



**HAL**  
open science

# Préparation d'haptènes de la vitamine D et obtention d'anticorps monoclonaux anti 25 hydroxyvitamine D pour la mise au point d'un immunodosage simultané des deux 25 hydroxyvitamines D2 et D3

Sébastien Penlou

## ► To cite this version:

Sébastien Penlou. Préparation d'haptènes de la vitamine D et obtention d'anticorps monoclonaux anti 25 hydroxyvitamine D pour la mise au point d'un immunodosage simultané des deux 25 hydroxyvitamines D2 et D3. Chimie organique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2004. Français. NNT : . tel-00952865

**HAL Id: tel-00952865**

**<https://theses.hal.science/tel-00952865>**

Submitted on 27 Feb 2014

**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.

N° d'ordre : 16-2004

# **THÈSE**

Présentée

devant l'**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1**

**Ecole Doctorale de Chimie**

pour l'obtention

du **DIPLÔME DE DOCTORAT**

**Spécialité Chimie**

(arrêté du 25 avril 2002)

par

**Sébastien PENLOU**

---

**Préparation d'haptènes de la vitamine D  
et obtention d'anticorps monoclonaux  
anti-25-hydroxyvitamine D  
pour la mise au point d'un immunodosage  
simultané des deux 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>**

---

Directeur de thèse : Dr Claude-Yves CUILLERON

*INSERM ERM0322 Hôpital Debrousse  
29, rue Soeur Bouvier ; 69 322 LYON Cedex 05*

Présentée et soutenue le 25 février 2004

Devant la commission d'examen composée de :

Pr Denis SINOÛ, Président  
Dr Issam HANNA, Rapporteur  
M. Frédéric JEAN, Rapporteur  
Dr Philippe PRADELLES  
Dr Eric ROUVIER  
Dr Henri DECHAUD  
Dr Claude-Yves CUILLERON  
Dr Elisabeth MAPPUS



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

## **Président de l'Université**

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la

Vie Universitaire

Secrétaire Général

**M. le Professeur D. DEBOUZIE**

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur R. GARRONE

M. le Professeur G. ANNAT

M. J.P. BONHOTAL

## SECTEUR SANTE

### Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et  
Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de  
Recherche en Biologie Humaine

Département de Formation à la Recherche et à  
l'Evaluation Pédagogiques

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. le Professeur J.DOURY

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : Mme le Professeur D. BOISSON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

Directeur : M. le Professeur M. LAVILLE

## SECTEUR SCIENCES

### Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de  
l'Ingénieur de Lyon

Département de 1<sup>er</sup> cycle Sciences

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J.L. VIALLE

Directeur : M. le Professeur G. BOSQUET

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF

Directeur : M. P. THIRIET Maître de Conférences

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J.P. PUAUX

Directeur : M. J.C. DUPLAN Maître de Conférences

Directeur : M. le Professeur M. ODIN

Directeur : M. le Professeur G. MAREST

Directeur : M. le Professeur D. SERANT



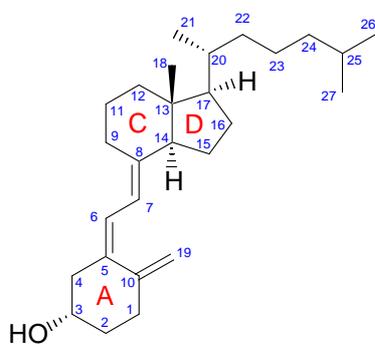
# Avant-propos

Ce manuscrit de thèse s'adresse à des lecteurs aux compétences aussi variées que la chimie, les immunodosages ou l'immunologie.

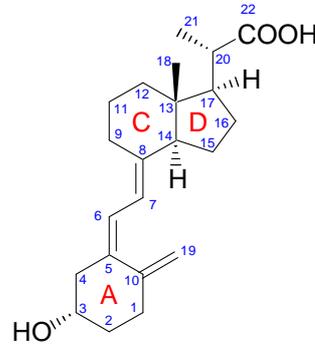
Sa lecture doit ainsi être compréhensible par l'ensemble de ces lecteurs. C'est pourquoi certains détails peuvent paraître anodins, mais sont présents pour garantir la cohérence du manuscrit.

Tous les dérivés de la vitamine D décrits dans ce mémoire sont des composés dont la chaîne latérale a été tronquée. Ainsi, sauf les cas précisés dans le Chapitre I – Bibliographie, par souci de simplification de la nomenclature de ces produits, il est fait abstraction du suffixe « 23,24,25,26,27-pentanor » ou « 24,25,26,27-tétranor » du nom des molécules.

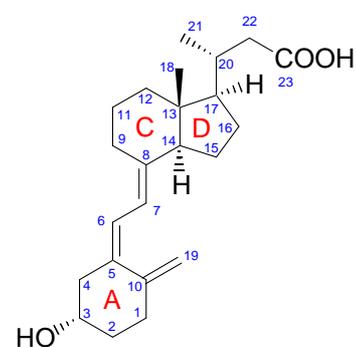
Par conséquent, la 20-COOH-23,24,25,26,27-pentanor-vitamine D<sub>3</sub> s'appellera donc « 20-COOH vitamine D » et la 22-COOH-24,25,26,27-tétranor-vitamine D<sub>3</sub> s'appellera donc « 22-COOH vitamine D »



vitamine D<sub>3</sub>  
cholecalciferol



20-COOH-23,24,25,26,27-pentanor-vitamine D<sub>3</sub>  
20-COOH vitamine D



22-COOH-24,25,26,27-tétranor-vitamine D<sub>3</sub>  
22-COOH vitamine D

Le terme vitamine D désigne indifféremment la vitamine D<sub>2</sub> et la vitamine D<sub>3</sub>, il en va de même pour les métabolites 25-hydroxylés et 1 $\alpha$ ,25-dihydroxylés.

# Remerciements

A mes parents.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Claude-Yves Cuilleron pour m'avoir accueilli au sein de l'ERM 0322, Interactions Stéroïdes-Protéines et Applications Immunodiagnostiques et Biocliniques et pour avoir encadré mes travaux, mais aussi Elisabeth Mappus, Catherine Grenot, Marc Rolland de Ravel et Thierry Blachère pour leurs conseils quotidiens et qui m'ont souvent guidé face aux problèmes rencontrés durant ma thèse.

Je remercie aussi Immunotech pour le financement de ma thèse ainsi que ses collaborateurs, tous de hautes compétences qui m'ont beaucoup appris dans le domaine du diagnostic. Un grand merci à Boun-My pour sa très grande technicité et pour les très bons moments à Marseille. J'ai aussi une pensée toute particulière pour Nina Lupi qui malheureusement nous a quitté trop tôt.

Je remercie très vivement Issam Hanna et Frédéric Jean pour avoir accepté de juger mon travail, ainsi que Denis Sinou pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

Je voudrais ensuite remercier Laurence Rousset et Denis Bouchu pour la spectrométrie de masse. Je tiens à adresser tous mes remerciements à Odile Miani et Bernard Fenet pour les spectres RMN.

J'aimerais aussi remercier l'ensemble des étudiants passés ou présents des laboratoires INSERM de l'Hôpital Debrousse, Romain, Delphine, Ingrid en particuliers pour les moments de détente à midi. Et enfin tous les autres membres des laboratoires INSERM de l'Hôpital Debrousse avec qui j'ai passé de bons moments.

## Liste des abréviations

AcOEt	: acétate d'éthyle
AcOH	: acide acétique
ALB	: albumine
AFP	: $\alpha$ -foetoprotéine
BSA	: albumine de serum bovin
CCM	: chromatographie sur couche mince
CLHP	: chromatographie liquide haute pression
CMA	: hémichlorhydrate de carboxyméthoxylamine
CMO	: carboxyméthylxime
DAI	: dérivé à ioder
DBP	: « vitamin D – binding protein »
DCC	: 1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DCU	: 1,3-dicyclohexylurée
DMSO	: diméthylsulfoxyde
DMF	: diméthylformamide
EDCI	: 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide-hydrochloride
EIA	: « enzyme immunoassay »
éq	: équivalent
Et <sub>3</sub> N	: triéthylamine
EtOH	: éthanol
HAT	: hypoxanthine, aminoptérine et thymidine
IBX	: acide 2-iodoxybenzoïque
MeOH	: méthanol
MM	: masse molaire
MTBE	: méthyl- <i>tert</i> -butyle oxyde
NHS	: N-hydroxysuccinimide
NSB	: “non-specific binding” : liaisons non-spécifiques
OVA	: ovalbumine
PDC	: pyridinium dichromate
Ta	: température ambiante
TBAF	: fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS	: <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl
THF	: tétrahydrofurane
Tr	: temps de rétention
RC	: réaction croisée
Rdt	: rendement
RIA	: « radioimmunoassay » : radioimmunodosage
RMN <sup>1</sup> H	: résonance magnétique nucléaire du proton
RMN <sup>13</sup> C	: résonance magnétique nucléaire du carbone (13)
SPOD	: conjugué streptavidine - horseradish peroxydase
SVF	: serum de veau foetal
US	: ultra-sons
VD, vit. D	: vitamine D
VDR	: récepteur nucléaire de la vitamine D

# Glossaire

## **Adjuvant :**

Substance qui amplifie non spécifiquement la réponse immunitaire à un antigène. (Adjuvant complet ou incomplet de Freund, hydroxyde d'aluminium ...)

L'hydroxyde d'aluminium est un adjuvant présent dans de nombreux vaccins injectables.

## **Adjuvant incomplet de Freund :**

Mélange d'huile minérale et d'émulsifiant permettant après mélange avec l'antigène d'obtenir une émulsion de la solution aqueuse d'immunogène.

## **Adjuvant complet de Freund :**

Contient, en plus de l'adjuvant incomplet, des mycobactéries tuées.

## **Anticorps :**

Immunoglobulines produites en réponse à un antigène particulier et ayant la propriété de se lier spécifiquement avec cet antigène. Ce sont les effecteurs de la réponse immunitaire humorale qui participe à l'élimination des microorganismes pathogènes extra-cellulaires.

## **Anti-anticorps :**

En plus des anti-anticorps produits lors des immunisations elles-mêmes (cascade immunitaire), des anti-anticorps peuvent être obtenus en réponse à l'injection d'un anticorps d'un animal appartenant à une espèce différente.

Les anti-anticorps marqués (par un fluorochrome, une enzyme, une molécule radioactive) sont utilisés comme marqueurs pour visualiser la fixation d'un anticorps sur un antigène.

## **Anticorps monoclonal :**

Anticorps produit par un clone d'hybridome et dirigé contre un seul déterminant antigénique.

## **Apoptose :**

(Grec : apopiptein = tomber de)

Mort cellulaire programmée.

Le terme fait référence à la chute des feuilles en automne, modèle de mort programmée ...

## **Clone :**

Population de cellules identiques dérivant d'une même cellule initiale.

## **Compétition (dosage par) :**

Méthode de dosage qui, le plus souvent, met en jeu la compétition entre un antigène à doser et un traceur vis-à-vis d'un anticorps.

## **Conjugué :**

Molécule résultant du couplage covalent entre deux molécules : par exemple un antigène ou un anticorps couplé à un marqueur.

## **ELISA :**

"Enzyme linked immunosorbent assay".

Désigne les méthodes d'immunodosage en phase hétérogène utilisant des antigènes ou des anticorps couplés à une enzyme comme système de détection ; l'EIA désigne des dosages faisant intervenir cette méthode de détection en phase homogène ou hétérogène.

## **Epitope :**

Zone de la molécule d'antigène reconnue par l'anticorps.

## **Haptène :**

Substance chimique de faible poids moléculaire, possédant une spécificité antigénique mais dépourvue de pouvoir immunogénique. L'haptène seul n'induit pas de réponse immunitaire : pour ce faire il doit être couplé à une substance elle-même immunogénique.

## **Hybridome :**

Cellule hybride obtenue par la fusion d'une cellule de myélome, choisi pour ne pas produire d'anticorps, et d'une cellule B de la rate d'un animal immunisé contre un antigène donné. La cellule hybride acquiert l'immortalité de la cellule cancéreuse et conserve la capacité de produire un anticorps monoclonal.

**IC<sub>50</sub> :**

Concentration d'analyte pour laquelle 50% de liaison du traceur à l'anticorps est mesurée sur la courbe d'étalonnage.

**Immunogène :**

Se dit d'une substance capable de provoquer une réaction immunitaire.

**Immunoprécipitation :**

Méthode de séparation par formation d'un précipité suite à la réaction d'un anticorps spécifique avec l'antigène correspondant en phase liquide. Cette réaction n'est possible que dans le cas d'un antigène multivalent ou par l'addition d'un anti-anticorps ;

**Immunoserum (antiserum) :**

Serum contenant des anticorps dirigés contre un antigène suite à l'injection de cet antigène.

**Marqueur :**

Composé fluorescent, radioactif ou enzyme fixé à un antigène ou un anticorps permettant de mettre en évidence révéler leur présence.

**Méthode sandwich double anticorps (IRMA) :**

Technique permettant de doser un antigène après l'avoir retenu par un premier anticorps fixé sur un support solide par révélation avec un deuxième anticorps marqué, complémentaire, reconnaissant un autre épitope de l'antigène que celui reconnu par le premier anticorps.

**Monoclonal :**

Qui est dérivé d'un clone. Par exemple les anticorps monoclonaux sont tous produits par le même clone.

**Plasmocytes :**

Cellules matures issues de la transformation des lymphocytes B présentes dans le tissu lymphoïde et responsables de la production et de la sécrétion des immunoglobulines.

**Pont disulfure :**

Liaison covalente établie entre les atomes de soufre de deux résidus cystéine dans une même

chaîne polypeptidique (pont intracaténaire) ou entre deux chaînes polypeptidiques (pont intercaténaire).

Dans les immunoglobulines, les chaînes légères et lourdes sont réunies entre elles par des ponts disulfures.

Chaque domaine d'une chaîne possède un pont disulfure qui lui confère une structure globulaire compacte.

**Protéine A :**

Protéine de la paroi de *Staphylococcus aureus* analogue à un récepteur d'IgG qui peut fixer des IgG par leur fragment Fc.

**Rate :**

Le plus volumineux des organes lymphoïdes secondaires.

**Réaction croisée :**

Réaction d'un anticorps avec un antigène différent de celui qui en a induit la formation et due à des parentés antigéniques entre les molécules. Pour les anticorps anti-stéroïdes, la référence est le stéroïde et non l'antigène.

**RIA :**

"Radioimmunoassay".

Désigne les méthodes immunologiques d'analyse par compétition faisant appel à des antigènes ou à des anticorps, marqués radioactivement dont la radioactivité est mesurable quantitativement.

**Spécificité :**

La spécificité reflète la capacité d'un anticorps à distinguer un déterminant antigénique (épitope) de structures chimiques proches.

**Titre :**

Inverse du facteur de dilution pour laquelle on observe 50% de liaison de l'antigène marqué, dans les conditions du dosage et en absence d'antigène froid.

**Traceur :**

Molécule (antigène ou anticorps) contenant un marqueur.



# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
<b>CHAPITRE I – BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>23</b>
I.1 Vitamine D .....	23
<i>I.1.1 Métabolisme de la vitamine D</i> .....	24
I.1.1.1 Voie endogène : production photochimique de vitamine D <sub>3</sub> .....	24
I.1.1.2 Voie exogène : absorption alimentaire des vitamines D <sub>2</sub> et D <sub>3</sub> .....	25
I.1.1.3 Concentrations plasmatiques en 25-OH vitamine D et ses métabolites .....	26
<i>I.1.2 Fonctions de la vitamine D</i> .....	27
I.1.2.1 Bioactivation et dégradation.....	27
I.1.2.2 Rôle dans l'organisme.....	28
I.2 Protéine de transport de la vitamine D .....	29
<i>I.2.1 Rôle biologique de la DBP</i> .....	30
<i>I.2.2 Structure de la DBP</i> .....	30
I.3 Généralités sur les immunodosages des stéroïdes .....	33
<i>I.3.1 Obtention d'anticorps</i> .....	33
<i>I.3.2 Techniques de couplage</i> .....	34
I.3.2.1 Couplage au moyen de carbodiimides.....	34
I.3.2.2 Couplage au moyen d'ester de N-hydroxysuccinimide.....	35
I.3.2.3 Couplage au moyen de diisocyanate .....	35
I.3.2.4 Couplage au moyen d'anhydride mixte.....	35
I.3.2.5 Couplage au moyen d'un sel de diazonium.....	36
I.3.2.6 Couplage au moyen du glutaraldéhyde .....	36
<i>I.3.3 Immunodosages</i> .....	36
I.4 Méthodes de dosage de la vitamine D .....	38
<i>I.4.1 Chromatographie liquide haute pression</i> .....	39
<i>I.4.2 Déplacement DBP-traceur</i> .....	39
<i>I.4.3 Différents types d'immunodosages</i> .....	40
I.4.3.1 Traceur tritié.....	40
I.4.3.2 Traceur iodé .....	40
I.4.3.3 Traceur enzymatique .....	41
<i>I.4.4 Immunodosages commerciaux de la 25-hydroxyvitamine D</i> .....	41
I.4.4.1 Trousse de dosage DiaSorin : .....	41
I.4.4.2 Trousse de dosage IDS (ref. AA-35F1) : .....	41
I.4.4.3 Trousse de dosage IBL (Immuno-Biological Laboratories) : .....	41
I.4.4.4 Trousse de dosage ELISA de IDS : .....	42
<i>I.4.5 Conclusion sur les méthodes de dosages de la 25-hydroxyvitamine D</i> .....	42
<i>I.4.6 Solubilité de la vitamine D et de ses dérivés</i> .....	43

I.5	Haptènes à l'origine des anticorps anti-vitamine D .....	44
I.5.1	<i>Haptène couplé par la position 3</i> .....	44
I.5.2	<i>Haptène couplé par la position 4</i> .....	45
I.5.3	<i>Haptène couplé par la position 11<math>\alpha</math></i> .....	45
I.5.4	<i>Haptène couplé par la position 22</i> .....	46
I.5.5	<i>Haptène couplé par la position 24</i> .....	47
I.5.6	<i>Conclusion sur la position de couplage de la 25-hydroxyvitamine D</i> .....	47
I.6	Chimie de la chaîne latérale de la vitamine D.....	48
I.6.1	<i>Synthèses totales</i> .....	48
I.6.2	<i>Irradiation UV d'un dérivé d'ergostérol</i> .....	50
I.6.3	<i>Hémisynthèse à partir de la vitamine D<sub>2</sub></i> .....	50
I.6.3.1	Protection par le fer nonacarbonylé : .....	50
I.6.3.2	Protection sous forme de 6(R)-hydroxy-3,5-cyclovitamine D : .....	51
I.6.3.3	Protection par réaction de Diels-Alder : .....	51
I.6.3.4	Protection par formation d'adduit de l'anhydride sulfureux : .....	52
I.7	Stratégie .....	53

