

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

②

N° 74 40759

⑤

Composés de foliates marqués au sélénium-75.

⑤

Classification internationale (Int. Cl.²). **C 07 D 475/04; C 07 B 23/00//G 01 N 33/16.**

②

Date de dépôt **11 décembre 1974, à 14 h 16 mn.**

③③ ③② ③①

Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée en Grande-Bretagne le 11 décembre 1973, n. 57.433/1973 au nom de la demanderesse.*

④

Date de la mise à la disposition du
public de la demande **B.O.P.I. — «Listes» n. 8 du 20-2-1976.**

⑦

Déposant : Société dite : **THE RADIOCHEMICAL CENTRE LIMITED**, résidant en Grande-Bretagne.

⑦

Invention de :

⑦

Titulaire : *Idem* ⑦

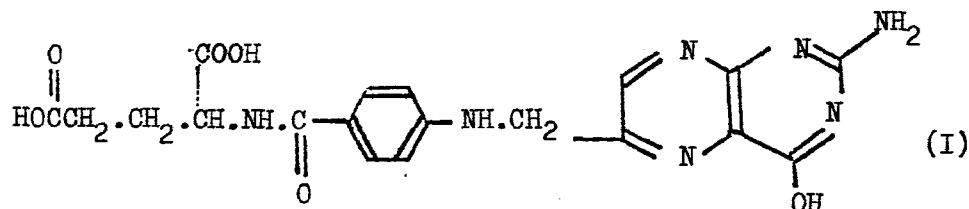
⑦

Mandataire : **Cabinet Maulvault.**

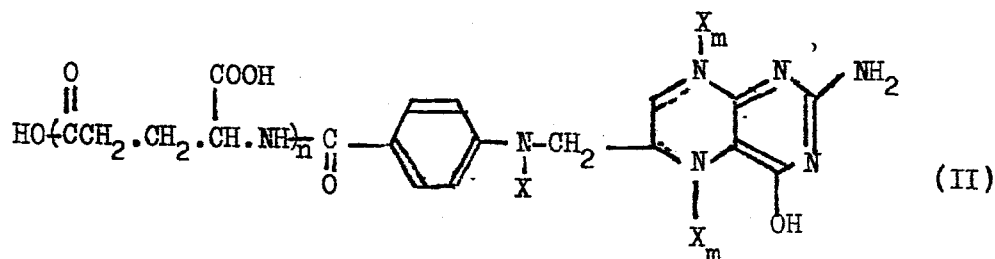
2eme demande divisionnaire déposée le 29 août 1975, n. 75.26580.

La présente invention concerne des foliates, une méthode de titrage par saturation impliquant des réactions radiochimiques concurrentes de ces foliates et de nouveaux dérivés de ces composés marqués par un radio-isotope.

5 L'acide folique répond à la formule (I) :



L'acide folique naturel consiste invariablement en un mélange avec d'autres composés apparentés et c'est ce mélange naturel qui a été appelé "foliates" dans le présent mémoire. Les autres composés apparentés répondent à la formule (II) :



10 dans laquelle la présence d'une seconde liaison en traits interrompus signifie que la liaison en question peut être simple ou double et

X représente H, $-CH_3$, $-CHO$, ou $-CH_2OH$,

15 \underline{m} est égal à 0 ou 1 (en sorte que l'atome adjacent d'azote est toujours trivalent) et

\underline{n} est égal à 1-11.

A titre de variante, le groupe X attaché aux atomes d'azote dans les positions 5 et 10 peut être absent et remplacé par un pont méthylénique. Le terme "foliates" couvre les esters et les sels des acides indiqués ci-dessus.

20 Dans la pratique de l'analyse par saturation utilisant des composés marqués par la radio-activité, un ingrédient essen-

