

PREPARATION ET PROPRIETES ANTIGENIQUES DU CONJUGUE TESTOSTERONE-15 α -CARBOXYMETHYL: ALBUMINE DE SERUM DE BOVIDES

R. CONDOM* et B. DESFOSES†

*Laboratoire de Chimie Structurale Organique, Université de Nice, Parc Valrose, 06034 Nice, and

†Laboratoire de Chimie Biologique, U.E.R. Biomédicale des Saints-Pères,
45, rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cédex 06, France

(Received 21 January 1977)

SUMMARY

The 15 α -carboxymethyl derivative of testosterone has been prepared from 15 α -carboxymethyl-DHA, the latter has been described previously [1]. The sequence involved formation of the tetrahydropyranoxy derivative at C-3, reduction of carbonyl at C-17 and acetylation. After acidification, the hydroxyl at C-3 was available for oxidation. Saponification gave the hapten, which was condensed with bovine serum albumin to afford the conjugate which produced anti-testosterone anti-serum. Calculations of cross-reaction at the 50% level and at 1 ng were made. Among the numerous steroids tested for cross reactivity androstenedione and 5 α -DHT showed 19% and 3.2% cross reactivity respectively at the 50% level.

INTRODUCTION

L'observation en 1970 de Midgley et Niswender[2] concernant la formation d'anticorps spécifiques dirigés contre la progestérone a conduit ces auteurs à formuler l'hypothèse selon laquelle un antigène qui contient un stéroïde dont les extrémités fonctionnelles sont libres doit provoquer après injection à un animal la production d'anticorps spécifiques. De nombreuses synthèses d'antigènes réalisées dans cette optique [3-10] ont montré que les groupements fonctionnels doivent agir comme déterminants antigéniques et qu'il est donc important qu'ils soient libres.

Notre intérêt s'est porté en particulier sur la préparation d'antigènes en série androgène dans lesquels le stéroïde est porteur d'un chaînon carboxyméthyl fixé en C-15. Après la préparation de carboxyméthyl-15 α -DHA [1], de 15 α -carboxyméthyl 5 α -androstane 3 α ,17 β -diol, de 15 α -carboxyméthyl 4-androstène 3 β ,17 β -diol, de 15 α -carboxyméthyl 5 α -androstane 3 β ,17 β -diol et du 15 α -carboxyméthyl 4-androstène 3,17-dione [11], nous décrivons ici la préparation de carboxyméthyl-15 α testostérone, de l'antigène correspondant. Les réactions croisées, à 50% [12] et au nanogramme [13], des anticorps, obtenus après injection

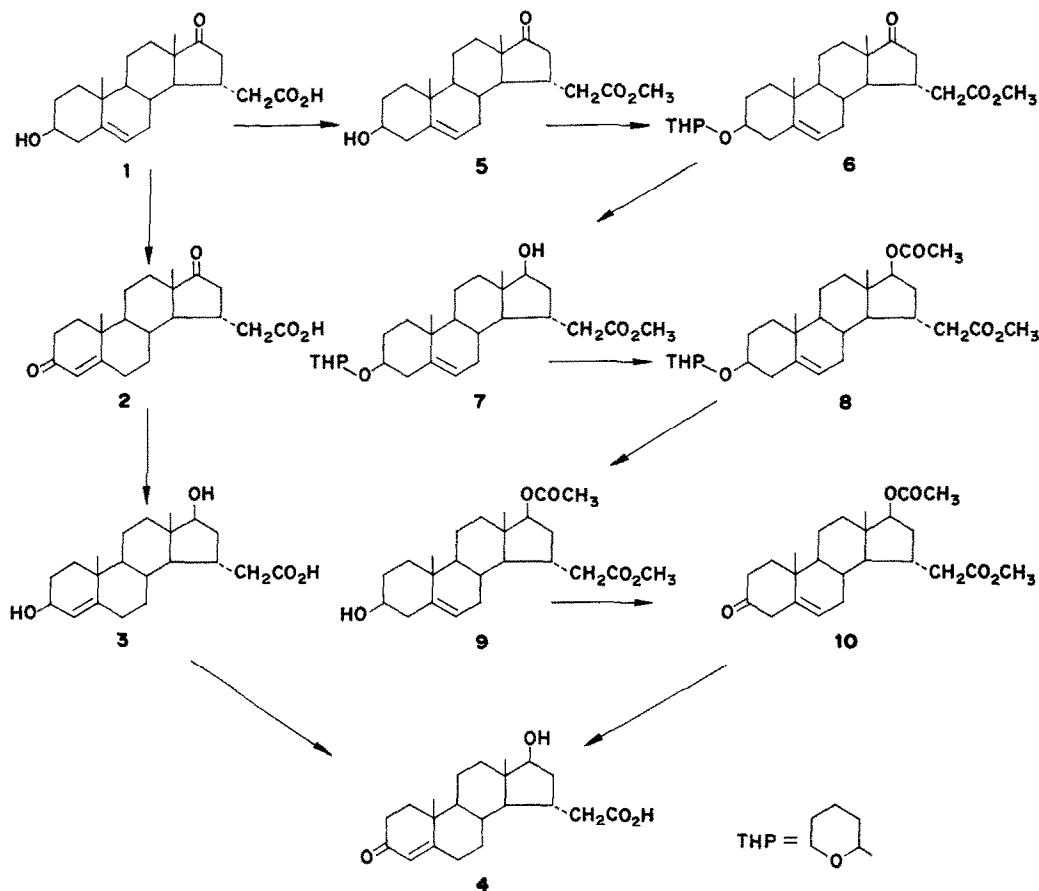
de cet antigène à des lapins, avec de nombreux stéroïdes sont données.