## **CHAPITRE II – SYNTHÈSE ORGANIQUE : PRÉPARATION DES HAPTÈNES, IMMUNOGÈNES ET TRACEURS ..... 59**

II.1	Voies d'accès aux 5 immunogènes préparés.....	59
II.1.1	<i>Voie commune et étapes transposables</i> .....	59
II.1.1.1	Protection du triène et de l'alcool .....	59
II.1.1.2	Clivage oxydatif de la double liaison 22(23).....	60
II.1.1.3	Utilisation de l'alcool 6 .....	64
II.1.1.4	Déprotection du triène et photo-isomérisation.....	65
II.1.1.5	Déprotection de l'alcool .....	66
II.1.2	<i>Immunogène de la 20-COOH vitamine D</i> .....	66
II.1.2.1	Oxydation de l'alcool 4 .....	67
II.1.2.2	Oxydation de l'aldéhyde 3.....	68
II.1.2.3	Déprotection du triène de l'acide 13a (ou 13b).....	69
II.1.2.4	Photo-isomérisation de l'acide du trans-triène 14.....	72
II.1.2.5	Déprotection de l'alcool .....	73
II.1.2.6	Activation de l'acide carboxylique .....	73
II.1.2.7	Couplage à la BSA.....	75
II.1.3	<i>Immunogène de la 22-CMO vitamine D</i> .....	76
II.1.3.1	O-Carboxyméthoxyde de l'aldéhyde 23 (22-CMO).....	76
II.1.3.2	Déprotection et photoisomérisation du triène du CMO 23 .....	77
II.1.3.3	Activation de l'acide carboxylique 27 .....	78
II.1.3.4	Couplage à la BSA.....	78
II.1.4	<i>Étapes chimiques communes aux trois autres nouveaux haptènes</i> .....	79
II.1.4.1	Ozonolyse et réduction de l'aldéhyde « one-pot ».....	80
II.1.4.2	Déprotection du triène .....	80
II.1.4.3	Photo-isomérisation du triène .....	81
II.1.4.4	Tosylation du triénol 31 .....	81

II.1.5	Immunogène de la 22-COOH vitamine D.....	83
II.1.5.1	SN <sub>2</sub> par le cyanure.....	84
II.1.5.2	Réduction du nitrile 33 en aldéhyde 34.....	85
II.1.5.3	Oxydation de l'aldéhyde 34 en acide carboxylique 35.....	86
II.1.5.4	Déprotection de l'alcool et activation de l'acide carboxylique.....	86
II.1.5.5	Couplage à la BSA.....	87
II.1.6	Immunogène de la 23-CMO vitamine D.....	87
II.1.7	Immunogène de la 22-S-Bz-COOH vitamine D.....	88
II.1.7.1	SN <sub>2</sub> par un thiol et déprotection de l'alcool.....	88
II.1.7.2	Activation de l'acide carboxylique et couplage à la BSA.....	89
II.1.8	Taux de couplage des haptènes de la vitamine D sur la BSA.....	90
II.2	Nouvelle voie d'accès à tous les dérivés de la vitamine D déjà obtenus.....	92
II.2.1	Un intermédiaire clef : le triènole 31.....	92
II.2.2	Oxydation du triènole 31 en triènal 48.....	94
II.3	Traceurs.....	94
II.3.1	Dérivés à ioder.....	95
II.3.1.1	22-Iodo vitamine D.....	96
II.3.1.2	20-CO-(5-iodohistamine) vitamine D 59.....	96
II.3.1.3	22-CMO-(5-iodohistamine) vitamine D 65.....	101
II.3.1.4	Préparation du dérivé à ioder 22-CO-histamine vitamine D 66.....	103
II.3.1.5	Préparation du dérivé à ioder 23-CMO-histamine vitamine D 68.....	103
II.3.1.6	Préparation du dérivé à ioder 22-(S-Bz-CO-histamine) vitamine D 70.....	104
II.3.2	Autres dérivés à ioder non-histaminés.....	104
II.3.2.1	Hydrogénation de l'acide urocanique.....	105
II.3.2.2	22-NH-[3-(1H-Imidazol-4-yl)-propionamido] vitamine D 84.....	105
II.3.3	Marquage à l'iode(125).....	106
II.3.4	Dérivés biotinylés.....	106
II.4	Marqueurs d'affinité.....	108
II.4.1	Accès aux dérivés aminés.....	108
II.4.2	Couplage d'une diamine.....	109
II.4.3	Transformation d'une fonction chimique en fonction amine.....	110
II.5	Analyse par RMN des dérivés de la vitamine D.....	112

## **CHAPITRE III – IMMUNISATIONS & SELECTION DES ANTICORPS.....117**

III.1	Immunisations.....	117
III.2	Anticorps polyclonaux de lapins.....	117
III.2.1	Lapins immunisés par la 20-CO-BSA vitamine D 22.....	117
III.2.2	Lapins immunisés par la 22-CMO-BSA vitamine D 29.....	119
III.3	Obtention d'hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux.....	120
III.3.1	Immortalisation de plasmocytes.....	120
III.3.2	Fusion à partir du rat R1-30 immunisé par la 20-CO-BSA vitamine D 22.....	122
III.3.2.1	Fusion.....	122

III.3.2.2 Protocole de screening en RIA .....	123
III.3.2.3 Résultats .....	123
III.3.3 Fusion à partir du rat R4-30 et R5-30 immunisés par la 20-CO-BSA vitamine D 22 .....	124
III.3.3.1 Fusion .....	124
III.3.3.2 Protocole de screening en EIA.....	125
III.3.3.3 Résultats .....	129
III.3.4 Caractérisation des anticorps sécrétés par les hybridomes des rats 20-CO-BSA vitamine D 22.....	130
III.3.4.1 Titres et déplacements des surnageants de cultures .....	130
III.3.4.2 Clonages .....	131
III.3.4.3 Production des anticorps monoclonaux en liquide d'ascite et caractérisation .....	132
III.4 Conclusion sur la 1 <sup>ère</sup> campagne d'immunisation .....	134
<b>CHAPITRE IV – COMPARAISON DES ANTICORPS OBTENUS POUR CHACUN DES IMMUNOGENES.....</b>	<b>139</b>
IV.1 Titres des immunoséras .....	139
IV.2 Compétition avec les gammes 25-OH vitamines D <sub>2</sub> et D <sub>3</sub> .....	142
IV.2.1 Souris immunisées par la 20-CO-BSA vitamine D 22.....	143
IV.2.2 Souris immunisées par la 22-CMO-BSA vitamine D 29 .....	143
IV.2.3 Souris immunisées par les autres immunogènes.....	144
IV.3 Conclusion sur les immunisations comparatives .....	145
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>149</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>152</b>
Matériels et méthodes .....	152
Modes opératoires.....	157
Table des illustrations .....	196
<b>ANNEXES .....</b>	<b>201</b>
Annexe A : Tableaux de déplacements RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C .....	201
Annexe B : Spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C.....	204
Annexe C : Spectres RMN 2D .....	248
Annexe D : Courbes de déplacements par les gammes 25-OH vitamines D <sub>2</sub> et D <sub>3</sub> de la liaison des traceurs iodés aux immunoséras de chaque souris en immunisation comparative .....	258
Annexe E : Références bibliographiques .....	260

---

# INTRODUCTION

---



# Introduction

L'objet des recherches présentées dans ce mémoire est l'obtention d'anticorps monoclonaux anti-25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> par immunisation d'animaux par des haptènes vitamine D de synthèse conjugués sur une protéine immunogénique. De tels anticorps sont destinés à la mise au point d'une trousse d'immunodosage simultané des deux 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>.

La vitamine D, essentielle pour le maintien de l'homéostasie phosphocalcique, existe sous deux formes : la vitamine D<sub>2</sub> (ou ergocalciférol) et la vitamine D<sub>3</sub> (ou cholécalciférol). Les deux vitamines D se différencient par la présence supplémentaire de la double liaison carbone-carbone 22(23) et du méthyle 28(R) pour la vitamine D<sub>2</sub>. Alors que la vitamine D<sub>2</sub> est d'origine végétale exclusivement, la vitamine D<sub>3</sub> est synthétisée par la peau par irradiation du 7-déhydrocholestérol (provitamine D) par les ultraviolets (UV). La concentration en vitamine D sera donc dépendante des apports alimentaires d'origine végétale (vitamine D<sub>2</sub>) ou animale (vitamine D<sub>3</sub>) et de l'exposition au soleil (vitamine D<sub>3</sub>).

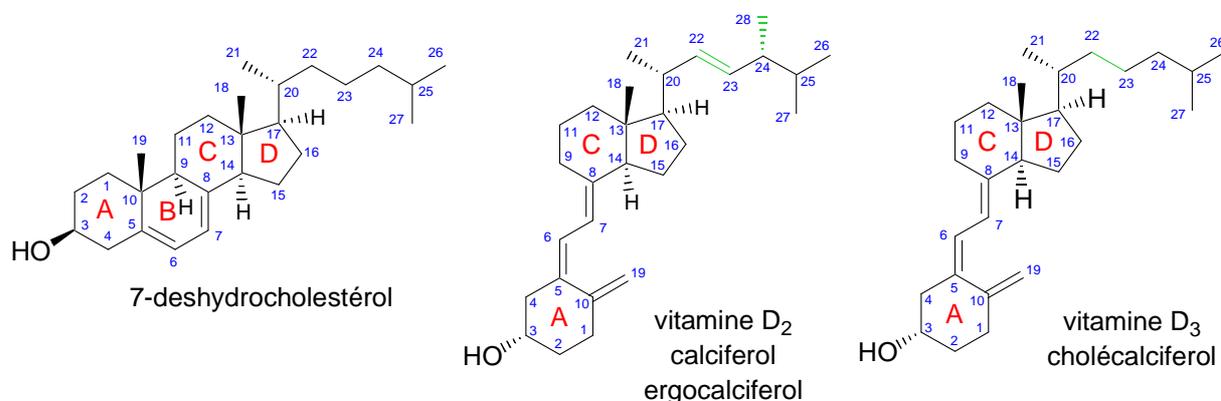


Figure 1 : Numérotation des carbones sur le squelette du 7-déhydrocholestérol, de la vitamine D<sub>2</sub> et de la vitamine D<sub>3</sub>

Le dosage de la vitamine D circulante est effectué par mesure des concentrations plasmatiques ou sériques de ses deux principaux métabolites présents dans l'organisme aussi bien sous la forme de 25-hydroxyvitamine D<sub>2</sub> que sous la forme de 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub>. En effet, le taux sanguin des 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> est un bon reflet des réserves circulantes en vitamine D. Un tel dosage est indispensable pour le dépistage d'hypovitaminose D qui se produit dans des pathologies telles que le rachitisme, l'hyperparathyroïdie secondaire ou l'atrésie des voies biliaires, mais aussi pour le suivi de patients souffrant d'hypoparathyroïdie qui sont traités par des apports massifs de vitamine D afin de maintenir l'homéostasie phosphocalcique.

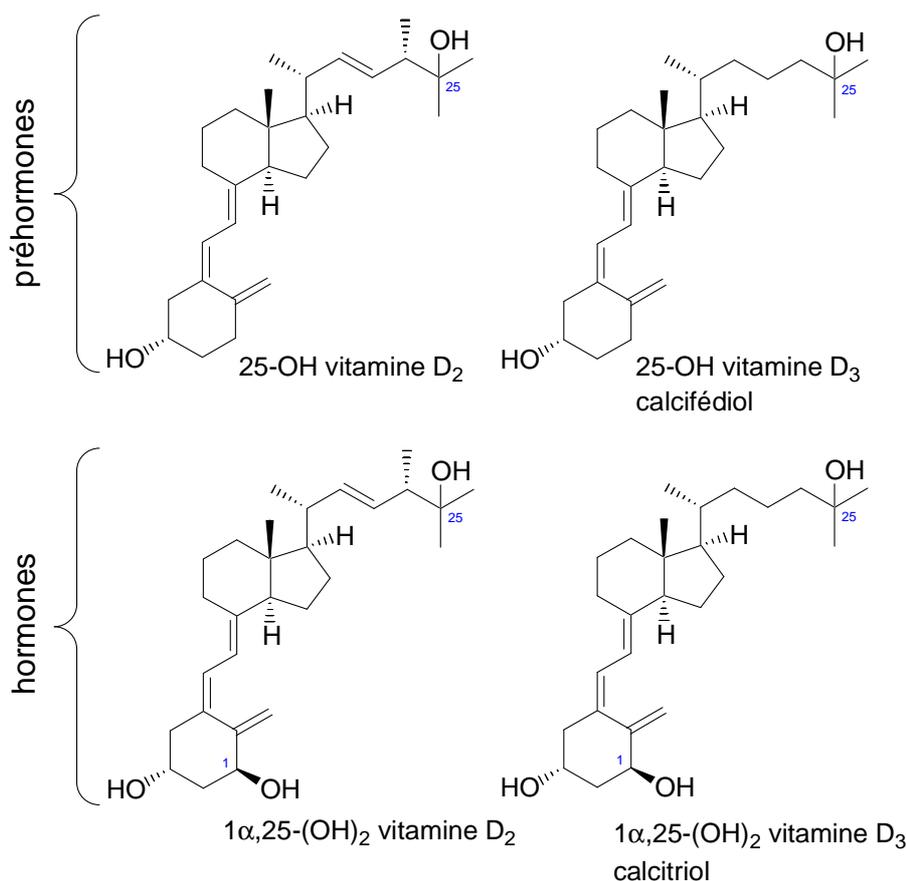


Figure 2 : Métabolites et forme hormonale des vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>

Dans le but d'accéder à un radioimmunos dosage (RIA) direct et simultané des deux 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> (Figure 2), il a été prévu d'obtenir des anticorps polyclonaux et monoclonaux reconnaissant simultanément ces deux dérivés de vitamine D ainsi que des traceurs iodés radioactifs adaptables à ces anticorps.

L'immunisation avec des molécules de petite taille telles que les stéroïdes ne produit pas d'anticorps. Pour franchir cet obstacle, il est nécessaire de les coupler de manière covalente à une molécule de haut poids moléculaire par exemple une protéine d'une espèce animale donnée. Puis un animal d'une autre espèce est immunisé pour qu'il se défende contre cette agression en produisant des anticorps dirigés contre la protéine inconnue ainsi que contre l'haptène conjugué à sa surface.

Dans le cas de la vitamine D<sub>2</sub> (ou D<sub>3</sub>), la chaîne latérale peut être transformée chimiquement pour permettre son couplage covalent, soit à une protéine immunogénique (p. ex. serumalbumine bovine "BSA") afin d'obtenir un immunogène susceptible de déclencher une réaction immunitaire chez l'animal (Figure 3), soit à une molécule marquée sélectivement par l'iode radioactif (p. ex. histamine) afin d'obtenir un traceur.

Le principe de base retenu pour obtenir des anticorps reconnaissant également les deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> est d'employer des haptènes ne conservant que la partie structurale commune aux deux vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> qui ne dépasse pas le carbone C-22 de la chaîne latérale en 17. La stratégie consiste à faire varier la structure des chaînons de couplage courts introduits à partir de l'extrémité C-22 ou C-23 de la chaîne latérale pour déceler les caractéristiques des haptènes vitamine D susceptibles d'améliorer la reconnaissance immunitaire préférentielle du squelette de la vitamine D par rapport à sa chaîne latérale en position 17. Puis, dans un second temps, l'interaction de l'anticorps avec les diverses

structures de traceurs iodés radioactifs dérivés de la vitamine D, couplées aussi en position C-22 ou C-23 devra être optimisée afin d'atteindre les caractéristiques requises par le dosage. De plus, cette stratégie pour induire la reconnaissance préférentielle du squelette devrait éviter l'interférence des métabolites 1 $\alpha$ -hydroxylés dont l'hormone.

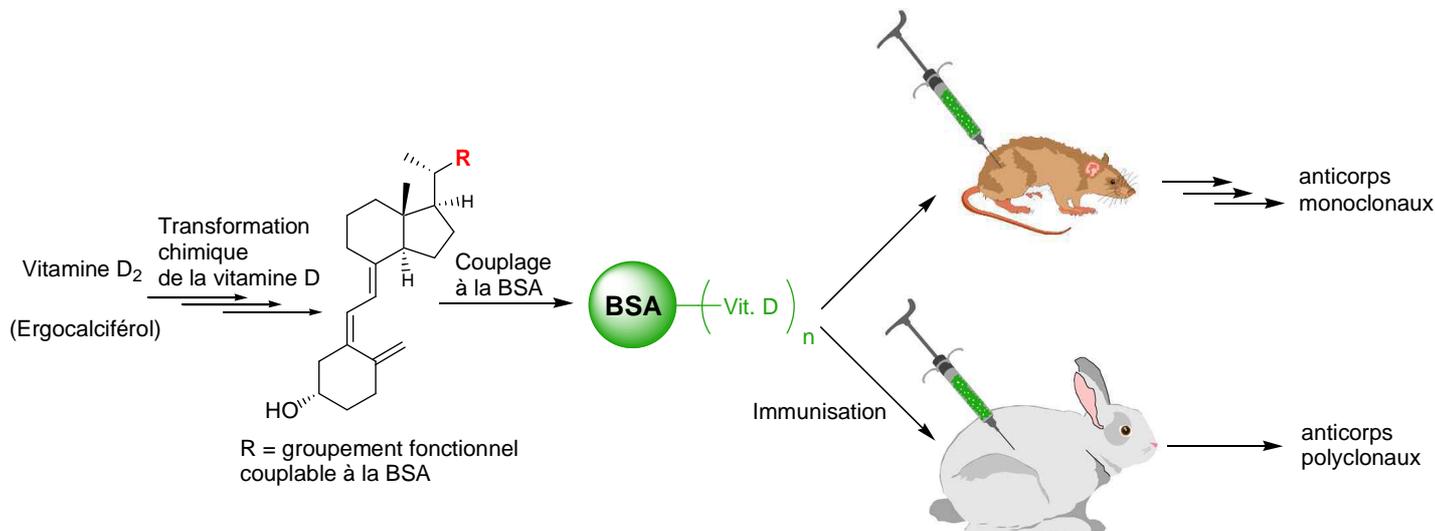


Figure 3 : Schéma d'obtention d'anticorps anti-vitamine D

Ce manuscrit se divise en 4 chapitres :

Le **chapitre I** de ce mémoire rassemble les données bibliographiques relatives à la vitamine D. Il comprend d'abord un historique de sa découverte, puis la description de son métabolisme, son rôle dans l'organisme et de son transport par la « vitamin D-binding protein ». Par la suite, les principes de base des immunodosages d'haptènes seront présentés, suivis des différentes méthodes de dosage des 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. Puis, les haptènes de la vitamine D ayant déjà permis d'obtenir des anticorps seront décrits en fonction de leur position de couplage. Enfin, les méthodes de synthèse chimique de dérivés de la vitamine D modifiés sur la chaîne latérale seront discutées.

Le **chapitre II** décrit les travaux de synthèse organique de chacun des haptènes dans le but de préparer les immunogènes et les dérivés de la vitamine D qui seront marqués.

Le **chapitre III** présente les résultats obtenus concernant les immunisations des animaux et les tests de leur immunsera qui contiennent des anticorps anti-25-hydroxyvitamine D. Les deux fusions de rats immunisés par le 1<sup>er</sup> immunogène ont permis la sélection de plusieurs hybridomes dont l'un d'eux, le clone 4D5 est un candidat potentiel pour la mise au point du dosage.

Enfin, le **chapitre IV** compare les immunsera des souris immunisées par tous les immunogènes synthétisés pour évaluer si d'autres réponses immunitaires issues des derniers immunogènes sont susceptibles d'être intéressantes pour développer des anticorps monoclonaux de qualité supérieure à ceux décrits dans le chapitre III.

La **conclusion** de ce travail est suivie d'une **partie expérimentale** regroupant les modes opératoires et les données analytiques pour la plupart des composés présentés dans le chapitre II.