tiel est une version marquée de la substance à doser qui entre en compétition pour occuper les sites de liaison d'une manière quantitativement définissable avec la substance naturelle et que l'on peut compter aisément après une opération convenable de séparation. Les composés que l'on désire doser sont typiquement des composés organiques présents en petites ou très petites quantités dans des liquides ou tissus corporels. Souvent, ces composés ne contiennent tout au plus que les éléments carbone, hydrogène, oxygène, azote, phosphore et soufre. Cela limite sévèrement la gamme des radionucléides disponibles pour le marquage. Le carbone C_{14} est le seul isotope pratique du carbone que l'on peut utiliser et le tritium est le seul isotope radio-actif de l'hydrogène. L'oxygène et l'azote n'ont ni l'un ni l'autre des isotopes radio-actifs de périodes supérieures à 10 minutes. Le phosphore et le soufre se rencontrent moins couramment dans les composés offrant un intérêt, mais en ce qui les concerne également, les seuls radionucléides pratiques sont P32, isotope purement bêtagène de période égale à environ 14 jours, et S35, autre isotope purement bêtagène de période égale à environ 87 jours. Le carbone 14 est un autre radio-isotope purement bêtagène et présente en outre l'inconvénient, pour de nombreuses applications, d'une faible activité spécifique due à sa très longue période, et le tritium n'est capable que d'une très faible émission bêta. En résumé, aucun de ces éléments ne possède un isotope gammagène utilisable et les émetteurs bêta présentent divers inconvénients.

Cela a conduit à l'utilisation du marquage avec des nucléides "étrangers" dont chacun doit satisfaire aux conditions suivantes :

- (i) Il doit avoir une période "convenable" ; si sa période est trop courte, on ne peut pas l'utiliser et si elle est trop longue, sa radio-activité spécifique est faible même à l'état nucléairement pur.
- (ii) Il doit émettre des rayons gamma d'énergie convenable. Le comptage des émetteurs gamma est plus rapide et plus économique que celui des émetteurs bêta.

(iii) Il doit pouvoir être obtenu de façon économique, avec une radio-activité spécifique satisfaisante.

(iv) Il doit se prêter à une incorporation stable dans toute une gamme de composés.

5 (v) Il doit produire le minimum de distorsion de la molécule dans laquelle il est incorporé.

Les deux isotopes de l'iode, I125 et I131, ont été pratiquement les seuls nucléides gammagènes utilisés jusqu'à présent dans l'analyse par saturation radio-active. Relativement
10 aux critères définis ci-dessus, il est évident que les isotopes de l'iode sont acceptables sous certaines réserves : la période de 8 jours de l'iode I131 est trop courte pour de nombreuses applications et la période de 60 jours de l'isotope I125 est elle-même parfois indésirablement courte. L'iode I125 émet des
15 rayons gamma mous et des rayons X qui peuvent être adsorbés d'une manière qui limite la facilité de son comptage. L'isotope Se75 offre certains avantages par rapport à l'isotope I125 de l'iode qui est utilisé le plus souvent. Sa période est plus longue (120 jours) et il émet des rayons gamma plus énergétiques qui
20 facilitent le comptage. Il est facile à préparer par irradiation neutronique de Se74 enrichi à des radio-activités spécifiques qui conviennent pour de nombreuses applications ; si de plus
grandes activités spécifiques sont recherchées, le bombardement de As75 avec des protons dans un cyclotron donne l'isotope Se75
25 essentiellement sans entraîneur.

Les concentrations d'acide folique dans le sérum peuvent être déterminées par des méthodes analytiques par saturation utilisant l'acide folique tritié comme coordinat radio-actif. L'utilisation d'isotopes gammagènes pour marquer le
30 coordinat radio-actif semble réalisable pour l'iode 125 et le sélénium 75. Bien que l'iode puisse être introduit dans le fragment p-aminobenzoate des acides ptéroylglutamiques, le produit est inutilisable pour le dosage par saturation des foliates. La substance marquée à l'iode radio-actif ne peut pas être pro-
35 duite avec une activité spécifique suffisamment grande et n'entre pas convenablement en compétition avec les foliates naturels pour

occuper les protéines de liaison utilisées dans le dosage par saturation des foliates. D'autres possibilités d'introduction de l'iode 125 dans des foliates impliquent le remplacement du résidu L-glutaminate de l'acide folique par un corps marqué à
5 l'iode radio-actif tel que l'iodotyramine - I125 ou l'iodo-tyrosine - I125. Ce remplacement peut être effectué par combinaison de l'iodotyramine - I125 ou de l'iodotyrosine - I125 ou de l'un de leurs esters avec l'acide ptéroïque ou un dérivé de cet acide ou bien à titre de variante, l'introduction d'iode
10 radio-actif dans un conjugué inactif de l'acide ptéroïque et d'un radical tel que le radical tyramine ou tyrosine. Le marquage de l'acide folique peut aussi être effectué par combinaison directe de l'iodotyramine - I125 ou de l'iodotyrosine - I125 avec l'acide folique pour former, par exemple, le L-gluta-
15 mylptéroate - I 125 d'iodotyrosyle.

