

PREPARATION ET PROPRIETES ANTIGENIQUES DU CONJUGUE ANDROSTERONE-15 α -CARBOXYMETHYL:BSA ET DE QUATRE CONJUGUES DES 5 α -ANDROSTANE-3,17 β -DIOL

R. CONDOM*, B. DESFOSSÉS† et G. HABRIOUX†

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

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

(Received 1 March 1977)

SUMMARY

Antisera against androsterone and 5 α -androsterone-3,17 β -diol were raised in rabbits with conjugates obtained by coupling 15 α -carboxymethylandrosterone, 1 α -carboxymethyl-5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol, 15 α -carboxymethyl-5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol, 7-(O-carboxymethyl) oxime-5 α -androsterone-3 β ,17 β -diol, 15 α -carboxymethyl-5 α -androsterone-3 β ,17 β -diol with bovine serum albumin. The preparation of haptens has been described. A part from a 17% cross reaction with 5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol the antisera anti-androsterone were highly specific. The antisera anti 15 α -carboxymethyl-5 α -androsterone-3,17 β -diol have shown no cross reactions with the epimeric steroids the C-3 position.

INTRODUCTION

Bien que la connaissance de la concentration dans le plasma de l'androstérone et des 5 α -androsterone-3,17 β -diol présente une importance certaine, peu d'études ont été faites concernant le dosage par radioimmunologie de ces substances [1-5]. Poursuivant notre étude qui concerne la préparation d'antigènes pouvant produire des anticorps spécifiques après inoculation à des lapins [6-8], nous décrivons la synthèse des haptènes de l'androstérone et des 5 α -androsterone-3,17 β -diol. Les chaînons utilisés carboxyméthyl ou (O-carboxyméthyl) oxime ont été fixés en des sites du stéroïde éloignés des positions fonctionnelles et de la jonction des cycles A et B.

Nous avons ainsi préparé les antigènes suivants: androstérone-15 α -carboxyméthyl:BSA, 5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol-1 α -carboxyméthyl:BSA, 5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol-15 α -carboxyméthyl:BSA, 5 α -androsterone-3 β ,17 β -diol-7-(O-carboxyméthyl)oxime:BSA et 5 α -androsterone-3 β ,17 β -diol-15 α -carboxyméthyl:BSA. La description des haptènes du 5 α -androsterone-3,17 β -diol a fait l'objet d'une publication préliminaire [9]. L'étude de la spécificité des antisérums produits par des lapins a été effectuée.

METHODES ET MATERIELS

1. Préparation du 15 α -carboxyméthyl-androstérone, du 15 α -carboxyméthyl-5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol et des antigènes correspondants. La préparation du 15 α -carboxyméthyl-5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol (7) (voir Fig. 1)

suit jusqu'au composé (6) la même voie que pour la synthèse du 15 α -carboxyméthyl-DHA [5]. Seuls les détails expérimentaux varient, la molécule d'androstérone (1) n'ayant pas un comportement identique à celui de la DHA en raison de l'absence de la double liaison.

L'androstérone (1) est soumise à l'action de l'éthylène glycol en présence d'acide *p*-toluène sulfonique. Le cétal (2) obtenu se bromure facilement en 16 α par l'utilisation du perbromure de phényltriméthyl ammonium (PTT) [10] en solution dans le tétrahydrofurane. La réaction est plus aisée qu'avec la DHA. En effet, il n'y a pas dans ce cas de réaction parasite (fixation de brome sur la double liaison), ce qui permet l'obtention d'un bon rendement. Une débromhydratation par le *tert*-butylate de potassium dans le diméthylsulfoxyde conduit à l'alcène (4). La décatalisation de (4) ne s'est pas effectuée dans les mêmes conditions que pour le composé analogue (3 β -hydroxy-5,15-androstadiène-17-one,17 éthylène dioxy) dans la série de la DHA. L'utilisation d'une solution aqueuse d'acide acétique conduit rapidement à la cétone conjuguée alors que l'action de l'acide *p*-toluène sulfonique dans l'acétone aqueuse à température ambiante, bien que possible, est plus lente et provoque la formation de deux produits parasites, plus polaires que la cétone conjuguée, que nous n'avons pas identifiés. Une réaction de Michaël sur la cétone conjuguée (5) donne, après saponification et décarboxylation, l'acide (6). Une réduction par le borohydrure de potassium permet l'accès à l'haptène 15 α -carboxyméthyl-5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol (7)

La condensation de l'haptène (6) avec la BSA donne un antigène dans lequel 20 mol de stéroïdes sont liées à 1 mol de BSA. La condensation des haptènes sur l'albumine de sérum de bovidés (BSA)

* Adresser les épreuves et la correspondance à R. Condom Laboratoire de Chimie Structurale Organique, Université de Nice, Parc Valrose, 06034 Nice cédex, France.