METHODES ET MATERIELS

La préparation de l'haptène est schématisée sur la Fig. 1. Deux voies peuvent conduire, à partir de la carboxyméthyl-15 α DHA [1] à l'haptène correspondant de la testostérone. L'une consiste à oxyder le composé (1) en solution dans un mélange de dioxane et de toluène en présence de cyclohexanone et d'isopropylate d'aluminium. On obtient ainsi le carboxyméthyl-15 α androsténone. Les fonctions cétone sont ensuite réduites par le borohydrure de potassium. Le diol (3) ainsi obtenu possède deux fonctions qui se différencient puisque celle en C-3 est allylique. Une oxydation par MnO₂ dans le chloroforme à température ordinaire devrait s'effectuer sélectivement en C-3. En fait cette oxydation n'est pas terminée lorsque débute celle de la fonction alcool en 17. On se trouve alors en présence de trois composés qui se distinguent par chromatographie. L'utilisation d'une chromatographie préparative nous a permis de séparer le composé ayant un R_f intermédiaire sous la forme d'une résine qu'il nous a été impossible de cristalliser. Ce composé présente en R.M.N. un proton éthylénique ayant un déplacement chimique identique à celui de la testostérone. Le spectre U.V. présente un maximum à 240 nm et un coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 10 \cdot 10^3$ (testostérone $\epsilon_{\max} = 17 \cdot 10^3$). Cependant, afin de caractériser avec une meilleure précision cet haptène, nous avons suivi une autre voie.

L'acide (1) est méthyli par le diazométhane puis le dérivé tétrahydropyranoxy (6) est formé. Une réduction au moyen du borohydrure de potassium

Les noms triviaux suivants ont été utilisés: testostérone = 17 β -hydroxy-4-androstène-3-one; épitestostérone = 17 α -hydroxy-4-androstène-3-one; progestérone = 4-prégnène-3,20-dione; 17-OH-progestérone = 17-hydroxy-4-prégnène-3,20-dione; dihydrotestostérone (DHT) = 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one; androstérone = 3 α -hydroxy-5 α -androstane-17-one; déhydroépiandrostérone (DHA) = 3 β -hydroxy-5-androstène-17-one; cortisol = 11 β ,17,21-trihydroxy-4-prégnène-3,20-dione; prégnandiol = 5 β -prégnane-3 α ,20 α diol; androsténone = 4-androstène-3,17-dione.