Dans le cas du marquage au sélénium - 75, il est possible de remplacer le radical p-aminobenzoyl par un dérivé de séléno-phène ou de déplacer un groupe 4-tosyle à l'aide d'un nucléophile contenant du sélénium, par exemple SeCN^- , HSe^- ou
20 CH_3Se^- . Le premier cas impliquerait une synthèse chimique assez compliquée tandis que dans le dernier, un groupe déterminant - serait modifié dans la liaison de l'acide folique à des protéines, en l'occurrence le groupe ptéridine. Toutefois, l'introduction de sélénium - 75 dans la molécule de foliate peut
25 être effectuée de même que l'introduction d'iode - 125 par remplacement du résidu L-glutaminate de l'acide folique par une séléno-amine ou un acide séléno-aminé marqué au sélénium - 75, par exemple la sélénométhionine - Se75, la méthylséléno-cystéine - Se75 ou la 2-(méthylséléno)-éthylamine - Se75. Ce remplacement
30 peut être effectué de même par combinaison de l'une de ces séléno-amines ou de l'un de ces amino-acides avec l'acide ptéroïque ou l'un de ses dérivés. A titre de variante, l'atome d'halogène d'un conjugué formé à partir d'acide ptéroïque et d'un séléno-amino-acide halogéné tel que la β -chloralanine ou l'acide
35 β - ou γ -chloroglutamique, pourrait être substitué avec un nucléophile contenant du sélénium - 75, par exemple CH_3Se^- . Le

marquage de l'acide folique avec du sélénium - 75 pourrait aussi être effectué par combinaison directe, par exemple de sélénométhionine - Se75 avec l'acide folique pour former le L-glutamyl-ptéroate - Se75 de sélénométhionyle.

5 Un avantage du marquage au sélénium par rapport au marquage à l'iode réside dans le fait que des modifications de la stéréochimie de la molécule d'acide folique peuvent être mieux limitées. La liaison du coordinat radio-actif avec une protéine
10 peut donc ressembler de plus près à la liaison de l'acide folique naturel.

La préparation d'acides aminés analogues à l'acide folique pour l'étude de systèmes enzymatiques a déjà été décrite par exemple dans "The Journal of Biological Chemistry", Volume 242, N° 7, 10 Avril 1967, pages 1466-76. Les procédés utilisés
15 pour ces synthèses sont bien connus en pratique et consistent à faire réagir le chloroformiate d'isobutyle avec un acide ptéroïque protégé en N¹⁰ en présence d'une amine tertiaire, la réaction étant conduite à l'abri de l'humidité dans des solvants anhydres tels que le dioxane et le diméthylformamide,
20 pour former l'anhydride mixte. Ce dernier est ensuite amené à réagir avec l'ester d'acide aminé désiré dans des milieux organiques aqueux pour former un produit de conjugaison d'un acide aminé avec l'acide ptéroïque. Si ces réactions sont appliquées à une gamme d'amines ou d'acides aminés marqués au sélénium - 75,
25 par exemple la sélénométhionine, la sélénoéthionine, la Se-méthylsélénocystéine, la Se-éthylsélénocystéine, la 2-(méthylséléno)-éthylamine, on peut préparer toute une gamme d'acides aminés marqués au sélénium - 75 analogues à l'acide folique, que l'on peut utiliser comme coordinats radio-actifs dans le
30 dosage par saturation de l'acide folique.

En conséquence, l'invention concerne une méthode de dosage par saturation d'un foliate, par réaction concurrente du composé à doser et d'une version dudit composé marquée par la radio-activité, avec un réactif spécifique dudit composé qui
35 est présent en quantité insuffisante pour se combiner avec la totalité du composé et de sa version marquée, séparation du

composé lié de son homologue non lié et mesure de la concentration radio-active du composé lié ou du composé non lié ou des deux, procédé caractérisé par le fait que la version du foliate marquée par un isotope radio-actif est marquée au sélénium - 75.