---

## **BIBLIOGRAPHIE**

---



# Chapitre I – Bibliographie

## I.1 Vitamine D

Durant la révolution industrielle du XIX<sup>ème</sup> siècle, la concentration de la population dans les grandes villes industrielles peu ensoleillées augmenta considérablement l'incidence des pathologies liées à un défaut de minéralisation des os, telles que le rachitisme.

Dès 1800, l'exposition au soleil mais aussi l'huile de foie de morue furent utilisées pour traiter le rachitisme. Sir Edward Mellanby, en 1919, observa que le rachitisme est dû à une carence d'origine alimentaire, ce qui l'amena à isoler une substance liposoluble à partir de l'huile de foie de poisson.<sup>1</sup> Ce n'est que dans les années 1930 que le facteur antirachitique fut identifié comme étant la vitamine D.

Le terme générique « vitamine D » inclut deux structures découvertes à quelques années d'intervalle et possédant les mêmes activités antirachitiques : la vitamine D<sub>2</sub> et la vitamine D<sub>3</sub>.

La structure de la vitamine D<sub>2</sub> dérive de l'ergostérol présent dans les végétaux et fut élucidée en 1931 par Askew *et al.*<sup>2</sup> (Figure 4)

La synthèse du 7-déhydrocholestérol par Windaus *et al.* en 1936, puis la confirmation que ce dérivé peut être transformé photochimiquement en une substance anti-rachitique, ont abouti à la découverte de la structure de la vitamine D<sub>3</sub>.<sup>3</sup> (Figure 4)

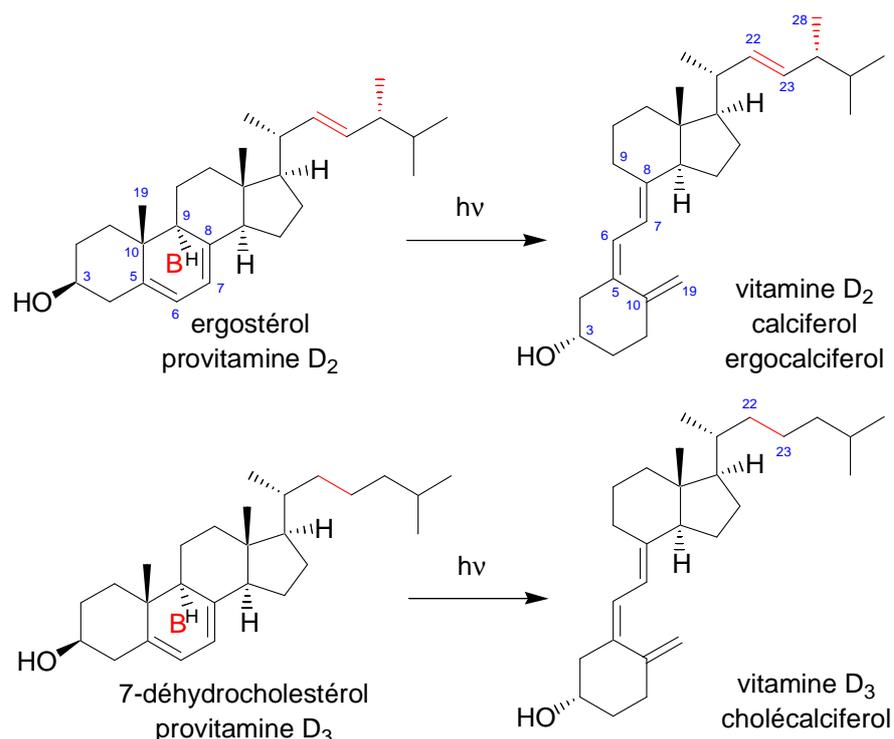


Figure 4 : Photoclivage du cycle B des provitamines D aboutissant aux vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>

Les structures de la vitamine D<sub>2</sub> et de la vitamine D<sub>3</sub> sont apparentées à celle de l'ergostérol (provitamine D<sub>2</sub>) et celle du 7-déhydrocholestérol (provitamine D<sub>3</sub>) dont elles dérivent, à la différence

<sup>1</sup> Mellanby, E. *Lancet* **1919**, *1*, 407-412.

<sup>2</sup> Askew, F. A.; Bourdillon, R. B.; Bruce, H. M.; Jenkins, R. G. C.; Webster, T. A. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1931**, *107*, 76-90.

<sup>3</sup> Windaus, A.; Schenck, F. R.; von Werder, F. *Z. Physiol.* **1936**, *241*, 100-103.

près que le cycle B du stéroïde est ouvert entre les carbones 9 et 10 par action d'un processus photolytique dans la peau, conduisant à un 9,10-secostéroïde.<sup>4</sup> (Figure 4 et Figure 5)

La vitamine D<sub>2</sub> diffère de la vitamine D<sub>3</sub> par la présence d'un groupement méthyle 28(R) supplémentaire porté par le carbone 24 et par la présence d'une double liaison entre les carbones 22 et 23. (Figure 4)

### I.1.1 Métabolisme de la vitamine D

Des expérimentations visant à étudier et à soigner les causes du rachitisme ont montré deux voies distinctes de traitement de la maladie :

- soit par exposition au soleil qui stimule la production par l'organisme de sa propre vitamine D, (endogène),
- soit par des apports alimentaires riches en substance antirachitique, (voie exogène).

#### I.1.1.1 Voie endogène : production photochimique de vitamine D<sub>3</sub>

La peau exposée au soleil et plus précisément à la zone des UV B du spectre (290-315 nm), surtout de mai à septembre dans l'hémisphère nord pour que le rayonnement soit suffisant, entraîne la photoconversion du 7-déhydrocholestérol, contenu en proportions identiques dans l'épiderme et le derme, en prévitamine D<sub>3</sub>. Cette dernière est isomérisée thermiquement, à la température du corps humain (37°C), en vitamine D<sub>3</sub>. Des études *in vitro* ont montré un rapport vitamine D<sub>3</sub> / prévitamine D<sub>3</sub> de 8 / 1 à l'équilibre atteint en 2 à 3 jours.

Cette synthèse endogène cutanée de la vitamine D<sub>3</sub>, sous l'action des ultraviolets, dépend du phototype et de la qualité générale de la peau (moins bonne chez les sujets âgés), mais aussi des possibilités d'exposition solaire.

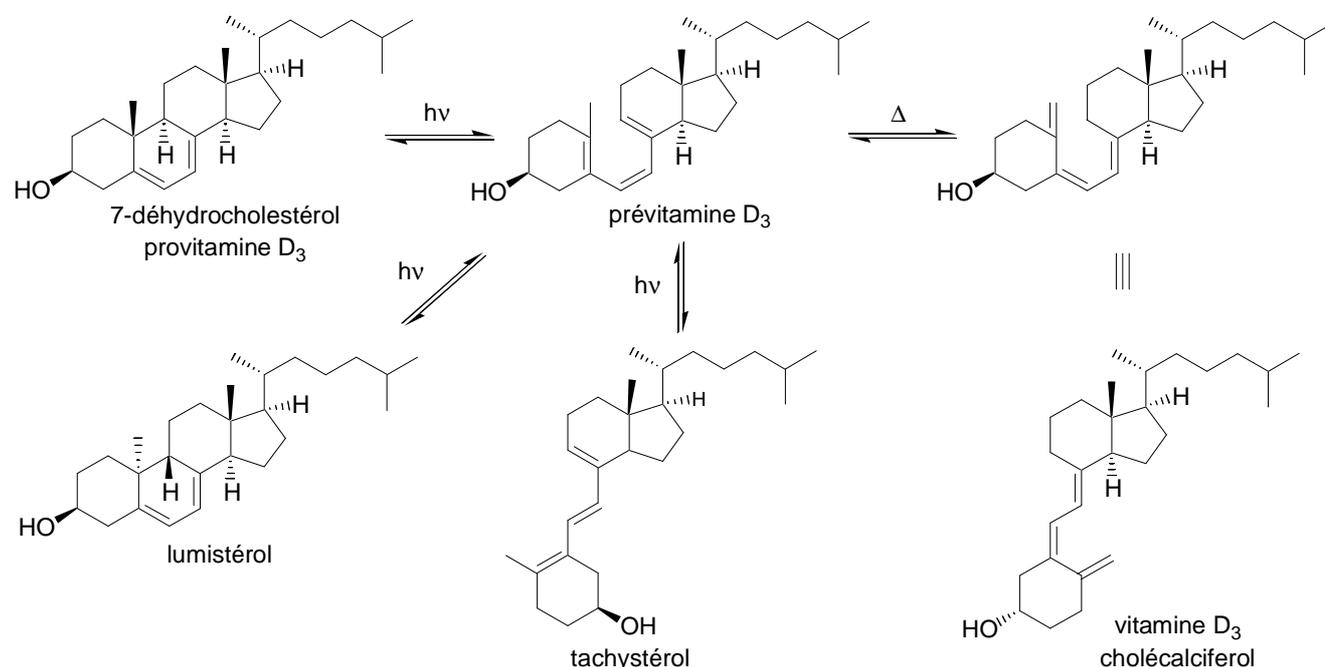


Figure 5 : Production de vitamine D<sub>3</sub> dans la peau par irradiation UV du 7-déhydrocholestérol

<sup>4</sup> Holick, M. F.; Frommer, J. E.; McNeill, S. C.; Richtand, N. M.; Henley, J. W.; Potts, J. T., Jr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *76*, 107-114.

L'organisme est naturellement protégé d'une intoxication par la vitamine D<sub>3</sub> provenant par exemple d'une trop forte dose de rayonnement UV par le fait que la pré-vitamine D<sub>3</sub> formée en excès peut absorber les UV et se convertir en tachystérol et en lumistérol biologiquement inactifs.<sup>5</sup> (Figure 5)  
 Une seule exposition au soleil sur l'ensemble du corps, juste suffisante pour provoquer un érythème, produit 10000 IU (250 µg) de vitamine D<sub>3</sub>. (1 µg = 40 IU)

### 1.1.1.2 Voie exogène : absorption alimentaire des vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>

La vitamine D<sub>2</sub>, d'origine exclusivement végétale et la vitamine D<sub>3</sub> d'origine animale sont les deux principales formes de la vitamine absorbées chez l'homme et chez l'animal, avec un apport journalier recommandé de 400 IU/jour (10 µg/jour) (USA) modulable en fonction de l'exposition au soleil (Figure 6).<sup>6</sup> Les produits alimentaires naturels représentent une source limitée d'apport en vitamine D (huiles de poissons, foie, jaune d'œuf, ...). Dans certains pays, quelques aliments courants tels des produits laitiers, des céréales, ... sont supplémentées en vitamine D pour éviter les carences à l'origine du rachitisme.

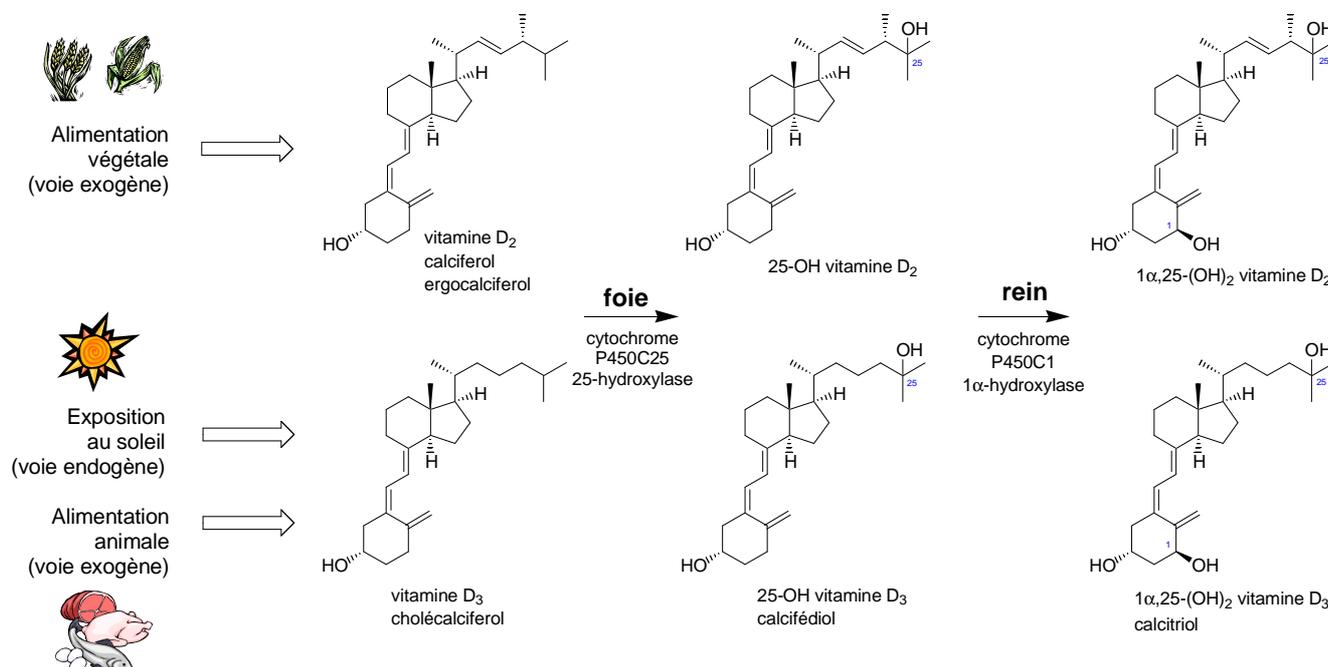


Figure 6 : Sources de vitamine D

La quantité de vitamine D disponible dans l'organisme dépend donc à la fois des sources endogènes (exposition au soleil) et exogènes (apport alimentaire), sachant que les apports exogènes sont généralement insuffisants pour couvrir les besoins de l'organisme.

L'ergocalciférol (vitamine D<sub>2</sub>) et le cholécalciférol (vitamine D<sub>3</sub>) sont classés dans le groupe des vitamines par le fait qu'en l'absence d'exposition au soleil (voie endogène), l'apport alimentaire en vitamine D est indispensable (voie exogène). Par ailleurs, leurs métabolites 1α,25-dihydroxylés, (Figure 6), sont classés parmi les hormones du fait de leurs modes d'action et de leurs implications dans de nombreux mécanismes cellulaires. (voir § 1.1.2 Fonctions de la vitamine D)

<sup>5</sup> Webb, A. R.; DeCosta, B. R.; Holick, M. F. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1989**, *68*, 882-887. Holick, M. F.; MacLaughlin, J. A.; Doppelt, S. H. *Science* **1981**, *211*, 590-593.

<sup>6</sup> Barger-Lux, M. J.; Heaney, R. P. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 4952-4956. Guinot, C.; Malvy, D.; Preziosi, P.; Galan, P.; Chapuy, M.; Maamer, M.; Arnaud, S.; Meunier, P.; Tschachler, E.; Hercberg, S. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2000**, *127*, 1073-1076. Holick, M. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *61*, 638-645.

La vitamine D, très hydrophobe, peut être stockée pendant des mois voire des années dans les tissus adipeux, mais est très peu présente dans la circulation sanguine. En revanche, ses métabolites sont de moins en moins hydrophobes au fur et à mesure de leur hydroxylation. La 25-OH vitamine D est le métabolite circulant majoritaire.

### **1.1.1.3 Concentrations plasmatiques en 25-OH vitamine D et ses métabolites**

La 25-hydroxylation de la vitamine D est un mécanisme physiologiquement peu régulé. La concentration en 25-OH vitamine D augmente en proportion avec celle de vitamine D. C'est pourquoi le taux de 25-OH vitamine D circulante est généralement admis comme un bon indicateur des réserves de vitamine D de l'organisme.

Les taux plasmatiques circulants de 25-OH vitamine D se situent habituellement entre 25 et 100 pmol/mL soit entre 10 et 40 ng/mL (Tableau 1), mais les taux moyens trouvés dans les diverses tranches d'âge d'une population normale varient d'un pays à l'autre. Cela peut s'expliquer par des différences alimentaires (supplémentation vitaminique, régime riche en poissons gras), ainsi que par le degré d'ensoleillement et la durée d'exposition au soleil (latitude, travail en extérieur, ...).

Les taux de 25-OH vitamine D observés chez les sujets carencés sont en général compris entre 0 et 15 pmol/mL (0 et 6 ng/mL). Inversement, des taux supérieurs à 250 pmol/mL (100 ng/mL) ont été constatés en cas d'intoxication alimentaire par la vitamine D.

Dans la population de sujets âgés, les taux sont souvent assez bas (10 à 12,5 pmol/mL), mais restent difficilement interprétables du fait de l'absence d'anomalies cliniquement décelables.

	25-OH D <sub>2</sub> ng/mL	25-OH D <sub>3</sub> ng/mL	24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ng/mL	25,26-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> pg/mL	1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> pg/mL	1,24,25-(OH) <sub>3</sub> D <sub>3</sub> pg/mL
Valeurs usuelles	1-5	5-40	0,2-3,8	56-450	22-59	4-8
Moy.		19	1,6	276	42	6

Tableau 1 : Concentrations sériques moyennes des métabolites de la vitamine D pour un adulte britannique

La vitamine D<sub>3</sub> et ses métabolites circulent à des concentrations plasmatiques très supérieures à celles de la vitamine D<sub>2</sub> et ses métabolites. Ce facteur (de 5 à 8 fois dans le Tableau 1 mais pouvant aller jusqu'à 20 fois) dépend des habitudes alimentaires. Les métabolites de la vitamine D<sub>2</sub> sont par ailleurs difficiles à quantifier de par leurs faibles concentrations.

La demi-vie de la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> dans la circulation sanguine de sujets en bonne santé est d'environ 2 semaines, durée très supérieure à celle de la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (6 à 8 heures). Ces propriétés reflètent le rôle de chacun de ces métabolites :

- vitamine D : réserve,
- 25-OH vitamine D (pré-hormone) : mise à disposition pour l'organisme,
- 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D : hormone, action à très faible concentration.

L'action hormonale de la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D est particulièrement importante dans la régulation de l'homéostasie phosphocalcique et de la division cellulaire.

## I.1.2 Fonctions de la vitamine D

### I.1.2.1 Bioactivation et dégradation

Biologiquement inactive, la vitamine D est activée puis dégradée au travers de l'action de 3 enzymes hydroxylases de type cytochrome P450.