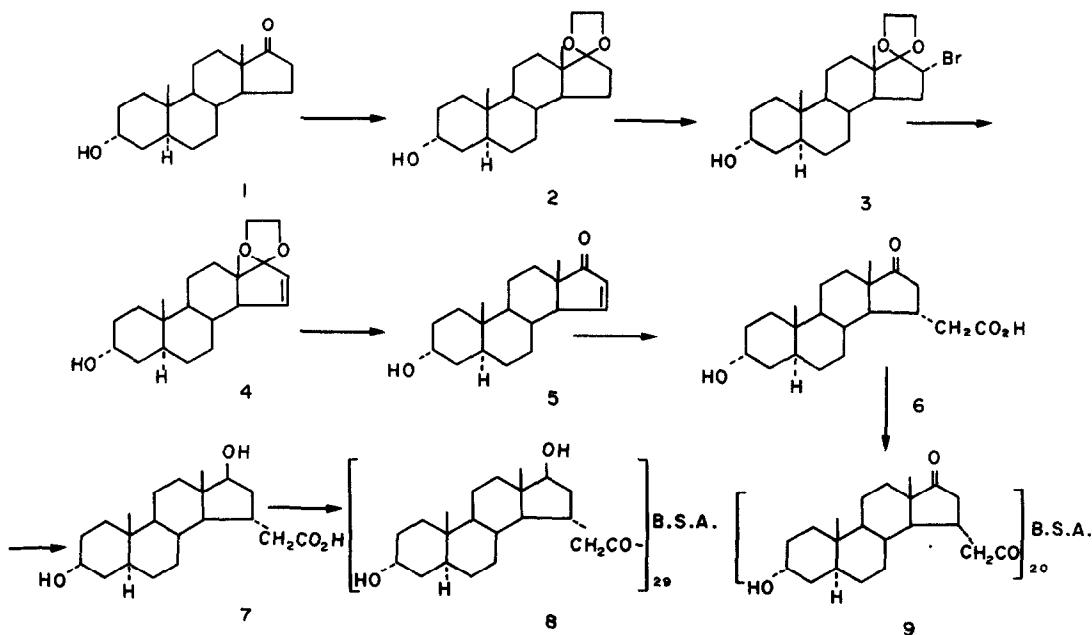


Fig. 1. Préparation des antigènes androstérone-15 α -carboxyméthyl:BSA et 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol-15 α -carboxyméthyl:BSA.

utilise la méthode à l'anhydride mixte [11] selon le processus expérimental relaté antérieurement [7]. La mesure de l'incorporation s'effectue en utilisant la nitrotrone [12], le coefficient d'extinction moléculaire du complexe [nitrotrone:BSA] étant de $5.10^3 M^{-1} cm^{-1}$ à 420 nm.

2. Préparation du 7-(O-carboxyméthyl)oxyimino-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (11) et de l'antigène correspondant—Fig.2. Nous sommes partis du 7-(O-carboxyméthyl)oxyimino-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol,17 β -acétate (10) dont la synthèse a été décrite dans un article relatant la préparation de la 5 α -DHT-7CMO:BSA [6]. Une saponification dans les conditions usuelles conduit à l'haptène (11) dont la condensation à la BSA a permis l'obtention de l'antigène (12) dans lequel 22 mol de stéroïdes sont unies à une mol de BSA.

3. Préparation du 15 α -carboxyméthyl-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol et de l'antigène correspondant—Fig. 3. L'haptène (15) a été préparé à partir de la 15 α -carboxyméthyl-DHA dont la préparation a été décrite antérieurement [5]. Une réduction par le borohydure de potassium conduit au diol (14) qui par hydrogénation dans le méthanol en présence de pyridine et de palladium sur charbon à 10% conduit à l'haptène (15).