5 L'invention concerne aussi un nécessaire de titrage destiné au dosage par saturation définie ci-dessus, nécessaire qui comprend :

(a) une version marquée au sélénium -75 du foliate à titrer ;

10 (b) un réactif spécifique qui se combine avec le composé à titrer ;

(c) de préférence, une source du composé à titrer, destinée à être utilisée pour la préparation d'étalons ;

(d) de préférence un milieu permettant de séparer le
15 composé lié du composé non lié ; et

(e) de préférence, plusieurs tubes permettant la conduite de l'analyse.

La version marquée du composé à titrer et son réactif spécifique peuvent avantageusement être introduits au préalable
20 dans les tubes et lyophilisés.

Ainsi, par exemple, dans le cas d'un titrage des foliates totaux du sérum, le nécessaire peut être équipé de fioles contenant le foliate marqué au sélénium - 75, de la β -lactoglobuline ou du sérum de porc comme protéine de liaison,
25 du N⁵-méthyltétrahydrofoliate ou de l'acide folique comme étalons et du charbon enrobé d'albumine ou d'hémoglobine pour séparer le composé lié du composé non lié.

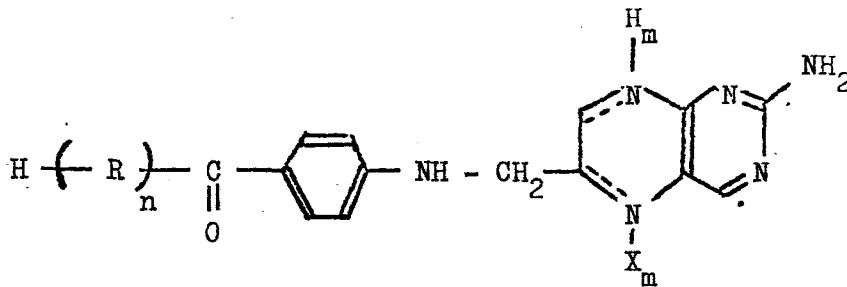
Les exemples de dosages auxquels le principe de l'analyse par saturation des foliates peut être appliqué comprennent :

30 i) la teneur totale en foliates du sérum ;

ii) la teneur totale en foliates des hématies ;

iii) les foliates spécifiques naturels, par exemple le N⁵-méthyltétrahydrofoliate et l'acide folique.

L'invention concerne également des composés de formule
35 le (III) :



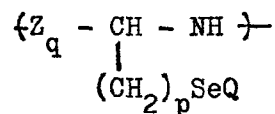
dans laquelle une seconde liaison en traits interrompus signifie que la liaison peut être simple ou double et

X désigne un atome d'hydrogène ou un groupe $-\text{CH}_3$,

\underline{m} est égal à 0 ou 1 (de manière que l'atome adjacent d'azote soit trivalent), et

5

a) R est un radical de formule :



dans laquelle :

10

Z est un groupe $-\text{OCO}-$

\underline{q} est égal à 0 ou 1

\underline{p} est égal à 1 ou 2

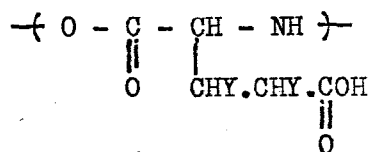
Q est un groupe méthyle ou éthyle,

lorsque \underline{q} est égal à 0, \underline{n} est égal à 1 et lorsque \underline{q} est égal

15

à 1, \underline{n} est égal à 1-11, ou

b) R est un radical de formule :



20 dans laquelle l'un des groupes Y représente un atome d'hydrogène et l'autre est un groupe $-\text{SeCH}_3$ ou $-\text{SeC}_2\text{H}_5$;

et les esters et sels de ces acides.

Ces composés sont des versions marquées au sélénium -

75 de foliates, y compris les versions marquées au sélénium - 75

25

de l'acide folique proprement dit, et on peut donc les utiliser

avantageusement dans le dosage par saturation de foliates y compris l'acide folique.

L'invention est illustrée par les exemples suivants, dont les exemples 1 à 3 décrivent la préparation de trois nouveaux dérivés de sélénium - 75 de composés apparentés à l'acide folique. Les exemples 4 à 13 décrivent des titrages radio-actifs de foliates par réactions concurrentes.

Exemple 1

Préparation de la Se-méthyl-L-sélénocystéine-Se75

10 On introduit 24 mg (1,05 milli-atome) de sodium dans un réacteur contenant du sélénium-Se75 rouge (78,5 mg ; 1,0 milli-atome ; 295 mCi) en suspension dans 20 ml d'ammoniac liquide, le réacteur étant relié à une conduite à vide et communiquant avec l'atmosphère par un piège de "Carbasorb" et charbon.