Sa bioactivation passe par l'intervention du cytochrome P450C25 du foie qui hydroxyle le carbone 25 pour conduire à la 25-hydroxyvitamine D, le principal métabolite circulant. Ensuite, l'hydroxylation par le cytochrome P450C1, dans le rein, engendre l'hormone biologiquement active : la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D (calcitriol).<sup>7</sup> (Figure 7)

La 1 $\alpha$ -hydroxylase P450C1 est contrôlée par une stimulation par la PTH et un taux plasmatique trop bas en calcium. Inversement, elle est inhibée par la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D. (Figure 9)

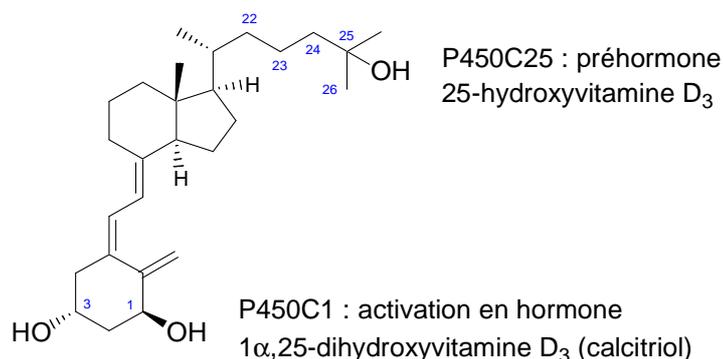


Figure 7 : Sites d'activation de la vitamine D

L'inactivation de la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D s'effectue par hydroxylation et oxydation des carbones 23 et 24 de la chaîne latérale par l'enzyme multifonctionnelle : cytochrome P450C24 pour donner des métabolites hydrosolubles et clivés (acide calcitroïque) qui pourront être éliminés par le rein.<sup>8</sup> (Figure 8)

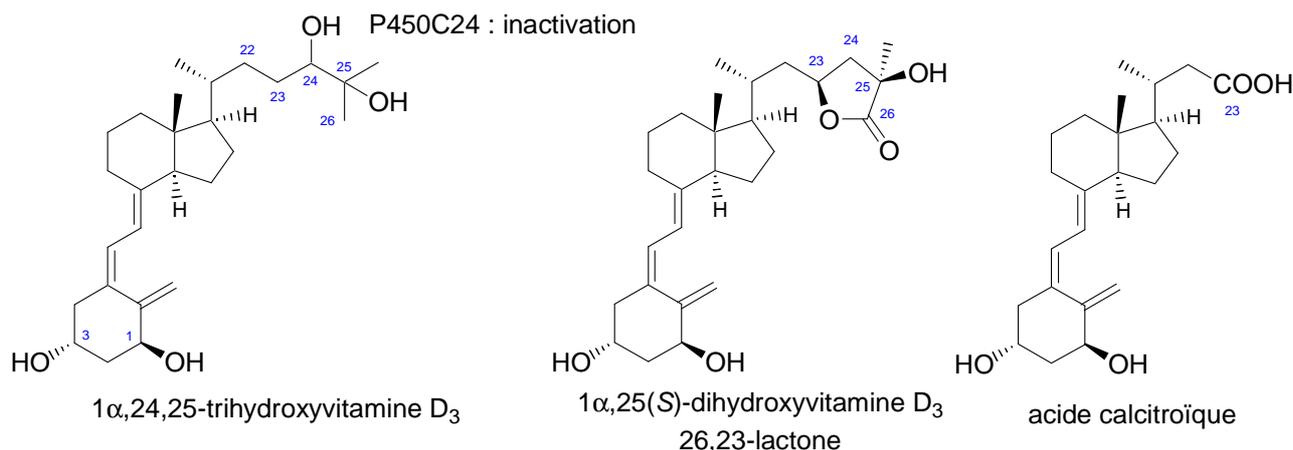


Figure 8 : Inactivation de la vitamine D et catabolites

<sup>7</sup> Kumar, R. *Physiological Reviews* **1984**, 64, 478-504.

<sup>8</sup> Reddy, G. S.; Tserng, K. Y. *Biochemistry* **1989**, 28, 1763-1769. Zimmerman, D. R.; Reinhardt, T. A.; Kremer, R.; Beitz, D. C.; Reddy, G. S.; Horst, R. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 392, 14-22.

Les deux cytochromes P450C1 et P450C24 sont des enzymes fortement régulées dont l'expression est contrôlée en réponse à de nombreux facteurs (Figure 9) comme par exemple :

- l'hormone parathyroïde (PTH) et l'hormone thyroïde calcitonine qui maintiennent l'homéostasie calcique,
- l'interféron gamma,
- le calcium, le phosphore,
- les hormones hypophysaires,
- la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D elle-même.

### 1.1.2.2 Rôle dans l'organisme

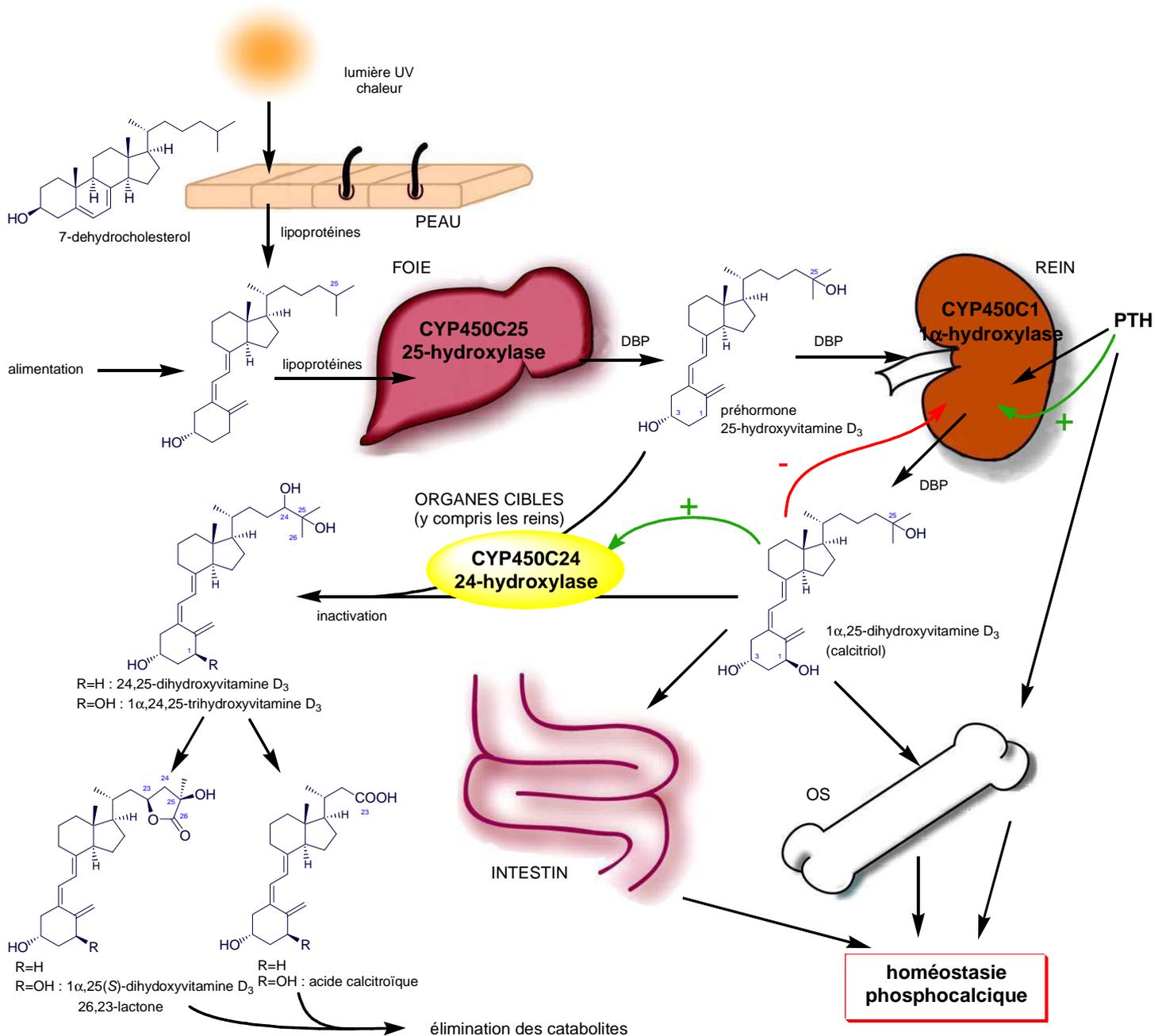


Figure 9 : Métabolisme et fonction homéostatique de la vitamine D dans le système endocrinien

Le rôle de la vitamine D dans l'organisme fait l'objet de beaucoup de recherches. Son mécanisme d'action complexe et ses multiples applications en font un sujet d'étude très vaste.<sup>9</sup>

La vitamine D a pu être localisée dans différents tissus, principalement dans le foie, l'intestin, les reins et les os à l'aide de vitamine D marquée radioactivement.<sup>10</sup>

Les vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> et leurs dérivés 25-hydroxylés n'ont pas d'effet hormonal mais sont les précurseurs de l'hormone 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D qui a été découverte par l'étude des métabolites radioactifs.<sup>11</sup> Ainsi, en plus d'être une vitamine, la vitamine D est aussi une préhormone de type stéroïde.

Après la fixation de l'hormone 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D sur le noyau (caractéristique d'une hormone stéroïde), puis l'activation de la transcription d'ADN et la synthèse d'ARNm, l'action hypercalcémiant peut s'observer à 3 niveaux dans l'organisme (Figure 9) :

- Intestinal : stimulation de l'absorption digestive du calcium et des phosphates.
- Osseux : participation au remodelage osseux en stimulant les ostéoblastes et la formation d'ostéoclastes.
- Rénal : augmentation de la réabsorption tubulaire du calcium et contrôle indirect de celle des phosphates.

L'hormone 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D régule plus de 60 gènes différents associés avec l'homéostasie phosphocalcique,<sup>12</sup> la réponse immunitaire,<sup>13</sup> la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose.<sup>14</sup> Ainsi, elle favorise la minéralisation osseuse en augmentant les concentrations en calcium et phosphates dans les fluides extracellulaires et en inhibant la production d'hormone parathyroïdienne (PTH). La 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D agit sur la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes. Elle favorise aussi les processus d'ostéoinduction et semble être localement impliquée dans la minéralisation de la dentine et de l'émail.<sup>15</sup>

Les recherches de nouveaux dérivés de la vitamine D pour des applications cliniques tendent de plus en plus à dissocier l'activité hypercalcémiant des effets sur la différenciation cellulaire (anti-cancéreux).

## 1.2 Protéine de transport de la vitamine D

La 25-OH vitamine D est transportée dans la circulation sanguine par la « Vitamin D-Binding Protein » (DBP), appelée aussi « group-specific component » (Gc-globulin).

Cette protéine spécifique possède un site de liaison pour les 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. Elle assure leur solubilisation, leur transport ainsi que leur biodisponibilité pour les organes cibles d'une manière

<sup>9</sup> Omdahl, J. L.; Morris, H. A.; May, B. K. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 139-166. Jones, G.; Strugnell, S. A.; DeLuca, H. F. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 1193-1231. Brown, A. J.; Dusso, A.; Slatopolsky, E. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **1999**, *277*, F157-175. Ross, T. K.; Darwish, H. M.; DeLuca, H. F. *Vitam. Horm.* **1994**, *49*, 281-326. Brown, A. J.; Dusso, A.; Slatopolsky, E. In *The Kidney : Physiology and Pathophysiology*; Second Edition ed.; Seldin, D. W., Ed.; Raven Press, Ltd: New York, 1992, p 1505-1552. Bikle, D. D. *Endocr. Rev.* **1992**, *13*, 765-784.

<sup>10</sup> Norman, A. W.; DeLuca, H. F. *Biochemistry* **1963**, *2*, 1160-1168.

<sup>11</sup> Haussler, M. R.; Myrtle, J. F.; Norman, A. W. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 4055-4064. Fraser, D. R.; Kodicek, E. *Nature* **1970**, *228*, 764-766. Lawson, D. E.; Fraser, D. R.; Kodicek, E.; Morris, H. R.; Williams, D. H. *Nature* **1971**, *230*, 228-230. Holick, M. F.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F.; Suda, T.; Cousins, R. J. *Biochemistry* **1971**, *10*, 2799-2804.

<sup>12</sup> DeLuca, H. F. *FASEB J.* **1988**, *2*, 224-236. Walters, M. R. *Endocr. Rev.* **1992**, *13*, 719-764.

<sup>13</sup> Deluca, H. F.; Cantorna, M. T. *FASEB J.* **2001**, *15*, 2579-2585.

<sup>14</sup> Sutton, A. L. M.; MacDonald, P. N. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 777-791. Christakos, S.; Dhawan, P.; Liu, Y.; Peng, X.; Porta, A. J. *Cell. Biochem.* **2003**, *88*, 695-705. Brown, A. J. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1999**, *14*, 11-16. Boland, R. *Endocr. Rev.* **1986**, *7*, 434-448.

<sup>15</sup> Bouillon, R.; Okamura, W. H.; Norman, A. W. *Endocr. Rev.* **1995**, *16*, 200-257. Walters, M. R. *Endocr. Rev.* **1992**, *13*, 719-764.

similaire à la « Sex Hormone-Binding Globulin » (SHBG) pour les androgènes et œstrogènes et la « Corticosterone-Binding Globulin » (CBG) pour les corticostéroïdes.

### I.2.1 Rôle biologique de la DBP

La protéine de transport de la vitamine D (« vitamin D-binding protein », DBP) est une protéine polymorphique sérique (plus de 120 variants détectés chez l'homme) exprimée par le foie à forte concentration plasmatique (400 mg/L ; 4 à 8  $\mu\text{M}$ <sup>16</sup>),<sup>17</sup> et possédant de multiples fonctions. Elle est codée par un gène unique situé sur le chromosome 4. La DBP fait partie de la même famille que l'albumine (ALB) et l' $\alpha$ -fœtoprotéine (AFP) avec lesquelles elle présente une forte homologie de structure primaire. Aucun sujet humain n'a été détecté jusqu'à présent avec absence totale de sécrétion de DBP, ce qui laisse penser qu'un tel individu ne serait pas viable.<sup>17</sup>

La DBP lie le principal métabolite circulant de la vitamine D : la 25-hydroxyvitamine D (calcidiol) et aussi l'hormone biologiquement active : la  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D (calcitriol). La DPB lie les dérivés suivants de la vitamine D par ordre d'affinité décroissant :  $25\text{-(OH)VD}_3 = 24,25\text{-(OH)}_2\text{VD}_3 = 25,26\text{-(OH)}_2\text{VD}_3 > 1,25\text{-(OH)}_2\text{VD}_3 >$  vitamine  $\text{D}_3$ . Ainsi les métabolites 24, 25, et 26 hydroxylés sont mieux reconnus par la DBP que l'hormone. Mais c'est la vitamine  $\text{D}_3$  qui a le moins d'affinité. La DBP humaine reconnaît la vitamine  $\text{D}_2$  de la même manière que la vitamine  $\text{D}_3$ , ce qui n'est pas le cas de la DBP aviaire.

L'une des fonctions principales de la DBP est de lier, solubiliser et transporter les 25-hydroxyvitamines  $\text{D}_2$  et  $\text{D}_3$  vers les organes cibles et les récepteurs tissulaires qui contrôlent la calcémie. La DBP a aussi été présumée avoir un rôle de réserve pour une distribution rapide de l'hormone aux tissus.<sup>17</sup>

Des souris « knockout » du gène de la DBP ont montré que celle-ci protège d'une carence alimentaire en vitamine D en augmentant sa demi-vie dans l'organisme. Les concentrations plasmatiques de 25-hydroxyvitamine D et  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D de ces souris sont en effet plus faibles que pour des souris normales. Mais, inversement, une intoxication par la vitamine D ne provoque pas d'hypercalcémie chez ces souris.<sup>18</sup>

La DBP circule dans le plasma à des concentrations 20 fois supérieures à la concentration de l'ensemble des métabolites de la vitamine D. Ce large excès, inhabituel pour une protéine de transport d'hormones ou de vitamines, peut s'expliquer par les autres fonctions de la DBP. En particulier, la DBP a une forte affinité avec l'actine monomérique pour laquelle elle possède un site de liaison.

Dans des conditions physiologiques normales, une grande partie des métabolites de la vitamine D circule sous forme liée à la DBP : la DBP lie 88% de 25-hydroxyvitamine D avec une forte constante d'affinité ( $K_a = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) et 85% de la  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D avec une constante d'affinité 10 fois plus faible ( $K_a = 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ). Ainsi, seulement 0,40% des métabolites de vitamine D sont sous forme libre. Le reste, non lié à la DBP et non libre, est lié à d'autres protéines sériques telles l'albumine et les lipoprotéines.

### I.2.2 Structure de la DBP

La DBP est principalement sécrétée par le foie<sup>19</sup> sous forme d'une glycoprotéine monomérique d'approximativement 58 kDa comprenant 458 acides aminés, dont 28 cystéines, toutes formant des

<sup>16</sup> Hillman, L. S.; Haddad, J. G. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1983**, *56*, 189-191.

<sup>17</sup> Cooke, N. E.; Haddad, J. G. *Endocr. Rev.* **1989**, *10*, 294-307.

<sup>18</sup> Safadi, F. F.; Thornton, P.; Magiera, H.; Hollis, B. W.; Gentile, M.; Haddad, J. G.; Liebhaber, S. A.; Cooke, N. E. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 239-251.

<sup>19</sup> McLeod, J. F.; Cooke, N. E. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21760-21769.

ponts disulfures.<sup>20</sup> Elle est constituée de trois domaines indépendants de structures similaires : 1-191, 192-378 et 379-458, comme les autres protéines de cette famille. (Figure 10)

La DPB et les autres membres de cette famille pourraient avoir évolué à partir de la triplication d'un gène ancestral constitué d'une séquence de 192 acides aminés formant 10 hélices  $\alpha$ . Dans la DBP, le 1<sup>er</sup> de ces trois domaines est relativement bien préservé. Par contre, dans le 2<sup>ème</sup> domaine, l'hélice 7 est remplacée par une structure inorganisée alors que le 3<sup>ème</sup> domaine est tronqué dans sa partie C-terminale et contient seulement les hélices 1 à 4.

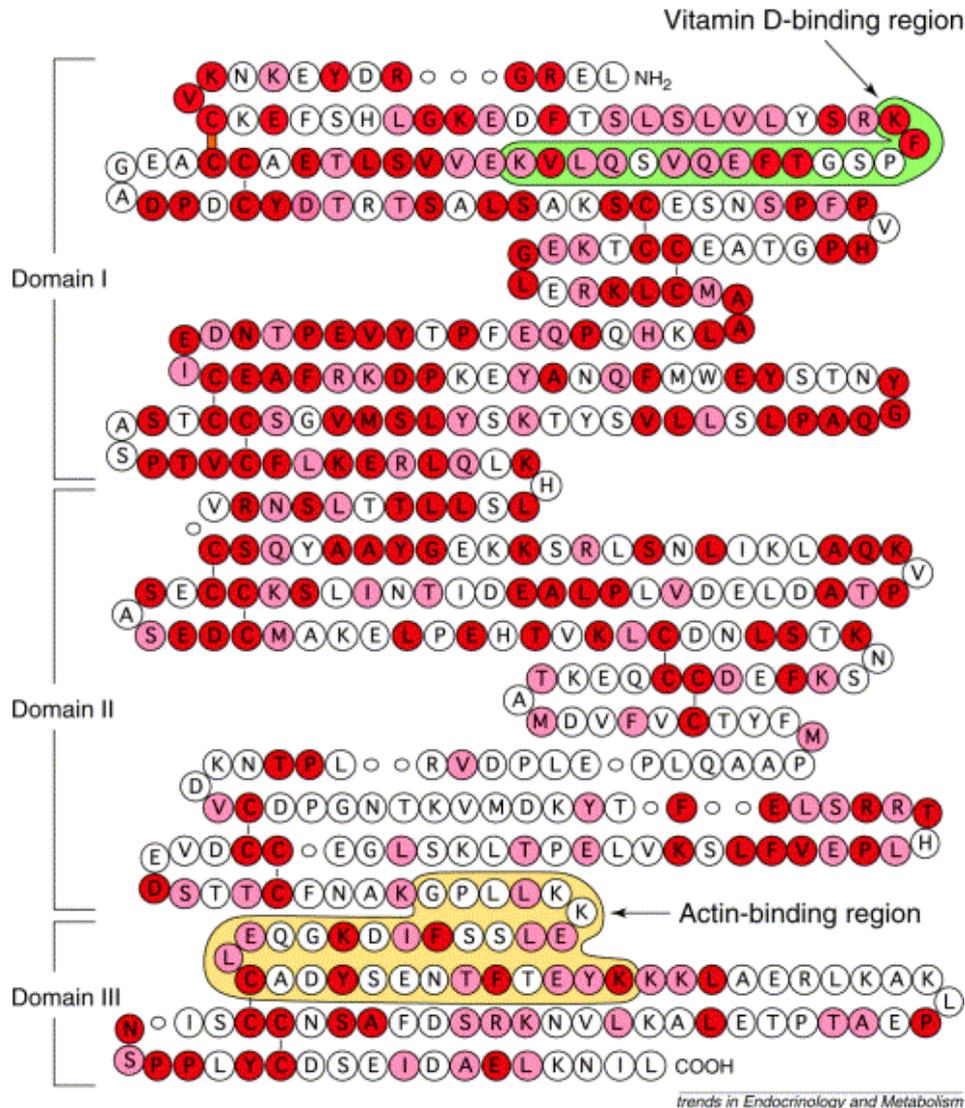


Figure 10 : Séquence d'acides aminés et structure secondaire présumée de la DBP humaine<sup>20</sup>

petit cercle «o» : acides aminés absents dans la DBP et présents dans l'albumine (ALB) et la  $\alpha$ -foetoprotéine (AFP), pont disulfure orange entre les cystéines 13 et 59 absent dans l'ALB et l'AFP, qui forme une boucle contenant le site de liaison en vert de la vitamine D, site de liaison de l'actine en jaune, les acides aminés conservés en rouges entre les DPB des 6 espèces (humaine, lapin, rat, souris, tortue et poulet) ou homologues en rose.