Fig. 1. Préparation de 15 α -carboxyméthyl-testostérone: BSA

du composé (6) conduit à l'alcool C-17 β correspondant (7) qui par acétylation dans les conditions usuelles donne (8). En plaçant ce composé en solution dans l'acétone en présence d'acide chlorhydrique, la fonction alcool en C-3 est libérée donnant (9) dont l'oxydation à -9°C dans l'acétone par une solution oxydante de Jones permet l'obtention du dérivé (10) de la testostérone. Une saponification livre l'haptène de la testostérone (4) que nous avons pu cristalliser. Une chromatographie a montré l'identité des produits obtenus selon les deux voies. Intermédiairement, les composés (6), (7), et (9) ont été caractérisés. Le couplage à la BSA de l'haptène (4) s'est effectué en utilisant la méthode à l'anhydride mixte décrite par Erlanger, Borek, Beiser et Liebermann[14].

La mesure de l'incorporation s'est effectuée en utilisant la nitrotrone selon la méthode décrite par Tamaoki *et al.*[15]. Elle indique qu'environ 20 mol de stéroïdes sont liées à une mol de BSA.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Büchi (Tottoli) et ne sont pas corrigés. Les spectres infra-rouge ont été enregistrés sur un appareil Perkin Elmer 254, les produits étant conditionnés dans le bromure de potassium. Les spectres de R.M.N. ont

été effectués sur un appareil Varian EM 360, le tétraméthylsilane étant pris comme référence interne. Les microanalyses ont été effectuées par le Service de Microanalyse du Centre National de la Recherche Scientifique à Thiais, France.

15 α -Carboxyméthyl-4-androstène 3,17-dione (2). 342 mg de l'acide (1) sont mis en solution dans 10 ml de dioxanne distillé, anhydre. La dissolution s'effectue par chauffage. 30 ml de toluène distillé, sec, sont ajoutés avec 5,0 g de cyclohexanone et 1,0 g d'isopropylate d'aluminium. Le mélange est placé sous reflux pendant 1,5 h. On évapore sous pression réduite. Le résidu est placé dans une ampoule à décanter en présence d'eau et d'acétate d'éthyle. Après extraction, la phase aqueuse est acidifiée par de l'acide formique et extraite à nouveau par de l'acétate d'éthyle (4 \times 50 ml). Les phases organiques sont jointes, séchées et amenées à sec. 252 mg de résine sont ainsi obtenues qui, cristallisées dans l'éther éthylique, donnent 138 mg de cristaux, F: 223–225 $^{\circ}\text{C}$.

Anal. Calc. pour $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$ C: 73,22 H: 8,19; trouvé C: 72,66 H: 8,88;

I.R. $\bar{\nu}$ max, 3280; 1740; 1680; 1640 cm^{-1} .

R.M.N. (CDCl_3) δ ppm 0,933 (C_{18} méthyl, 3H, S) 1,20 (C_{19} méthyl, 3H, S) 5,72 (H_4 , 1H, S).

15 α -Carboxyméthyl (méthyl ester) 3-(2'-tétrahydropyranyle)éther 5-androstène 17-one (6). 940 mg de l'ester

méthylque (5) sont dissous dans 24 ml de dioxanne anhydre. On ajoute au mélange 3 ml de dihydropyranne et 25 mg d'acide *p*-toluène sulfonique. La solution est agitée 2 h à 22°C puis jetée dans l'eau d'une ampoule. L'acidité est neutralisée par une solution de NaHCO₃ à 5%. La phase aqueuse est extraite par du chloroforme (3 × 20 ml). Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation du solvant, 1,5 g d'une résine jaune semi cristalline est obtenue qui par cristallisation dans le mélange méthanol—eau donne 645 mg de cristaux, F: 124–125°C. Par ajout d'eau aux eaux-mères, il vient un second jet, 248 mg, F: 125–129°C.

L'échantillon analytique, F: 135–136°C, a été obtenu après une nouvelle cristallisation dans le même mélange de solvants.

Anal. Calc. pour C₂₇H₄₀O₅ C: 72,94 H: 9,07; trouvé C: 72,82 H: 9,22;

I.R. $\bar{\nu}$ max. 2920; 1730; 1700 cm⁻¹.

15 α -Carboxyméthyl (méthyl ester) 3-(2'-tétrahydropyranyl) éther 5-androstèn 17 β -ol (7). La réduction de la fonction cétone de (6) s'effectue en plaçant 1,32 g de ce produit en solution dans 150 ml de méthanol, en présence de 1,0 g de KBH₄. On traite comme usuellement. En amenant à sec la solution étherée, une cristallisation se produit. On isole une fraction de 77 mg de cristaux, F: 126–129°C. Par recristallisation de 30 mg dans l'acétone aqueux, il vient 11,4 mg de cristaux analytiques, F: 137–139°C.

Anal. Calc. pour C₂₉H₄₄O₆ C: 71,28 H: 9,08; trouvé C: 71,54 H: 9,10;

I.R. $\bar{\nu}$ max. 3310; 2900; 1730 cm⁻¹.

15 α -Carboxyméthyl (méthyl ester) 5-androstène 3 β ,17 β -diol acétate-17 β (9). La dépyranylation s'effectue en plaçant 550 mg du composé (8) en solution dans 25 ml d'acétone. Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,1 M est ajoutée jusqu'au trouble. Le mélange est abandonné pendant 36 h à 20°, puis amené à sec. Le résidu est repris par du chloroforme, lavé à l'eau, séché et évaporé sous pression réduite. Les 500 mg de résine obtenus sont cristallisés dans 15 ml d'acétone auxquels on ajoute de l'eau jusqu'au trouble. Les cristaux sont placés en dessiccation sous vide sur P₂O₅ pour parfaire le séchage. On obtient ainsi 420 mg, F: 162–164°C.

L'échantillon analytique est obtenu après une nouvelle cristallisation dans le même mélange de solvants, F: 163–164°C.

Anal. Calc. pour C₂₄H₃₆O₅ C: 71,25 H: 8,97; trouvé C: 70,95 H: 8,75;

I.R. $\bar{\nu}$ max. 3310; 2910; 1700 cm⁻¹.

R.M.N. (CDCl₃) δ ppm: 0,83 (méthyl 18, 3H, S); 1,00 (méthyl 19, 3H, S); 3,63 (CH₃ ester, 3H, S); 4,55 (H_{17 α} , 1H, triplet); 5,28 (H₆, 1H, S).

15 α -Carboxyméthyl 3-oxo 4-androstèn 17 β -ol (4). 100 mg de (9) sont dissous dans 40 ml d'acétone et placés à -9°C. On ajoute sous agitation 0,16 ml d'une solution oxydante de Jones. Au bout de 5 mn, quelques gouttes d'éthanol sont ajoutées. Une chromatographie (CCM Merck. Gel de silice. Chloro-

forme—éthanol 9:1 v/v) montre qu'il n'y a pratiquement pas de produits parasites à côté du produit principal. La solution est jetée dans l'eau d'une ampoule à décanter et extraite par du chloroforme. Après séchage et mise à sec, cette solution laisse 90 mg de résine qui sont repris par 60 ml de méthanol et 100 mg de potasse dissoute dans 1 ml d'eau. Le mélange est placé sous reflux pendant 1,5 h. La solution est ensuite amenée à sec, reprise par l'eau et transférée dans une ampoule. Après extraction par du chloroforme, la phase aqueuse est acidifiée puis extraite à nouveau par 3 × 20 ml de chloroforme. Les phases organiques sont jointes, séchées et amenées à sec. On obtient ainsi 72 mg de résine jaune-clair. Une cristallisation dans le mélange acétate d'éthyle-hexane donne 40 mg de cristaux, F: 238–240°C.

Anal. Calc. pour C₂₁H₃₀O₄ C: 72,59 H: 8,70; trouvé C: 72,40 H: 8,74;

I.R. $\bar{\nu}$ max. 3320; 2900; 1740; 1660 cm⁻¹.

Préparation de l'antisérum. Deux lapins de race New-Zealand (2–3 kg) ont été utilisés. La première injection a été constituée par un mélange de 1 mg d'antigène, 0,5 ml de sérum physiologique stérile et 0,5 ml d'adjuvant de Freund complet. Le mélange a été émulsionné avant l'injection par voie sous-cutanée en 10 à 20 sites. On a injecté ensuite, par voie intramusculaire 0,25 ml de vaccin anti-coquelucheux. Trois rappels ont été effectués à six semaines d'intervalle. Dix jours après le dernier rappel, un titrage sur du sérum prélevé à la veine marginale de l'oreille a été fait, les animaux ont été sacrifiés 13 jours après. Les titres des antisérums sont de 1:2500 et 1:1000. L'étude complète des réactions croisées a été effectuée avec le premier antisérum qui possédait la meilleure spécificité.