15 On agite le mélange réactionnel jusqu'à ce qu'on ait obtenu une solution de couleur brun-rouge de diséléniure disodique. On ajoute ensuite à la solution 205 mg (1,41 millimole) de sel de sodium de β -chloro-L-alanine et on continue d'agiter jusqu'à ce que l'ammoniac se soit évaporé. Le résidu de sélénocystine-Se75

20 brute est dissous avec précaution dans de l'acide chlorhydrique 2M et un précipité de sélénium rouge est séparé par filtration. Le pH de la liqueur surnageante est ajusté à 6-7 avec de l'hydroxyde d'ammonium 4M. Le précipité jaune qui se dépose est séparé, lavé avec 1 ml d'eau et 3 ml d'éthanol et séché sous

25 vide en donnant 136 mg (0,407 millimole ; 236 mCi) de L-sélénocystine-Se75.

On transvase 100 mg (0,3 millimole ; 172 mCi) de L-sélénocystine-Se75 dans un réacteur dans lequel on a condensé 20 ml d'ammoniac liquide. On ajoute 32,9 mg (1,43 milli-atome)

30 de sodium au réacteur et lorsque la réaction a eu lieu, on ajoute 125 μ l (2 millimoles) d'iodure de méthyle à la solution sous agitation, ce qui fait disparaître la coloration bleue. Après une nouvelle période de réaction de 10 minutes, on ajoute 164 mg (1,13 millimole) d'iodure d'ammonium et on laisse ensuite

35 l'ammoniac s'évaporer. On dissout le résidu dans 1 ml d'eau et on le fait reprécipiter avec 8 ml d'acétone. On sépare le produit

on le redissout dans 1 ml d'eau et on le reprécipite avec 2 ml d'éthanol. Après refroidissement de la solution aqueuse-alcoolique pendant 1 heure, on sépare le produit par centrifugation, on le lave avec 1 ml d'éthanol et on le sèche sous vide pour
5 obtenir 29 mg (0,15 millimole ; 44 mCi) de Se-méthyl-L-sélénocystéine-Se75.

Préparation de la N-ptéroyl-Se-méthyl-L-sélénocystéine-Se75

On ajoute à l'abri de l'humidité 13,5 µl de chloroformiate d'isobutyle et 13,5 µl de triéthylamine à 22 mg d'acide
10 N¹⁰-trifluoracétylptéroïque déshydraté sous vide dans 0,5 ml de diméthylformamide anhydre, à 5°C. On laisse réagir le mélange sous atmosphère d'azote et atteindre la température ambiante en une période de 30 minutes pour former l'anhydride mixte. On ajoute encore 2 ml de diméthylformamide au mélange réactionnel, puis
15 on ajoute 14 mg (18,4 mCi) de sel de sodium de Se-méthyl-L-sélénocystéine-Se75 dans 1,5 ml d'eau. On agite le mélange réactionnel pendant environ 16 heures à la température ambiante puis on le laisse reposer pendant encore 24 heures. On le lyophilise ensuite et on chauffe le résidu à 60°C pendant 30 minutes avec
20 3 ml d'hydroxyde de sodium 0,1M pour éliminer le groupe trifluoracétyle ; on conduit l'hydrolyse à l'obscurité sous atmosphère d'azote. La solution est refroidie et son pH est ajusté à 3,0 avec de l'acide chlorhydrique dilué, puis un précipité se forme. On le sépare par centrifugation, on le lave avec 2 ml d'eau et
25 après dissolution dans une solution diluée d'hydroxyde d'ammonium (0,25 ml de solution 0,05 M), on le purifie par chromatographie en couche mince (cellulose "Avicel" F, 1 mm ; éluant : solution aqueuse à 5 % de bicarbonate d'ammonium. On conduit la chromatographie à l'obscurité. On autoradiographie la plaque
30 et on enlève le composant de Rf égal à environ 0,19 en l'extrayant dans de l'hydroxyde d'ammonium 0,1M pour obtenir 2,4 mCi d'une solution de N-ptéroyl-Se-méthyl-L-sélénocystéine-Se75 ; λ max. 259, 286 nm (tampon au phosphate, pH 11,0).

Exemple 2

35 Préparation de la N-ptéroyl-L-sélénométhionine-Se75

En opérant à l'abri de l'humidité, on ajoute 13,5 µl de chloroformiate d'isobutyle et 13,5 µl de triéthylamine à 22 mg

d'acide N¹⁰-trifluoracétylptéroïque déshydraté sous vide dans 1 ml de diméthylformamide anhydre à 5°C. On fait réagir le mélange sous atmosphère d'azote et on lui laisse atteindre la température ambiante en une période de 30 minutes pour former

5 l'anhydride mixte. On ajoute encore 2 ml de diméthylformamide au mélange réactionnel puis 3,5 mg (20 mCi) de sel de sodium de L-sélénométhionine-Se75 dans 1 ml d'eau. On agite le mélange réactionnel pendant environ 16 heures à la température ambiante. On le lyophilise ensuite et on chauffe le résidu à 60°C pendant

10 40 minutes avec 3 ml d'hydroxyde de sodium 0,1M pour éliminer le groupe trifluoracétyle ; on conduit l'hydrolyse à l'obscurité sous atmosphère d'azote. Le léger précipité jaune qui est formé est redissous par addition d'hydroxyde de sodium 0,1M. La solution est refroidie à environ 5°C et son pH est ajusté à 3,0 avec de

15 l'acide chlorhydrique dilué, et un précipité jaune se forme. On le sépare par centrifugation, on le lave avec 2 ml d'eau puis on l'agite pendant 10 minutes avec 2 ml d'hydroxyde d'ammonium 1,0M. La substance solide jaune restante est séparée, lavée avec 2 ml d'eau et séchée sous vide ; on obtient 1,75 mCi de

20 N-ptéroyl-L-sélénométhionine-Se75 ; λ max. 259, 281 nm (tampon au phosphate, pH 11,0).

Exemple 3

Préparation de la 2-(méthylséléno)-éthylamine-Se75

On ajoute 9,2 mg (0,4 milli-atome) de sodium à un

25 réacteur contenant 28,8 mg (0,366 milli-atome ; 3,8 mCi) de sélénium-Se75 rouge dans 25 ml d'ammoniac liquide, le réacteur étant relié à une conduite à vide et communiquant avec l'atmosphère par un piège de "Carbasorb"/charbon. On agite le mélange réactionnel pendant environ 10 minutes jusqu'à l'obtention d'une solution

30 brune de diséléniure disodique. On ajoute à la solution sous agitation 65,2 mg (0,46 millimole) d'iode de méthyle pour obtenir une solution incolore de diséléniure de diméthyle. Au bout d'environ 3 minutes, on ajoute un supplément de 11 mg de sodium au réacteur jusqu'à l'obtention d'une couleur persistante d'un

35 noir bleuté, qui indique le clivage total de la liaison diséléniure avec formation de méthylséléniure de sodium. On ajoute

83 mg (0,4 millimole) de bromhydrate^{de} 2-brométhylamine au mélange réactionnel que l'on agite ensuite jusqu'à ce que tout l'ammoniac se soit évaporé. On déshydrate le résidu sous vide, on le dissout dans l'éthanol et on le purifie par chromatographie préparative en couche mince (cellulose "Avicel F", 1 mm ; éluant : butanol, eau, acide acétique 15:25:60). On autoradiographie la plaque et on prélève le composant dominant, correspondant sur une plaque analytique au composant le plus rapide de Rf égal à 0,81 et on l'extrait dans l'éthanol pour obtenir 10 1,4 mCi de 2-(méthylséléno)-éthylamine-Se75.

Combinaison de l'acide N¹⁰-trifluoracétylptéroïque avec la 2-(méthylséléno)-éthylamine-Se75

En opérant à l'abri de l'humidité, on ajoute 11 µl de chloroformiate d'isobutyle et 10 µl de triéthylamine à 20 mg (0,049 millimole) d'acide N¹⁰-trifluoracétylptéroïque déshydraté sous vide dans 0,4 ml de diméthylformamide anhydre à 10°C. On agite la solution à la température ambiante pendant 45 minutes. Ensuite, on ajoute encore 20 µl de triéthylamine et on transvase la solution dans un ballon contenant 16 mg (0,12 millimole ; 20 1,2 mCi) de 2-(méthylséléno)-éthylamine-Se75. On agite le mélange réactionnel pendant environ 16 heures à la température ambiante puis on le soumet à une chromatographie en couche mince (gel de silice Merck "60F₂₅₄" ; éluant : méthanol). Le produit désiré est localisé par autoradiographie et fluorescence UV. Le composant de Rf égal à 0,63 est prélevé et extrait au méthanol ; on obtient 120 µCi d'une solution méthanolique du produit de conjugaison de 2-(méthylséléno)-éthylamine-Se75 de l'acide N¹⁰-trifluoracétylptéroïque ; λ_{max.} 257, 286 nm (tampon au phosphate, pH 11,0). Ce produit peut être transformé en N-ptéroyl-2-(méthylséléno)-éthylamine-Se75 par la technique d'hydrolyse dont la description générale est donnée dans les exemples 1 et 2.

Exemple 4

Dosage typique des foliates utilisant la ptéroyl-méthylsélénocystéine marquée au sélénium-Se75

35 On introduit à la pipette dans des tubes à essai en polystyrène des solutions étalons de N⁵-méthyltétrahydrofoliate

contenant 0; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 4 ng de ce composé dans 200 µl de tampon au phosphate et à l'albumine. On ajoute également du tampon aux tubes contenant le mélange "total" et le "blanc" (400 et respectivement 300 µl). On ajoute à chaque tube 0,5 ng de ptéroylméthylsélénocystéine-Se75 (activité spécifique d'environ 0,24 Ci/millimole) dans 100 µl de tampon. Immédiatement après, on ajoute à tous les tubes, excepté les blancs, 100 µg de β-lactoglobuline dans 100 µl de tampon. Après incubation pendant 60 minutes à la température ambiante, on ajoute une suspension de charbon enrobé d'albumine dans 200 µl de tampon à 4°C à tous les tubes, excepté les tubes "totaux". On centrifuge, (2000 g pendant 10 minutes) et on effectue un comptage sur la liqueur surnageante pendant 300 secondes dans un compteur β-gamma "NE8312".

15 Les résultats s'expriment comme suit :

		Nombre de chocs - comptage sur le blanc	
		Composé lié, % = 100 x $\frac{\text{Total} - \text{bruit de fond}}{\text{Total}}$	
20	Poids de N ⁵ -méthyltétrahydrofoliate, ng		Pourcentage de foliate marqué lié
	0		94
	0,25		81,8
	0,25		78,0
25	0,5		81,4
	1		78,3
	1		78,6
	2		51,3
	2		58,0
30	4		44,4
	4		34,1

Exemple 5

Méthode typique de titrage du foliate utilisant des étalons d'acide folique

35 On suit le mode opératoire de l'exemple 4, à la différence qu'on utilise l'acide folique comme étalon au lieu de N⁵-méthyltétrahydrofoliate.

Résultats

	Poids d'acide folique, ng	Pourcentage de foliate marqué lié
	0	95,5
5	0,25	86,1
	0,25	85,6
	0,5	67,7
	0,5	82,5
	1	45,5
10	1	41,4
	2	28,1
	2	32,6
	4	10,4

Exemple 615 Méthode typique de titrage des foliates en utilisant la ptéroyl-sélénométhionine marquée au sélénium-Se75

On suit le mode opératoire de l'exemple 4, à la différence qu'on effectue le marquage avec de la Se75-ptéroylsélénométhionine (0,5 ng ; activité spécifique d'environ 2,25 Ci/millimole) au lieu de Se75-ptéroylméthylsélénocystéine.

Résultats

	Poids de N ⁵ -méthyltétrahydrofoliate, ng	Pourcentage de foliate marqué lié
	0	49,9
25	0,25	39,3
	0,25	36,1
	0,5	35,9
	0,5	37,3
	1	32,6
30	1	33,0
	2	25,9
	4	25,4
	4	24,1

Exemple 7

35 On suit le mode opératoire de l'exemple 6, à la différence qu'on utilise une solution de 30 µl de sérum de porc dans 70 µl de tampon à la place de la β-lactoglobuline comme protéine de liaison.

Résultats

	Quantité de N ⁵ -méthyltétrahydrofoliate, ng	Pourcentage de foliate marqué lié
	0	36,4
5	0,25	21,3
	0,5	17,2
	0,5	17,1
	1	20,7
	1	18,5
10	2	19,3
	2	17,2
	4	15,5
	4	15,6

Exemple 8

15 On répète le mode opératoire de l'exemple 4 en utilisant une solution (100 µl) contenant 30 µl de sérum de porc et 70 µl de tampon à la place de la β-lactoglobuline, comme protéine de liaison.

Résultats

	Poids de N ⁵ -méthyltétrahydrofoliate, ng	Pourcentage de foliate marqué lié
	0	89,3
-	0,25	61,4
	0,25	52,0
25	0,5	43,3
	0,5	48,1
	1	41,2
	1	38,9
	2	40,9
30	2	39,3
	4	34,5
	4	31,0

Exemple 9

35 On répète le mode opératoire de l'exemple 8, en utilisant comme étalon l'acide folique à la place du N⁵-méthyltétrahydrofoliate.

Résultats

	Poids d'acide folique, ng	Pourcentage d'acide folique marqué lié au sérum de porc
5	0	92,7
	0,25	67,1
	0,25	68,7
	0,5	60,9
	0,5	43
10	1	26,2
	1	31,5
	2	28,0
	2	28,3
	4	9
15	4	2,6

Exemple 10

On suit le mode opératoire de l'exemple 6, en utilisant comme étalon l'acide folique à la place du N⁵-méthyltétrahydrofoliate.

20 Résultats

	Poids d'acide folique, ng	Pourcentage de foliate marqué lié
-	0 --	59,1
	0,25	38,1
	0,25	37,2
	0,5	34
	0,5	30,7
25	1	19
	1	22,6
	2	14,2
	2	13,2
	4	5,8
30	4	8

Exemple 11

35 On suit le mode opératoire de l'exemple 10, à la différence qu'on utilise comme protéine de liaison une solution contenant 30 µl de sérum de porc et 70 µl de tampon, à la place de

la β -lactoglobuline.

Résultats

	Poids d'acide folique, ng	Pourcentage de foliate marqué lié
5	0	35,7
	0,25	20,3
	0,25	21,1
	0,5	18,4
	0,5	20,9
10	1	16,8
	1	17,3
	2	13,0
	2	13,9
	4	12,6
15	4	15,2

Exemple 12

Méthode typique de dosage radio-immunologique de l'acide folique en utilisant la ptéroylméthylsélénocystéine marquée au Se⁷⁵

On introduit à la pipette dans des tubes à essai en polystyrène des solutions étalons d'acide folique contenant 0; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 4 ng d'acide folique dans 200 μ l de tampon au phosphate et à l'albumine. On ajoute également du tampon aux tubes contenant le mélange "total" et contenant le "blanc" (400 et respectivement 300 μ l). On ajoute à chaque tube 0,5 ng de Se⁷⁵-ptéroylméthylsélénocystéine (activité spécifique d'environ 0,24 Ci/millimole) dans 100 μ l de tampon. Immédiatement après, on ajoute à tous les tubes, excepté aux blancs, 100 μ l de tampon contenant 2 μ l d'un anti-sérum anti-acide folique de lapin de titre égal à 1/15 000, préparé par réaction au produit de conjugaison de l'acide folique et de sérum-albumine.

Après 60 minutes d'incubation à la température ambiante, on ajoute à 4°C à tous les tubes, excepté les tubes "totaux", une suspension de charbon enrobé d'albumine dans un tampon (200 μ l). On centrifuge les tubes (2000 g pendant 10 minutes) et on effectue un comptage pendant 300 secondes sur les liqueurs surnageantes.

Résultats

	Poids d'acide folique, ng	Pourcentage de foliate marqué lié à l'anti-sérum
5	0	97,6
	0,25	72,4
	0,25	90,9
	0,5	52,5
	0,5	70,3
10	1	50,1
	1	35,3
	2	20,1
	2	29,6
	4	20,1
15	4	12,8

Exemple 13

Méthode typique de titrage radio-immunologique de l'acide folique utilisant la ptéroylsélénométhionine marquée au sélénium-Se75

20 On répète le mode opératoire de l'exemple 12, à la différence qu'on effectue le marquage avec la ptéroylsélénométhionine-Se75 (0,5 ng ; activité spécifique d'environ 2,25 Ci/millimole) au lieu de Se75-ptéroylsélénocystéine.

Résultats

	Poids d'acide folique, ng	Pourcentage de foliate marqué lié
25	0	42,2
	0,25	25,7
	0,25	27,6
	0,5	22,1
	0,5	19
30	1	20,8
	1	21,9
	2	16,7
	2	15,5
	4	16
35	4	13,7