Deux sites de liaison ont été trouvés sur la DBP, l'un pour la vitamine D se situant dans le domaine I entre les hélices 2, 3 et 4 principalement (Figure 11), l'autre pour l'actine se situant dans le domaine III entre les résidus 373 et 403.<sup>20</sup>

<sup>20</sup> White, P.; Cooke, N. *Trends Endocrinol. Metab.* **2000**, *11*, 320-327.

L'étude du site de liaison de la 25-hydroxyvitamine D à DBP a fait l'objet de nombreux marquages d'affinité à l'aide de photomarqueurs ou de chimiomarqueurs de la vitamine D fonctionnalisés dans diverses positions (1,<sup>21a</sup> 3,<sup>21a,b,d</sup> 6,<sup>21c,d</sup> 11,<sup>21d</sup> 19<sup>21e,d</sup>)

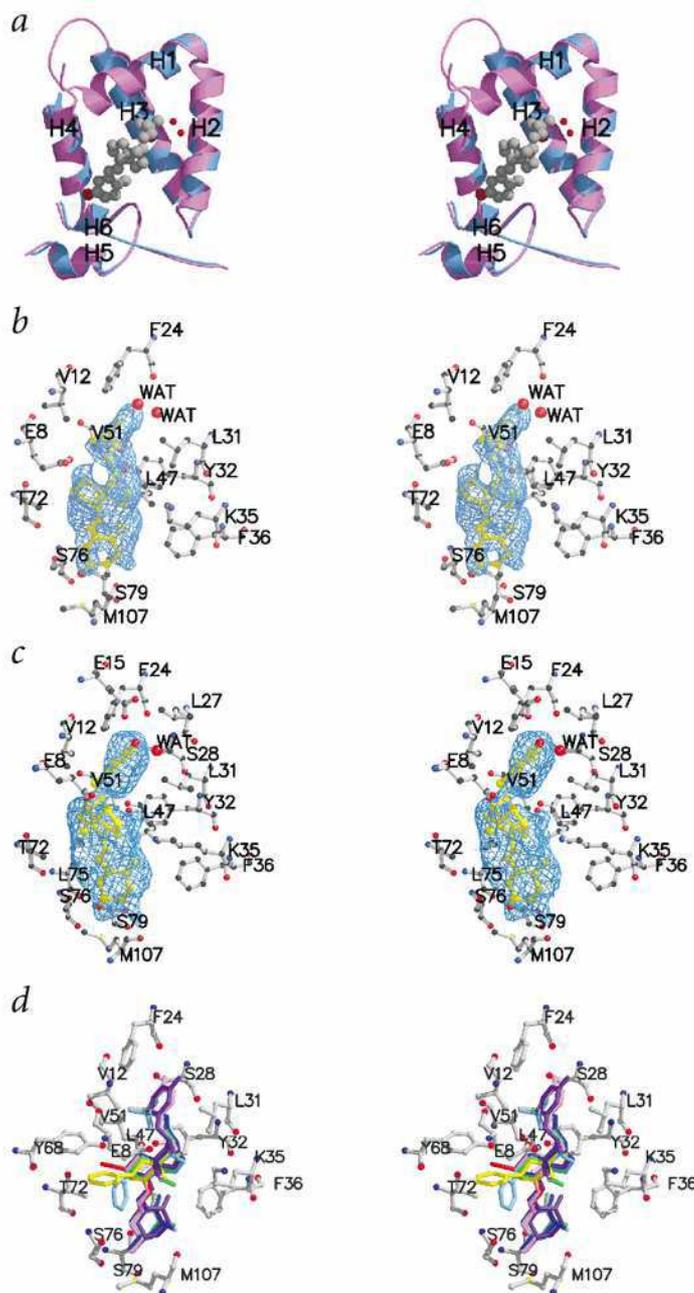


Figure 11 : Vue stéréo du site de liaison de la vitamine D sur une partie du domaine I de la DBP<sup>22</sup>

<sup>21a</sup> Swamy, N.; Dutta, A.; Ray, R. *Biochemistry* **1997**, *36*, 7432-7436.

<sup>21b</sup> Haddad, J. G.; Hu, Y. Z.; Kowalski, M. A.; Laramore, C.; Ray, K.; Robzyk, P.; Cooke, N. E. *Biochemistry* **1992**, *31*, 7174-7181.  
Kutner, A.; Link, R. P.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. *Bioorg. Chem.* **1986**, *14*, 134-147. Link, R. P.; Kutner, A.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. *Biochemistry* **1987**, *26*, 3957-3964. Ray, R.; Bouillon, R.; Van Baelen, H.; Holick, M. F. *Biochemistry* **1991**, *30*, 7638-7642. Ray, R.; Bouillon, R.; Van Baelen, H.; Holick, M. F. *Biochemistry* **1991**, *30*, 4809-4813. Ray, R.; Holick, S. A.; Hanafin, N.; Holick, M. F. *Biochemistry* **1986**, *25*, 4729-4733. Swamy, N.; Ray, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *333*, 139-144. Swamy, N.; Ray, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *319*, 504-507.

<sup>21c</sup> Addo, J. K.; Swamy, N.; Ray, R. *Steroids* **1999**, *64*, 273-282.

<sup>21d</sup> Swamy, N.; Addo, J.; Vskokovic, M. R.; Ray, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *373*, 471-478.

<sup>21e</sup> Addo, J. K.; Ray, R. *Steroids* **1998**, *63*, 218-223.

A l'inverse du site de liaison de la  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D au récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR), qui est enfoui dans une cavité, le site de liaison de la vitamine D à la DBP est situé en surface comme cela a été montré récemment par les travaux de cristallisation et d'analyse par rayons X.<sup>22</sup> Les acides aminés constituant le site de liaison contiennent principalement des résidus hydrophobes, compatibles avec l'hydrophobicité des ligands vitamine D. La  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D est susceptible de former les mêmes liaisons hydrogène que la 25-hydroxyvitamine D mais l'encombrement stérique de l'hydroxyle axial  $1\alpha$  en face de la Met 107 peut expliquer la plus faible affinité de l'hormone pour la DBP. Il semble aussi que la conformation du cycle A de la  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D dans le site de la DBP et dans le site du VDR soit différente : l'hydroxyle 3 est équatorial dans le site de la DBP (hydroxyle  $1\alpha$  axial, chaise A) et l'hydroxyle 3 est axial dans le site du VDR (hydroxyle  $1\alpha$  équatorial, chaise B). Par ailleurs, l'angle de torsion C5-C6-C7-C8 a une valeur de  $149^\circ$  pour la DBP et de  $-149^\circ$  pour le VDR, tandis que les angles de torsion responsables de l'orientation de la chaîne latérale diffèrent aussi pour les deux types de sites (angle C13-C17-C20-C22 de  $-77^\circ$  pour la DBP et de  $89^\circ$  pour le VDR ; angle C17-C20-C22-C23 de  $-70^\circ$  pour la DBP et de  $-156^\circ$  pour le VDR). L'orientation de la  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D dans la DBP et dans le VDR diffère donc essentiellement par la conformation du cycle A (hydroxyle 3 équatorial ou axiale) et de la chaîne latérale.

### 1.3 Généralités sur les immunodosages des stéroïdes

Les immunodosages correspondent à l'ensemble des méthodes analytiques quantitatives mettant en jeu la réaction antigène-anticorps. La plupart d'entre eux utilisent un troisième élément, le marqueur (radioélément, enzyme, luminophore).

Les stéroïdes sont des petites molécules hormonales, présentes dans les fluides biologiques sous plusieurs formes :

- libres
- conjugués à des protéines
- liés aux protéines avec différentes affinités (p. ex.. serum albumine (SA)) ou protéines plasmatiques de transport spécifiques

La quantification est effectuée par déplacement par l'analyte d'une quantité fixe d'un traceur, de structure identique ou très proche de l'analyte, marqué par un radioélément, une enzyme ou un luminophore.

#### 1.3.1 Obtention d'anticorps

Le faible poids moléculaire des stéroïdes engendre un certain nombre de particularités propres aux immunodosages stéroïdiens.

Les molécules de faible poids moléculaire ( $MM < 1000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) étrangères à un organisme ne sont pas reconnues par les lymphocytes B. De plus, beaucoup de stéroïdes font partie du soi. Il n'est donc pas possible, d'obtenir par immunisation directe des anticorps contre des petites molécules (haptènes) telles que les stéroïdes. Il faut donc, dans un premier temps, les coupler de manière covalente à des molécules immunogéniques de haut poids moléculaire comme des protéines (albumine bovine BSA, ovalbumine OVA, thyroglobuline TG, hémocyanine, polylysine, ...) puis, dans un deuxième temps, immuniser un animal (rat, souris, lapin, mouton, chèvre, ...) d'une autre espèce que celle à laquelle

<sup>22</sup> Verboven, C.; Rabijns, A.; De Maeyer, M.; Van Baelen, H.; Bouillon, R.; De Ranter, C. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 131-136. Swamy, N.; Head, J. F.; Weitz, D.; Ray, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 14-23. Head, J. F.; Swamy, N.; Ray, R. *Biochemistry* **2002**, *41*, 9015-9020.

correspond la protéine employée. Ce procédé permet de produire des anticorps dirigés contre la protéine inconnue et contre l'haptène couplé dessus.

La spécificité des anticorps anti-stéroïdes est directement liée à la structure de l'immunogène injecté à l'animal et plus particulièrement à la position et la structure du chaînon de couplage introduit par synthèse sur le squelette du stéroïde.

Les immunisations de gros animaux (lapin, mouton, chèvre, ...) permettent des prélèvements conséquents d'antisera qui fournissent généralement suffisamment d'anticorps polyclonaux pour les utilisations ultérieures. Ces anticorps sont issus de plusieurs clones de lymphocytes qui chacun sécrète un anticorps (monoclonal) dirigé contre un épitope de l'immunogène.

A l'inverse, chez le rat et la souris, les prélèvements sanguins et donc d'immunsera sont trop faibles pour une exploitation à grande échelle de leur anticorps polyclonaux. En revanche, il est possible d'immortaliser les lymphocytes B, sécréteurs d'anticorps, localisés dans leur rate en fusionnant les cellules spléniques avec un myélome. Chaque hybridome ainsi obtenu conserve la capacité de sécréter un anticorps monoclonal tout en se multipliant à l'infini.

### I.3.2 Techniques de couplage

Pour qu'un haptène puisse être couplé de manière covalente à une macromolécule porteuse, il doit posséder un ou plusieurs groupements fonctionnels complémentaires de ceux présents sur cette structure. S'il n'en possède pas, il est nécessaire d'en rajouter par le biais de la synthèse organique.

Les macromolécules porteuses les plus utilisés sont des protéines comme l'albumine bovine, facile à obtenir, ou la thyroglobuline, très immunogénique. En pratique, le schéma général d'obtention d'un immunogène comporte donc deux étapes :

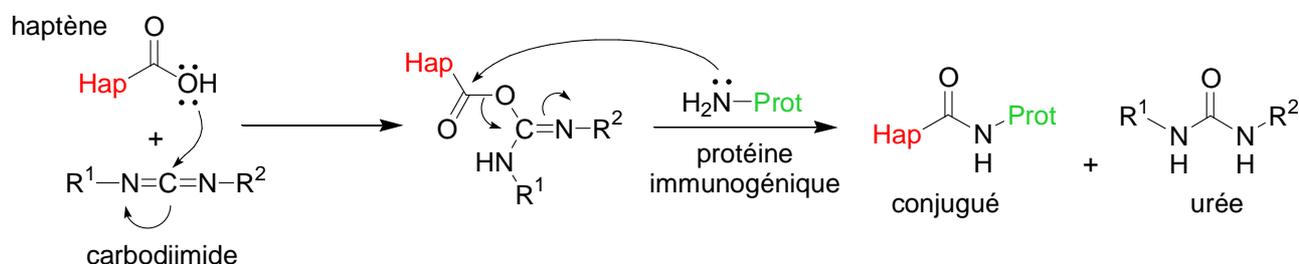
- synthèse d'un dérivé de l'haptène,
- fixation covalente de ce dérivé à la protéine porteuse à l'aide d'un agent de couplage.

Ce couplage s'effectue le plus souvent par formation d'une liaison peptidique entre un groupement carboxyle de l'haptène et une fonction amine de la protéine. Mais d'autres types de liaisons peuvent être utilisées.

Le procédé de formation d'un dérivé de l'haptène dépend de la structure chimique de ce dernier. Il est donc très variable.

#### I.3.2.1 Couplage au moyen de carbodiimides

La réaction générale de couplage est la suivante :

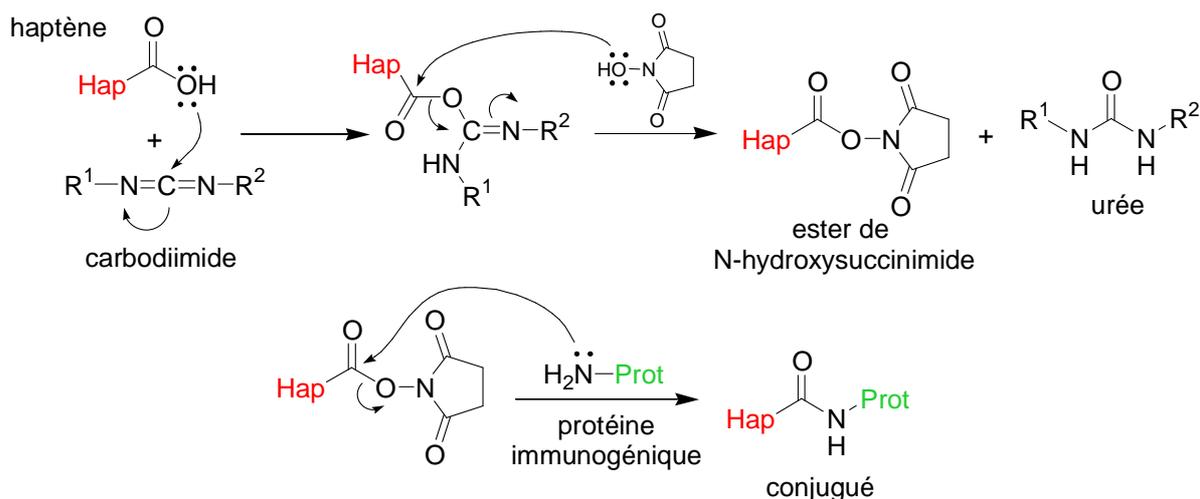


Les carbodiimides solubles dans l'eau les plus utilisées sont le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDCI) et le metho-*p*-toluènesulfonate de 1-cyclohexyl-3-(2-morpholino-éthyl)carbodiimide (CMC). L'excès de réactif est éliminé par dialyse. Cette méthode est très employée pour coupler des petits peptides, des hormones, des médicaments, de l'AMP cyclique...

### 1.3.2.2 Couplage au moyen d'ester de N-hydroxysuccinimide

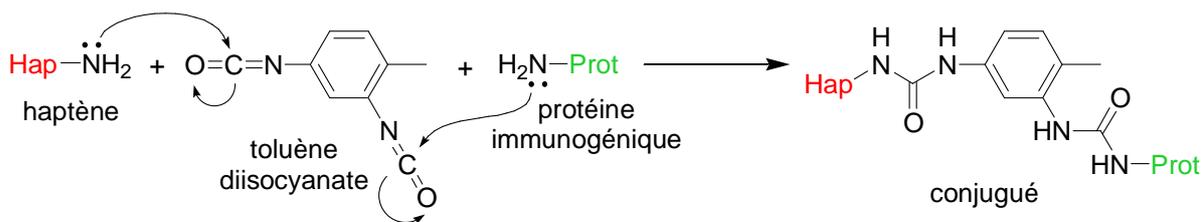
La fonction acide carboxylique de l'haptène est condensée avec le N-hydroxysuccinimide par l'intermédiaire de la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour donner un ester activé plus stable que celui de la précédente technique de couplage :

- il ne réagit pas sur les hydroxyles,
- il ne s'hydrolyse pas rapidement,
- il peut être purifié avant le couplage,
- il réagit spécifiquement sur les amines primaires peu encombrées telles que les  $\epsilon$ -amines de lysines.



### 1.3.2.3 Couplage au moyen de diisocyanate

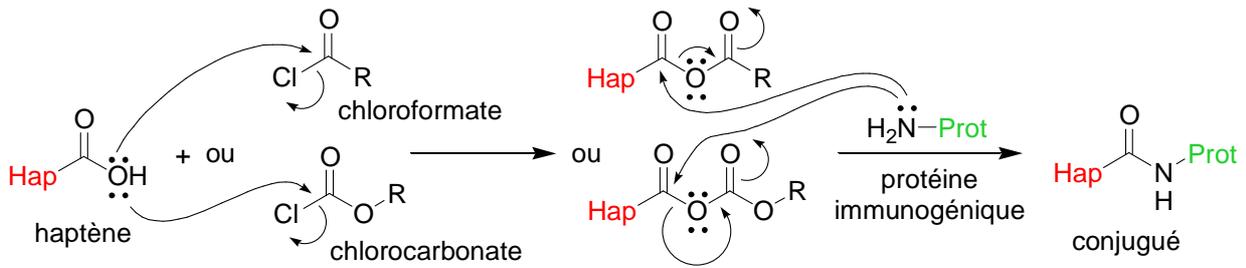
Le plus commun, le toluène 2,4-diisocyanate, permet de lier deux fonctions amines de deux molécules différentes. Le schéma de la réaction est le suivant :



Il est possible de réaliser cette réaction en deux temps : l'haptène réagit avec un excès de diisocyanate, puis après élimination de l'excès de réactif, le mono-isocyanate formé est mélangé avec la protéine. Cette méthode s'applique surtout au couplage des peptides.

### 1.3.2.4 Couplage au moyen d'anhydride mixte

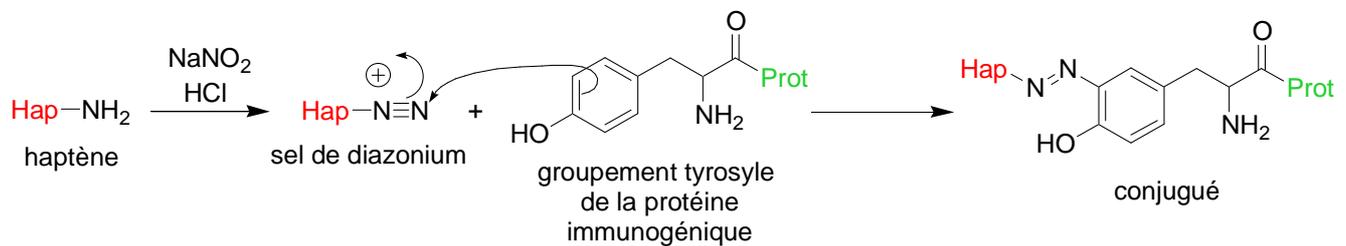
Un anhydride mixte peut être obtenu par exemple entre un dérivé hémisuccinate d'haptène et un dérivé chlorocarbonate ou chloroformate. Cet anhydride, stable en milieu non aqueux et à basse température, réagit ensuite avec une fonction amine de la protéine. Le schéma de la réaction est le suivant :



Cette méthode sert à préparer des conjugués de l'albumine avec des vitamines, des médicaments, des hormones...

### 1.3.2.5 Couplage au moyen d'un sel de diazonium

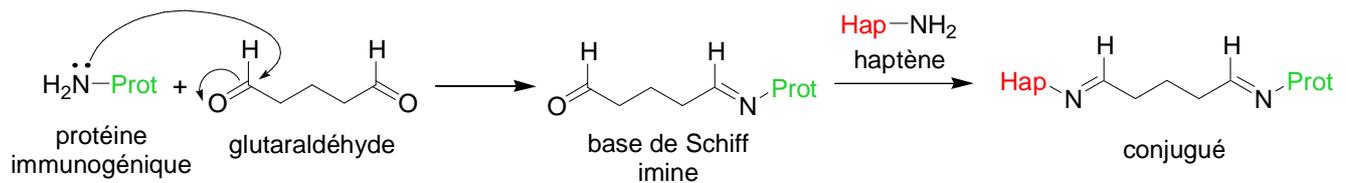
La réaction est schématisée ci-dessous :



Un sel de diazonium de l'haptène à fonction amine est réalisé par action du nitrite de sodium en milieu acide et à basse température. Ce sel est alors condensé sur les groupes phénoliques des tyrosines de la protéine.

### 1.3.2.6 Couplage au moyen du glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde est une molécule bifonctionnelle qui permet de coupler entre elles deux fonctions amine primaire. Le glutaraldéhyde est aussi très utilisé dans le couplage des enzymes aux protéines.



Toutes ces méthodes permettent de résoudre la plupart des problèmes de couplage.

## 1.3.3 Immunodosages

Il existe de nombreuses méthodes d'immunodosages, qui peuvent être regroupées en deux catégories (Figure 12) :

- Les méthodes dites « en défaut d'anticorps » ou méthode par compétition entre l'analyte et un traceur,
- Les méthodes dites « en excès d'anticorps » dont fait partie la méthode sandwich qui utilise la complémentarité de fixation de deux anticorps sur une même molécule d'analyte.

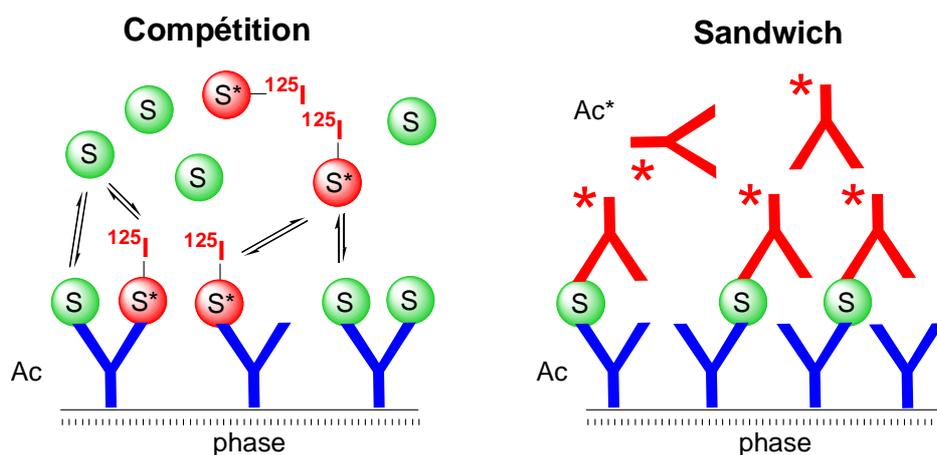
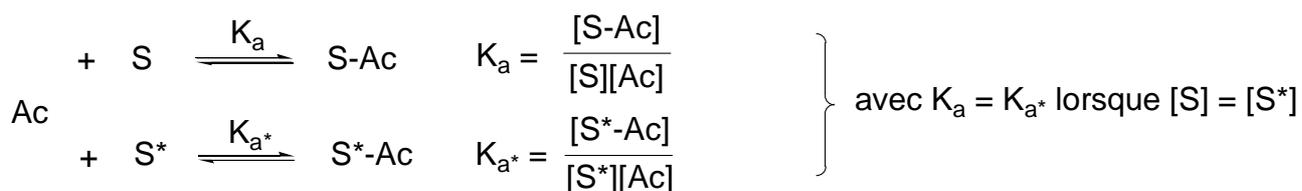


Figure 12 : Schéma réactionnel d'une compétition et d'un sandwich

Pour les haptènes, trop petits pour l'utilisation de méthodes sandwich avec deux anticorps, la méthode usuelle est le dosage par compétition.

L'analyte à doser (S), l'analyte préalablement marqué ( $S^*$  : traceur) ainsi que l'anticorps spécifique de cet analyte (Ac) sont mis en présence dans un tube. Si la concentration en anticorps est limitante, c'est-à-dire lorsqu'elle est inférieure à la concentration en analyte marqué, il se produit une compétition entre le stéroïde de l'échantillon et le stéroïde marqué vis-à-vis des sites de l'anticorps. Il se forme deux complexes : S-Ac et  $S^*$ -Ac selon les réactions suivantes :

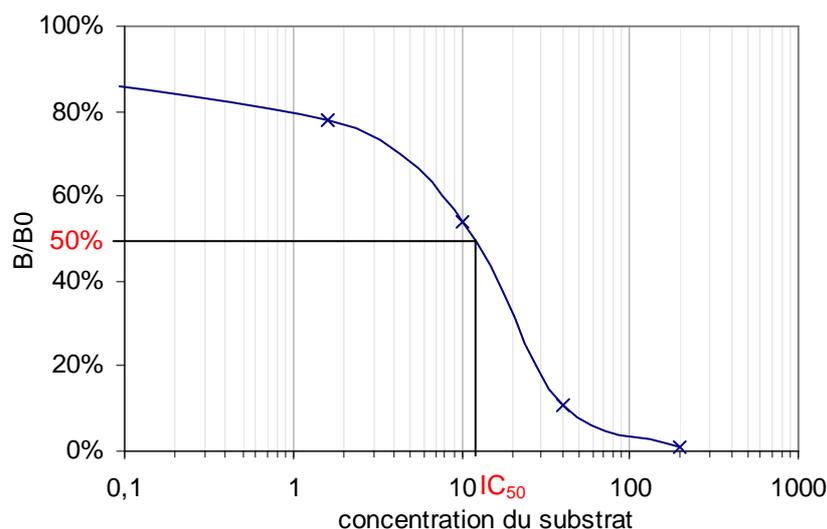


L'égalité des constantes d'équilibre n'est vraie que dans le cas d'un traceur de même structure que l'analyte, c'est-à-dire constitué de radioéléments tels que le tritium ou le carbone(14). Dans le cas de traceurs iodé(125) ou enzymatiques, la modification de taille, de polarité et de structure induit des différences de constantes d'équilibre. Il faut alors adapter la structure du chaînon pour obtenir une reconnaissance aussi proche que possible de celle de l'analyte et éviter une reconnaissance trop faible ou trop forte du traceur.

La détection de la radioactivité  $\gamma$  de l'iode(125) par rapport à la radioactivité  $\beta$  du tritium permet, en plus du gain en sensibilité lié à l'activité spécifique élevée de l'iode(125), une plus grande facilité de détection et de préparation du traceur.

Si les concentrations en anticorps et en analyte marqué sont connues et maintenues constantes, toute augmentation de la concentration d'analyte à doser entraînera une augmentation de la concentration du complexe S-Ac, diminuant ainsi la proportion d'analyte marqué lié à l'anticorps ( $S^*$ -Ac). Il est alors possible de déterminer grâce au signal délivré par le marqueur, soit la concentration d'analyte marqué libre, soit la concentration d'analyte marqué lié à l'anticorps. Ceci peut être réalisé si l'on dispose d'une méthode de séparation entre la fraction libre et la fraction d'analyte complexé sans modifier l'équilibre de la réaction.

En utilisant une gamme de concentrations connues d'analyte (concentrations standards), il est possible d'établir une courbe d'étalonnage dans laquelle le signal mesuré à partir du marqueur lié aux anticorps est inversement proportionnel à la concentration d'analyte à doser. (Graphique 1)



Graphique 1 : Exemple de courbe d'étalonnage et  $IC_{50}$

Les méthodes de dosage direct par compétition nécessitent que plusieurs conditions soient réunies :

- Un nombre constant de sites anticorps pour avoir une bonne reproductibilité. Ainsi, la quantité d'anticorps introduite ou la qualité du « coating » de ces anticorps sur les tubes doit être constante,
- Une constante d'affinité élevée pour permettre une limite de détection très basse,
- Une spécificité élevée permettant des dosages directs à partir des fluides biologiques, sans extraction des échantillons ni séparation chromatographique. En effet, il est nécessaire que l'anticorps soit capable de discriminer l'analyte des autres métabolites ou molécules de structures proches. Les réactions croisées donnent un aperçu des interférences possibles.

## **1.4 Méthodes de dosage de la vitamine D**

Dans un article, Porteous *et al.* dressent la liste des méthodes de dosage de la vitamine D et de ses métabolites jusqu'à 1987.<sup>23</sup> Un article plus récent passe en revue les techniques et troussees existantes.<sup>24</sup>

Les vitamines  $D_2$  et  $D_3$  ne sont pas de bons indicateurs. De par leur forte hydrophobicité, leur distribution dans l'organisme est assez inégale, elles se retrouvent principalement dans les tissus adipeux et peu dans la circulation sanguine.<sup>25</sup>

Les autres fluides biologiques ne contiennent pas de vitamine D ou seulement les catabolites. En effet, la 25-OH vitamine D n'a pas été détectée dans la salive<sup>26</sup> tandis que l'urine n'est censée contenir que les métabolites hydrosolubles de la vitamine D, dont l'acide calcitroïque.

Il est donc plus intéressant de doser les deux 25-hydroxyvitamines  $D_2$  et  $D_3$  connues pour être un bon indicateur de la totalité de la vitamine D disponible dans l'organisme.<sup>27</sup> Le dosage de la 25-OH vitamine D est effectué exclusivement dans le plasma ou le serum.

<sup>23</sup> Porteous, C. E.; Coldwell, R. D.; Trafford, D. J.; Makin, H. L. *Journal of Steroid Biochemistry* **1987**, *28*, 785-801. Seemark, D. A.; Trafford, D. J.; Makin, H. L. *Journal of Steroid Biochemistry* **1981**, *14*, 111-123.

<sup>24</sup> Pernod, J.; Rousseau-Tsangaris, M.; Dubois, D.; Caillot, A. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* **1994**, *9*, 308-312.

<sup>25</sup> Clemens, T. L.; Adams, J. S.; Nolan, J. M.; Holick, M. F. *Clin. Chim. Acta* **1982**, *121*, 301-308.

<sup>26</sup> Trafford, D. J.; Makin, H. L. *Clinica Chimica Acta* **1983**, *129*, 19-25.

<sup>27</sup> Haddad, J. G.; Stamp, T. C. B. *Am. J. Med.* **1974**, *57*, 57-62.

### 1.4.1 Chromatographie liquide haute pression

D'anciennes méthodes de détermination de la concentration sérique en 25-OH vitamine D existent.<sup>28</sup> La méthode par chromatographie liquide haute pression (CLHP) de ImmunoDiagnostik (ref. KC 3400) permet de doser un seul échantillon à la fois avec un délai d'injection de 20 mn sur la colonne CLHP de silice « phase normale » en isocratique.

L'échantillon de 0,5 mL de serum est précipité à l'acétonitrile, extrait sur une cartouche C18, évaporé sous azote, puis injecté en CLHP. La limite de détection à 264 nm est de 4 pmol/mL (1,6 ng/mL) et la réponse est linéaire jusqu'à 1250 pmol/mL (500 ng/mL). Cette méthode est longue et consommatrice en serum, mais a l'avantage d'être linéaire sur une gamme très large de concentrations.

### 1.4.2 Déplacement DBP-traceur

La simplification des méthodes de dosage de la vitamine D<sub>3</sub> dans le plasma a commencé avec l'emploi d'une DBP d'origine animale pour la quantification de la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> par compétition avec le traceur tritié [26,27-methyl-<sup>3</sup>H]-25-OH vitamine D<sub>3</sub>. La DBP reconnaît sans distinction les deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> et lie correctement les métabolites hydroxylés de la chaîne latérale. En revanche, l'hormone 1 $\alpha$ -hydroxylée est moins bien reconnue. Ces caractéristiques reflètent la fonction de la DBP (voir § I.2.1).

Les dosages directs des sera par compétition sur la DBP avaient la fâcheuse tendance à surestimer de l'ordre de 20% la quantité de 25-OH vitamine D dans les échantillons de serum par rapport aux méthodes par extraction, à cause des liaisons non-spécifiques sur la DBP.<sup>29</sup>

Ainsi, l'extraction des composés hydrophobes par un mélange de méthanol et de chloroforme (2:1, v/v),<sup>30</sup> suivie d'une prépurification mettant en œuvre des séparations chromatographiques par Lipidex-5000 et CLHP améliorent l'exactitude des résultats.

Ce type de méthode de détermination de la concentration sérique en vitamine D est long et fastidieux et nécessite de grandes quantités de serum. De plus ses performances sont limitées du fait des nombreuses interférences liées au manque de spécificité de la DBP qui croise avec les substances hydrophobes contenues dans les échantillons de serum.<sup>31</sup>

Des améliorations à cette méthode de dosage ont été apportées par Hollis *et al.*<sup>32</sup> et Lambert *et al.*<sup>33</sup> qui diminuent les interférences et la quantité de serum nécessaire qui passe de 5 mL à 250  $\mu$ L :

<sup>28</sup> Jones, G.; DeLuca, H. F. *Monogr. Endocrinol* **1988**, *30*, 95-139. Eisman, J. A.; Shepard, R. M.; DeLuca, H. F. *Anal. Biochem.* **1977**, *80*, 298-305. Horst, R. L.; Littledike, E. T.; Riley, J. L.; Napoli, J. L. *Anal. Biochem.* **1981**, *116*, 189-203. Hollis, B. W.; Franck, N. E. *J. Chromatogr.* **1985**, *343*, 43-49. Mawer, E. B.; Hann, J. T. *Journal of Chromatography* **1987**, *415*, 305-316.

<sup>29</sup> Bouillon, R.; Van Herck, E.; Jans, I.; Tan, B. K.; Van Baelen, H.; De Moor, P. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1984**, *30*, 1731-1736. Belsey, R. E.; DeLuca, H. F.; Potts, J. T. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1974**, *38*, 1046-1051. Offermann, G.; Dittmar, F. *Horm. Metab. Res.* **1974**, *6*, 534. Garcia-Pascual, B.; Peytremann, A.; Courvoisier, B.; Lawson, D. E. *Clinica Chimica Acta* **1976**, *68*, 99-105.

<sup>30</sup> Bligh, E. G.; Dyer, W. J. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911.

<sup>31</sup> Belsey, R. E.; DeLuca, H. F.; Potts, J. T. *J. Endocrinol. Metab.* **1971**, *33*, 554. Horst, R. L.; Reinhardt, T. A.; Beitz, D. C.; Littledike, E. T. *Steroids* **1981**, *37*, 581-591.

<sup>32</sup> Hollis, B. W.; Roos, B. A.; Lambert, P. W. *Steroids* **1981**, *37*, 609-620.

<sup>33</sup> Lambert, P. W.; Syverson, B. W.; Arnaud, C. D.; Spelsberg, T. C. *Journal of Steroid Biochemistry* **1977**, *8*, 929.

- l'extraction de la vitamine D<sub>3</sub> est modifiée (méthanol/dichlorométhane, 2:1, v/v),
- l'échantillon est débarrassé des lipides par séparation sur colonne Lipidex-5000,
- la sensibilité est augmentée par l'utilisation de la CLHP comme méthode de séparation de la vitamine D<sub>3</sub> des autres dérivés de vitamine D,
- la quantification se fait au moyen d'un « nonequilibrium assay » sur un serum de rat dilué contenant de la DBP,
- la détection se fait toujours au moyen du traceur tritié.

Un autre type de dosage est l'ELISA commercialisé par Biomedica (ref. BI-20442) pour le dosage des 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> plasmatiques ou sériques dans des concentrations de 2,5 à 100 ng/mL, en plaque 96 puits, avec une limite de détection de 1,5 pmol/mL (0,6 ng/mL). Les protéines de l'échantillon (50 µL) sont préalablement précipitées par ajout d'éthanol. La 25-OH vitamine D, contenue dans l'échantillon à doser, entre en compétition avec une 25-OH vitamine D biotinylée, « coatée » dans les micro-puits, vis-à-vis de la DBP ajoutée. Cette DBP restée fixée par l'intermédiaire du traceur vitamine D immobilisée est détectée par un anticorps de lapin spécifique anti-DBP puis révélé par un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin marquée par la horseradish peroxydase.

Kamiya Biomedical Company commercialise une trousse similaire.

L'utilisation d'anticorps anti-haptènes de haute affinité et de spécificité élevée est une alternative au dosage de la 25-OH vitamine D par compétition avec la DBP, long et fastidieux car nécessitant obligatoirement une extraction ou une précipitation de l'échantillon.

### 1.4.3 Différents types d'immunodosages

#### 1.4.3.1 Traceur tritié

Les premiers dosages de la 25-OH vitamine D développés avec des anticorps spécifiques faisaient appel au traceur tritié de la 25-OH vitamine D.<sup>34</sup>

#### 1.4.3.2 Traceur iodé

Le remplacement du traceur tritié par un traceur iodé d'affinité compatible avec l'anticorps augmente la sensibilité.

L'émission  $\gamma$  du traceur iodé est facile à détecter par rapport à la radioactivité  $\beta$  du tritium qui nécessite l'ajout de liquide scintillant pour sa détection.

Par contre, la demi-vie du traceur iodé (60 jours) est très inférieure à celle du traceur tritié (12 ans), ce qui nécessite de renouveler fréquemment le traceur mais qui facilite la gestion des déchets radioactifs, simplement placés en vieillissement et jetés lorsque le seuil de radioactivité réglementaire est atteint.

Les premiers radioimmunodosages employant un traceur iodé radioactif faisaient appel à une chromatographie préliminaire et ne dosaient que la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> et non la 25-OH vitamine D<sub>2</sub>, ce qui limite leur utilité dans le cas de régimes alimentaires supplémentés en vitamine D<sub>2</sub>.<sup>35</sup>

---

<sup>34</sup> Hollis, B.; Napoli, J. L. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1985**, *31*, 1815-1819.