Mesure des caractéristiques de l'antisérum. On utilise un tampon phosphate 0,05 M à pH 7 contenant 12,387 g de Na₂HPO₄, 12H₂O; 2,124 g de NaH₂PO₄, H₂O; 4,5 g de NaCl; 0,5 g d'azide de sodium et 0,1% de gélatine pour 1 l d'eau bi-distillée.

La suspension de charbon-dextran utilisée pour séparer les stéroïdes libres des stéroïdes liés aux anticorps a été préparée ainsi: 400 mg de charbon, 40 mg de dextran ont été mélangés à 100 ml de tampon phosphate. Le mélange a été conservé une semaine à 4°C mais n'est remise en suspension qu'au moment de l'emploi.

Le dosage s'est effectué dans des tubes en polystyrène dans lesquels on a disposé successivement 100 μ l du stéroïde étudié en solution dans le tampon phosphate, 100 μ l de l'immunsérum, 100 μ l d'une solution dans le tampon de traceur radioactif ayant environ 25000 d.p.m. Tous les dosages ont été effectués en double. Par ailleurs, des tubes témoins ont servi de références: deux tubes contenant le traceur seul, deux tubes contenant l'immunsérum et le traceur seuls.

Dans tous les tubes, le volume a été amené à 500 μ l au moyen du tampon. Les échantillons ont été agités à chaque introduction de réactif et mis à incuber 3 h

Tableau 1. Pourcentage de réaction croisée à 50% et à 1 ng de l'antisérum 15 α -cm-testostérone

Stéroïde	Réaction croisée à 50%	Réaction croisée à 1 ng
Testostérone	100	100
Épitéstostérone	0.6	6
Progestérone	0.4	19
17-OH Progestérone	<0.4	0
5 α -Androstane 3 β ,17 β -diol	<0.4	1
5 α -Androstane 3 α ,17 β -diol	<0.4	1
5 α -DHT	3.2	27
Androstérone	<0.4	0
DHA	<0.4	0
Estradiol	<0.4	0
Cortisol	<0.4	0
Prégnandiol	<0.4	0
Androsténone	19	44

à 4°C. 1 ml de la suspension de charbon a été introduit dans chaque tube. Après agitation et un repos de 40 min à 4°C les tubes ont été centrifugés pendant 10 mn à 3000 tours et à 4°C.

La phase aqueuse contenant le traceur lié aux anticorps a été placée dans les fioles de comptage. La radioactivité a été mesurée avec 10 ml de solution de Bray dans un compteur à scintillation Intertechnique SL 30. Les résultats sont exprimés par rapport au point de référence.

RESULTATS ET DISCUSSION

Ainsi que le montre le tableau 1, l'antisérum ne présente qu'une faible réaction croisée à 50% avec le 5 α -DHT (3,2%) ainsi qu'avec l'épitéstostérone (0,6%) et la progestérone (0,4%) mais une réaction croisée importante avec l'androstène dione (19%). Les réactions croisées au 1 ng sont données à titre indicatif.

Le choix du site de fixation s'est fait à partir de l'hypothèse selon laquelle il est nécessaire, pour obtenir des anticorps spécifiques vis-à-vis de stéroïdes possédant un groupement fonctionnel ène-4 one-3, que le cycle A ne soit pas encombré ou déformé. Cette hypothèse, qui nous a conduit à la préparation de plusieurs haptènes et antigènes possédant cette caractéristique [1, 11] s'est trouvée renforcée par les résultats obtenus par différents auteurs.

La fixation d'un chaînon carboxyméthyl en C-6 β [9] conduit à un encombrement au niveau d'un site caractéristique de la molécule de testostérone (jonction des cycles) et par conséquent à des réactions croisées importantes avec la 5 α -DHT (80%) (ainsi qu'avec le 5 α -androstane 3 β ,17 β diol [16]).

Weinstein *et al.* [17] ont fixé un chaînon 7 α -carboxyméthylthioéther ou 7 α -carboxyéthylthioéther sur la testostérone obtenant des antigènes qui ont donné lieu à la formation d'anticorps présentant des réactions croisées importantes (42% et 52% respectivement) avec la 5 α -DHT, (5% et 4%) avec la 5 β -DHT ainsi qu'avec le 5 α -androstane 3 α ,17 β -diol (17% et 8%) et avec le 5 α -androstane 3 β ,17 β -diol (7%). Les réac-

tions croisées avec la 5 α -DHT peuvent ici encore s'expliquer par l'encombrement stérique du site C-5 par l'atome de soufre fixé en 7 α .

Par ailleurs, la fixation d'un chaînon hémisuccinate, sur le cycle C, en position 11 α de la 11 α -hydroxy testostérone [10] ne conduit pas à des anticorps très spécifiques puisque Bosch *et al.* [18] ont mesuré une réaction croisée de l'ordre de 60% avec la 5 α -DHT.

La spécificité des anticorps que avions obtenus à partir de la carboxyméthyl-15 α DHA:BSA [20] et les faibles réactions croisées que nous enregistrons ici avec la 5 α -DHT (3,2%) ainsi qu'avec le (5 α) androstane diol 3 α ,17 β (<0,4%) et le (5 α) androstane diol-3 β ,17 β (<0,4%) montrent que cette hypothèse est féconde. Ces résultats sont confirmés par ailleurs par Rao et Moore [19] qui ont obtenu des anticorps anti-carboxyéthylthioéther-15 β testostérone donnant une réaction croisée faible avec la 5 α -DHT (1,81%).

Remerciement—Nous remercions pour leur soutien financier la D.G.R.S.T. (contrat no. 73.7.1043) et l'I.N.S.E.R.M. (contrat n° 76.1.134.4).

REFERENCES

1. Condom R. et Emiliozzi R.: *Steroids* **23** (1974) 483-498.
2. Midgley A. R. et Niswender G. D.: In *Steroid Assay by Protein Binding*, 2nd Karolinska Symposium on Research Method in Reproductive Endocrinology (Editeur Diczfalluzy) Genève 1970; *Acta endocr.*, Supp **147** (1970) 320-331.
3. Lindner H. R., Perel E. et Friedlander A.: In *Research on Steroids* (Editeur Finkelstein M., Conti C., Klopfer A. et Cassano C.). Pergamon Press, Oxford, Vol. 4 (1970) p. 197.
4. Exley D., Johnson M. G. et Dean P. D. G.: *Steroids* **18** (1971) 605-610.
5. Jeffcoate S. L. et Searle J. E.: *Steroids* **19** (1972) 181-188.
6. Kuss E. et Goebel R.: *Steroids* **19** (1972) 509-518.
7. Linder M.: Thèse, Nice (1974).
8. Lindner H. R., Perel E., Friedlander A. et Zeitlin A.: *J. Endocr.* **52** (1972) 17-19.
9. Riley W. J., Smith E. R., Robertson D. M. et Kellie A. E.: *J. steroid Biochem.* **3** (1972) 357-367.
10. Hillier S. G., Brownsey B. G. et Cameron E. H. D.: *Steroids* **21** (1973) 735-754.

11. Condom R.: *C.R. hebdomadaire. Acad. Sci., Paris* **281** (1975) 139-141.
12. Abraham G. E.: *J. clin. Endocr. Metab.* **29** (1969) 866-876.
13. de Lauzon S., Cittanova N., Desfosses B. et Jayle M. F.: *Steroids* **22** (1973) 747-761.
14. Erlanger B. F., Borek F. M., Beiser S. M. et Lieberman S.: *J. biol. Chem.* **228** (1957) 713-727.
15. Tamaoki H., Murase Y., Minato S. et Nakanishi K.: *J. Biochem.* **62** (1967) 7-14.
16. Tyler J. P. P., Henman J. F., Newton J. R. et Collins W. P.: *Steroids* **22** (1973) 871-881.
17. Weinstein A., Lindner H. R., Friedlander A. et Bauminger S.: *Steroids* **20** (1972) 789-811.
18. Bosch A. M. G., den Hollander F. C. et Woods G. F.: *Steroids* **23** (1974) 699-711.
19. Rao P. M. et Moore P. H.: *Steroids* **28** (1976) 101-109.
20. Dray F.: In *Steroid Immunoassay* (Editeurs E. H. D. Cameron, S. G. Hillier et K. Griffiths). Alpha Omega Publishing Ltd, Cardiff, (1975) p. 125.