La condensation de cet haptène à la BSA a donné l'antigène (16) dans lequel 30 mol de stéroïdes sont liées à une mol d'albumine.

4. Préparation du 1 α -carboxyméthyl-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol et de l'antigène correspondant. Cette préparation a été décrite dans un précédent article [6]. La condensation de cet haptène à la BSA a donné un antigène possédant une incorporation de 20 mol de stéroïdes par mole de BSA.

/ PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Büchi (Tottoli) et ne sont pas corrigés. Les spectres I.R. ont été enregistrés sur un Perkin Elmer 254, les produits étant conditionnés en pastilles dans le KBr. Les spectres de R.M.N. ont été enregistrés sur un appareil Varian EM 360, le tétraméthylsilane étant utilisé comme référence interne.

3 α -Hydroxy-5 α -androstane-17-one,17-éthylène dioxy (2)

Ce composé est préparé selon la méthode usuelle: 27 g d'androstérone sont dissous dans 600 ml de benzène. On ajoute à la solution 120 ml d'éthane-diol-1,2 et 1,2 g d'acide *p*-toluène sulfonique. Le

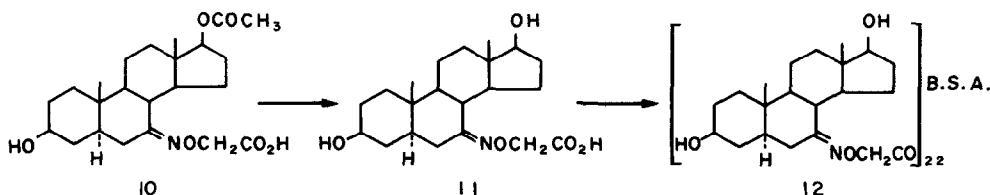


Fig. 2. Préparation de l'antigène 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol-7-CMO:BSA.

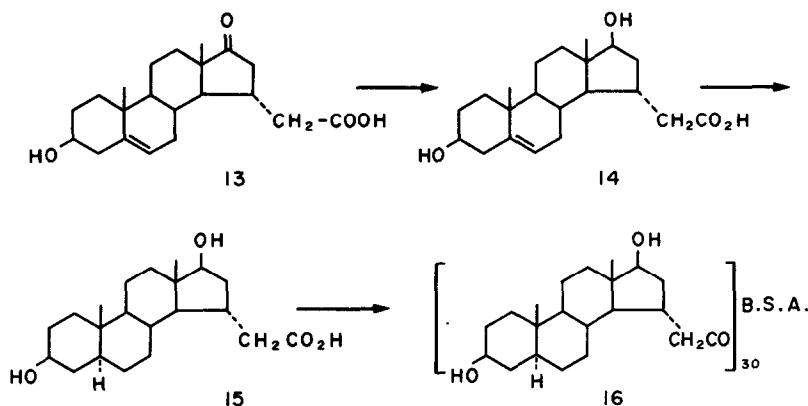


Fig. 3. Préparation de l'antigène 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol-15 α -carboxyméthyl:BSA.

mélange est placé au reflux, surmonté d'un appareil de Soxhlet (chargé de sulfate de calcium), pendant 24 H. La solution est neutralisée puis réduite par évaporation sous vide. Le résidu, repris par du chloroforme, est lavé abondamment à l'eau. Après mise à sec de la phase organique, la résine résultante est reprise par le méthanol. On obtient ainsi 31,0 g de cristaux, $F = 133-135^{\circ}\text{C}$. Par recristallisation dans le méthanol aqueux, les cristaux analytiques sont obtenus, $F = 134-135^{\circ}\text{C}$.

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$; Calc. C: 75,40, H: 10,24; Tr. C: 75,25 H: 10,21; I.R. $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3400, 2920 cm^{-1} , R.M.N. (CDCl_3) δ ppm: 0,76 (C_{19} méthyl, 3H, S) 0,83 (C_{18} méthyl, 3H, S), 3,86 (éthylène dioxy, 4H, S) 4,02 (3 β H, 1H, S).