<sup>35</sup> Hummer, L.; Nilas, L.; Tjellesen, L.; Christiansen, C. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1984**, *44*, 163-167. Bouillon, R.; Van Herck, E.; Jans, I.; Tan, B. K.; Van Baelen, H.; De Moor, P. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1984**, *30*, 1731-1736.

### **1.4.3.3 Traceur enzymatique**

Le principal avantage d'un immunodosage enzymatique sur un radioimmunodosage est l'absence de déchets radioactifs. Par exemple, le traceur en EIA peut être constitué d'un dérivé de l'analyte qui est biotinylé.

La détection est basée sur la forte affinité de la biotine pour l'avidine ou la streptavidine (4 sites de liaison pour la biotine) couplée à une enzyme. La révélation colorimétrique de l'horseradish peroxydase ou la phosphatase alcaline conjuguées à la streptavidine (ou avidine) par le substrat (TMB, OPD) permet un grand débit d'échantillons en général en plaque de 96 puits.

## **1.4.4 Immunodosages commerciaux de la 25-hydroxyvitamine D**

Il n'existe pas de méthode RIA direct de la 25-OH vitamine D. La seule méthode direct est un ELISA commercialisé par IDS ltd mais qui ne reconnaît pas les deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la même manière (Tableau 2). Les autres dosages font tous intervenir une étape supplémentaire de précipitation des protéines interférant avec le dosage, en particulier la DBP.

Il n'existe pas à ce jour d'anticorps monoclonaux anti-25-OH vitamine D utilisés dans un dosage de la 25-OH vitamine D.

### **1.4.4.1 Trousse de dosage DiaSorin :**

Cette trousse de dosage requiert une précipitation des protéines de l'échantillon par l'acétonitrile. L'échantillon est alors centrifugé et le surnageant placé en compétition avec un anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la 25-OH vitamine D en présence d'un traceur iodé. La séparation de la fraction de traceur libre de la fraction liée à l'anticorps se fait par immuno-précipitation au moyen d'anticorps de mouton anti-anticorps de chèvre. La détection de la radioactivité se fait sur la fraction décantée après centrifugation. Sa sensibilité est inférieure à 1,1 pmol/mL (2,8 ng/mL) et le dosage effectué dans une gamme de 5 à 150 ng/mL. Les réactivités croisées sont indiquées dans le Tableau 2.

### **1.4.4.2 Trousse de dosage IDS (ref. AA-35F1) :**

Cette trousse de dosage requiert une précipitation des protéines de l'échantillon par l'acétonitrile. L'échantillon est alors centrifugé et le surnageant placé en compétition avec un anticorps polyclonal de mouton spécifique avec un traceur iodé. La séparation de la fraction de traceur libre de la fraction liée à l'anticorps se fait au moyen d'anticorps anti-anticorps de mouton fixés sur cellulose. La détection de la radioactivité se fait sur la fraction décantée après centrifugation. La sensibilité est inférieure à 3 pmol/mL (1,2 ng/mL).

Une autre trousse est commercialisée sous licence IDS par Nichols Institute Diagnostics (ref. 40-6095). Les réactivités croisées sont indiquées dans le Tableau 2.

### **1.4.4.3 Trousse de dosage IBL (Immuno-Biological Laboratories) :**

Cette trousse dose la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> uniquement. Les échantillons sont extraits par l'acétonitrile de la même façon que les autres trousse. L'originalité vient du fait que c'est la seule trousse dans laquelle l'anticorps est immobilisé sur des tubes plastiques (tubes « coatés »). Il n'y a plus d'étape supplémentaire d'immunoprécipitation comme dans les deux trousse précédentes. Cette trousse utilise aussi un traceur iodé radioactif et la séparation de la fraction libre de la fraction liée à l'anticorps s'effectue par simple aspiration du milieu d'incubation.

#### **I.4.4.4 Trousse de dosage ELISA de IDS :**

La trousse de dosage direct en ELISA de IDS fonctionne en format 96 puits. L'ajout d'un tampon dissociant permet de s'affranchir des interférences dues à la DBP. Sa sensibilité est inférieure à 6 pmol/mL (2,4 ng/mL) et sa gamme d'utilisation de 6 à 360 pmol/mL (2,4 à 144 ng/mL). Les réactivités croisées sont indiquées dans le Tableau 2.

C'est la seule trousse de dosage de la 25-OH vitamine D qui procède sans extraction ni précipitation. Les dosages directs sont plus rapides que les autres méthodes de par l'absence de toute étape supplémentaire de précipitation, d'extraction ou de prépurification.

Le dérivé biotinylé de la vitamine D nécessaire à un tel dosage n'est pas décrit.

#### **I.4.5 Conclusion sur les méthodes de dosages de la 25-hydroxyvitamine D**

La grande majorité des méthodes de dosage de la 25-OH vitamine D requiert une précipitation des protéines sériques (ou plasmatiques) par l'acétonitrile ou l'éthanol afin d'éliminer les interférences avec la DBP contenue dans les échantillons.

Les méthodes les plus anciennes (CLHP et compétition avec la DBP) procèdent avec une étape supplémentaire :

- soit une extraction par un solvant organique,
- soit une séparation des lipides.

Un seul dosage EIA de la 25-OH vitamine D existe, commercialisé par IDS ltd.

Des comparaisons des différentes méthodes de dosage de la 25-OH vitamine D ont été réalisées.<sup>36</sup> Elles aboutissent à la conclusion que les méthodes utilisant la CLHP sont plus précises mais que les trousse commerciales RIA ou ELISA sont plus fréquemment utilisées en routine en raison de leur facilité d'emploi.

Hollis, qui est à l'origine de la trousse de DiaSorin, a montré que cette dernière reconnaît de façon équivalente les deux vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. A l'inverse, la trousse IDS reconnaît moins bien la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et donc sous-estime la quantité totale de vitamine D lorsque la quantité de 25-OH vitamine D<sub>2</sub> circulante est significative.<sup>37</sup>

---

<sup>36</sup> Hollis, B. W. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **2000**, *46*, 1657-1661. Lindback, B.; Berlin, T.; Bjorkhem, I. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1987**, *33*, 1226-1227. Lips, P.; Chapuy, M. C.; Dawson-Hughes, B.; Pols, H. A.; Holick, M. F. *Osteoporos. Int.* **1999**, *9*, 394-7.

<sup>37</sup> Hollis, B. W. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **2000**, *46*, 1657-1661.

Immunogène	Réactions croisées						
	20-CO-BSA Vit. D		trousse Biomedica et Kamiya ELISA	trousse IDS et Nichols RIA et ELISA	3-(hémisuc-BSA)-25-OH VD <sub>3</sub>		
	trousse DiaSorin Hollis RIA - tritié	trousse DiaSorin Hollis RIA - iodé			Bouillon et al. Compétition DBP compétition - tritié	Bouillon et al. Anticorps 1 RIA - tritié	Bouillon et al. Anticorps 2 RIA - tritié
VD <sub>2</sub>	10%	0,8%	<1%	<0,3%			
VD <sub>3</sub>	10%	0,8%	<1%	<0,01%	4%	8,0%	0,5%
25-OH VD <sub>2</sub>	100%	100%	100%	75%	105%	11%	0,8%
25-OH VD <sub>3</sub>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
24,25-(OH) <sub>2</sub> VD <sub>2</sub>	100%	100%					
24,25-(OH) <sub>2</sub> VD <sub>3</sub>	100%	100%	100%	>100%	106%	26%	7%
25,26-(OH) <sub>2</sub> VD <sub>2</sub>	100%	100%					
25(S),26-(OH) <sub>2</sub> VD <sub>3</sub>	100%	100%			102%	21%	53%
25-OH VD <sub>3</sub> -26,23-lactone		100%			95%	4%	0,6%
23,25-(OH) <sub>2</sub> VD <sub>3</sub>	100%						
1 $\alpha$ ,25-(OH) <sub>2</sub> VD <sub>2</sub>	5%	2,5%				18%	0,6%
1 $\alpha$ ,25-(OH) <sub>2</sub> VD <sub>3</sub>	5%	2,5%	<1%		8%	270%	40%
Cholestérol	<1%						
DHT		<0,1%					

Tableau 2 : Réactions croisées des différentes méthodes de dosage de la 25-OH vitamine D pour les dérivés de vitamine D et pour deux stéroïdes

Il existe aussi un dosage par compétition sur le récepteur de la vitamine D (VDR), mais il reste anecdotique.<sup>38</sup>

#### 1.4.6 Solubilité de la vitamine D et de ses dérivés

L'un des problèmes majeurs rencontrés lors des compétitions aussi bien avec la DBP qu'avec un anticorps est le manque de solubilité de la 25-OH vitamine D. Lorsque le milieu d'incubation du dosage n'est pas adapté, la 25-OH vitamine D, très hydrophobe, s'adsorbe sur les parois en plastique ou en verre, entraînant ainsi des erreurs de dosage et des liaisons non-spécifiques anormalement élevées.<sup>39</sup>

L'adjonction au milieu d'incubation du dosage d'un agent de solubilisation adéquat revêt alors un caractère essentiel.

Parmi les solubilisants (BSA, ovalbumine, gélatine, l'alcool polyvinylique (PVA), polyéthylène glycol (PEG), Tween 80, Triton X-100,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -cyclodextrines, lipoprotéines de bœuf), tous ne donnent pas les mêmes résultats en termes de récupération de la radioactivité du traceur tritié [26,27-méthyl-<sup>3</sup>H]-25-OH vitamine D<sub>3</sub> et de maintien de la reconnaissance antigène anticorps.

Les travaux de Kobayashi *et al.*<sup>39</sup> indiquent que la  $\beta$ -cyclodextrine (0,1%) ainsi que la Me- $\beta$ -cyclodextrine (0,1%) donnent de très bons résultats de solubilisation du traceur tritié (récupération >95%), mais engendrent une perte de reconnaissance. L' $\alpha$ -cyclodextrine solubilise très mal le traceur probablement du fait de la trop faible taille de sa cavité. Les meilleurs résultats sont obtenus avec l'ajout d'alcool polyvinylique (PVA) (>1%) à un tampon gélatine (récupération >87%). Le Tween 20 et les PEG ne donnent pas de résultats aussi bons.

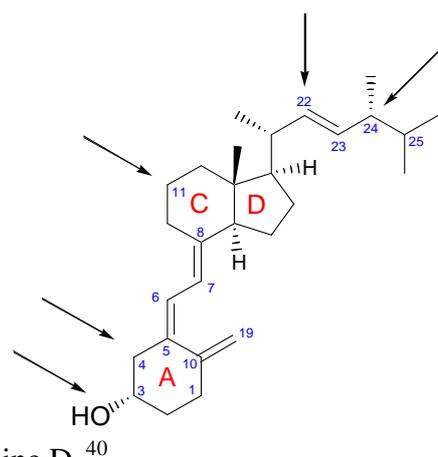
<sup>38</sup> Koyama, H.; Prah, J. M.; Uhland, A.; Nanjo, M.; Inaba, M.; Nishizawa, Y.; Morii, H.; Nishii, Y.; DeLuca, H. F. *Anal. Biochem.* **1992**, *205*, 213-219.

<sup>39</sup> Kobayashi, N.; Ueda, K.; Shimada, K. *Clinica Chimica Acta* **1992**, *209*, 83-88.

## 1.5 Haptènes à l'origine des anticorps anti-vitamine D

La position de couplage du dérivé de vitamine D sur la protéine immunogénique ayant une grande importance sur la qualité de reconnaissance des anticorps, l'ensemble des anticorps anti-25-OH vitamine D recensés dans la littérature sont classés ci-dessous en fonction de la position de couplage des haptènes vitamine D. Les réactions croisées (RC) vis-à-vis des autres dérivés de la vitamine D sont aussi mentionnées dans la mesure du possible.

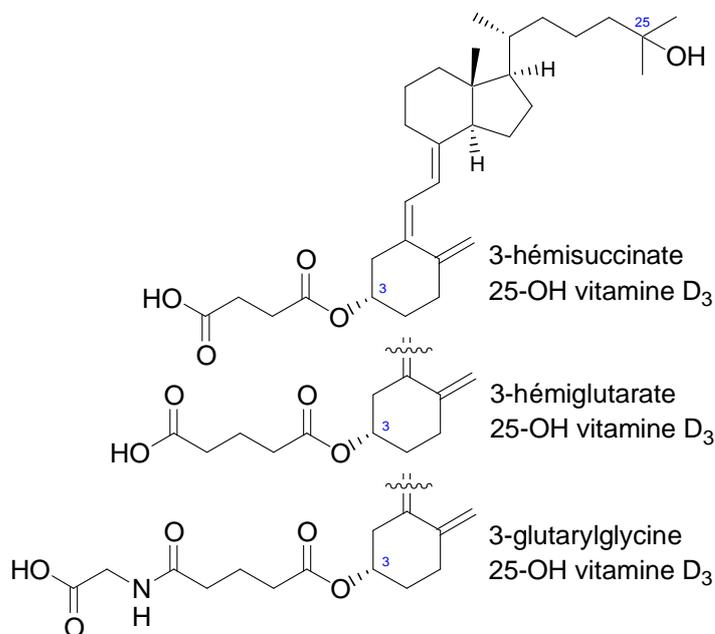
Il faut aussi noter que de nombreux travaux existent sur des anticorps anti-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D utilisés pour les dosages dans des sera humains de ce métabolite actif, présent en très faible quantité par rapport à son précurseur, la 25-hydroxyvitamine D.<sup>40</sup>



### 1.5.1 Haptène couplé par la position 3

Le couplage de dérivés de la vitamine D à partir de l'hydroxyle 3 est celui qui est le plus facilement réalisable.

Bouillon *et al.* ont décrit un radioimmunos dosage de la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> ainsi qu'un dosage par compétition avec la DBP de rat. Le radioimmunos dosage utilise des anticorps polyclonaux de lapins dirigés contre l'immunogène 3-hémisuccinoyloxy-25-OH vitamine D<sub>3</sub> (dérivé 3-hémisuccinate de la 25-OH vitamine D<sub>3</sub>) conjugué sur la BSA.<sup>41</sup> Les réactions croisées de ces anticorps sont indiquées dans le Tableau 2 (anticorps 1 et 2). Les deux anticorps polyclonaux croisent significativement avec l'hormone 1 $\alpha$ -hydroxylée, mais peu avec les métabolites hydroxylés de la chaîne latérale.



Kobayashi *et al.*<sup>42</sup> ont décrit une série de trois haptènes de la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> comportant des longueurs différentes de bras en position 3 qui ont été employés pour l'immunisation de lapins (3-hémisuccinate 25-OH vitamine D<sub>3</sub>, 3-hémiglutarate 25-OH vitamine D<sub>3</sub> et 3-glutaryl-glycine 25-OH vitamine D<sub>3</sub>, couplés à la BSA). Les réactions croisées sont très fortes avec la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (80-230%) et faibles avec la 25-OH vitamine D<sub>2</sub>, ne montrant aucune discrimination pour la position 1 mais une bonne reconnaissance des différences des chaînes latérales des vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. Le métabolite 24,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> est mal reconnu (8-26%). Ces

<sup>40</sup> Voir par exemple : Holick, M. F.; Holick, S. A.; Uskokovic, M. R.; Baggiolini, E. G.; Meng, X.; Henderson, S.; Clemens, T. L. *Steroids* **1983**, *42*, 503-508. Mawer, E. B.; Berry, J. L.; Bessone, J.; Shany, S.; Smith, H.; White, A. *Steroids* **1985**, *46*, 741-754.

<sup>41</sup> Bouillon, R.; Van Herck, E.; Jans, I.; Tan, B. K.; Van Baelen, H.; De Moor, P. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1984**, *30*, 1731-1736.

<sup>42</sup> Kobayashi, N.; Ueda, K.; Kitahori, J.; Shimada, K. *Steroids* **1992**, *57*, 488-493.

anticorps ont été développés pour un dosage de la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> en EIA mais avec un prétraitement par colonne d'immunoaffinité.<sup>43</sup>

Kobayashi *et al.* ont aussi décrit des anticorps monoclonaux dirigés contre la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> préparés entre autres à partir de l'haptène 3-hémisuccinate 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> conjugué avec la BSA.<sup>44</sup> D'autres anticorps polyclonaux ont été obtenus par immunisation avec un conjugué de 3-hémiglutarate de 24(R),25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> couplé à la BSA pour doser la 24(R),25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>. Ces anticorps polyclonaux croisent peu avec les dérivés de la chaîne latérale (24(S),25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (<3%), 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub> (<0,3%), 25,26-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (<0,53%) mais beaucoup avec les dérivés 1 $\alpha$ -hydroxylés (>68%).<sup>45</sup> Cependant, ces réactions croisées montrent que l'hormone 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> ne pourrait interférer que de façon limitée dans le dosage de la 24(R),25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> puisqu'elle est 25 fois moins concentrée en moyenne dans les séra.

L'ensemble des anticorps issus d'immunisations par des dérivés de la vitamine D<sub>3</sub> conjugués par la position 3 sur la BSA montre les mêmes types de réactions croisées, ceci quelque soit le bras espaceur employé. Les métabolites 1 $\alpha$ -hydroxylés sont reconnus au même titre que les précurseurs non-1 $\alpha$ -hydroxylés. De ce fait, ces anticorps ne sont pas capables de faire la différence entre la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> et l'hormone 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> ce qui n'est pas très gênant, compte tenu des concentrations beaucoup plus faibles de l'hormone. En revanche, ces anticorps croisent peu avec les métabolites hydroxylés de la chaîne latérale. Le principal inconvénient de ces anticorps est qu'ils ne reconnaissent que la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> mais pas la 25-OH vitamine D<sub>2</sub>.

Des conjugués de la vitamine D par la position 3 ne sont par conséquent pas intéressants pour un dosage simultané des 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> destiné à donner un aperçu des réserves en vitamine D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>.

## 1.5.2 Haptène couplé par la position 4

Des anticorps polyclonaux de lapin anti-vitamine D<sub>3</sub> ont été obtenus dans le but de développer un dosage de la vitamine D<sub>3</sub> dans le lait suppléé en vitamine D<sub>3</sub>. L'immunogène est préparé par couplage de la vitamine D<sub>3</sub> en position 4, par l'intermédiaire de formaldéhyde, à de la BSA dont les acides carboxyliques (-COOH) ont été convertis préalablement en amides par condensation de la diéthylamine en présence l'EDCI.<sup>46</sup> Cette méthode de couplage est incertaine. De tels anticorps ne permettent que le dosage de la vitamine D<sub>3</sub>, mais pas des 25-OH vitamines D.

## 1.5.3 Haptène couplé par la position 11 $\alpha$

L'équipe de Kobayashi a préparé le conjugué de la BSA avec la 11 $\alpha$ -hémiglutaryloxy-25-OH vitamine D<sub>3</sub>.<sup>47</sup> L'immunisation de lapins a permis d'obtenir des anticorps polyclonaux anti-25-OH vitamine D<sub>3</sub>. A l'inverse des anticorps obtenus à partir d'immunogènes couplés en position 3 qui ne reconnaissent pas le cycle A, les immunogènes couplés en position 11 $\alpha$  montrent une bonne reconnaissance du cycle A et de la position 1 $\alpha$  (RC 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (0,1-2,4%), 25-OH vitamine D<sub>3</sub> 3(S) (<0,3%)), mais une mauvaise discrimination des métabolites de la chaîne latérale (RC 24,25-(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> (110-120%), 25,26-(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> (66-130%)).

<sup>43</sup> Kobayashi, N.; Ueda, K.; Tsutsumi, M.; Tabata, Y.; Shimada, K. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *44*, 93-100.

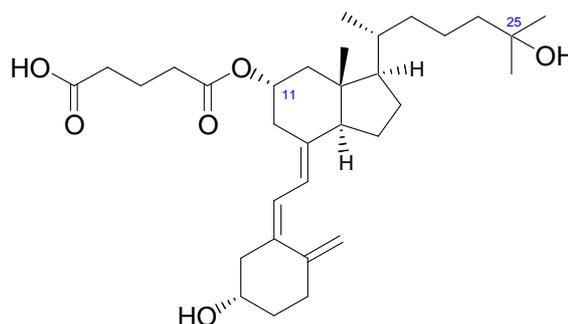
<sup>44</sup> Kobayashi, N.; Sato, A.; Takagi, K.; Shimada, K. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 948-953.

<sup>45</sup> Kobayashi, N.; Higashi, T.; Saito, K.; Murayama, T.; Douya, R.; Shimada, K. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *62*, 79-87.

<sup>46</sup> Jean, J.; Turcotte, C.; Simard, R. E.; Fliss, I. *J. Immunol. Methods* **1999**, *223*, 155-163.

<sup>47</sup> Kobayashi, N.; Hisada, A.; Shimada, K. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *48*, 567-572.

l'immunogène 11 $\alpha$ -hémiglutaryloxy-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> couplé à la BSA, préparé par l'équipe de Kobayashi *et al.* a permis d'obtenir des anticorps monoclonaux reconnaissant la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> et croisant beaucoup avec d'autres dérivés 1 $\alpha$ -hydroxylés différant par la chaîne latérale mais très peu avec les dérivés 1 $\alpha$ -déhydroxylés.<sup>48</sup>



11 $\alpha$ -hémiglutaryloxy-25-OH vitamine D<sub>3</sub>

De même, l'immunogène 11 $\alpha$ -hémiglutaryloxy-24(R),25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> couplé à la BSA a permis d'obtenir des anticorps pour le dosage de la 24(R),25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> qui, à l'inverse de ceux obtenus suite à un couplage sur la position 3, ne croisent que très peu avec les dérivés 1 $\alpha$ -hydroxylés (<0,69%) mais croisent avec la 24(S),25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (>67%), la 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub> (>14%) et la 25,26-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (>23%).<sup>49</sup>

En conclusion, les immunogènes des dérivés de la vitamine D<sub>3</sub> couplés par la position 11 $\alpha$  sur la BSA permettent d'obtenir des anticorps reconnaissant bien le cycle A et les chaînes latérales des vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>, mais qui ne distinguent pas les dérivés hydroxylés de la chaîne latérale de la vitamine D<sub>3</sub> entre eux.

#### 1.5.4 Haptène couplé par la position 22

Une équipe japonaise a déposé un brevet pour des dérivés 22-COOH-25-OH vitamine D dont la chaîne latérale est toujours présente, dans le but d'obtenir des anticorps.<sup>50</sup>

Hollis est le premier, en 1985, à proposer des anticorps polyclonaux contre la 25-OH vitamine D capables de reconnaître sans distinction les deux vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> et donc de déterminer la quantité totale de vitamine D circulante.<sup>51</sup>

Le traitement au rivanol\* des immunosera de lapins immunisés par l'équipe de Hollis avec un immunogène obtenu par couplage à la BSA de la 20-COOH-23,24,25,26,27-pentanor-vitamine D<sub>3</sub> ont montré des titres au 1/15000 pour le traceur tritié 25-OH-[<sup>3</sup>H]cholécalférol et des réactions croisées identiques pour le 25-hydroxycholécalférol et le 25-hydroxyergostérol. Les réactivités croisées sont indiquées dans le Tableau 2.

Les faibles réactions croisées de la vitamine D<sub>2</sub> et de la vitamine D<sub>3</sub> sont attribuées à leur manque de solubilité dans les milieux aqueux employés pour les essais de compétition avec le traceur tritié [26,27-méthyl-<sup>3</sup>H]-25-OH vitamine D<sub>3</sub>. Les vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>, très hydrophobes, s'adsorbent dans les tubes et ne sont que très peu solubilisées par les protéines plasmatiques. L'anticorps devrait pouvoir les reconnaître, mais leurs propriétés physico-chimiques empêchent de quantifier leurs réactions croisées.

La méthode de dosage implique une précipitation des protéines par de l'acétonitrile. La séparation entre la fraction libre de [26,27-méthyl-<sup>3</sup>H]-25-OH vitamine D<sub>3</sub> ou de 25-OH vitamine D de la fraction liée à l'anticorps polyclonal de lapin se fait par immunoprécipitation au moyen d'un second anticorps polyclonal de chèvre anti-anticorps de lapin.

<sup>48</sup> Kobayashi, N.; Imazu, T.; Ebisawa, A.; Shimada, K. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *63*, 127-137.

<sup>49</sup> Kobayashi, N.; Higashi, T.; Saito, K.; Murayama, T.; Douya, R.; Shimada, K. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *62*, 79-87.

<sup>50</sup> Oshida, J.-I.; Nishikawa, O.; Ishimaru, K.; Tsuruta, H.; Takeshita, T.; Yamamoto, I. EP0092004 **1982**.

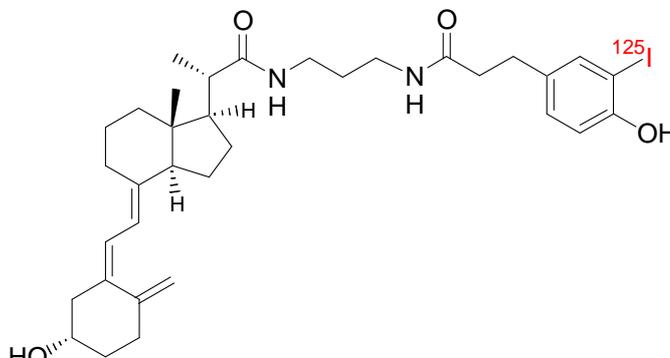
<sup>51</sup> Hollis, B.; Napoli, J. L. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1985**, *31*, 1815-1819.

\* Le rivanol est utilisé pour débarrasser les immunosera des  $\alpha$ -globulines, dont fait partie la DBP qui interfère lors du dosage.

La limite de détection est évaluée à 3,0 ng/mL de 25-OH vitamine D<sub>3</sub> et seulement 1 µL de plasma serait nécessaire par tube. Par commodité, la prise d'essai est plus importante.

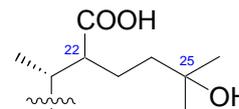
La synthèse et la caractérisation structurale de l'haptène ne sont pas décrites dans l'article mais fait référence à la voie classique de photoclivage du cycle B, méthode difficilement transposable pour la synthèse de nombreux dérivés de la vitamine D modifiés sur la chaîne latérale.

Plus tard, Hollis *et al.* proposent une version améliorée de ce dosage par le remplacement du traceur tritié par un traceur iodé obtenu par couplage du réactif de Bolton-Hunter (N-succinimidyl-3-(4-hydroxy-3-[<sup>125</sup>I]iodophenyl)propionate) déjà radioactif sur l'amine de la 20-CO-NH-(3-amino-propyl) vitamine D avec une limite de détection de 2,8 ng/mL de 25-OH vitamine D<sub>3</sub>. Les anticorps utilisés pour ce dosage proviennent de l'immunisation de chèvres par le même immunogène que précédemment.<sup>52</sup> La gamme de calibration est préparée dans des sera déplétés en vitamine D. Les autres paramètres restent inchangés.



### 1.5.5 Haptène couplé par la position 24

De même que pour la position 22, une autre équipe japonaise a déposé un brevet sur des haptènes 24-COOH-25-OH vitamine D<sub>3</sub> pour le dosage de la 25-OH vitamine D<sub>3</sub>.<sup>53</sup>



Il faut noter que Kobayashi *et al.* ont aussi décrit des anticorps monoclonaux dirigés contre la 1α,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> préparés, entre autres, à partir de l'haptène 24-COOH-25,26,27-trinor-1α-hydroxyvitamine D<sub>3</sub> conjugué avec la BSA.<sup>54</sup>

### 1.5.6 Conclusion sur la position de couplage de la 25-hydroxyvitamine D

Les travaux de ces différentes équipes pour l'obtention d'anticorps anti-25-OH vitamine D montrent qu'il est difficile de trouver des anticorps reconnaissant la totalité de la structure de l'haptène.

Le problème de reconnaissance ambivalent des stéroïdes a déjà été rencontré dans le laboratoire dans le cas d'anticorps anti-oestradiol. Quelque soit la position de couplage, il est impossible d'isoler des anticorps monoclonaux reconnaissant à la fois le cycle A phénolique et le cycle D hydroxylé en position 17.<sup>55</sup>

Ainsi, des haptènes conjugués à la BSA par la position 3 de la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub> engendrent des anticorps incapables de discriminer les dérivés non-1α-hydroxylés des métabolites 1α-hydroxylés tels que l'hormone, la position de couplage en 3 sur le cycle A étant trop proche de la position 1. En revanche de tels anticorps reconnaissent les différences de structures entre les vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> au niveau de la chaîne latérale portée par le cycle D.

Les mêmes problèmes de spécificité sont rencontrés avec un couplage par la position 11α de la 24(R),25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>. Ces anticorps croisent peu avec les métabolites de l'hormone, mais les dérivés de la chaîne latérale ne sont pas discriminés.

<sup>52</sup> Hollis, B. W.; Kamerud, J. Q.; Selvaag, S. R.; Lorenz, J. D.; Napoli, J. L. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1993**, *39*, 529-533.

<sup>53</sup> Oshida, J.-I.; Nishikawa, O.; Ishimaru, K.; Tsuruta, H.; Takeshita, T.; Yamamoto, I. EP0092004 **1982**.

<sup>54</sup> Kobayashi, N.; Sato, A.; Takagi, K.; Shimada, K. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 948-953. Kobayashi, N.; Takama, A.; Shiomura, K.; Tabata, Y.; Takagi, K.; Shimada, K. *Steroids* **1994**, *59*, 404-411.

<sup>55</sup> Coulon, S.; Pellequer, J. L.; Blachere, T.; Chartier, M.; Mappus, E.; Chen Sw, S. W.; Cuilleron, C. Y.; Baty, D. *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 6-18.

L'haptène de Hollis, couplé par la position 22, engendre aussi des anticorps qui ne reconnaissent pas la chaîne latérale mais reconnaissent bien le squelette 9,10-seco-stéroïde de la vitamine D sans la confondre avec les métabolites de l'hormone.

## 1.6 Chimie de la chaîne latérale de la vitamine D

Le couplage de la vitamine D à partir de sa chaîne latérale implique la fonctionnalisation de cette partie. De nombreuses méthodes sont possibles dont les plus fréquentes sont regroupées ci-dessous :

- synthèses totales,
- méthodes par ouverture du cycle B des dérivés d'ergostérols,
- méthodes par hémisynthèse à partir de la vitamine D<sub>2</sub>.

### 1.6.1 Synthèses totales

De nombreux dérivés de la vitamine D sont accessibles par synthèse convergente de 2 fragments disjoints :

Le cycle A peut être obtenu par synthèse totale, ce qui permet un contrôle de la stéréochimie de tous les centres stéréogéniques, en particulier celui de l'hydroxyle 1 $\alpha$  dont l'obtention par hémisynthèse sur la vitamine D est assez difficile. L'autre avantage est de permettre aussi de synthétiser des structures plus élaborées pour la recherche de nouveaux dérivés d'intérêt biologique de la vitamine D par des variations de substituants sur le cycle A.<sup>56</sup>

Le groupe des deux cycles C et D peut être obtenu par ozonolyse puis réduction de la vitamine D<sub>2</sub> non protégée. Toutes les doubles liaisons sont par conséquent coupées pour donner des cycles C et D hydroxylés en position 8 et 22, conduisant à un composé appelé diol de Lythgoe-Inhoffen.<sup>57</sup> (Figure 13)

Une synthèse des cycles C et D par une réaction de Claisen stéréospécifique et une réaction de Diels-Alder intramolécule a par ailleurs été décrite par Wilson *et al.*<sup>58</sup>

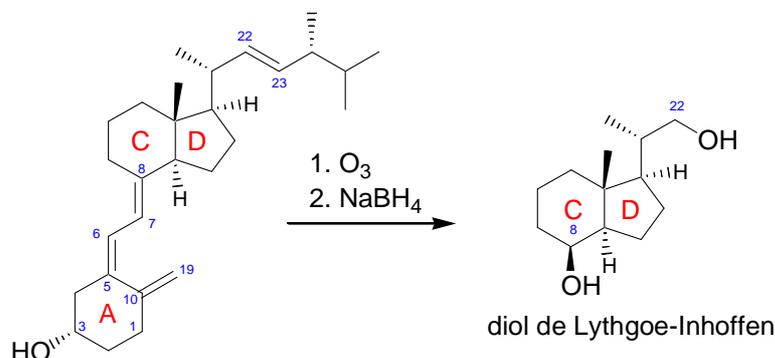


Figure 13 : Préparation du diol de Lythgoe-Inhoffen par ozonolyse de la vitamine D<sub>2</sub>

La molécule de vitamine D peut être obtenue par couplage des fragments A et C/D par une réaction de Wittig-Horner entre des dérivés du diol de Lythgoe-Inhoffen, oxydés en cétone en position 8 et un oxyde de phosphine à l'extrémité 7 du synthon A.<sup>59</sup> (Figure 14)

<sup>56</sup> Hatakeyama, S.; Okano, T.; Maeyama, J.; Esumi, T.; Hiyamizu, H.; Iwabuchi, Y.; Nakagawa, K.; Ozono, K.; Kawase, A.; Kubodera, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 403-415.

<sup>57</sup> Inhoffen, H. H.; Quinkert, G.; Schütz, S.; Friedrich, G.; Tober, E. *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 181-191. Mascarenas, J. L.; Sarandeses, L. A.; Castedo, L.; Mourino, A. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3485-3498.

<sup>58</sup> Wilson, S. R.; Jacob, L. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4380-4385.

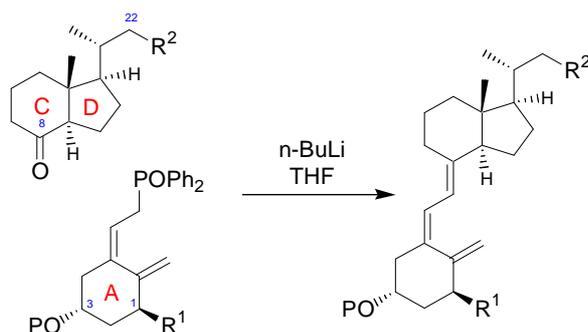


Figure 14 : Couplage de Wittig-Horner

La réaction de couplage des cycles C/D et d'un précurseur du cycle A est aussi possible par la méthode de Trost catalysée par un complexe du palladium.<sup>60</sup> (Figure 15)

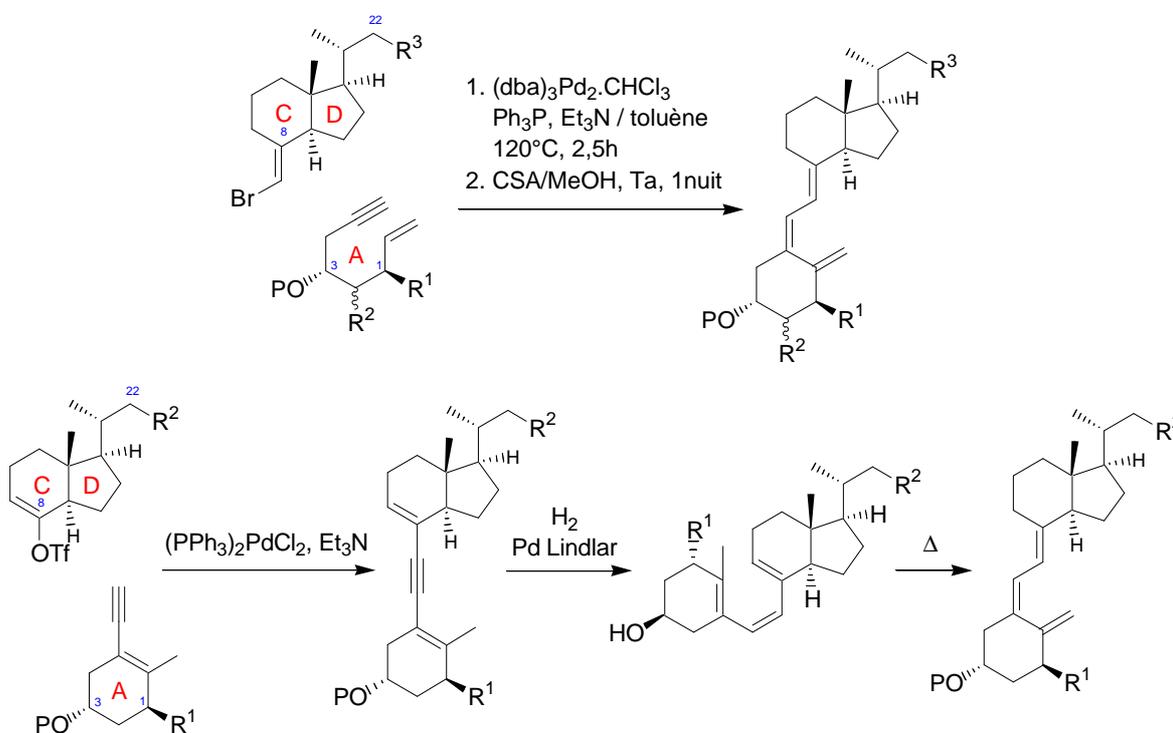


Figure 15 : Couplage par catalyse au palladium

Une autre méthode faisant aussi intervenir un couplage catalysé par un complexe du palladium met en œuvre un vinyle triflate et un ényne (couplage de Sonogashira) qui donnent un dièneyne avec environ 86% de rendement. Il faut ensuite réduire sélectivement la triple liaison sur le catalyseur de Lindlar empoisonné par la quinoléine pour donner la prévitamine D correspondante (Rdt  $\approx$  95%) qui est ensuite isomérisée thermiquement.<sup>61</sup>

<sup>59</sup> Lythgoe, B.; Moran, T. A.; Nambudiry, M. E. N.; Tideswell, J.; Wright, P. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 590-595. Sardina, F. J.; Mourino, A.; Castedo, L. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1264-1269. Lee, N. E.; Williard, P. G.; Brown, A. J.; Campbell, M. J.; Koeffler, H. P.; Peleg, S.; Rao, D. S.; Reddy, G. S. *Steroids* **2000**, *65*, 252-265.

<sup>60</sup> Trost, B. M.; Dumas, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 9836-9845. Takayama, H.; Konno, K.; Fujishima, T.; Maki, S.; Liu, Z.; Miura, D.; Chokki, M.; Ishizuka, S.; Smith, C.; DeLuca, H. F.; Nakagawa, K.; Kurobe, M.; Okano, T. *Steroids* **2001**, *66*, 277-285.

<sup>61</sup> Mascarenas, J. L.; Sarandeses, L. A.; Castedo, L.; Mourino, A. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3485-3498. Castedo, L.; Mascarenas, J. L.; Mourino, A.; Sarandeses, L. A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1203-1206. Granja, J. R.; Castedo, L.; Mourino, A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 124-131. Sestelo, J. P.; Mascarenas, J. L.; