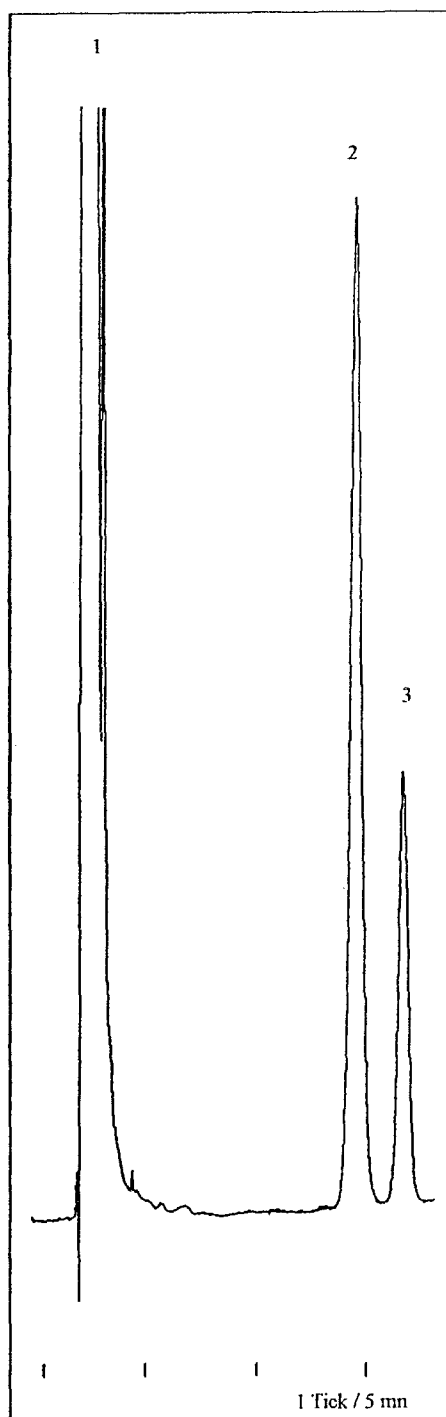


Annexe IIc : chromatogramme obtenu avec le MELANGE
POLYVITAMINIQUE n° 30.

1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 2 = acide folique ;
3 = impureté de la vit B2 ; 4 = vit B2.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 , U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.
Débit = 1 ml / mn.

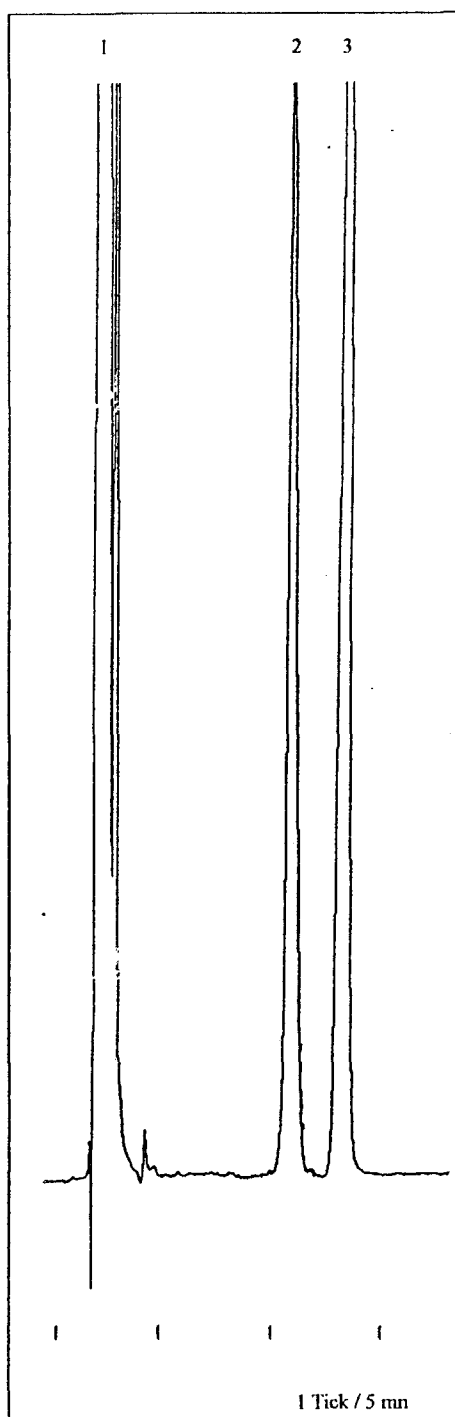


Annexe II d : chromatogramme obtenu avec le MELANGE
POLYVITAMINIQUE n° 32.

1 = Vit B1 + B6 + PP ; 2 = acide folique ; 3 = Vit B2.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 , U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.
Débit = 1 ml / mn.



Annexe IIe : chromatogramme obtenu avec le MELANGE POLYVITAMINIQUE n° 37.

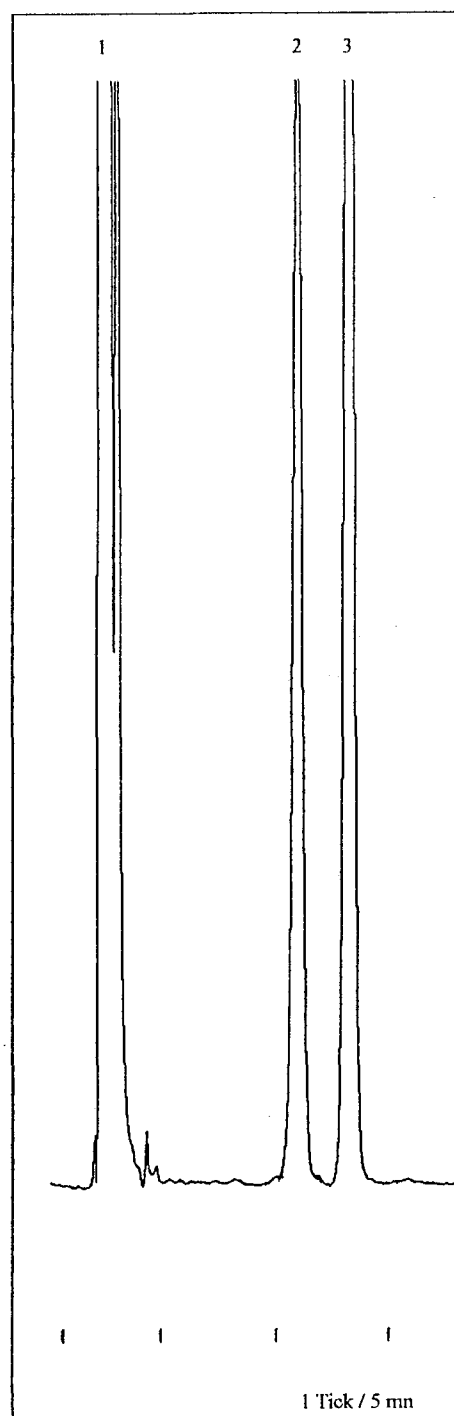
1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 2 = acide folique ; 3 = Vit B2.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 . U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.

Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IIIf : chromatogramme obtenu avec le MELANGE POLYVITAMINIQUE n° 44.

1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 2 = acide folique ; 3 = Vit B2.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 . U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.

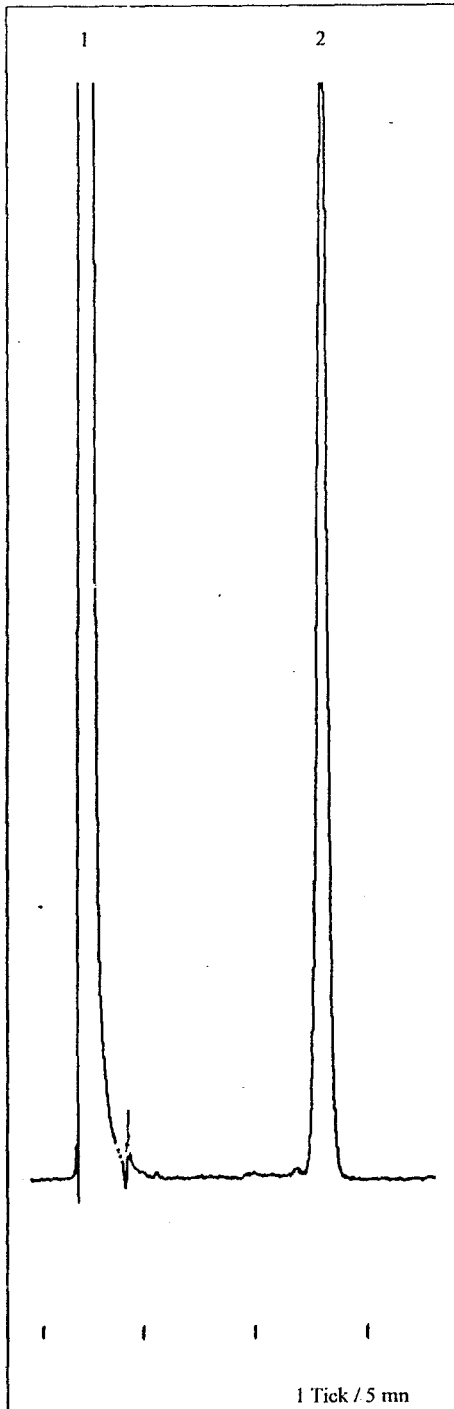
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.

ANNEXE III

SPECIFICITE DE LA METHODE :

- Colonne à température ambiante,**
- pH de la phase éluante = 3,3.**



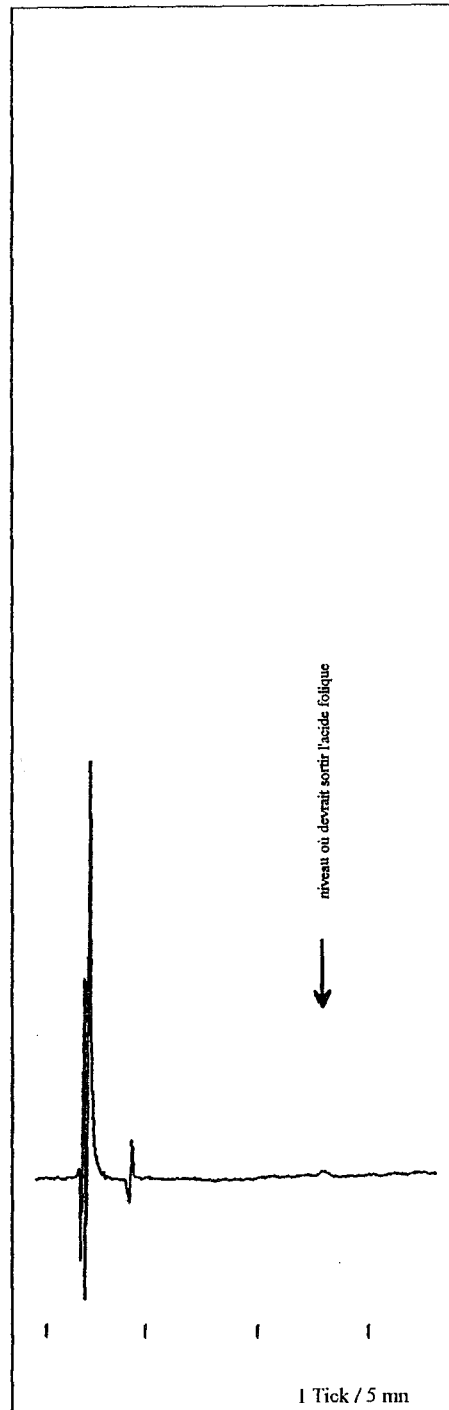
Annexe IIIa : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence.

1 = Vit C ; 2 = acide folique (ou Vit B9).

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



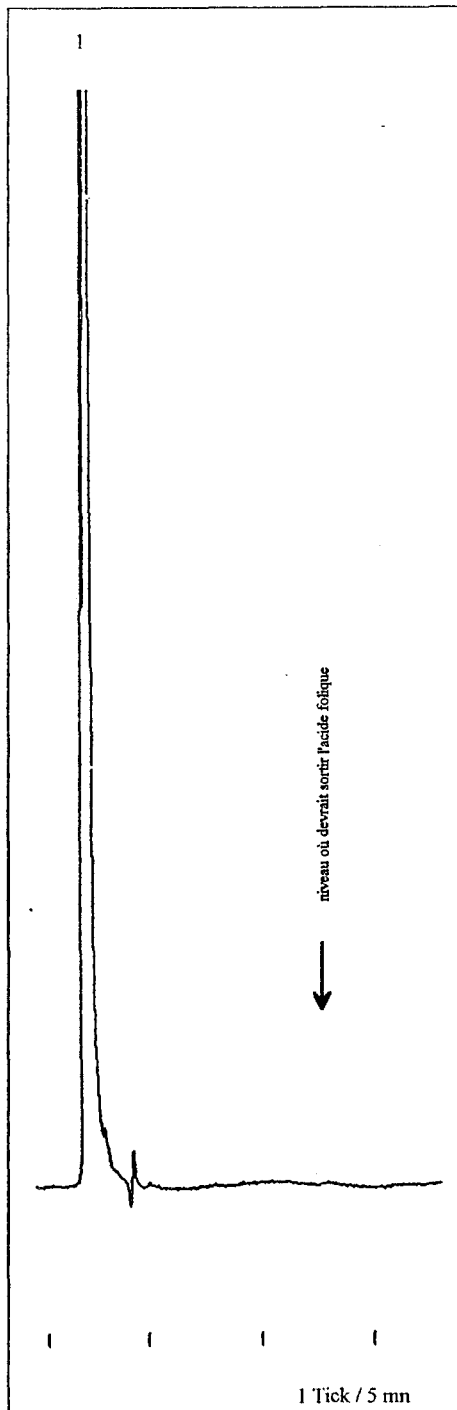
Annexe IIIb : chromatogramme obtenu avec la solution tampon phosphate pH 7,4.

Aucun pic détecté.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IIIc : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B1 (thiamine HCl à 29,8 mg / 100 ml).

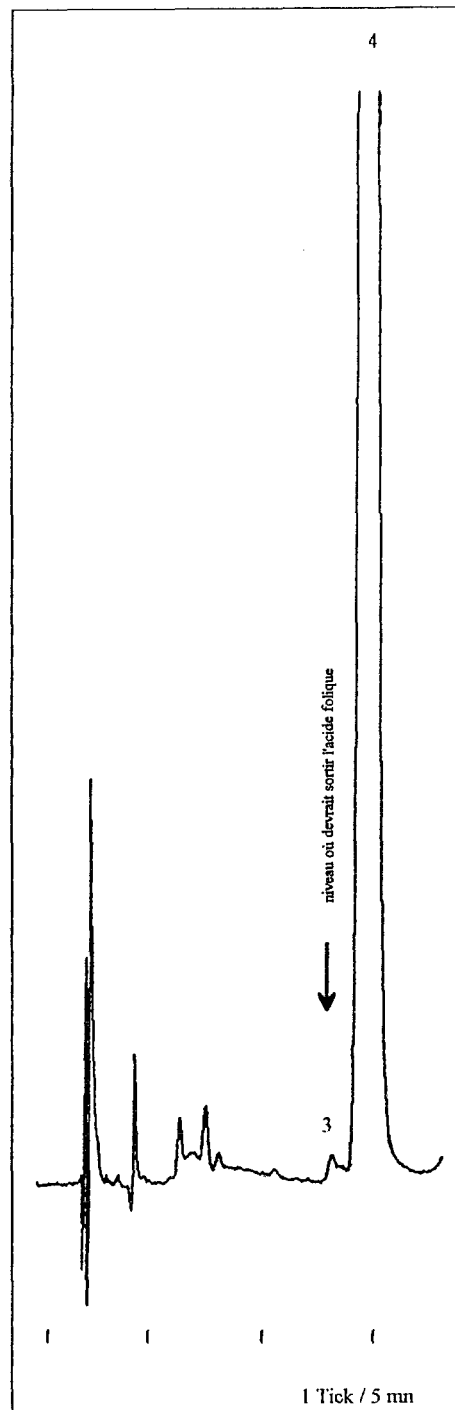
1 = Vit B1 ;

aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



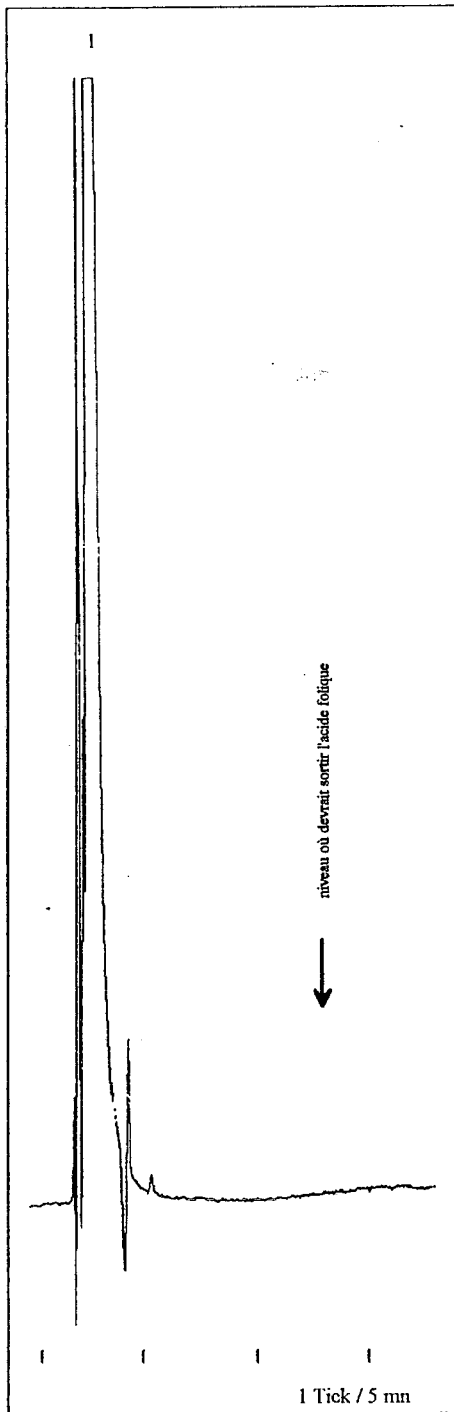
Annexe III d : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B2 (riboflavine base à 27,7 mg / 100 ml).

4 = Vit B2 ; 3 = impureté de la Vit B2 au niveau de la sortie du pic d'acide folique.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IIIe : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B6 (pyridoxine HCl à 45 mg / 100 ml).

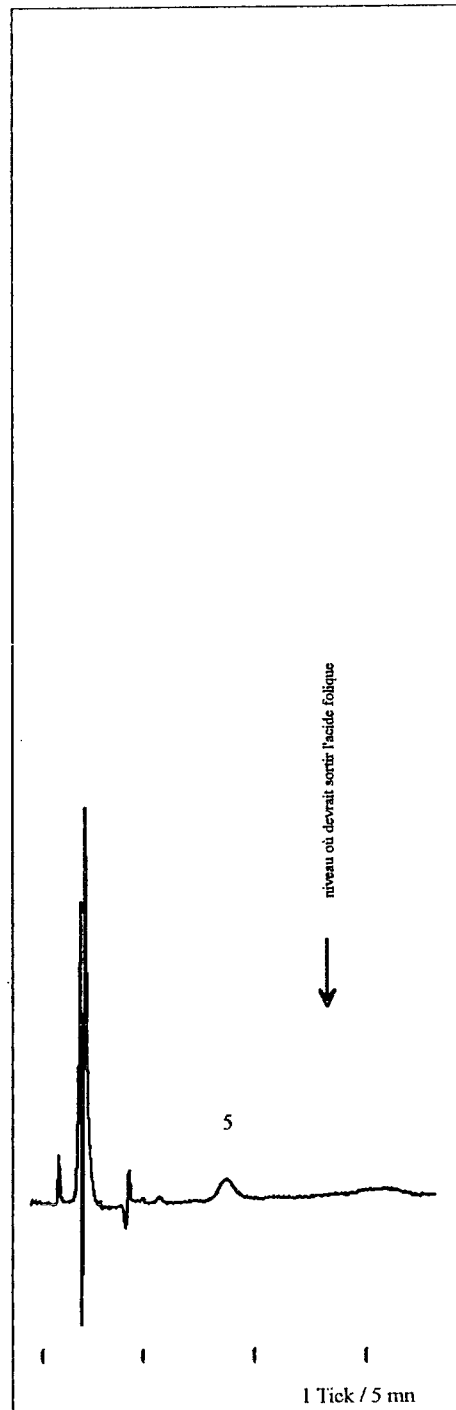
1 = Vit B6.

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (1° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IIIf : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B12 (Vit B12 0,1 % w/s à 124,4 mg / 100 ml).

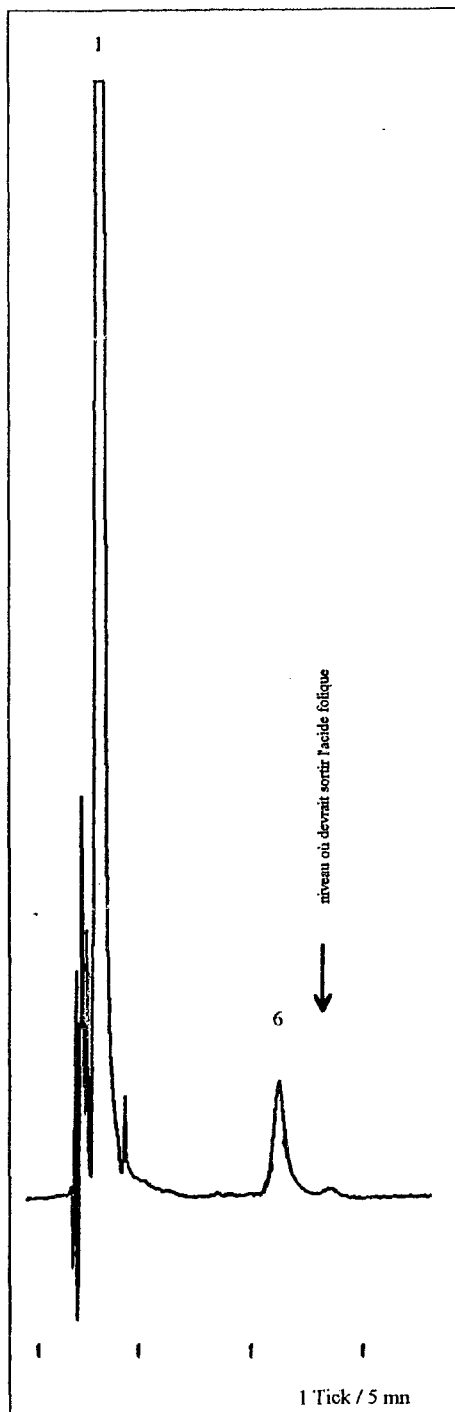
5 = impureté de la Vit B6 (voir annexe IX).

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (1° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



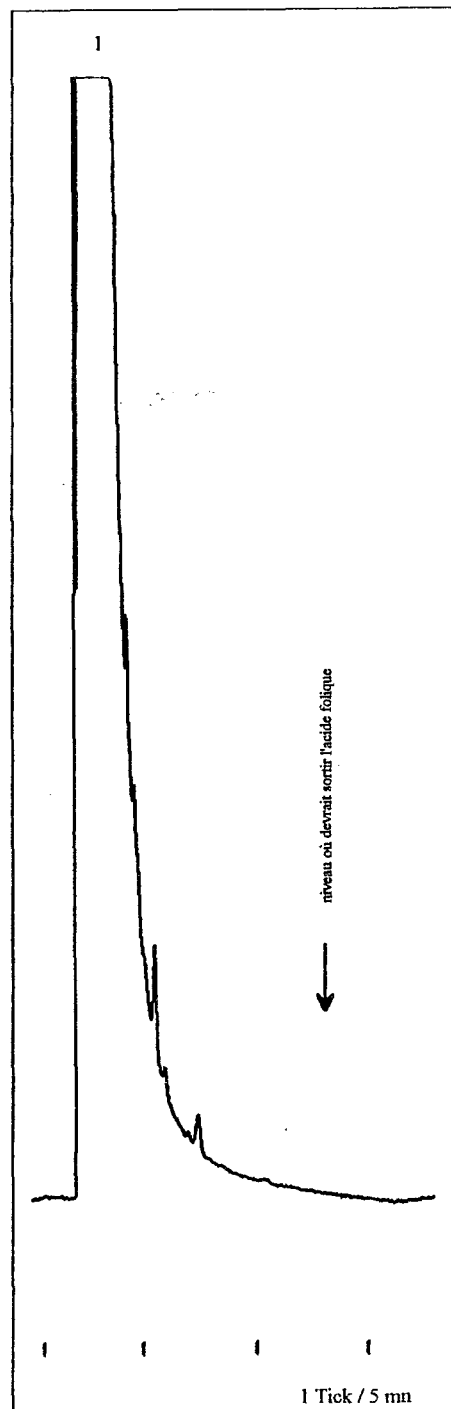
Annexe IIIg : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit PP (amide nicotinique à 223,2 mg / 100 ml).

1 = Vit PP ; 6 = impureté de la Vit PP.
Aucun pic détecté au niveau de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



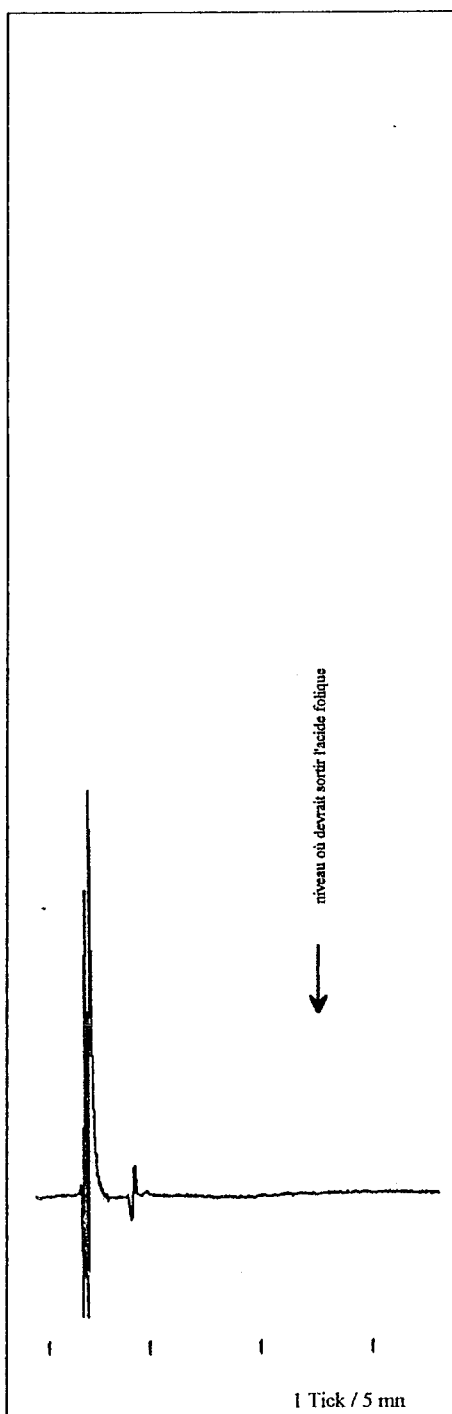
Annexe IIIh : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit C (acide ascorbique à 2,9 g / 50 ml).

1 = Vit C.
Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



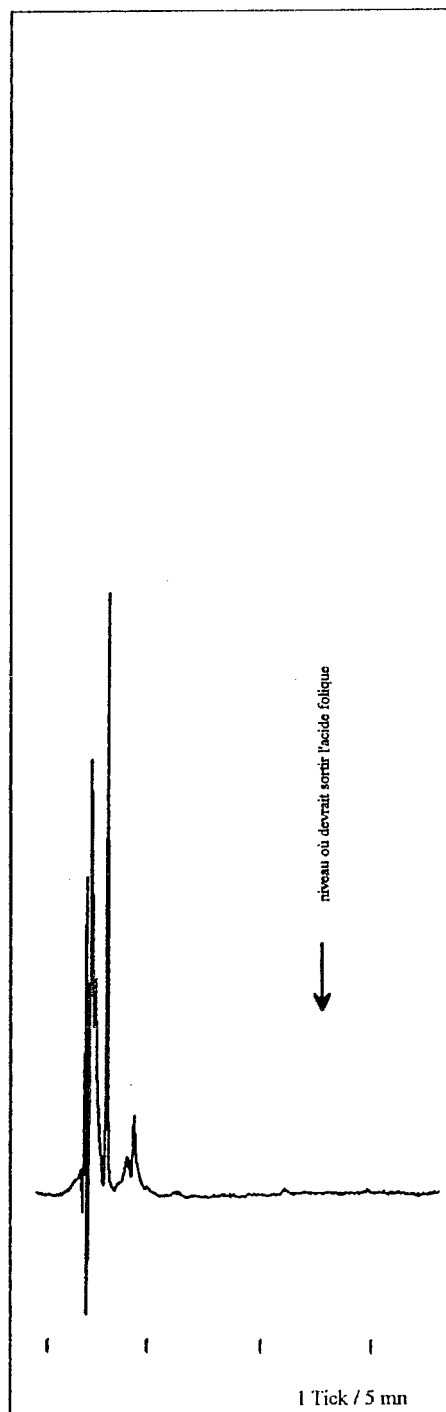
Annexe IIIi : chromatogramme obtenu avec une solution de pantothénate de calcium à 70 mg / 100 ml.

Aucun pic détecté.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn



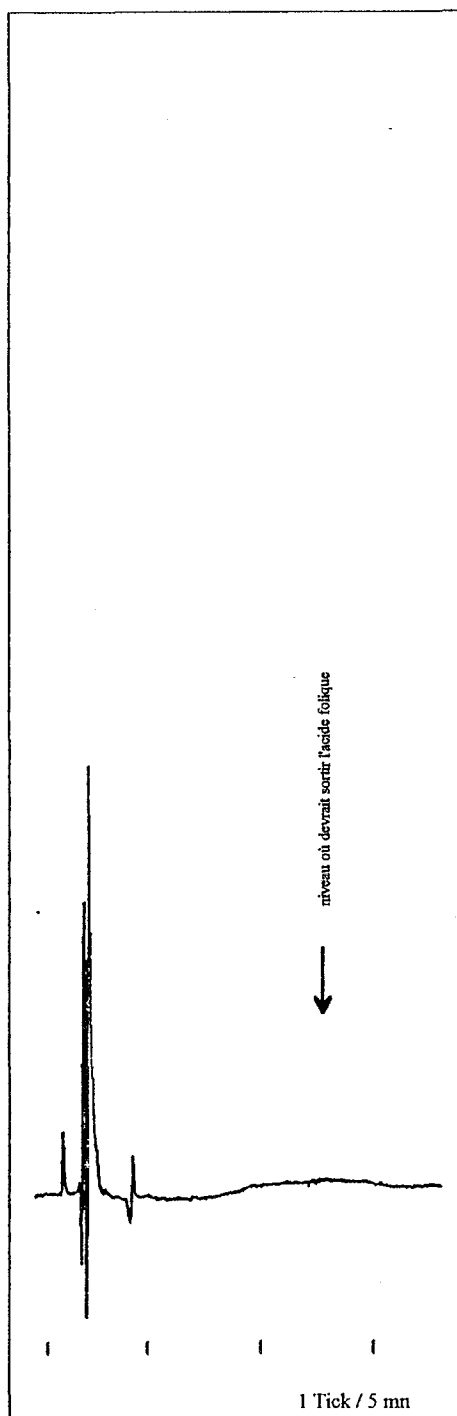
Annexe IIIj : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit A (Vit A acétate pdré 325 cws/l à 228,4 mg / 50 ml).

Aucun pic détecté.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogène phosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



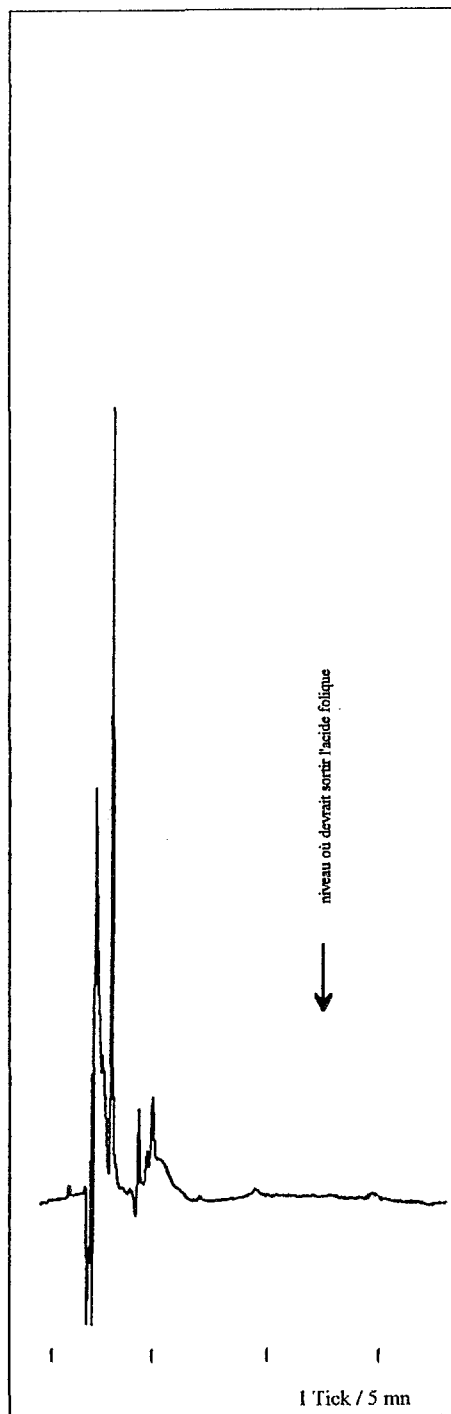
Annexe IIIk : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit D (Vit D3 100 cws/a à 74,9 mg / 50 ml).

Aucun pic détecté.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



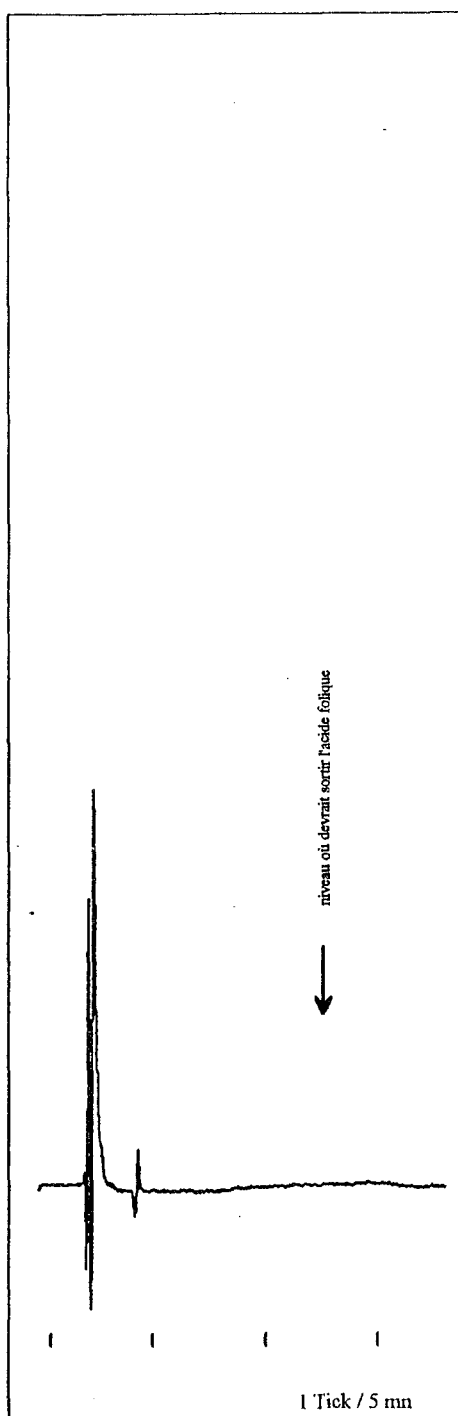
Annexe IIIl : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit E (Vit E 50 % cws/f à 851,9 mg / 50 ml).

Aucun pic détecté.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



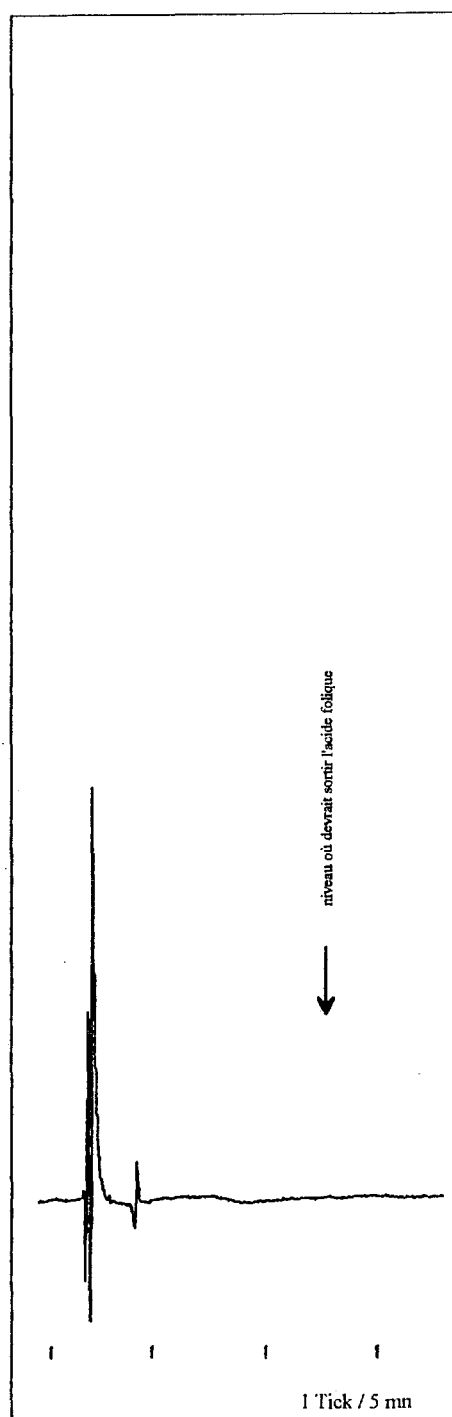
Annexe III m : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit K (Vit K1 à 5 mg / 200 ml).

Aucun pic détecté.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



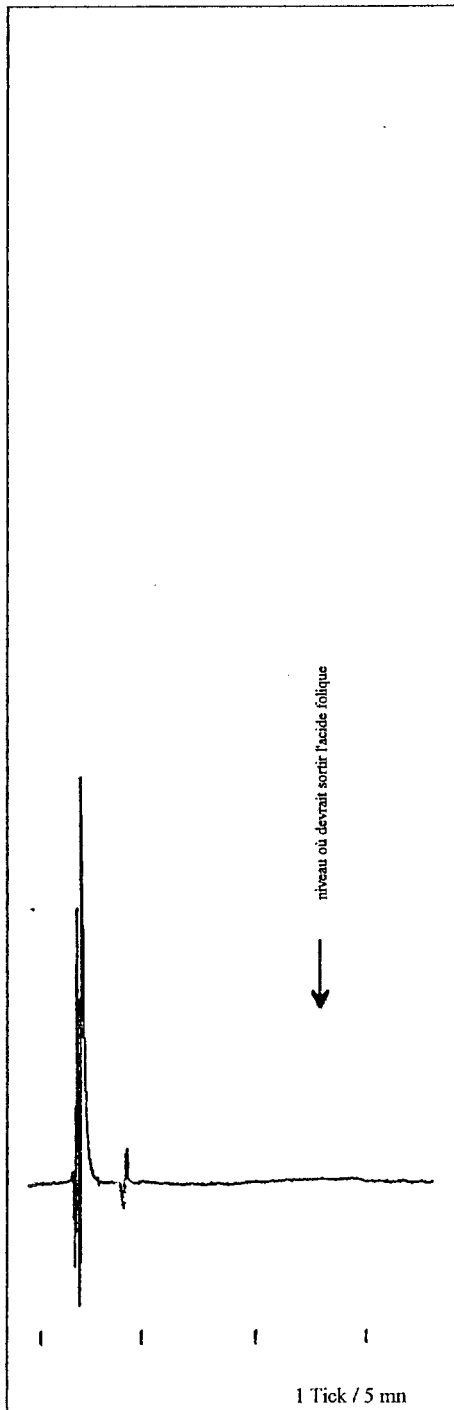
Annexe III n : chromatogramme obtenu avec une solution de Biotine à 1,7 mg / 100 ml).

Aucun pic détecté.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



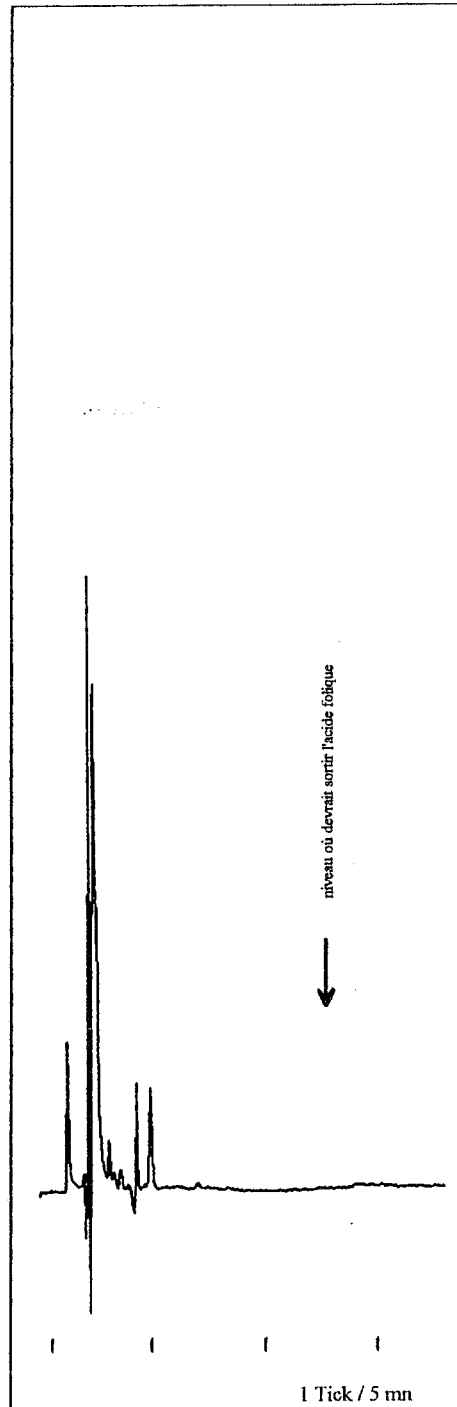
Annexe IIIo : chromatogramme obtenu avec une solution de Taurine à 310 mg / 50 ml.

Aucun pic détecté.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (1° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



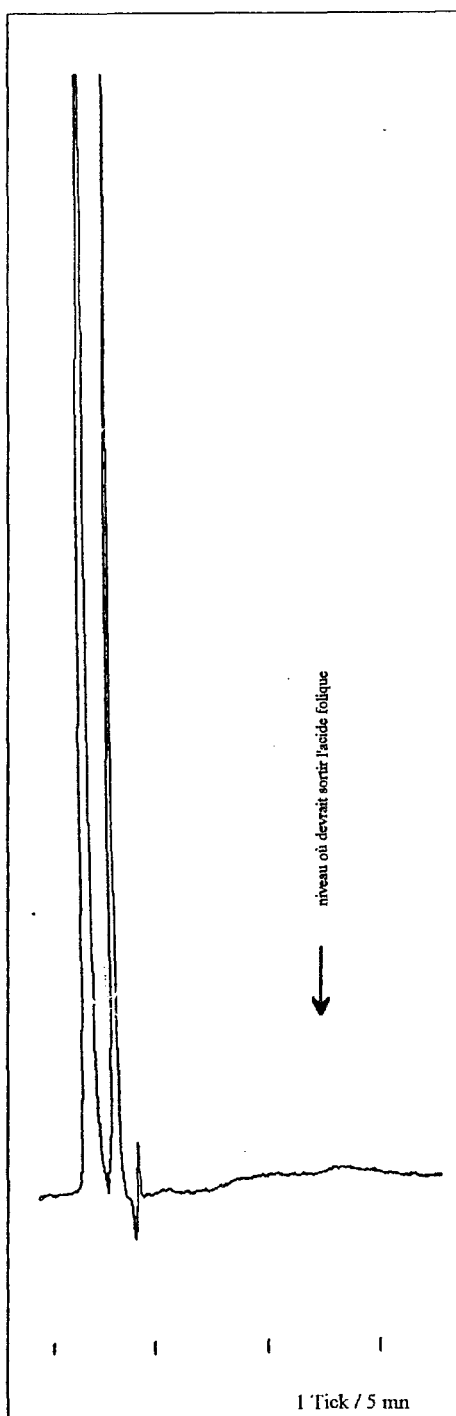
Annexe IIIp : chromatogramme obtenu avec une solution contenant les 4 excipients pouvant être rencontrés lors des différents dosages : Maltodextrine (Glucidex12 à 1210 ; glucose à 478 ; lactose à 5366 ; amidon de maïs à 910 mg / 100 ml).

Aucun pic détecté.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (1° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IIIq : chromatogramme obtenu avec une solution de minéraux (composition voir ci-contre).

Aucun pic détecté.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.

Composition du mélange de minéraux :

Lactate de fer à 170 mg / 100 ml,

Sulfate de fer, 7 H_2O à 150 mg / 100 ml,

Fumarate ferreux à 100 mg / 100 ml,

Fer réduit à 30 mg / 100 ml,

Gluconate de cuivre à 30 mg / 100 ml,

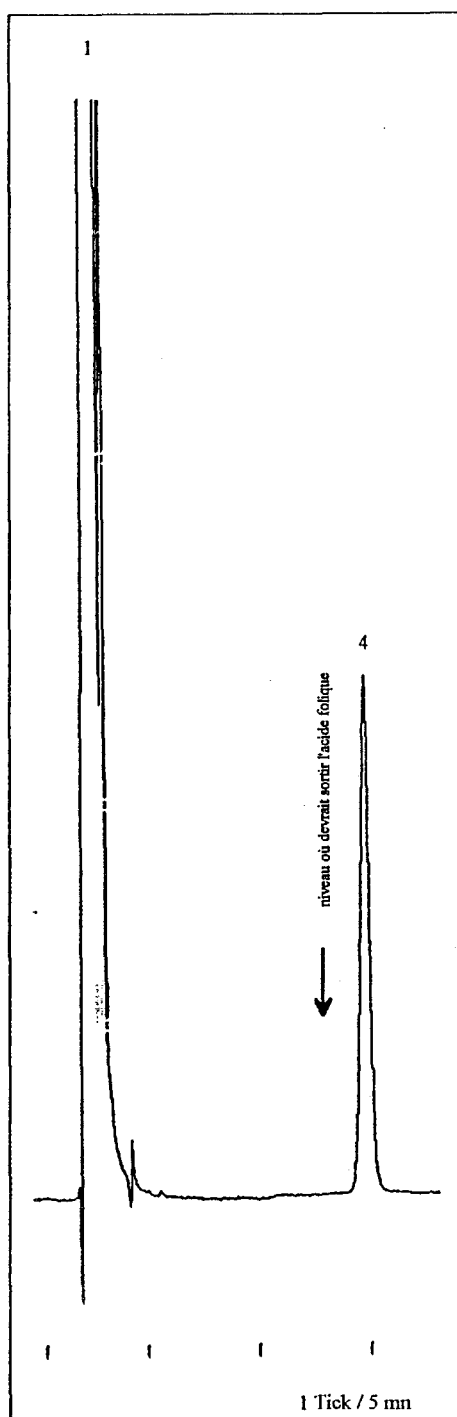
Sulfate de cuivre à 20 mg / 100 ml,

Sulfate de zinc à 130 mg / 100 ml,

Sulfate de manganèse à 15 mg / 100 ml,

Carbonate de calcium à 250 mg / 100 ml,

Iodure de potassium à 1,3 mg / 100 ml.



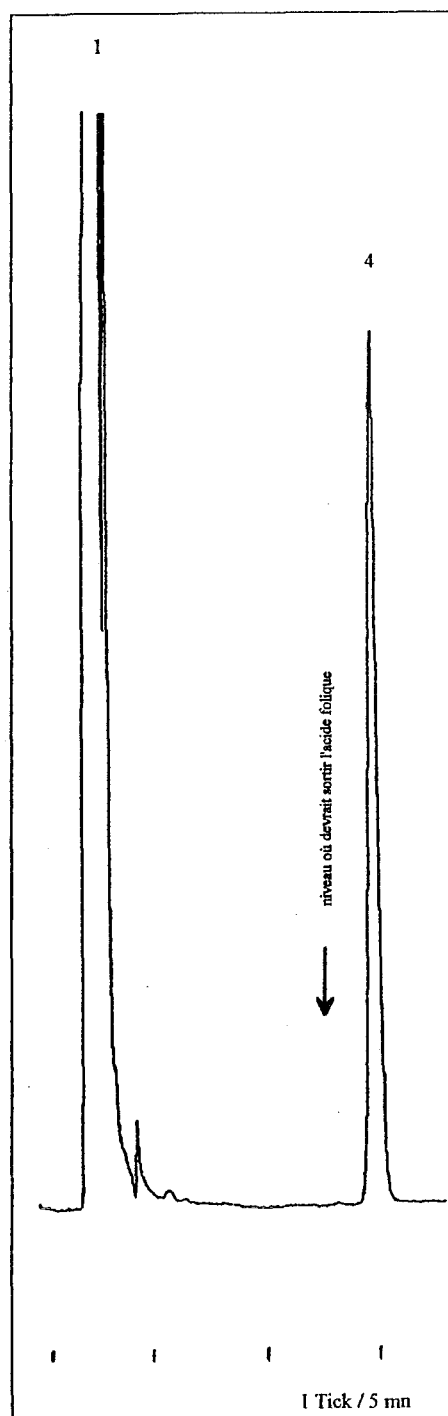
Annexe IIIr : chromatogramme obtenu avec le "placebo"
du MELANGE POLYVITAMINIQUE n° 32.

1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 4 = Vit B2.
Aucun pic détecté au niveau de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (1° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IIIs : chromatogramme obtenu avec le "placebo"
du MELANGE POLYVITAMINIQUE n° 37.

1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 4 = Vit B2.
Aucun pic détecté au niveau de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (1° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

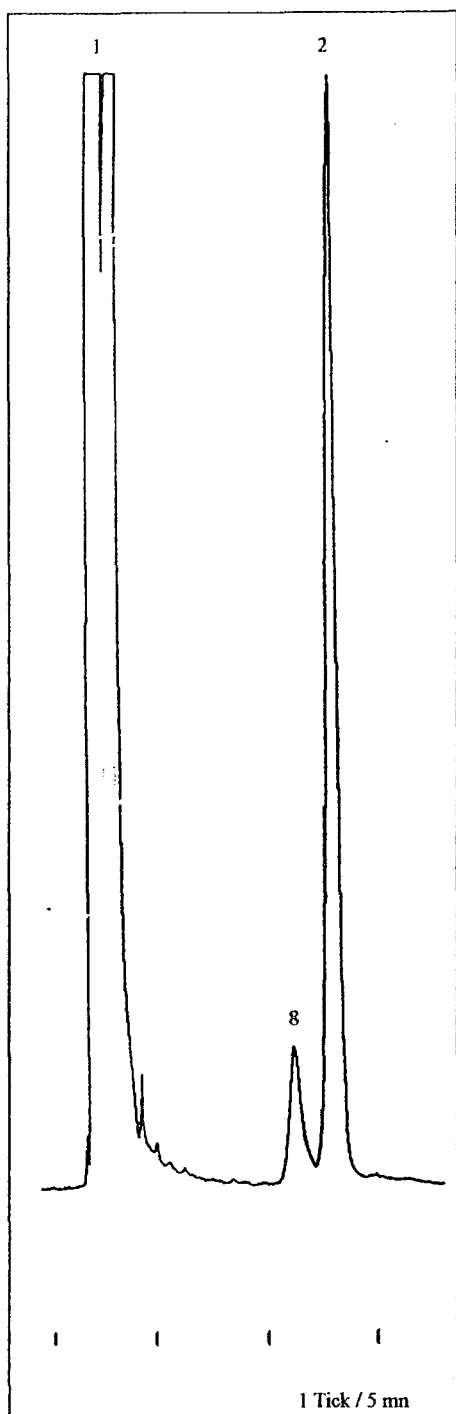
Débit = 1 ml / mn.

ANNEXE IV

CHROMATOGRAMMES DES ASSOCIATIONS :

- Vit B9 + Vit PP,**
- Vit B9 + Vit B12.**

CALCUL DE LA RESOLUTION ENTRE CES DIFFERENTS PICS.



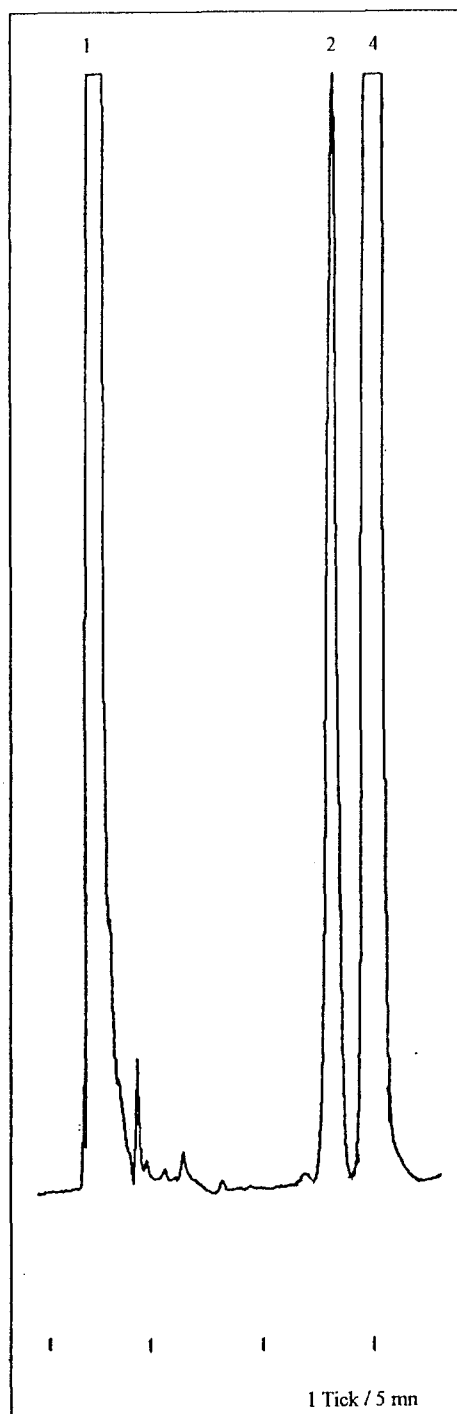
Annexe IVa : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence (Vit B9 à 4 µg / 100 ml + Vit C à 0,2 g / 100 ml) + Vit PP (amide nicotinique à 225 mg / 50 ml).

1 = Vit C + PP ; 2 = acide folique ; 8 = "impureté" de la Vit PP.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_4 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IVb : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence + Vit B2 (riboflavine base à 30 mg/100 ml).

1 = Vit C ; 2 = acide folique ; 4 = Vit B2.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_4 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.

CALCUL DE LA RESOLUTION ENTRE :

- la Vit B₉ et une impureté de la Vit PP,
- la Vit B₉ et la Vit B₂.

La résolution entre deux pics A et B est définie par la formule :

$$R = \frac{\text{Tr B} - \text{Tr A}}{0,85 (W_{1/2} \text{ A} + W_{1/2} \text{ B})}$$

Avec :- Tr A et Tr B = temps de rétention des pics A et B,

- W_{1/2} A et W_{1/2} B = largeur des pics A et B à mi hauteur.

Résolution entre la Vit B₉ et l'impureté de la Vit PP :

- Tr Vit B₉ = 13,0 min,
- Tr impureté Vit PP = 11,2 min,
- W_{1/2} Vit B₉ = 29,1 s,
- W_{1/2} impureté Vit PP = 33,3 s.

D'où R = 2,04

Résolution entre Vit B₉ et Vit B₂ :

- Tr Vit B₉ = 13,0 min,
- Tr Vit B₂ = 14,8 min,
- W_{1/2} Vit B₉ = 29,0 s,
- W_{1/2} Vit B₂ = 24,9 s.

D'où R = 2,36

La résolution entre ces différents pics est bonne puisqu'elle est supérieure à 1,5.

ANNEXE V

**ETUDE DE LA REGRESSION LINEAIRE
SUR UNE SOLUTION D'ACIDE FOLIQUE PUR.**

**ETUDE DE LA LINEARITE DE LA METHODE SUR UNE SOLUTION
D'ACIDE FOLIQUE PUR EN SOLUTION DANS LE TAMPON PHOS-
PHATE PH 7,4 + ACIDE ASCORBIQUE A 0,2 % (M/V).**

Procédure : - 5 solutions de concentration variant de 2 à 8 µg / ml en Vit B9 sont injectées deux fois chacune.

- On mesure la surface du pic obtenu pour chaque mesure (counts).

LINEARITY WITH F-TEST

Legend: X: µg/ml Y: counts

Value No	X	Y	Y(calc)	Y - Y(calc)
1	2.010E+00	5.935E+04 5.822E+04	5.859E+04 5.859E+04	7.602E+02 -3.698E+02
2	3.020E+00	8.982E+04 8.862E+04	8.850E+04 8.850E+04	1.313E+03 1.117E+02
3	4.020E+00	1.183E+05 1.153E+05	1.181E+05 1.181E+05	2.145E+02 -2.798E+03
4	6.030E+00	1.780E+05 1.777E+05	1.777E+05 1.777E+05	3.689E+02 7.193E+01
5	8.050E+00	2.368E+05 2.385E+05	2.375E+05 2.375E+05	-6.469E+02 9.751E+02

Parameter	Estimated Value	Standard Deviation	Confidence Limits (P=95%, f=8, t=2.306)
Intercept	-9.458E+02	9.067E+02	-3.037E+03 to 1.145E+03
Slope	2.962E+04	1.775E+02	2.921E+04 to 3.003E+04
Residual Stand. Dev.		1.216E+03	
Correlation Coeff.	0.9999		

Regression Line	$Y = -9.458E+02 + 2.962E+04 \cdot X$
F-Test	$F' = 1.05 \quad F(0.95; 3; 5) = 5.41$

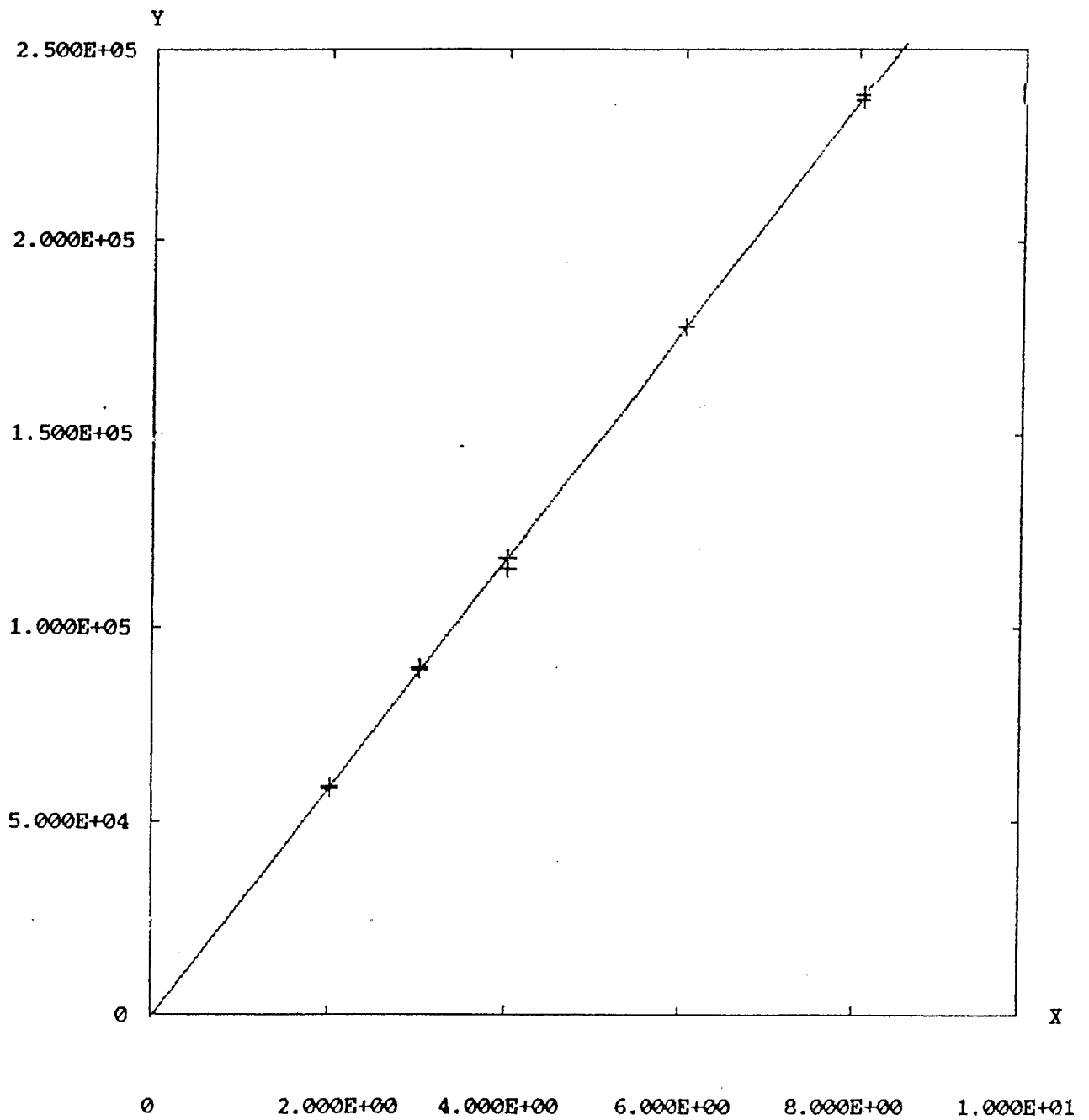
Comment:

The correlation coefficient of the regression line exceeds 0.99

The confidence interval of the intercept contains the origin

$F' < F$: Linearity corresponds

LINEARITY WITH F-TEST

Legend: X: $\mu\text{g/ml}$ Y: counts

ANNEXE VI

ETUDE DE LA REGRESSION LINEAIRE :

- AVEC LE MELANGE POLYVITAMINIQUE N° 32
RECONSTITUE,**
- AVEC LE MELANGE POLYVITAMINIQUE N° 37
RECONSTITUE.**

ETUDE DE LA LINEARITE DE LA METHODE SUR LE MELANGE
POLYVITAMINIQUE N° 32.

Procédure : - Le mélange est reconstitué sans l'acide folique.

- L'acide folique est rajouté dans la fiole du dosage en quantité exactement pesée. Le tout est parfaitement homogénéisé puis laissé en contact une heure avant d'effectuer les dosages.

- On mesure la quantité d'acide folique retrouvée.

LINEARITY WITH F-TEST

Legend: X_i : mg d'acide folique peses Y_i : mg d'acide folique retrouvés

Value No	X	Y	Y(calc)	Y - Y(calc)
1	1.633E+01	1.612E+01	1.617E+01	-4.801E-02
		1.627E+01	1.617E+01	1.020E-01
		1.617E+01	1.617E+01	1.985E-03
2	1.840E+01	1.814E+01	1.820E+01	-5.866E-02
		1.812E+01	1.820E+01	-7.866E-02
		1.835E+01	1.820E+01	1.513E-01
3	2.070E+01	2.039E+01	2.045E+01	-6.494E-02
		2.050E+01	2.045E+01	4.506E-02
		2.047E+01	2.045E+01	1.506E-02
4	2.291E+01	2.254E+01	2.262E+01	-8.292E-02
		2.265E+01	2.262E+01	2.708E-02
		2.240E+01	2.262E+01	-2.229E-01
5	2.488E+01	2.450E+01	2.456E+01	-5.547E-02
		2.481E+01	2.456E+01	2.545E-01
		2.457E+01	2.456E+01	1.453E-02

Parameter	Estimated Value	Standard Deviation	Confidence Limits (P=95%, f=13, t=2.160)
Intercept	1.485E-01	2.057E-01	-2.959E-01 to 5.928E-01
Slope	9.810E-01	9.858E-03	9.597E-01 to 1.002E+00
Residual Stand. Dev.		1.167E-01	
Correlation Coeff.	0.9993		

Regression Line $Y = 1.485E-01 + 9.810E-01 \cdot X$

F-Test $F' = 1.04$ $F(0.95; 3; 10) = 3.71$

Comment:

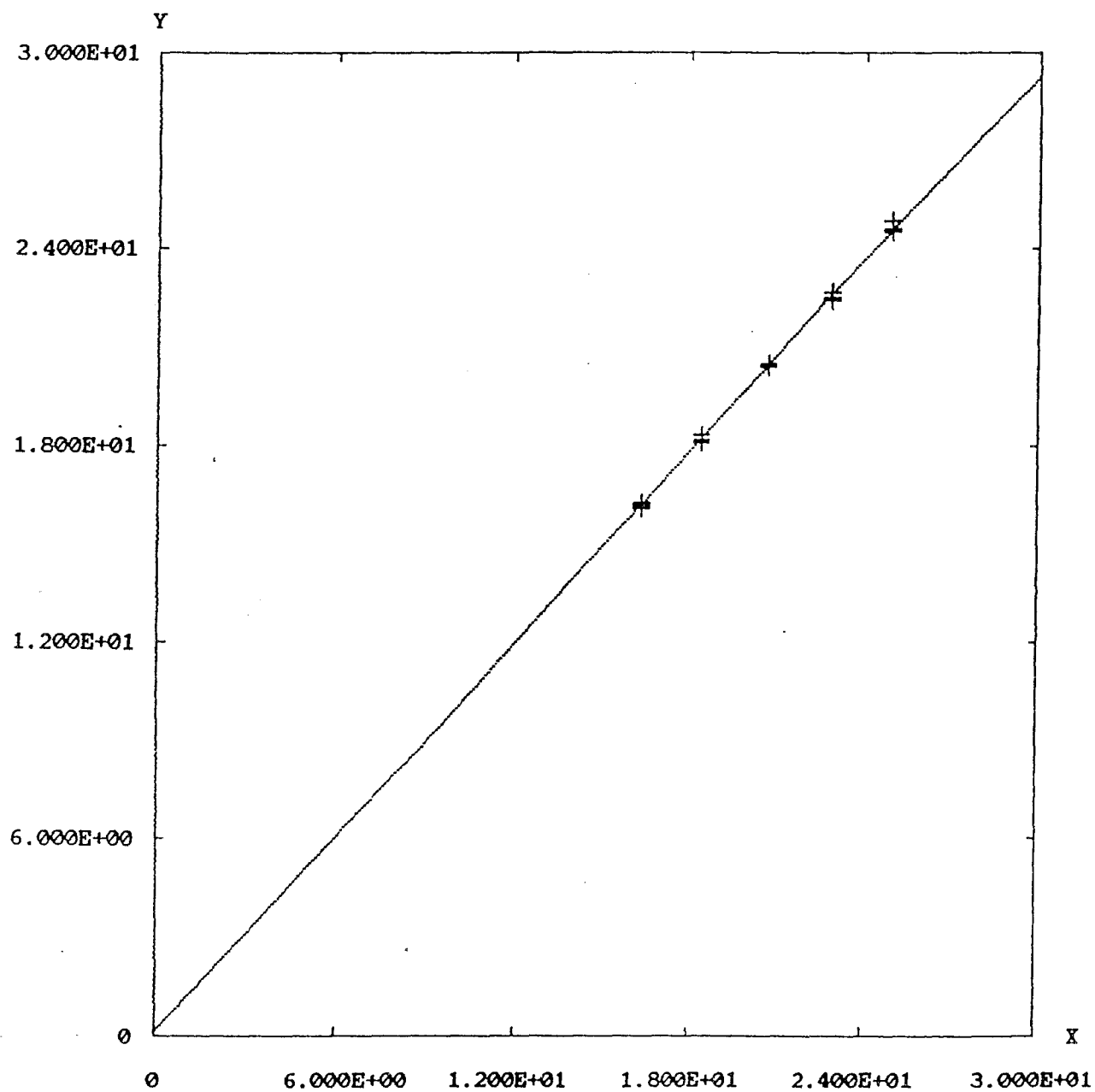
The correlation coefficient of the regression line exceeds 0.99

The confidence interval of the intercept contains the origin

$F' < F$: Linearity corresponds

LINEARITY WITH F-TEST

Legend: X: mg d'acide folique peses Y: mg d'acide folique retrouves



ETUDE DE LA LINEARITE DE LA METHODE SUR LE MELANGE POLYVITAMINIQUE N° 37.