16 α -Bromo-3 α -hydroxy-5 α -androstane-17-one,17-éthylène dioxy (3)

31,3 g de dioxolanne d'androstérone (2) sont dissous dans 320 ml de tétrahydrofurane sec. On ajoute sous agitation 38,5 g de PTT et laisse reposer pendant 5 H. La solution est ensuite jetée dans une ampoule contenant 1,5 l d'eau. L'extraction s'effectue par 3×100 ml d'éther, qui après séchage par SO_4Na_2 sont distillés sous pression réduite. La cristallisation s'effectue dans le méthanol pour le premier jet, 21,0 g, $F = 176-177^{\circ}\text{C}$ et dans le méthanol aqueux pour le second, 9,4 g $F = 175-177^{\circ}\text{C}$. Par recristallisation dans le méthanol, le composé analytique, $F = 196-197^{\circ}\text{C}$ est obtenu.

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{O}_3\text{Br}$; Calc. C: 61,01, H: 8,04, Br: 19,33; Tr. C: 60,84, H: 8,09, Br: 19,35; I.R. $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3320, 2900 cm^{-1} ; R.M.N. (CDCl_3) δ ppm: 0,78 (C_{19} méthyl, 3H, S) 0,88 (C_{18} méthyl, 3H, S), 4,0 (éthylène dioxy, 4H, multiplet).

3 α -Hydroxy-5 α -androst-15-ène-17-one,17-éthylène dioxy (4)

On dissout dans 250 ml de diméthylsulfoxyde distillé 20 g du dérivé bromé (3) et ajoute 29 g de tert-butylate de potassium fraîchement préparé et sublimé. Le mélange est placé 15 H à 40° . La solution est ensuite traitée comme dans la série de la DHA. La résine obtenue est cristallisée dans le méthanol don-

nant un premier jet de 9,44 g, $F = 111-113^{\circ}\text{C}$. Par ajout d'eau, il vient un second jet, 3,72 g, $F = 110-113^{\circ}\text{C}$. L'échantillon analytique est obtenu dans le même mélange, $F = 111-113^{\circ}\text{C}$.

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_3$; Calc. C: 75,86, H: 9,70; Tr. C: 75,75, H: 9,68; I.R. $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3440, 2940, 1660 cm^{-1} ; R.M.N. (CDCl_3) δ ppm 0,80 (C_{19} méthyl, 3H, S) 0,90 (C_{18} méthyl, 3H, S) 3,92 (éthylène dioxy, 4H, multiplet caractéristique du groupement en α d'une double liaison) 4,0 (3 β H, 1H, S), 5,63 (H_{15} , 1H, quadruplet: $J_{15-16} = 6,0$ Hz, $J_{15-14} = 3,0$ Hz) 6,13 (H_{16} , 1H, doublet: $J_{16-15} = 6,0$ Hz).

3 α -Hydroxy-5 α -androst-15-ène-17-one (5)

On dissout 825 mg de 3 α -hydroxy-5 α -androst-15-ène-17-one,17-éthylène dioxy dans 20 ml d'acide acétique et ajoute 6 ml d'eau. On laisse reposer la solution 1 H 30 à 20° , puis jette dans l'eau glacée d'une ampoule et extrait par du chloroforme. Cette phase organique est lavée par une solution saturée de bicarbonate de sodium, à l'eau, séchée et amenée à sec. On obtient 800 mg de résine. Une cristallisation sur une fraction (220 mg) dans l'acétate d'éthyle donne 180 mg de cristaux analytiques, $F = 151-153^{\circ}\text{C}$.

Analyse: $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$; Calc. C: 79,12, H: 9,78; Tr. C: 79,26, H: 9,85; I.R. $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3420, 1700, 1650 cm^{-1} ; R.M.N. (CDCl_3) δ ppm 0,85 (C_{19} méthyl, 3H, S) 1,05 (C_{19} méthyl, 3H, S) 4,0 (3 β H, 1H, S) 5,96 (H_{15} , 1H, quadruplet: $J_{15-16} = 5,5$ Hz; $J_{15-14} = 2,6$ Hz) 7,46 (H_{16} , 1H, quadruplet: $J_{16-15} = 5,5$ Hz, $J_{16-14} = 1,3$ Hz).

15 α -Carboxyméthyl-3 α -hydroxy-5 α -androstane-17-one (6)

1,72 g De l'alcène (5) sont placés en solution dans 60 ml de THF. On ajoute une solution de THF contenant 1,3 g de malonate d'éthyle sodé (par NaH). Le mélange est abandonné à température ambiante pendant 6H, puis de l'acide acétique est ajouté jusqu'à la neutralité. La solution est amenée à sec. La résine est reprise par le chloroforme, lavée à l'eau, séchée et amenée à sec. Cette nouvelle résine est dissoute dans 10 ml de *t*-butanol et mise en présence de 10 ml d'une solution de soude (2 g). Le mélange est agité

pendant 24 H. Le *t*-butanol est distillé sous pression réduite. La phase aqueuse est extraite par le chloroforme puis acidifiée et enfin extraite par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée et amenée à sec. La décarboxylation s'effectue dans un mélange de 20 ml de dioxanne, 2 ml d'eau et 2 ml d'acide formique du reflex pendant 12 H. Le mélange réactionnel est amené à sec et la résine résultante reprise par de l'acétate d'éthyle. Cette phase organique est lavée par de l'eau saturée en NaCl, séchée et évaporée à sec.

La cristallisation s'effectue dans l'acétate d'éthyle. Après deux cristallisations, l'échantillon analytique, $F = 201-202^{\circ}\text{C}$ est obtenu. Le rendement est de 25%.

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4$; Calc. C: 72,38, H: 9,26; Tr. C: 71,75, H: 9,80; I.R. $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3260, 2920, 1680 cm^{-1} ; R.M.N. (DMSO d_6) δ ppm 0,80 (C_{19} méthyl, 3H, S) 0,90 (C_{18} méthyl, 3H, S) 3,8 (3 β H, 1H, S).

15 α -Carboxyméthyl-5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (17)

500 mg De 15 α -carboxyméthyl-3 α -hydroxy-5 α -androstane-17-one sont dissous dans 15 ml de méthanol. 380 mg De borohydrure de potassium sont ajoutés par petites fractions. Le mélange est ensuite amené à sec, repris par de l'eau. La solution est transférée dans une ampoule à décanter et après acidification, extraite par 3 \times 20 ml d'acétate d'éthyle. Cette phase est séchée, et amenée à sec. Une cristallisation de la résine résultante dans un mélange méthano-leau donne 345 mg de cristaux analytiques, $F = 260-262^{\circ}\text{C}$.

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$; Calc. C: 72,37, H: 9,25; Tr. C: 71,83, H: 9,90; I.R. $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3400, 2920, 1680 cm^{-1} ; R.M.N. (DMSO d_6) δ ppm 0,76 (C_{18} méthyl, 3H, S) 0,83 (C_{19} méthyl, 3H, S) 4,0 (3 β H, 1H, S).

3 β ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstane-7-one-7-(*O*-carboxyméthyl) oxime (11)

La saponification du 17 β -acétoxy-3 β -hydroxy-5 α -androstane-7-one-7-(*O*-carboxyméthyl) oxime (10) s'effectue en plaçant 190 mg de ce composé en solution dans 20 ml de méthanol contenant 1,0 g de potasse. La solution est abandonnée 12 H à température ambiante, puis jetée dans l'eau. On extrait par le chloroforme puis acidifie la solution aqueuse par une solution d'acide chlorhydrique. L'acide précipite. On l'extrait par 3 \times 15 ml de chloroforme. On sèche et amène à sec cette solution. 190 mg De résine blanche sont obtenus. Une cristallisation dans le méthanol aqueux donne 94,2 mg d'aiguilles blanches, $F = 138-140^{\circ}\text{C}$.

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{O}_5\text{N}$; Calc. C: 66,46, H: 8,76, N: 3,69; Tr. C: 66,85, H: 8,81, N: 3,70; I.R. $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3390, 1730, 1630, 1230 cm^{-1} .

15 α -Carboxyméthyl-5-androstène-3 β ,17 β -diol (14)

250 mg De l'acide (13) sont dissous dans 40 ml de méthanol et 180 mg de borohydrure de potassium sont ajoutés. Le mélange est agité et après 5 mn, quelques gouttes d'acide acétique sont versées. La solution

est évaporée et le résidu dissous dans l'éther. On lave à l'eau, sèche la phase organique et amène à sec. La résine résiduelle est cristallisée dans le mélange méthanol-acétate d'éthyle donnant 200 mg de cristaux $F = 253-255^{\circ}\text{C}$.