Procédure : - Le mélange est reconstitué sans l'acide folique.

- L'acide folique est rajouté dans la fiole du dosage en quantité exactement pesée. Le tout est parfaitement homogénéisé puis laissé en contact une heure avant d'effectuer les dosages.

- On mesure la quantité d'acide folique retrouvée.

LINEARITY WITH F-TEST

Legend: X: mg d'acide folique pesés Y: mg d'acide folique retrouvés

Value No	X	Y	Y(calc)	Y - Y(calc)
1	1.683E+01	1.644E+01	1.634E+01	9.771E-02
		1.617E+01	1.634E+01	-1.723E-01
2	1.877E+01	1.644E+01	1.634E+01	9.771E-02
		1.777E+01	1.807E+01	-2.982E-01
3	2.104E+01	1.799E+01	1.807E+01	-7.824E-02
		1.831E+01	1.907E+01	2.418E-01
4	2.307E+01	2.013E+01	2.009E+01	4.222E-02
		2.002E+01	2.009E+01	-6.778E-02
5	2.545E+01	1.996E+01	2.009E+01	-1.278E-01
		2.183E+01	2.189E+01	-6.380E-02
		2.211E+01	2.189E+01	2.162E-01
		2.232E+01	2.189E+01	4.262E-01
		2.418E+01	2.401E+01	1.688E-01
		2.379E+01	2.401E+01	-2.212E-01
		2.375E+01	2.401E+01	-2.612E-01

Parameter	Estimated Value	Standard Deviation	Confidence Limits (P=95%, f=13, t=2.160)
Intercept	1.369E+00	3.878E-01	5.316E-01 to 2.207E+00
Slope	8.897E-01	1.825E-02	8.503E-01 to 9.291E-01
Residual Stand. Dev.		2.154E-01	
Correlation Coeff.	0.9973		

Regression Line $Y = 1.369E+00 + 8.897E-01 \cdot X$

F-Test $F' = 1.19$ $F(0.95;3;10) = 3.71$

Comment:

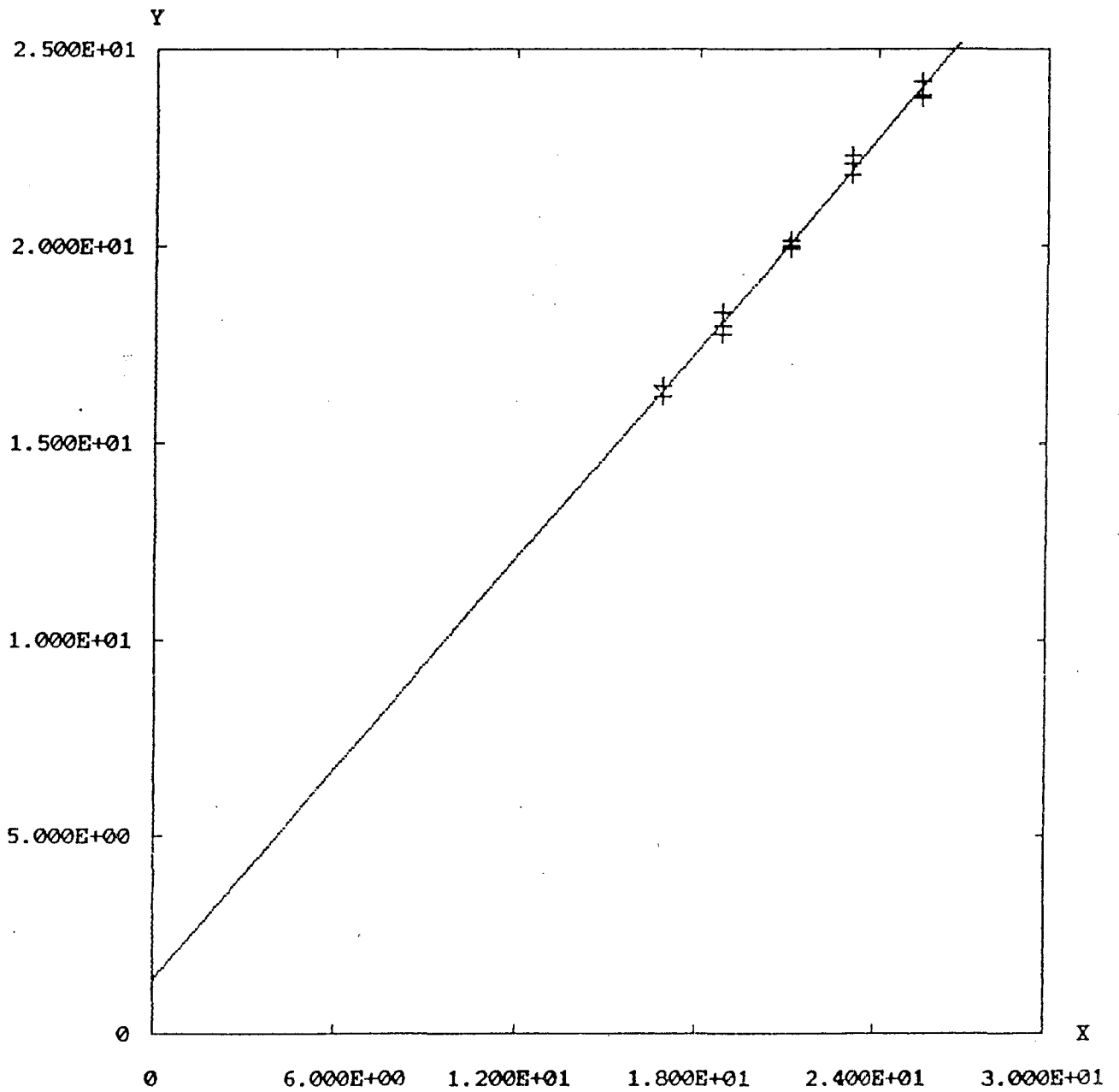
The correlation coefficient of the regression line exceeds 0.99

The confidence interval of the intercept doesn't contain the origin

$F' < F$: Linearity corresponds

LINEARITY WITH F-TEST

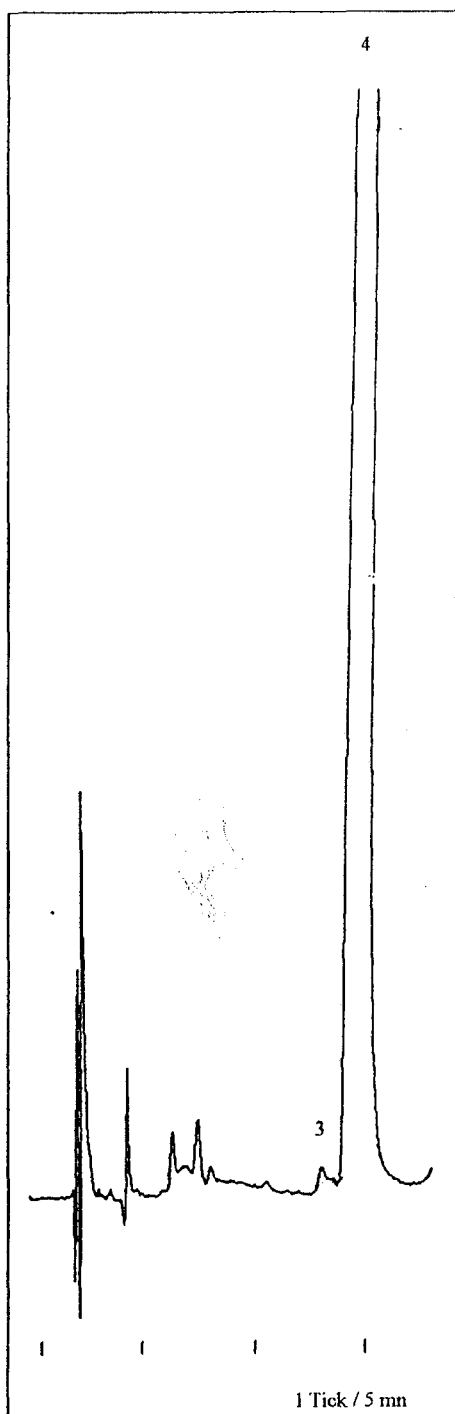
Legend: X: mg d'acide folique peses Y: mg d'acide folique retrouves



ANNEXE VII

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE LA COLONNE SUR LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE :

- chromatogramme de la Vit B2 (colonne à t° ambiante),
 - chromatogramme de la Vit B2 (colonne à 25° C),
- chromatogramme de l'association Vit B2 + B9 (colonne à t° ambiante),
 - chromatogramme de l'association Vit B2 + B9 (colonne à 25° C),
- calcul de la résolution entre le pic de la Vit B9 et le pic correspondant à l'impureté de la Vit B2.
 - chromatogramme de la Vit PP (colonne à t° ambiante),
 - chromatogramme de la Vit PP (colonne à 25° C),
- chromatogramme de l'association Vit PP + B9 (colonne à t° ambiante),
 - chromatogramme de l'association Vit PP + B9 (colonne à 25° C).



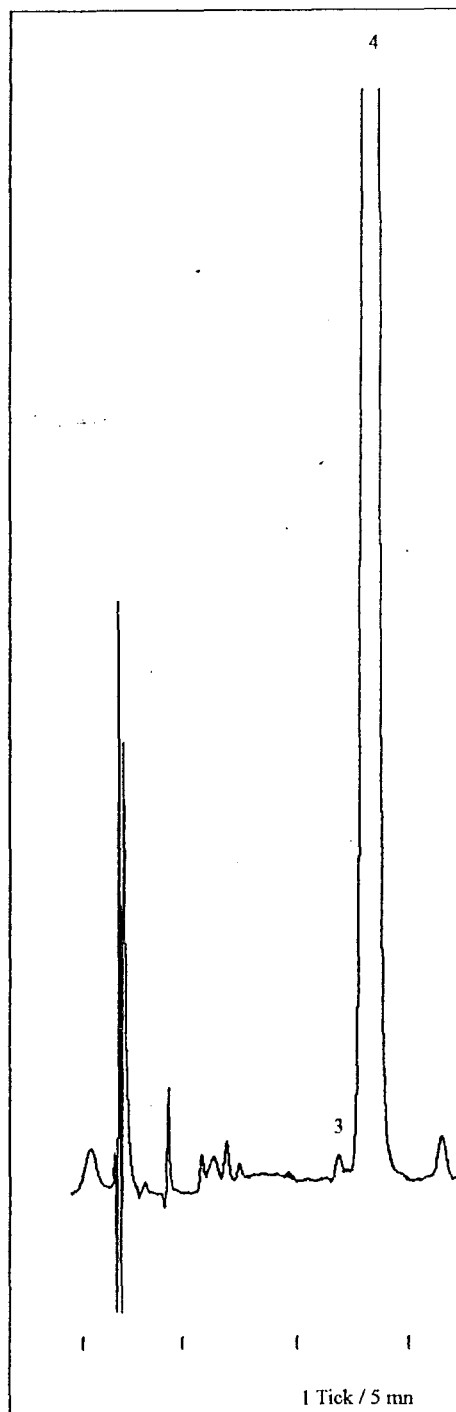
Annexe VIIa : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B2 (riboflavine base à 27,7 mg / 100 ml).

3 = impureté Vit B2 ; 4 = Vit B2.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



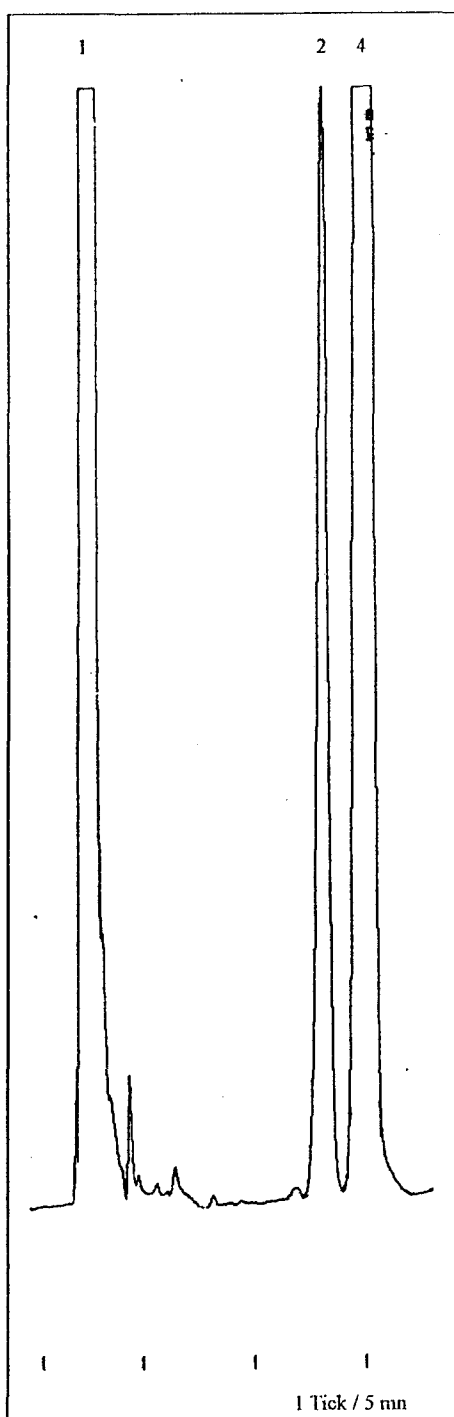
Annexe VIIb : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B2 (riboflavine base à 21,4 mg / 100 ml).

3 = impureté Vit B2 ; 4 = Vit B2.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



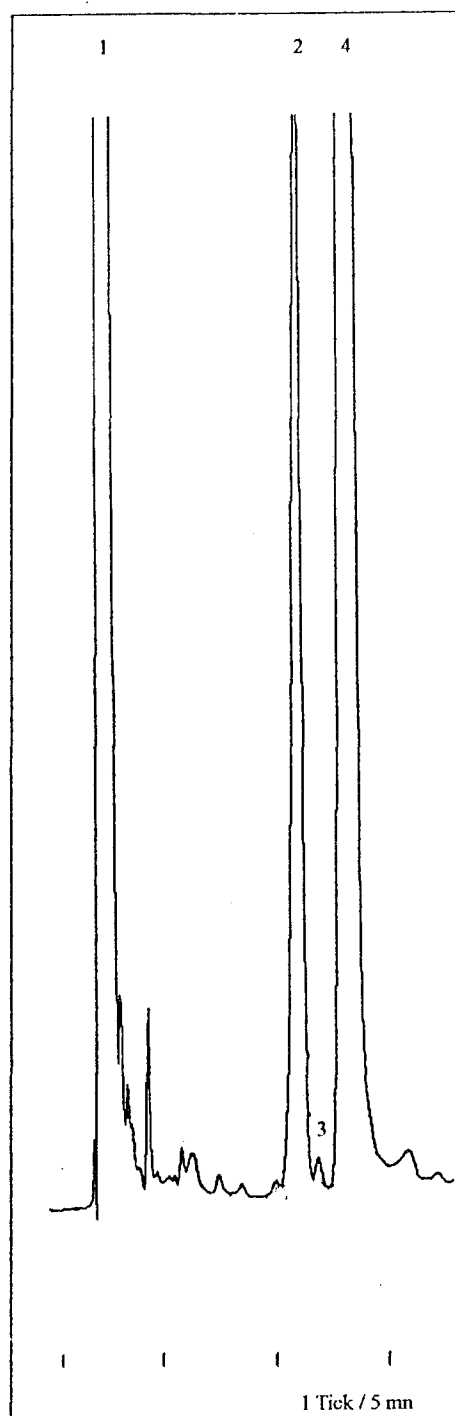
Annexe VIIc : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence + Vit B2 (23,5 mg / 100 ml).

1 = Vit C ; 2 = acide folique ; 4 = Vit B2.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe VIId : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence + Vit B2 (23,5 mg / 100 ml).

1 = Vit C ; 2 = acide folique ; 3 = impureté Vit B2 ; 4 = Vit B2.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^{\circ} = 25^{\circ} C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.

CALCUL DE LA RESOLUTION ENTRE :

- la Vit B₉ et une impureté de la Vit B₂,
- la Vit B₉ et la Vit B₂,
- colonne thermostatée à 25° C.

La résolution entre deux pics A et B est définie par la formule :

$$R = \frac{\text{Tr B} - \text{Tr A}}{0,85 (W1/2 A + W1/2 B)}$$

Avec : - Tr A et Tr B = temps de rétention des pics A et B,

- W1/2 A et W1/2 B = largeur des pics A et B à mi hauteur.

Résolution entre la Vit B₉ et l'impureté de la Vit B₂ :

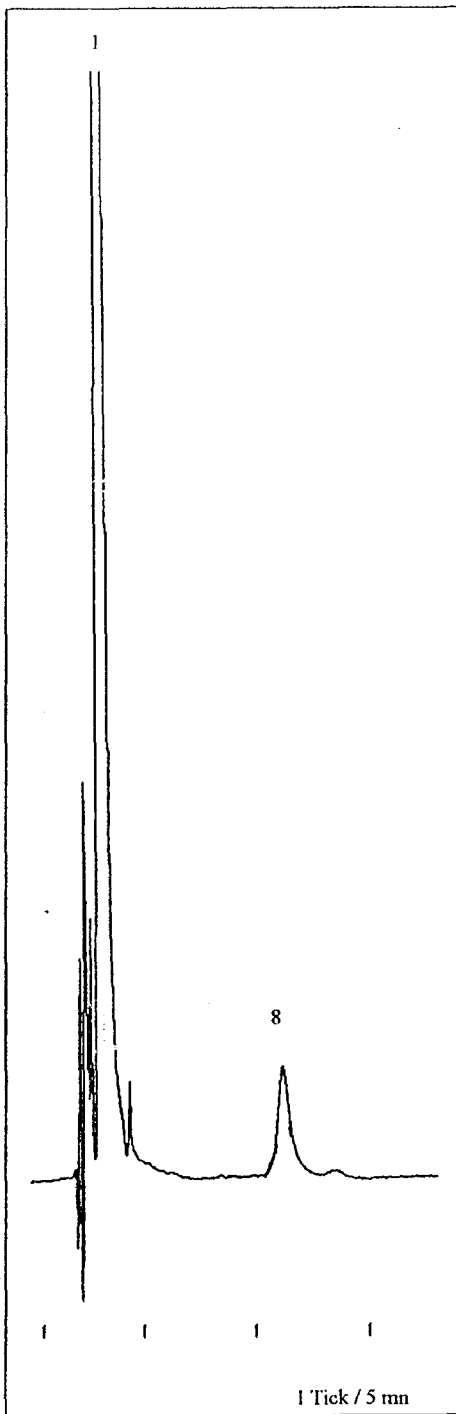
- Tr Vit B₉ = 10,9 min,
- Tr impureté Vit B₂ = 11,8 min,
- W1/2 Vit B₉ = 24,1 s,
- W1/2 impureté Vit B₂ = 24,9 s.

D'où R = 1,3 ce qui est insuffisant (<1,5).

Résolution entre Vit B₉ et Vit B₂ :

- Tr Vit B₉ = 10,9 min,
- Tr Vit B₂ = 13,1 min,
- W1/2 Vit B₉ = 24,1 s,
- W1/2 Vit B₂ = 21,8 s.

D'où R = 3,4 ce qui est bon (> 1,5).



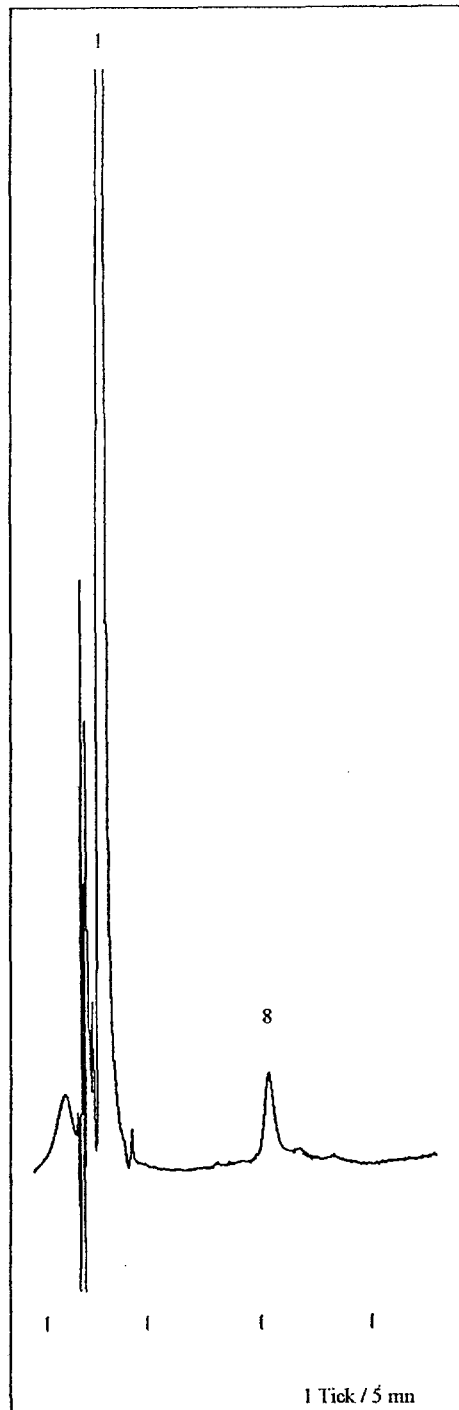
Annexe VIIe : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit PP (amide nicotinique à 223,6 mg / 100 ml).

1 = Vit PP ; 8 = impureté de la vit PP.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



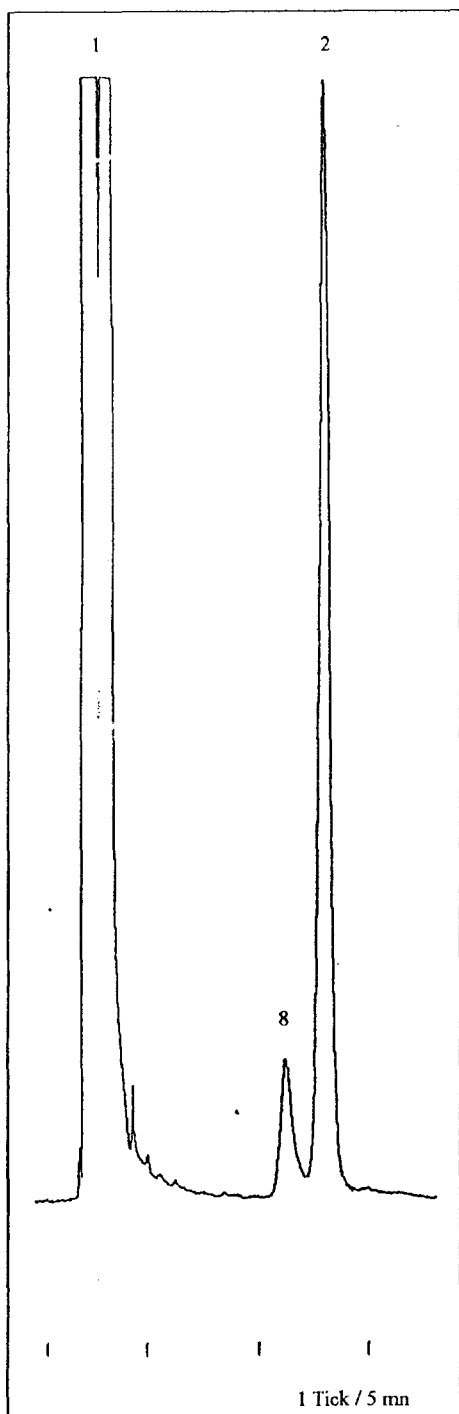
Annexe VIIf : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit PP (amide nicotinique à 304 mg / 100 ml).

1 = Vit PP ; 8 = impureté de la vit PP.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^{\circ} = 25^{\circ} C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



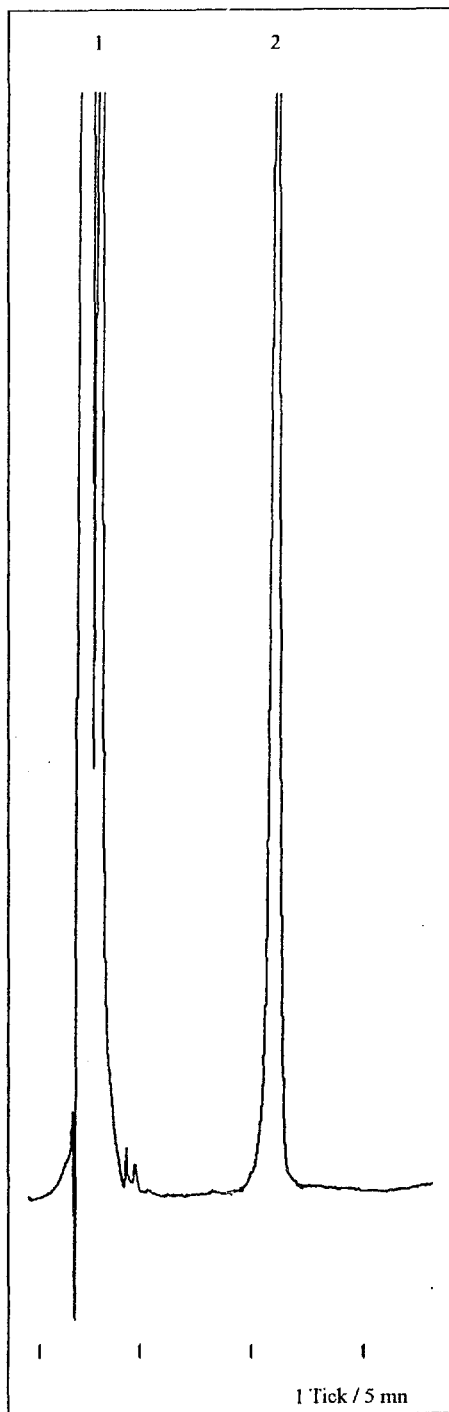
Annexe VIIg : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence + Vit PP (225,1 mg / 100 ml).

1 = Vit C + PP ; 2 = acide folique ; 8 = impureté Vit PP.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 (t° ambiante). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe VIIh : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence + Vit PP (230,2 mg / 100 ml).

1 = Vit C + PP ; 2 = acide folique + impureté Vit PP.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,3 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.

ANNEXE VIII

INFLUENCE DU pH DE LA PHASE MOBILE SUR LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE :

- ACIDE FOLQUE SEUL pH 3,5.

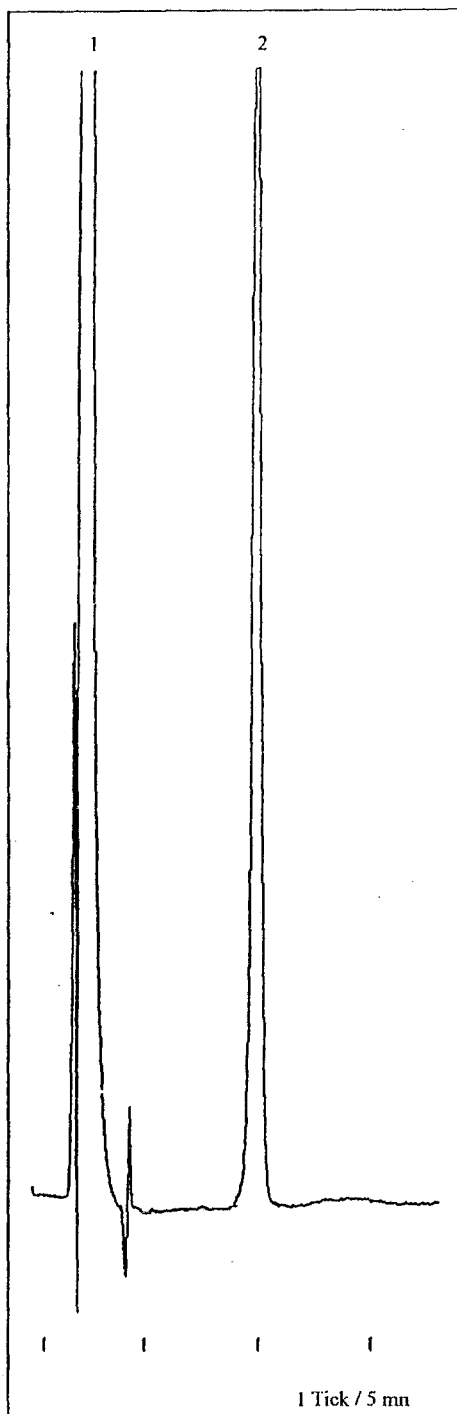
- MELANGE DES VITAMINES B₁ - B₂ - B₆ - B₁₂ - PP et C, pH 3,5.

- ACIDE FOLQUE SEUL pH 3,3.

- MELANGE DES VITAMINES B₁ - B₂ - B₆ - B₁₂ - PP et C, pH 3,3.

- ACIDE FOLQUE SEUL pH 3,1.

- MELANGE DES VITAMINES B₁ - B₂ - B₆ - B₁₂ - PP et C, pH 3,1.



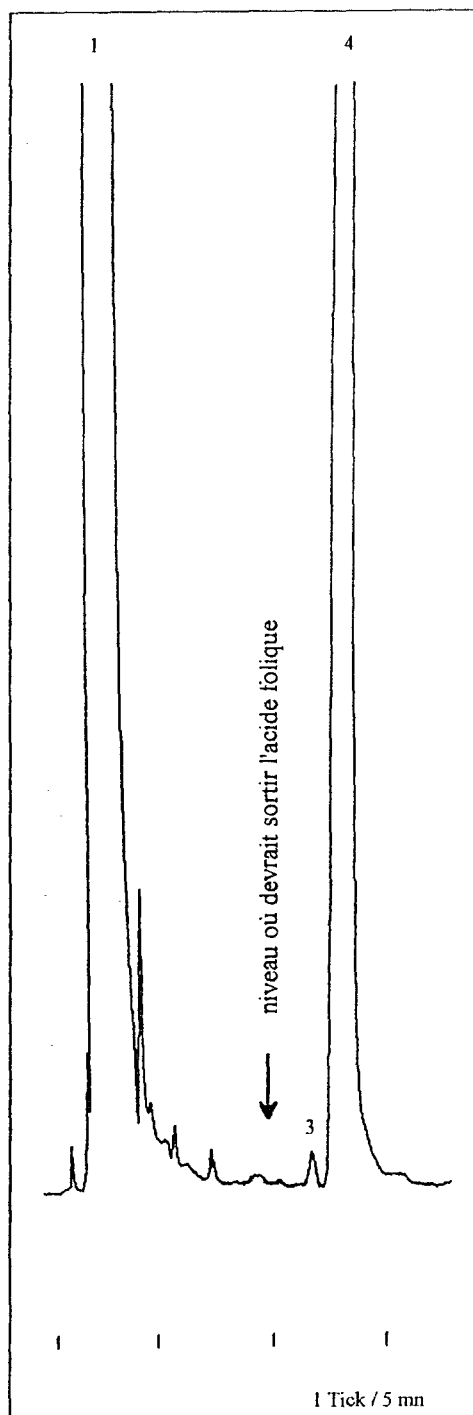
Annexe VIIIa : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence.

1 = Vit C ; 2 = acide folique.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à **pH 3,5** avec H_2PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



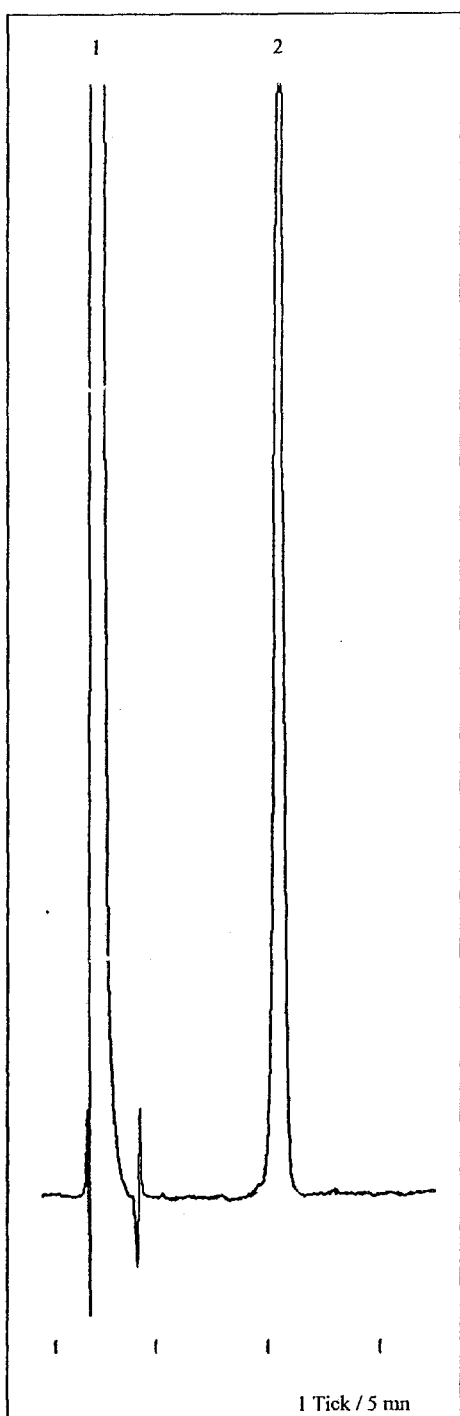
Annexe VIIIb : chromatogramme obtenu avec un mélange des vitamines B1 - B2 - B6 - B12 - PP et C.

1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 3 = Vit B2 ;
4 = impureté Vit B2

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à **pH 3,5** avec H_2PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



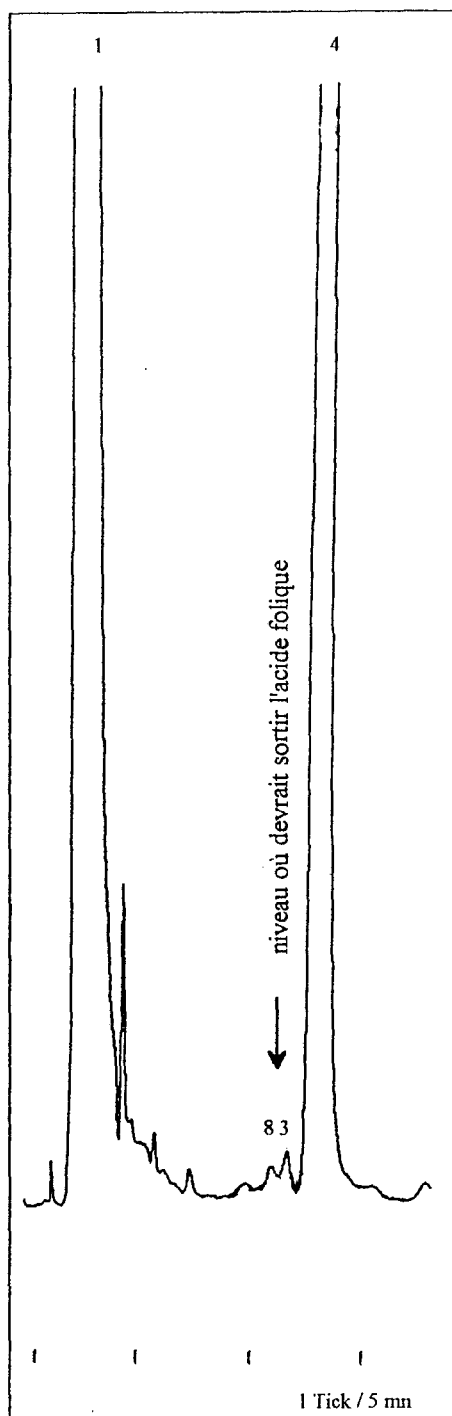
Annexe VIIIc : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence.

1 = Vit C ; 2 = acide folique.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à **pH 3,3** avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



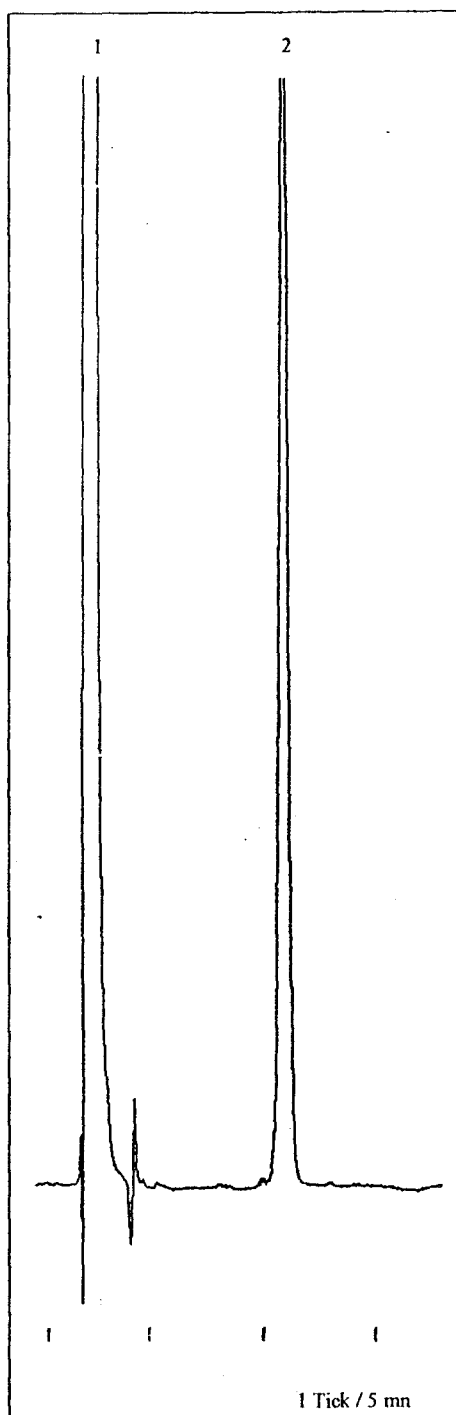
Annexe VIIId : chromatogramme obtenu avec un mélange des vitamines B1 - B2 - B6 - B12 - PP et C.

1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 3 = Vit B2 ;
4 = impureté Vit B2 ; 8 = impureté Vit PP.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à **pH 3,3** avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



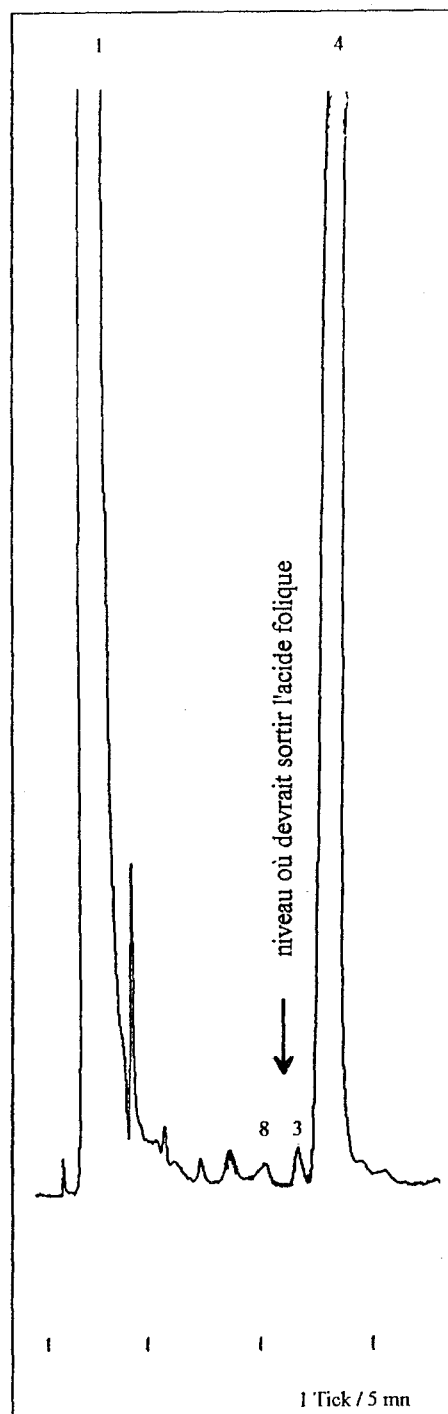
Annexe VIIIe : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence.

1 = Vit C ; 2 = acide folique.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à **pH 3,1** avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe VIII f : chromatogramme obtenu avec un mélange des vitamines B1 - B2 - B6 - B12 - PP et C.

1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 2 = acide folique ; 3 = Vit B2 ; 4 = impureté Vit B2 ; 8 = impureté Vit PP.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à **pH 3,1** avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.

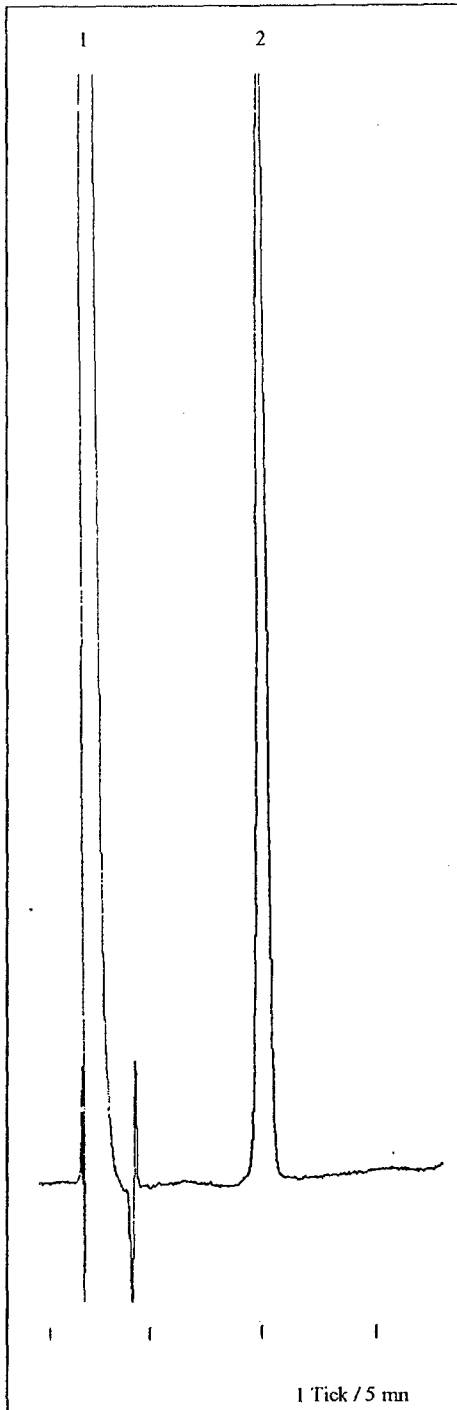
ANNEXE IX

SPECIFICITE DE LA METHODE :

- COLONNE THERMOSTATEE A 25° C,**
- pH DE LA PHASE ELUANTE FIXE A 3,5.**

**NOUS N'AVONS TESTE QUE LES VITAMINES B₁ - B₂ - B₆ - B₁₂ - PP
ET C, SEULES SUSCEPTIBLES DE DONNER UNE INTERFERENCE
DANS LES CONDITIONS DE L'ANALYSE (VOIR ANNEXE III).**

**CHAQUE CHROMATOGRAMME EST PRESENTE EN DOUBLE CE
QUI CORRESPOND A L'INJECTION SUCCESSIVE DE DEUX FOIS LE
MEME ECHANTILLON ;
CECI AFIN DE MONTRER L'INTERFERENCE SURVENANT AVEC LA
VITAMINE B₆.**



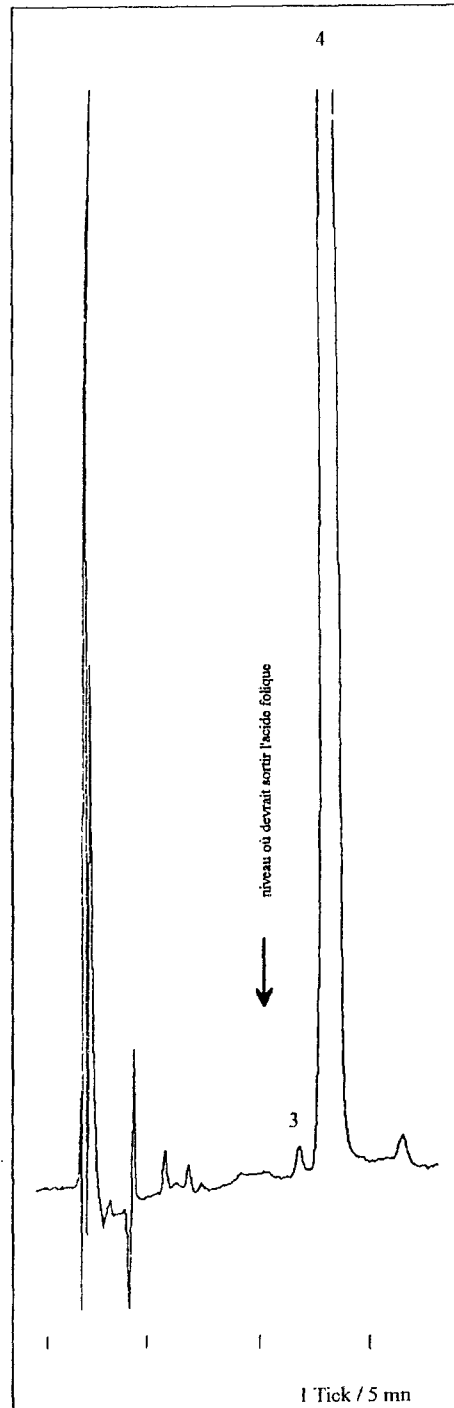
Annexe IXa : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence.

1 = Vit C ; 2 = acide folique (ou Vit B9).

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IXb : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B2 (riboflavine base à 20,3 mg / 100 ml). Inj n° 1.

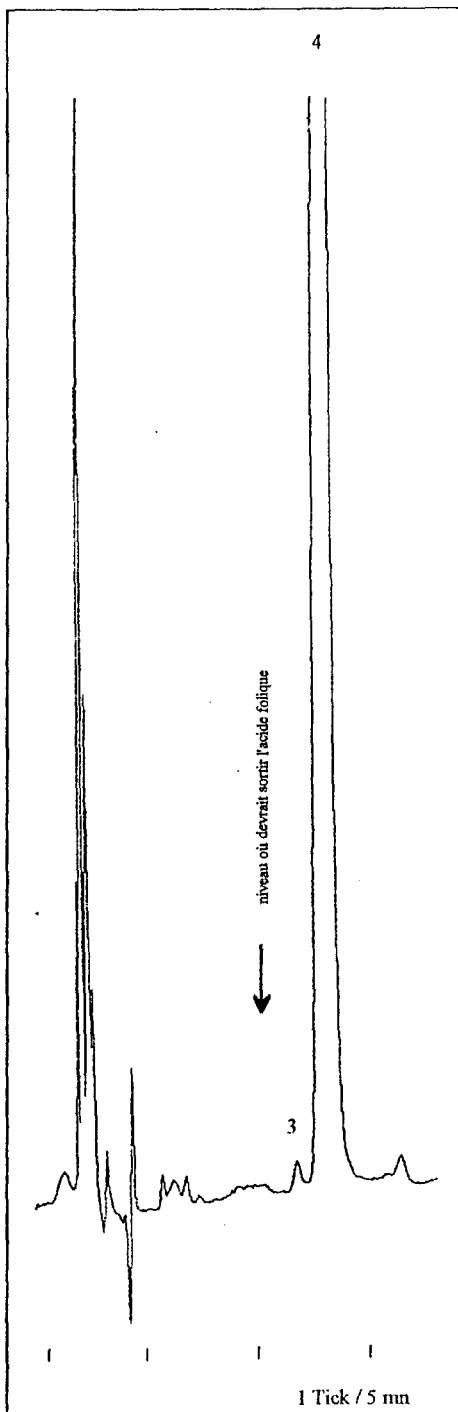
3 = impureté de la Vit B2 ; 4 = Vit B2.

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IXc : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B2 (riboflavine base à 20,3 mg / 100 ml). **Inj n° 2**.

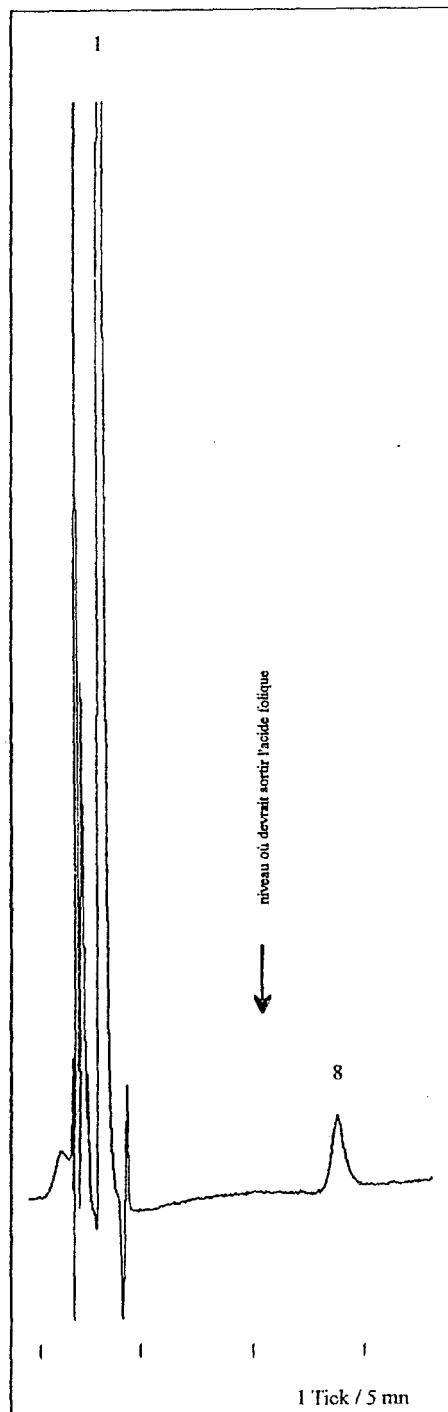
3 = impureté de la Vit B2 ; 4 = Vit B2.

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IXd : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit PP (amide nicotinique à 123,2 mg / 100 ml). **Inj n° 1**.

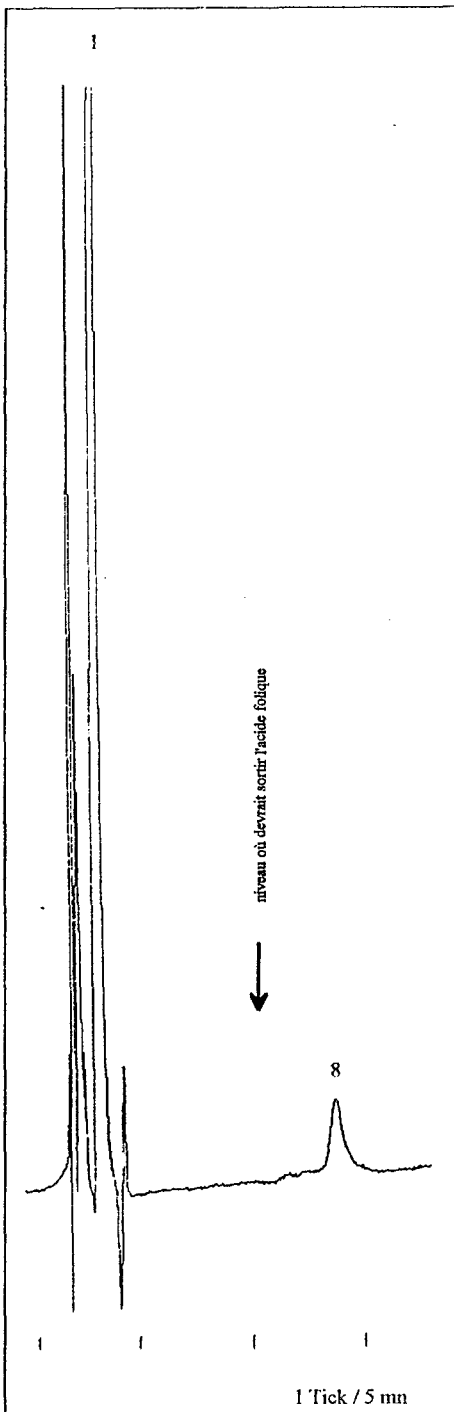
1 = Vit PP ; 8 = impureté de la Vit PP.

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IXe : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit PP (amide nicotinique à 123,2 mg / 100 ml). **Inj n° 2.**

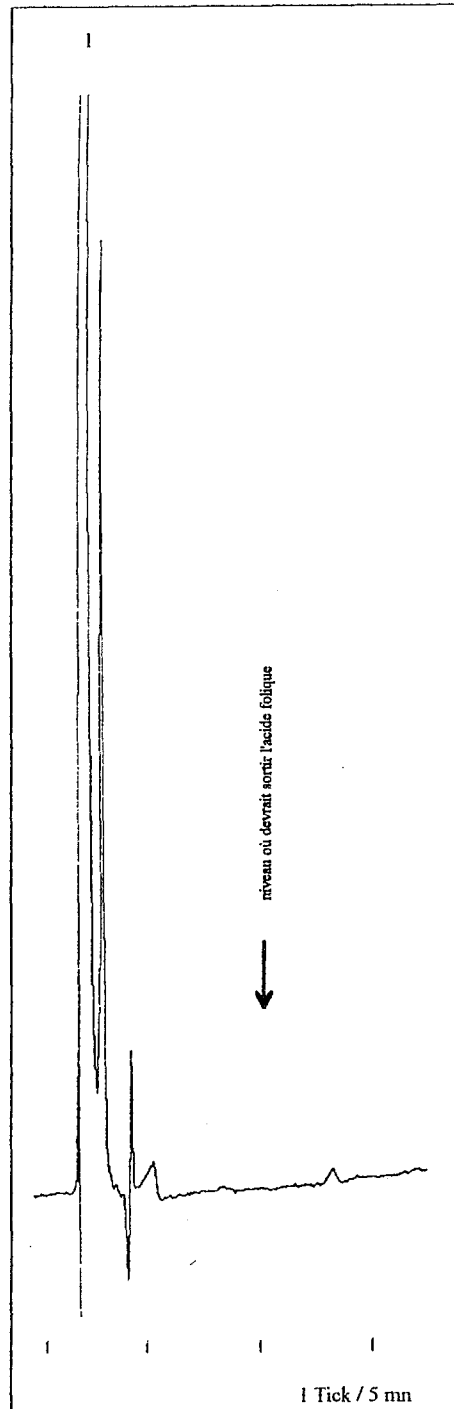
1 = Vit PP ; 8 = impureté de la Vit PP.

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_4 ($t^{\circ} = 25^{\circ} C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IXf : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B1 (thiamine HCl à 27,5 mg / 100 ml). **Inj n° 1.**

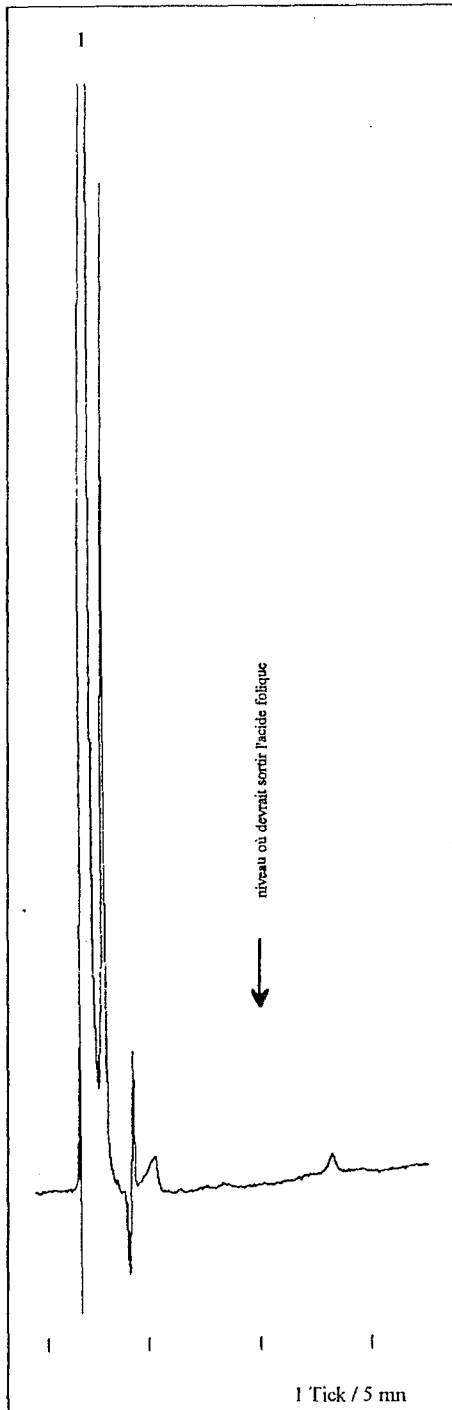
1 = Vit B1.

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_4 ($t^{\circ} = 25^{\circ} C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IXg : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B1 (thiamine HCl à 27,5 mg / 100 ml). **Inj n° 2**.

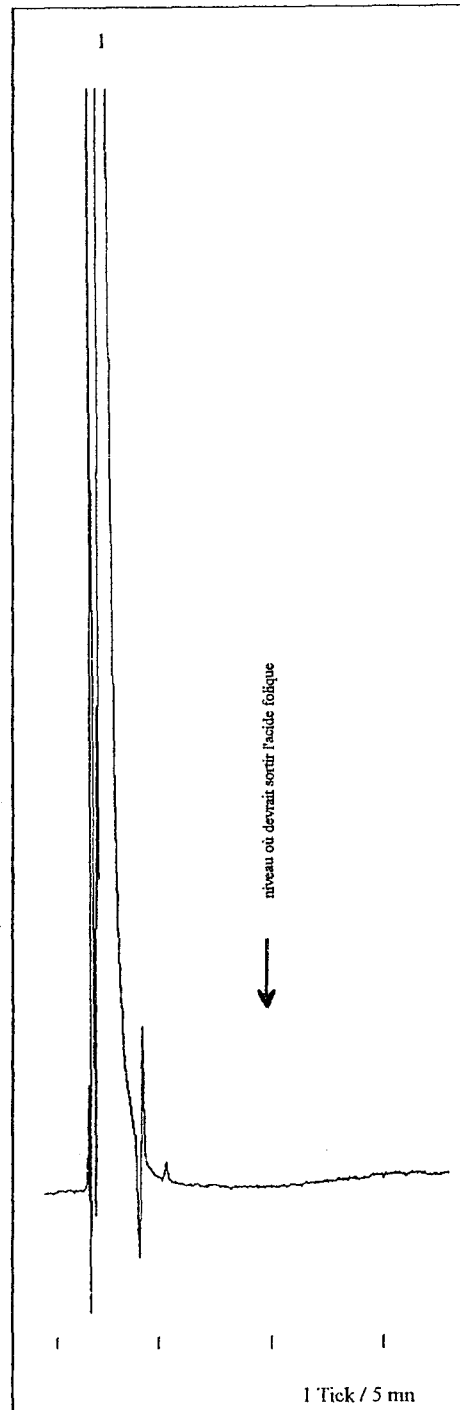
1 = Vit B1.

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IXh : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B6 (pyridoxine HCl à 45,3 mg / 100 ml). **Inj n° 1**.

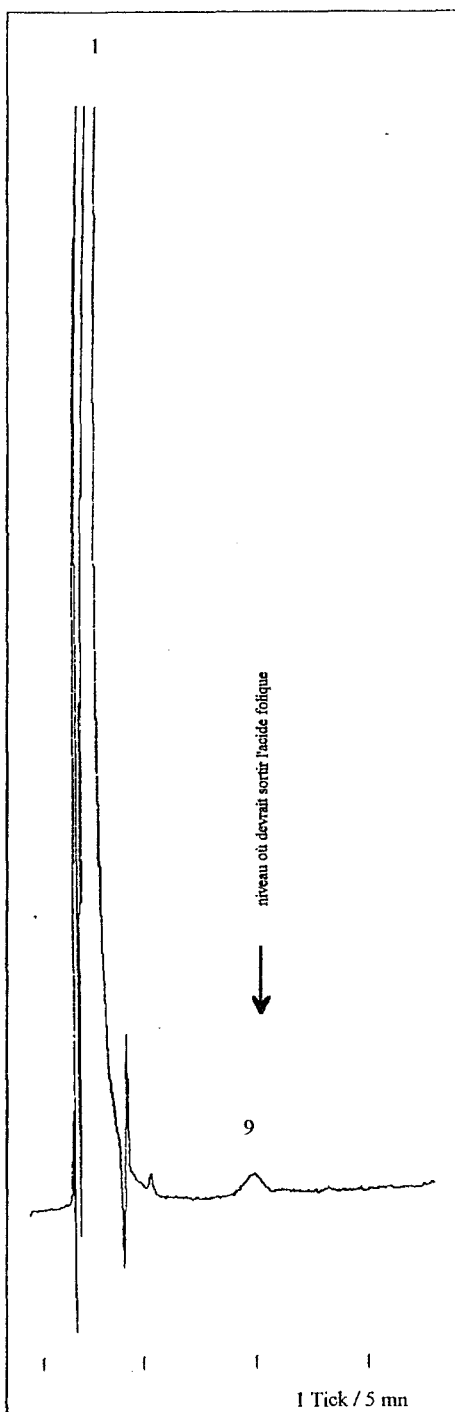
1 = Vit B6.

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn



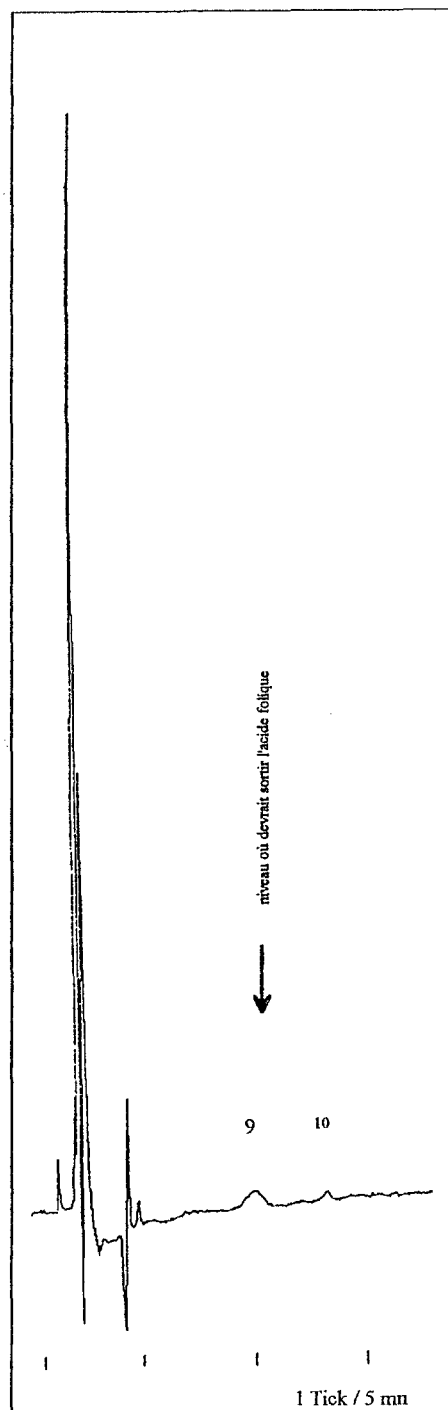
Annexe IXi : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B6 (pyridoxine HCl à 45,3 mg / 100 ml). **Inj n° 2.**

1 = Vit B6 ; 9 = impurété de la Vit B6 ayant un temps de rétention de l'ordre de 30 minutes.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn



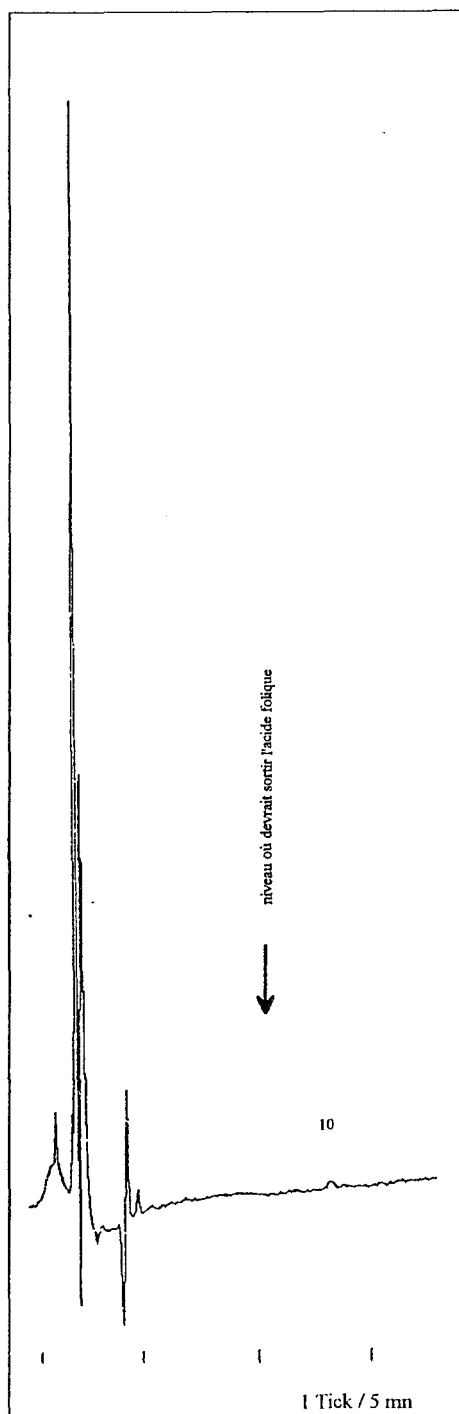
Annexe IXj : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B12 0,1 % w / s à 123,6 mg / 100 ml. **Inj n° 1.**

9 = impurété de la Vit B6 ayant un temps de rétention de l'ordre de 30 minutes ; 10 = impurété non identifiée.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle. Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn



Annexe IXk : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit B12 0,1 % w / s à 123,6 mg / 100 ml. Inj n° 2:

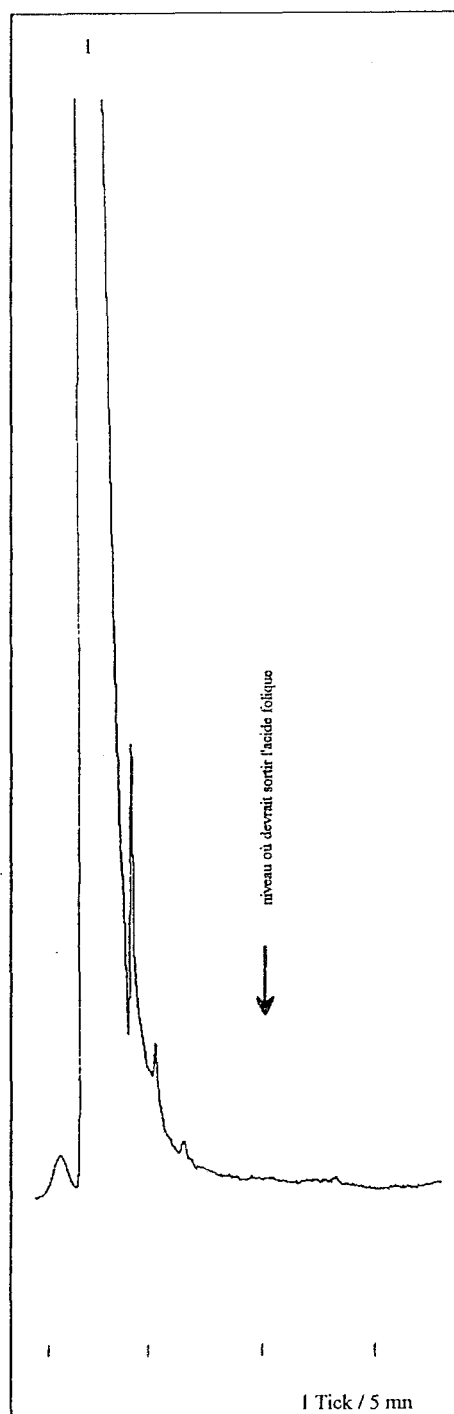
10 = impureté non identifiée.

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C₄ (t° = 25° C). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H₃PO₄ concentré.

Débit = 1 ml / mn



Annexe IXl : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit C (acide ascorbique à 3,0 g / 100 ml). Inj n° 1.

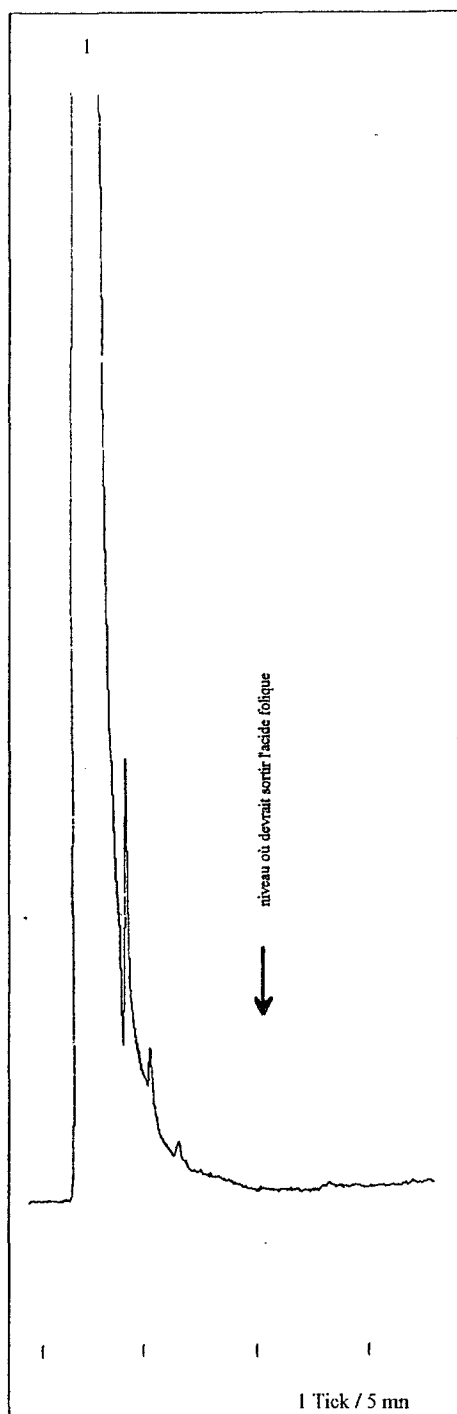
1 = Vit C :

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C₄ (t° = 25° C). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H₃PO₄ concentré.

Débit = 1 ml / mn.



Annexe IXm : chromatogramme obtenu avec une solution de Vit C (acide ascorbique à 3,0 g / 100 ml). **Inj n° 2**.

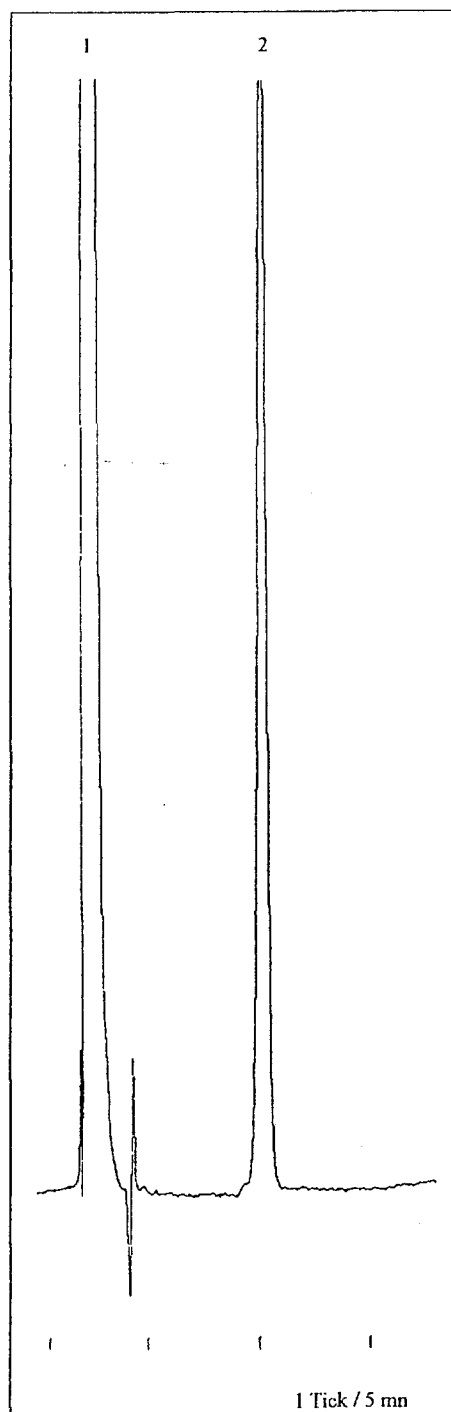
1 = Vit C.

Aucun pic détecté au niveau de la sortie de la Vit B9.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.



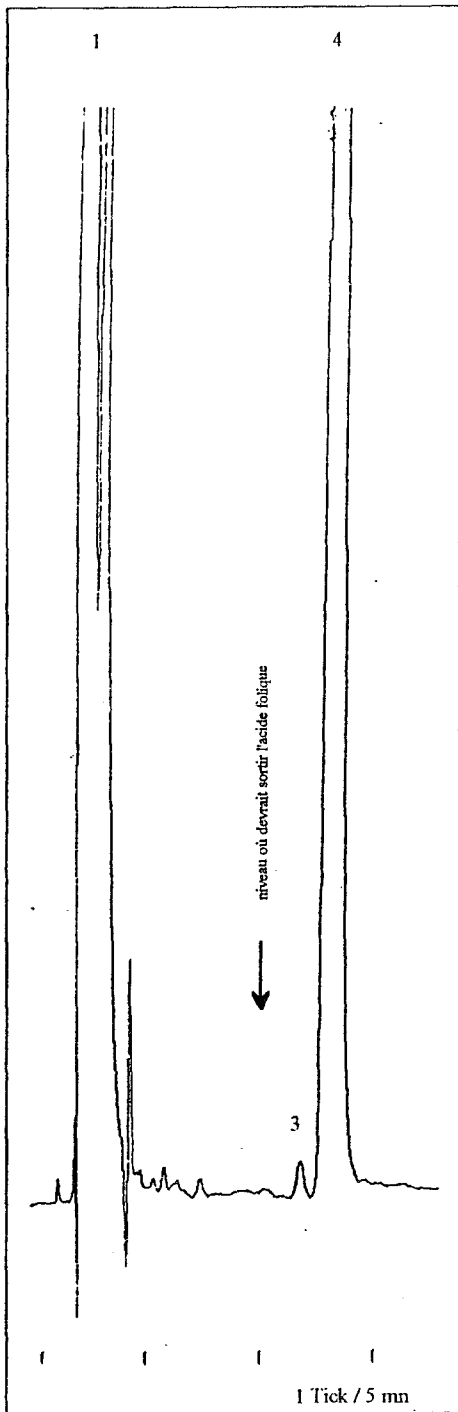
Annexe IXn : chromatogramme obtenu avec la solution d'acide folique de référence.

1 = Vit C ; 2 = acide folique (ou Vit B9).

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium, le tout ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré.

Débit = 1 ml / mn.

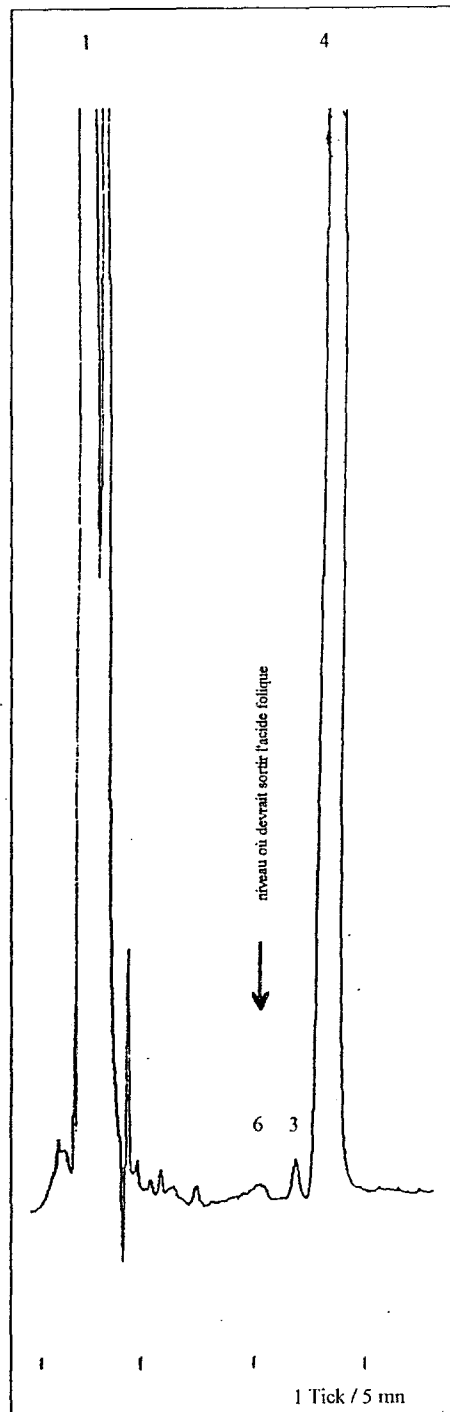


Annexe IXo : chromatogramme obtenu avec le "placebo" du
MELANGE POLYVITAMINIQUE n° 32.

1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 3 = impureté de la Vit B2 ;
4 = Vit B2 + impureté Vit PP.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + so-
lution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium. le tout
ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré. Débit = 1 ml / mn.



Annexe IXp : chromatogramme obtenu avec le "placebo" du
MELANGE POLYVITAMINIQUE n° 30.

1 = Vit B1 + B6 + PP + C ; 3 = impureté de la Vit B2 ;
4 = Vit B2 + impureté Vit PP ; 6 = impureté de la Vit B6 prove-
nant de l'injection précédente.

Conditions chromatographiques :

Colonne en C_8 ($t^\circ = 25^\circ C$). U.V = 280 nm. Injecteur à boucle.
Phase éluante composée de tétrahydrofurane + acétonitrile + so-
lution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium. le tout
ajusté à pH 3,5 avec H_3PO_4 concentré. Débit = 1 ml / mn.

ANNEXE X

REGRESSION LINEAIRE ETUDIEE SUR UNE SOLUTION D'ACIDE FOLIQUE DE CONCENTRATION COMPRISE ENTRE 200 ET 800 ng / ml.

REPETABILITE DE LA METHODE EFFECTUEE SUR UNE SOLUTION D'ACIDE FOLIQUE A 400 ng /100 ml DE SOLUTION A.

**ETUDE DE LA LINEARITE DE LA METHODE SUR UNE SOLUTION
D'ACIDE FOLIQUE PUR EN SOLUTION DANS LE TAMPON PHOS-
PHATE PH 7,4 + ACIDE ASCORBIQUE A 0,2 % (M/V).**

Procédure : - 5 solutions de concentration variant de 0,2 à 0,8 µg / ml en Vit B9
sont injectées trois fois chacune.

- On mesure la surface du pic obtenu pour chaque mesure (counts).

LINEARITY WITH F-TEST

Legend: X: ng/ml Y: counts

Value No	X	Y	Y(calc)	Y - Y(calc)
1	2.038E+02	6.551E+03	6.080E+03	4.712E+02
		5.781E+03	6.080E+03	-2.988E+02
		5.956E+03	6.080E+03	-1.238E+02
2	3.058E+02	9.336E+03	9.079E+03	2.574E+02
		8.844E+03	9.079E+03	-2.346E+02
		8.805E+03	9.079E+03	-2.736E+02
3	4.077E+02	1.236E+04	1.207E+04	2.856E+02
		1.191E+04	1.207E+04	-1.674E+02
		1.208E+04	1.207E+04	6.633E+00
4	6.115E+02	1.823E+04	1.807E+04	1.668E+02
		1.804E+04	1.807E+04	-2.299E+01
		1.815E+04	1.807E+04	8.001E+01
5	8.153E+02	2.396E+04	2.406E+04	-9.562E+01
		2.412E+04	2.406E+04	6.138E+01
		2.394E+04	2.406E+04	-1.196E+02

Parameter	Estimated	Standard	Confidence
Limits	Value	Deviation	(P=95%, f=13)
t=2.160)			
Intercept	8.817E+01	1.408E+02	-2.160E+02 to
3.924E+02			
Slope	2.940E+01	2.720E-01	2.881E+01 to
2.999E+01			
Residual Stand. Dev.		2.313E+02	
Correlation Coeff.	0.9994		

Regression Line $Y = 8.817E+01 + 2.940E+01 \cdot X$

F-Test $F' = 0.27$ $F(0.95; 3; 10) = 3.7$

Comment:

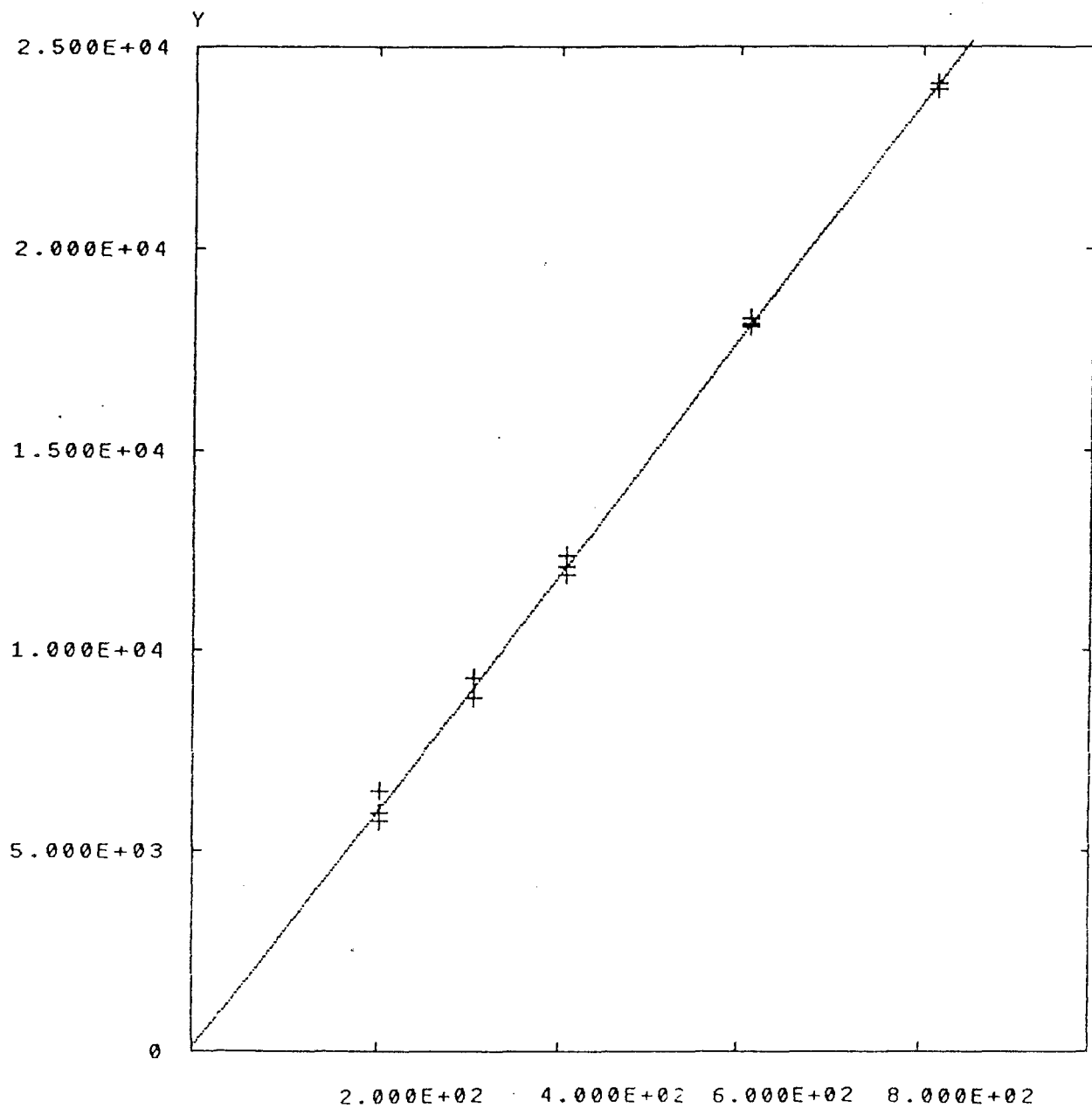
The correlation coefficient of the regression line exceeds 0.99

The confidence interval of the intercept contains the origin

$F' < F$: Linearity corresponds

LINEARITY WITH F-TEST

Legend: X: nG/mL Y: count



**ETUDE DE LA REPETABILITE DE LA METHODE SUR UNE SOLU-
TION D'ACIDE FOLIQUE A 0,4 µg/ml DANS LE TAMPON PHOSPHA-
TE pH 7,4 ADDITIONNE D'ACIDE ASCORBIQUE (0,2 % m/v).**

Procédure : le coefficient de variation a été calculé à partir de 15 injections de la solution d'acide folique à 0,4 µg/ml effectuées dans la même journée.

PRECISION: STANDARD DEVIATION (REPEATABILITY, ONE SAMPLE)

Legend: X: COUNT X_m: Mean Value

Value No	X	X - X _m	100%·(X-X _m)/X _m
1	1.207E+04	8.727E+01	0.73
2	1.183E+04	-1.507E+02	-1.26
3	1.194E+04	-3.773E+01	-0.31
4	1.198E+04	1.267E+00	0.01
5	1.177E+04	-2.117E+02	-1.77
6	1.208E+04	9.827E+01	0.82
7	1.206E+04	7.927E+01	0.66
8	1.213E+04	1.503E+02	1.25
9	1.197E+04	-6.733E+00	-0.06
10	1.172E+04	-2.567E+02	-2.14
11	1.188E+04	-1.017E+02	-0.85
12	1.212E+04	1.403E+02	1.17
13	1.196E+04	-2.173E+01	-0.18
14	1.233E+04	3.533E+02	2.95
15	1.186E+04	-1.227E+02	-1.02

Mean Value:	1.198E+04
Absolute Standard Deviation:	1.584E+02
Relative Standard Deviation:	1.32 %
Confidence Limits (P=95%):	1.189E+04 to 1.207E+04

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ADRIAN-J.
Dosage microbiologique des vitamines du groupe B.
CNRS Paris, 1959.
- 2 ALLEN-B.A ; NEWMAN-R.A.
HPLC separation of clinically important folic acid derivates using ion-pair chromatography.
J. Chromatogr., 1980 ; **190** (1) : 241-45.
- 3 ANDERSON-D ; WILKINSON-A ; ABOU-SALEY-M ; FARRAR-G ;
BLAIR-J.A.
Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate.
The British Journal of Psychiatry, 1992 ; **160** (1) : 130.
- 4 ANONYME.
Vita Memo : L'essentiel sur les vitamines.
Centre d'étude et d'Information sur les Vitamines.
Laboratoires PRODUITS ROCHE, 1991.
- 5 AUGET-J.L ; MACCARIO-J.
Mésusage du coefficient de corrélation linéaire dans la comparaison de deux méthodes.
R. B. M., 1981 ; **3** (3) : 187-92.
- 6 BAIJAL-E ; JONES-I.G ; ROWORTH-M ; WALKER-D.
Folic acid to prevent neural tube defects.
Lancet, 1991 ; **338** (8765) : 506.
- 7 BAILEY-L.B
Folate status assesment.
J. Nutr., 1990 ; **120**, suppl 11 : 1508-11.

- 8 BERGER-I ; BERGER-M ; SCHMAHL-D.
Le rôle des vitamines dans la prophylaxie et le traitement du cancer.
Centre d'Etude et d'Information sur les Vitamines.
Laboratoires PRODUITS ROCHE, 1988.
- 9 BOREL-J.P ; RANDOUX-A ; MAQUART-F.X ; LE PEUCH-C ;
VALEYRE-J.
Biochimie Dynamique.
Maloine Décarie éditeur, 1987.
- 10 BOTEZ-M.I ; BOTEZ-T.
Neurologic and psychiatric illness and folate deficiency, a review.
in : Aspects actuels des carences en fer et en folates dans le monde.
HERCBERG-S ; GALAN-P ; DUPIN-H.
Colloque INSERM, 1990 ; 197 : 429-40.
- 11 BOTEZ-M.I ; YOUNG-S.N ; BACHSEVALIER-J ; GAUTHIER-S.
The effect of folic acid and vitamin B12 deficiencies on 5-hydroxyindol
acetic acid in human cerebrospinal fluid.
Ann. Neurol., 1982 ; 12 : 479-84.
- 12 BOTTIGLIERI-T ; LAUNDY-M ; GODFREY-P ; CARNEY-M.W.P ;
TOONE-B.K ; REYNOLDS-E.H.
Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate.
Lancet, 1990 ; 336 (8730) : 1579-80.
- 13 BOTTIGLIERI-T ; LAUNDY-M ; CARNEY-M.W.P ;
CHARY-T.K.N ; TOONE-B.K ; REYNOLDS-E.H.
Folate status in psychiatric patients : relationship with CSF neurotrans-
mitter metabolites.
Chemistry and Biology of Pteridines.
Eds WALTER de GRUYTER and Co, Berlin, 1986.

- 14 BOTTIGLIERI-T ; LAUDY-M ; MARTIN-R ; CARNEY-M.W.P ;
NISSENBAUM-H ; TOONE-B.K ; JOHNSON-A.L ;
REYNOLDS-E.H.
S-adenosylmethionine influences monoamine metabolism.
Lancet, 1984 ; **2** (8396) : 224.
- 15 BOUDE-P ; ZITTOUN-J ; SOBEL-A.
Folate, vitamin b12, and HIV infection
Lancet, 1990 ; **335** (8702) : 1401-2.
- 16 BRIGGS-D.R ; JONES-G.P ; SAE-EUNG-P.
Isocratic separation of food folacin by HPLC.
J. Chromatogr., 1982 ; **246** (1) : 165-68.
- 17 BROCKER-P ; LODS-J.C ; LAFFONT-C.
Dépistage de la carence en folates en gériatrie : folates sériques ou
érythrocytaires.
in : Aspects actuels des carences en fer et en folates dans le monde.
HERCBERG-S ; GALAN-P ; DUPIN-H.
Colloque INSERM, 1990 ; **197** : 475-78.
- 18 BUREAU -J.P ; RITTER-J ; BONHOMME-J.S.
Les anomalies du colpocytogramme au cours des anémies par carence
en acide folique.
Nouv. Presse Med., 1973 ; **2** : 1661-63.
- 19 BUTTERWORTH-C.E ; HATCH-K.D ; MACALUSO-M ; COLE-P ;
SAUDERLICH-H.E ; SOONG-S.J ; BORST-M ; BAKER-V.V.
Folate deficiency and cervical dysplasia.
JAMA, 1992 ; **267** (4) : 528-33.

- 20 BUTTERWORTH-C.E ; HATCH-K.D ; SOONG-S.J ; COLE-P ; TAMURA-T ; SAUDERLICH-H.E ; BORST-M ; MACALUSO-M ; BAKER-V.V.
Oral folic acid supplementation for cervical dysplasia : a clinical intervention trial.
Am. J. Obstet. Gynecol., 1992 ; **166** : 803-09.
- 21 CACOUB-P ; GATFOSSE-M ; DERBEL-A ; CHAPELON-C ; VERNY-C ; GODEAU-P.
Pancytopenie carencielle mimant une leucémie.
La Presse Médicale, 1991 ; **20** (33) : 1603-06.
- 22 CARNEY-M.W.P ; SHEFFIELD-B.F.
Neuropharmacology of 5-adenosyl methionine.
Clin. Neuropharmacol., 1986 ; **9** : 235-43.
- 23 CAUDE-M ; ROSSET-R.
Automatisation de la détermination de l'acide folique dans les produits diététiques par CLHP.
Analisis, 1989 ; **17** (6) : 315-18.
- 24 COPPEN-A ; SWADE-C ; JONES-S.A ; ARMSTRONG-R.A ; BLAIR-J.A ; LEEMING-R.J.
Depression and tetrahydrobiopterin : the folate connection.
J. Affective Dis., 1989 ; **16** : 103-07.
- 25 CURCIO-M ; CATTO-E ; STRAMENTINOLI-G ; ALGERI-S.
Effect of 5-adenosyl-L-methionine on serotonin metabolism in rat brain.
Prog. Neuro. Psychopharmacol., 1978 ; **2** :65-71.
- 26 DANSKY-L ; ROSENBLATT-D.S ; ANDERMANN-E.
Mechanism of teratogenesis : folic acid and antiepileptic therapy.
Neurology, 1992 ; **42**, suppl 5 : 32-42.

- 27 DAS-K ; HOFFBRAND-H.
Lymphocyte transformation in megaloblastic anemia. Morphology and DNA synthesis.
Brit. J. Haematol., 1970 ; **19** : 459.
- 28 DAVIS-R.E.
Folic acid to prevent neural tube defect.
Lancet, 1991 ; **338** (8765) : 506.
- 29 DEL SER QUIJANO-T ; BERMEJO PAREJA-F ; MUNOZ GARCIA-D ; PORTERA-A.
Psychological disturbance and folic acid in chronic epileptic patients.
Epilepsia, 1983 ; **24** : 588-96.
- 30 DHUR-A ; GALAN-P ; CHRISTIDES-J.P ; POTIER DE COUREY-G
PREZIOSI-P ; HERCBERG-S.
Effect of folic acid deficiency upon lymphocyte subsets from lymphoid organs in mice.
Comp. Biochem. Physiol., 1991 ; **98 a** (2) : 235-40.
- 31 ECONOMIDES-D.L ; FERGUSON-J ; MACKENZIE-I.Z ;
DARLEY-J ; WARE-I.I ; HOLMES-SIEDLE-H.
Folate and vitamin B12 concentrations in maternal and fetal blood, and amniotic fluid in second trimester pregnancies complicated by neural tube defects.
British Journal of Obstetrics and Gynecology, 1992 ; **99** : 23-25.
- 32 EGUILEOR-I ; ORTEGA-R.M ; MOREIRAS VAREA-O ;
ANDRES-P.
Folic acid status of an institutionalised elderly group in Madrid.
in : Aspects actuels des carences en fer et en folates dans le monde.
HERCBERG-S ; GALAN-P ; DUPIN-H.
Colloque INSERM, 1990 ; **197** : 471-74.

- 33 ELMER de RITTER.
Vitamins in pharmaceuticals formulations.
Journal of Pharmaceutical Sciences, 1982 ; **71** (10) : 1073-96.
- 34 FAWAZ-M ; NOVOVITCH-M ; ALARY-J.
Identification et dosage de l'acide folique et des folates par CLHP. Validation de la méthode.
Ann. Pharm. Fr., 1988 ; **46** (2) : 121-28.
- 35 GIRARD-P.M ; BRUN PASCAUD-M ; ROUX-P.
Traitement de la pneumocystose : évaluation préclinique.
Rev. Pneumol. Clin., 1991 ; **47** (3) : 109-14.
- 36 GREGORY-J.F ; DAY-B.P.F ; RISTON-K.A.
Comparaison of H.P.L.C., radiometric, and Lactobacillus casei methods for the determination of folacin in selected food.
J. Food. Sci., 1982 ; **47** (5) : 1568-71.
- 37 HERBERT-T.V.
Experimental nutritional folate deficiency in man.
Trans. Assoc. Amer. Physicans, 1962 ; **75** : 307-20.
- 38 HOLZGREVE-W ; TERCAULI-S ; PIETRIZIK-K.
Vitamins to prevent neural tube defects.
Lancet, 1991 ; **338** (8767) : 639-40.
- 39 HUTIN-Y ; EUGENE-C.
Sprue tropicale révélée par une anémie sévère chez une femme d'origine Guadeloupéenne.
Gastrenterol. Clin. Biol., 1992 ; **16** (3) : 278-80.
- 40 JACOBSON-W ; WREGHITT-T.G ; SAICH-T ; NAGINGTON-S.
Serum folate in viral and mycoplasmal infections.
J. Infections, 1987 ; **14** : 103-11.

- 41 JAMES-L ; TUOMILEHTO-J ; KAIF-Y.U ; COLMAN-n ;
BLANES-S ; KOSKELA-P ; RUNDLE-W.E ; FORMAN-M ;
TOIVANEN-L ; RHOADS-G.C.
Maternal vitamin levels during pregnancies producing infants with neu-
ral tube defects.
J. Pediatr., 1992 ; **120** (6) : 863-71.
- 42 JENKINS-J.
An HPLC method for the separation and quantification of water-soluble
vitamins in vitamin-mineral formulations.
Pharmaceutical Technology, 1982 ; **6** : 53-65.
- 43 KEAGY-P.M.
Computerized semiautomated microbiological assay of folacin.
J. Assoc. Off Anal. Chem., 1986 ; **69** (5) : 773-77.
- 44 KLOTZ-F ; GUISSSET-M ; DEBONNE-J.M.
Diarrhée chronique au retour d'Afrique Noire "penser à la sprue
tropicale".
Med. Trop., 1991 ; **51** (4) : 467-70.
- 45 LASHNER-B.A ; GOMEZ-G.
Effect of folate supplementation on the incidence of dysplasia and can-
cer in chronic ulcerative colitis.
Gastroenterology, 1991 ; **100** (6) : 1789-90.
- 46 LASHNER-B.A ; HEIDENREICH-P.A ; SU-G.L ; KANE-S.V ;
HANAUER-S.B.
Effect of folate supplementation on the incidence of dysplasia and can-
cer in chronic ulcerative colitis.
Gastroenterology, 1989 ; **97** : 255-59.

- 47 LASHNER-B.A ; RANSOHOFF-D.F.
Folate supplementation in ulcerative colitis.
Gastroenterology, 1990 ; **98** (2) : 544-45.
- 48 LEEMING-R.J ; BLAIR-J.A ; WALTERS-J.
Serum dihydrobiopterin levels in patients on tricyclic antidepressant.
Psychol. Med., 1982 ; **12** (1) : 191-92.
- 49 LECERF-J.M ; FRESSIN-C ; LEFEBVRE-B ; DECKER-I ;
SALOMEZ-J.L ; SAILLY-J.C ; COLVEZ-A ; HATTON-M.F ;
ZYLBERBERG-G.
Statut en folates plasmatiques, apports énergétiques et alcooliques, bilan
hématologique de 400 personnes âgées à domicile.
in : Aspects actuels des carences en fer et en folates dans le monde.
HERCBERG-S ; GALAN-P ; DUPIN-H.
Colloque INSERM, 1990 ; **197** : 409-18.
- 50 LE GRUSSE-J.
Vitascope : l'essentiel sur les vitamines.
Centre d'Etude et d'Information sur les vitamines.
Laboratoires PRODUITS ROCHE, 1991.
- 51 LETTERS.
Folic acid to prevent neural tube defects.
Lancet, 1991 ; **338** (8763) : 379-80.
- 52 LODS-J.C ; BROCKER-P.
Troubles psychiques lors des carences en folates en gériatrie.
in : Aspects actuels des carences en fer et en folates dans le monde.
HERCBERG-S ; GALAN-P ; DUPIN-H.
Colloque INSERM, 1990 ; **197** : 479-81.

- 53 LONGRE-B.
Anémies : notions fondamentales.
Masson éditeur, 1983 : 69-88.
- 54 LOUISOT-P.
Biochimie structurale 3 : vitamines et coenzymes.
Simep - Editions, 1974.
- 55 LUBETZKI-J ; DUPREY-J ; WARNET-A.
Maladies métaboliques et de la nutrition ; Physiopathologie clinique.
J.B Baillière, 1978.
- 56 MERRY-J ; ABOU SALEH-M ; COPPEN-A.
Alcoholism, depression and plasma folate.
Brit. J. Psychiatry., 1982 ; **141** : 103-04.
- 57 MILUNSKY-A ; JICK-H ; JICK-S ; BRUEL-C ; Mc LAUGHLIN-D.S ; ROTHMAN-K.J ; WILLETT-W.
Multivitamin / folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects.
JAMA, 1989 ; **262** (20) : 2847-52.
- 58 MIRGEL-C ; PIETRZIK-K.F.
Reevaluation of folacin status.
in : Aspects actuels des carences en fer et en folates dans le monde.
HERCBERG-S ; GALAN-P ; DUPIN-H.
Colloque INSERM, 1990 ; **197** : 455-58.
- 59 MONTES-L.F ; DIAZ-M ; LAJOUS-J ; GARCIA-N.J.
Folic acid and vitamins B12 in vitiligo : a nutritional approach.
Cutis, 1992 ; **50** (1) : 39-42.

- 60 MORGAN-S.L ; BAGGOT-J.E ; VAUGHN-W.H.
The effect of folic acid supplementation on the toxicity of low-dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis.
Arthritis and Rheumatism, 1990 ; **33** (1) : 9-18.
- 61 MEDICAL RESEARCH COUNCIL VITAMIN STUDY RESEARCH GROUP.
Prevention of neural tube defect : result of the Medical Research Council Vitamin Study.
Lancet, 1991 ; **338** : 131-37.
- 62 MULLOY-W.P.
Folate deficiency anemia among pregnant females in rural Haiti.
in : Aspects actuels des carences en fer et en folates dans le monde.
HERCBERG-S ; GALAN-P ; DUPIN-H.
Colloque INSERM, 1990 ; **197** : 403-08.
- 63 NAJEAN-Y ; LEGRAND-M ; SENECHAL-A ; LEROY-M ; RAIN-J.D.
Analyse critique de 1000 dosages systématiques du taux sérique de vitamine B12 et des folates.
Presse Med., 1989 ; **18** (17) : 867-71.
- 64 NAUSS-K.M ; CONNAR-A.M ; KAVANAUGH-A ; NEWBERNE-P.N.
Alterations in immune function in rats caused by dietary lipitrope deficiency.
J. Nutr., 1982 ; **112** : 2333-41.
- 65 NEWMAN-E.M ; TSAI-J.F.
Microbiological analysis of 5-formyl tetrahydrofolic acid and other folates using an automatic 96 - Well Plate Reader.
Anal. Biochem., 1986 ; **154** (2) : 509-15.

- 66 NIYON GABO-T ; LEPORT-C ; VILDE-J.L.
Utilité de l'acide folinique dans les cytopénies induites par les médicaments antiparasitaires au cours du SIDA.
Presse Med., 1991 ; **20** (34) : 1677-81.
- 67 PARRY-T.E.
Folate deficient neuropathy.
Acta Haematol., 1990 ; **84** (2) : 108.
- 68 PARTISANI-M ; HASSAIRI-N ; BETHENCOURT-S ; LANG-J.M.
Recherche d'une corrélation entre la diminution des folates sériques et l'augmentation de la néoptérine dans l'infection par le VIH.
Presse Med., 1991 ; **20** (18) : 870-71.
- 69 PIETRZIK-K.F ; HAGE-S.
Methodological aspects in the estimation of vitamin status.
in : Aspects actuels des carences en fer et en folates dans le monde.
HERCBERG-S ; GALAN-P ; DUPIN-H.
Colloque INSERM, 1990 ; **197** : 449-54.
- 70 RAYNAUD-F ; TANGAPREGASSOM-A.M. ; PETTER-C.
Effet de la pyriméthamine à différentes périodes de gestation chez la rate sur la teneur en folates maternels et foetaux.
in : Aspects actuels des carences en fer et en folates dans le monde.
HERCBERG-S ; GALAN-P ; DUPIN-H.
Colloque INSERM, 1990 ; **197** : 419-28.
- 71 RENVOIZE-E.B ; GASTKELL-R.K ; KAR-H.M.
Results of investigations in 150 demented patients consecutively admitted to a psychiatric hospital.
Br. J. Psychiatry, 1985 ; **147** : 204-05.

- 72 REYNOLDS-E.H ; ROTHFELD-P ; PINCUS-J.H.
Neurological disease associated with folate deficiency.
Br. Med. J., 1973 ; **2** : 398-400.
- 73 SCHIEFFER-G.W ; WHEELER-G.P ; CIMIMINO-C.O.
Determination of folic acid in commercial diets by anion exchange solid
phase extraction and subsequent reversed phase HPLC.
Journal of Liquid Chromatography, 1984 ; **7** (13) : 2659-69.
- 74 SCHLIENGER-J.L.
Nutrition du praticien.
Expansion Scientifique Française, 1991 : 215-16.
- 75 SCOTT-J.M ; WIRKE-P ; BROIN-S.O ; WEIR-D.G.
Folic acid to prevent neural tube defects.
Lancet, 1991 ; **338** (8765) : 505.
- 76 SHORVON-S.D ; CARNEY-M.W.P ; CHANARIN-I ;
REYNOLDS-E.H.
The neuropsychiatry of megaloblastic anemia.
Br. Med. J., 1980 ; **281** : 1036-38.
- 77 SMITHELLS-R.W ; SHEPPARD-S ; SCHORAH-C.J.
Vitamin levels and neural tube defects.
Arch. Dis. Child., 1959 ; **51** : 944-50.
- 78 STEINSCHNEIDER-M et al.
Congenital folate malabsorption : reversible clinical and neurophysiologic abnormalities.
Neurology, 1990 ; **40** (8) : 1315.

- 79 STEWART-K.A ; MACKENZIE-A.H ; CLOUGH-J.D ; WILKE-W.S ;
Folate supplementation in methotrexate - treated rheumatoid arthritis
patients.
Semin. Arthritis Rheum., 1991 ; **20** (50) : 332-38.
- 80 SURTEES-R ; HYLAND-K ; SMITH-I.
Central nervous system methyl-group metabolism in children with neu-
rological complications of HIV infection.
Lancet, 1990 ; **335** : 619-21.
- 81 TAFOLA-W.H ; SARAPUR-A.C ; DUKES-G.R.
Rapid and specific HPLC assay for folic acid in multivitamins mineral
pharmaceutical preparation.
Journal of Pharmaceutical Sciences, 1981 ; **70** (11) : 1273-76.
- 82 TAGUCHI-H.
Folic acid to prevent neural tube defects.
Lancet, 1991 ; **338** (8765) : 506.
- 83 TAMURA-T ; SHIN-Y.S ; WILLIAMS-M.A ; STOKSTAD-E.L.R.
Lactobacillus casei response to pteroylpolyglutamates.
Anal. Biochem., 1972 ; **49** (2) : 517-21.
- 84 TANI-M ; IWAI-K.
HPLC separation of physiological folate monoglutamate compounds.
Investigation of absorption and conversion of pteroylglutamic acid in the
small intestine of the rat in situ.
J. Chromatogr., 1983 ; **267** (1) : 175-81.
- 85 THOULON PAGE-C.M
Diététique 1 : nutriments, aliments et technologies alimentaires.
Simep Edition, 1989.

- 86 TRIMBLE-M.R ; CORBETT-J.A ; DONALDSON-D.
Folic acid and mental symptoms in children with epilepsy.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1980 ; **43** : 1030-1034.
- 87 VANDEMARK-F.L ; SCHMIDT-G.J.
Determination of water soluble vitamins in pharmaceutical preparations
using HPLC.
Journal of Liquid Chromatography, 1981 ; **4** (7) : 1157-71.
- 88 VELLAL-B ; ALBAREDE-J.L.
Nutrition et vieillissement.
Maloine Edition, 1988.
- 89 WALTER-C ; WILLET-M.D.
Folic acid and neural tube defect : can't we come to closure ?
American Journal of Public Health, 1992 ; **82** (5) : 666-68.
- 90 WEGNER-C ; TROTZ-M ; NAU-H.
Direct determination of folate monoglutamates in plasma by HPLC
using an automatic precolumn-switching as sample clean UP procedure.
J. Chromatogr., 1986 ; **378** (1) : 55-65.
- 91 WOOLARD-D.C.
New ion pair reagent for the HPLC separation of B group vitamins in
pharmaceuticals.
J. Chromatogr., 1984 ; **301** : 470-76.
- 92 YOUNG-S.N ; GHADIRIAN-A.M.
Folic acid and psychopathology.
Prog. Neuro. Psychopharmacol. and Bio. Psychiat., 1989 ; **13** : 841-63.
- 93 ZAZZO-J.F.
Guide Becar ; Nutrition Clinique.
Arnette édition, 1988.

94 ZITTOUN-J.

Facteurs alimentaires, médicaments et pathologies intervenant sur le statut en folates.

in : Aspects actuels des carences en fer et en folates dans le monde.

HERCBERG-S ; GALAN-P ; DUPIN-H.

Colloque INSERM, 1990 ; 197 : 379-84.



AUTORISATION D'IMPRESSION ET DE SOUTENANCE

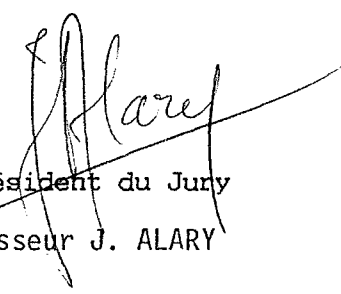
De la Thèse dont l'intitulé est : _____

L'Acide Folique : Mise au point d'une méthode de dosage par CLHP dans les
mélanges polyvitaminiques

CANDIDAT : M FAURE R

VU

GRENOBLE, le 19.5.1993


Le Président du Jury
Professeur J. ALARY

VU

GRENOBLE, le 25 mai 1993

p/ Le Président de l'Université
Joseph FOURIER GRENOBLE I
Sciences. Technologie. Médecine


Le Directeur de l'UFR Pharmacie

J. ROCHAT