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4$; Calc. C: 72,38, H: 9,25; Tr. C: 72,55, H: 9,13; I.R. $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3500-3200, 1740, 1680, 1270 cm^{-1} ; R.M.N. (DMSO d_6) δ ppm 0,67 (C_{18} méthyl, 3H, S) 0,93 (C_{19} méthyl, 3H, S) 5,32 (H_6 , 1H, S).

15 α -Carboxyméthyl-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (15)

283 mg (14) Sont placés dans une fiole à hydrogéner contenant 50 ml de méthanol, 0,100 ml de pyridine et 200 mg de catalyseur (Pd/C à 10%). Lorsque la quantité d'hydrogène théorique + 20% est absorbée, le mélange est filtré et le catalyseur lavé abondamment par du méthanol chaud. La solution est filtrée à nouveau à travers une couche de célite, puis amenée à sec. Le résidu (240 mg) est cristallisé dans l'acétone, livrant 208 mg de cristaux $F = 244-246^{\circ}\text{C}$.

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$; Calc. C: 71,96, H: 9,77; Tr. C: 71,82, H: 9,80; I.R. $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3350, 1740 cm^{-1} ; R.M.N. (DMSO d_6) δ ppm 0,67 (C_{18} méthyl, 3H, S) 0,92 (C_{19} méthyl, 3H, S).

PREPARATION DES ANTISERUMS

Chaque antigène a été injecté à deux lapins de race New Zealand. Un mélange formé de 1 mg d'antigène dissous dans 0,5 ml de sérum physiologique stérile et 0,5 ml d'adjuvant de Freund complet a été émulsionné puis injecté par voie intradermique en une vingtaine de sites du dos du lapin préalablement épilé. On injecte de plus, uniquement lors de la première injection, par voie intramusculaire 0,25 ml de vaccin anticoquelucheux. Trois rappels ont été effectués à six semaines d'intervalle. Dix jours après le dernier rappel, des titrages sur du sérum prélevé à la veine marginale de l'oreille ont été effectués puis les lapins ont été sacrifiés.

Tous les lapins ont formé des anticorps. Les titres des sérums utilisés ont été les suivants: sérum anti-androstérone 1:7000; sérum anti-15 α -carboxyméthyl-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol 1:4300; sérum anti-7-(*O*-carboxyméthyl)oxymino-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol 1:2200; sérum anti-15 α -carboxyméthyl-5 α -androstane-3 α ,17 β -diol 1:2200; sérum anti-1 α -carboxyméthyl-5 α -androstane-3 α ,17 β -diol 1:5000.

CARACTERISATION DES ANTISERUMS

Le calcul des réactions croisées s'est effectué selon deux méthodes:

—à 50%, selon la définition d'Abraham [13]: $\text{R.C. } 50\% = x/y \times 100$ où x est la masse de stéroïde non marqué homologue, et y la masse du composé hétérologue nécessaire pour produire un déplacement de 50% du stéroïde marqué fixé sur l'anticorps.

—au 1 ng, selon la définition de de Lauzon *et al.* [14]: R.C. 1 ng = $x/y \times 100$ où x est le pourcentage de traceur déplacé par 1 ng du stéroïde dont on étudie la réaction croisée et y le pourcentage de traceur déplacé par 1 ng d'haptène.

RESULTATS

Les tableaux 1, 2 et 3 donnent les réactions croisées à 50% et au 1 ng des cinq antisérums étudiés.

Le tableau 1 montre que l'antisérum anti-15 α -carboxyméthyl-androstérone possède une spécificité élevée puisque la seule réaction croisée importante a lieu avec le 5 α -androstane-3 α ,17 β (17%).

Le tableau 2 montre que le sérum anti-15 α -carboxyméthyl-5 α -androstane-3 α ,17 β -diol croise à 9% avec l'androstérone, la seule réaction croisée importante enregistrée. Le même tableau met en évidence les réactions croisées parfois très élevées de l'antisérum anti-1 α -carboxyméthyl-5 α -androstane-3 α ,17 β -diol avec la 5 α -DHT (173%), la testostérone (84%), l'androstènedione (9%) et le 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (9%) rendant cet immunosérum inutilisable pour un dosage radioimmunologique. Les immunosérums anti-7-CMO-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol et anti-15 α -CMO-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol ne croisent pas avec le 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (0,4%) ainsi que le montre le tableau 3. Des réactions croisées peu importantes existent cependant avec la DHA (respectivement 11% et 4%), la 5 α -DHT (1,4% et 5%), la testostérone (< 0,4% et 2,8%) et l'androstènedione (< 0,4% et 1%).

DISCUSSION

Cet article décrit la préparation d'antigènes de l'androstérone, du 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol et du 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol. La spécificité de l'antisérum anti-15-carboxyméthyl androstérone (Tableau 1) peut être comparée à celle de l'antisérum obtenue par Kream, Hellman et Rosenfeld [1] à partir d'un antigène 17-(O-carboxyméthyl) oxyimino-androstérone:BSA. Alors que nous enregistrons une réaction

croisée de 17% avec le 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, ces auteurs ont mesuré avec le même stéroïde une réaction croisée de 37%. En outre, ces auteurs enregistrent des réactions croisées allant de 12% à 5% avec quatre 17-oxo stéroïdes. Ainsi est mis une nouvelle fois en évidence que pour obtenir des anticorps de spécificité élevée il est nécessaire que les extrémités fonctionnelles du stéroïde soient libres dans l'antigène. Il est possible que la réaction croisée à 17% enregistrée ici avec le 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol puisse être due à la proximité du chaînon carboxyméthyl fixé en 15 avec la fonction portée en C-17 qui provoquerait une mauvaise reconnaissance de ce site par les anticorps. Les résultats des réactions croisées qui seraient obtenus à partir d'anticorps anti-7-(O-carboxyméthyl) oxime androstérone:BSA [2] pourraient apporter une réponse sur ce point précis.

L'antisérum anti-1 α -carboxyméthyl-5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (Tableau 1) se différencie des autres antisérums anti-androstanediol par sa non-spécificité. Cette particularité est vraisemblablement due à la présence du chaînon carboxyméthyl en position 1 α qui encombre deux des sites caractéristiques de la molécule: la fonction portée en 3, la jonction des cycles A/B. Nous avons déjà rapporté que l'antisérum anti-1 α -carboxyméthyl DHT était peu spécifique [7]. On a noté avec cet antisérum des réactions croisées importantes avec la testostérone (23%) et avec la 5 β -DHT (31,5%). Ici, l'encombrement méta diaxal encore plus important du groupement hydroxyl en 3 α par le chaînon carboxyméthyl provoque une mauvaise reconnaissance de la fonction portée par le cycle A puisque l'on enregistre des réactions croisées de 173% avec la 5 α -DHT, 84% avec la testostérone. Les trois autres antisérums antiandrostaniol (Tableaux 2 et 3) se révèlent particulièrement spécifiques vis-à-vis de l'épimère en C-3 du stéroïde se trouvant dans l'antigène qui a initié leur formation. L'anti-7CMO-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol donne une réaction croisée de 1,4% avec la 5 α -DHT, de 11% avec la DHA. Dans ce dernier cas, la réaction croisée élevée est vraisemblablement due à l'analogie des structures de la DHA et du stéroïde dans l'haptène.

Tableau 1. Pourcentages de réaction croisée du sérum anti-15 α -carboxyméthyl androstérone

Steroiide	R.C. 50%	R.C. 1 ng
Androstérone	100	100
5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol	17	80
5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol	<0,3	0
5 α -Dihydrotestostérone	<0,3	0
Testostérone	<0,3	0
Déhydroépiandrostérone	<0,3	0
17 α -Hydroxy-4-androstène-3-one	<0,3	0
4-Androstène-3,17-dione	<0,3	0
Progestérone	<0,3	3
17 α -Hydroxy-4-prégnène-3,20-dione	<0,3	0
5 α -Prégnane-3 β ,20-diol	<0,3	0
11 β ,17 α ,21-Trihydroxy-4-prégnène-3,20-dione	<0,3	0
Oestradiol-17 β	<0,3	0

Tableau 2. Pourcentages de réactions croisées des sérums anti-5 α -androstane 3 α ,17 β -diol

Stéroïde	Anti-sérum		Anti-1 α -CM-androstane-diol		Anti-15-CM-androstane-diol	
	R.C.	R.C. 50%	R.C.1 ng	R.C. 50%	R.C.1 ng	
5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol		100	100	100	100	
5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol		9	48	<0,4	0	
5 α -Dihydrotestostérone		173	104	<0,4	0	
Déhydroépiandrostérone		<0,4	0	<0,4	0	
Testostérone		84	78	<0,4	0	
17 α -Hydroxy-4-androstène-3-one		<0,5	3	<0,4	0	
4-Androstène-3,17-dione		9	16	<0,4	0	
3 α -Hydroxy-5 α -androstane-17-one		2	24	9	49	
Progestérone		<0,5	0	<0,4	0	
17 α -Hydroxy progestérone		<0,4	0	<0,4	0	
5 α -Prégnane-3 β ,20-diol		<0,4	0	<0,4	0	
11 β ,17 α ,21-Trihydroxy-4-prégnène-3,20-dione		<0,4	0	<0,4	0	
Oestradiol		<0,4	0	<0,4	0	

Tableau 3. Pourcentages de réactions croisées des sérums anti-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol

Stéroïde	Anti-sérum		Anti 7-CMO androstane diol		Anti 15-CM androstane diol	
	R.C.	R.C. 50%	R.C. 1 ng	R.C. 50%	R.C.1 ng	
5 α Androstane-3 β ,17 β -diol		100	100	100	100	
5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol		<0,4	0	0,4	0	
5 α -Dihydrotestostérone		1,4	5	5	36	
Déhydroépiandrostérone		11	32	4	31	
Testostérone		<0,4	0	2,8	24	
17 α -Hydroxy-4-androstène-3-one		<0,4	0	<0,2	0	
4-Androstène-3,17-dione		<0,4	0	1	11	
3 α -Hydroxy-5 α -androstane-17-one		<0,4	0	0,2	0	
Progestérone		<0,4	0	0,3	8	
17 α -Hydroxy-progestérone		<0,4	0	<0,2	0	
5 α -Prégnane-3 β ,20-diol		<0,4	0	<0,2	0	
11 β ,17 α ,21-Trihydroxy-4-prégnène-3,20-dione		<0,4	0	<0,2	0	
Oestradiol		<0,4	0	<0,2	0	

Ainsi, les réactions croisées enregistrées avec les antisérums anti androstérone et les antisérums anti androstanediol (à l'exclusion de l'anti-1 α -CM-5 α -androstane-3 α ,17 β -diol) permettent d'envisager un dosage radioimmunologique de ces substances dans le plasma après une chromatographie éliminant dans le premier cas les androstanediols et dans le second case les stéroïdes portant une fonction cétone en C-3 ou C-17.

Remerciements—Nous remercions le Dr R. Emiliozzi pour les nombreuses et fructueuses discussions. Ce travail a été accompli grâce à l'aide financière de la D.G.R.S.T. (contrat no. 73.7.1043) et de l'I.N.S.E.R.M. (contrat no. 76.1.134.4).

BIBLIOGRAPHIE

- Kream J., Hellman L. et Rosenfeld R. S.: *Steroids* **27** (1976) 727-739.
- Rosenfeld R. S., Kream J., Paul I. et Hellman L.: *Steroids* **25** (1975) 153-161.
- Kinouchi T. et Horton R.: *J. clin. Endocr. Metab.* **38** (1974) 262-267.
- Schonbacher B. D. et Ewing L. L.: *Endocrinology* **94** (1975) 787-791.
- Youssefnejadian E., Collins W. P. et Sommerville I. F.: *Steroids* **21** (1973) 63-75.
- Condom R. et Emiliozzi R.: *Steroids* **23** (1974) 483-498.
- Condom R. et Desfosses B.: *J. steroid. Biochem.* **8** (1977) 1165-1169.
- Condom R. et Desfosses B.: *J. steroid. Biochem.* **8** (1977) in press.
- Condom R.: *C.R. Acad. Sci., Paris* **281** (1975) 139-141.
- Marquet A., Dvolaitzky M., Kagan H. B., Mamlok L., Ouannes C. et Jacques J.: *Bull. Soc. Chim.* (1961) 1822-1825.
- Vaughan J. R.: *J. am. Chem. Soc.* **73** (1951) 3347-3349.
- Tamaoki H., Murase Y., Minato S. et Nakanishi K.: *J. Biochem.* **62** (1967) 7-14.
- Abraham G. E.: *J. clin. Endocr. Metab.* **29** (1969) 866-876.
- de Lauzon S., Cittanova N., Desfosses B. et Jayle M. F.: *Steroids* **22** (1973) 747-761.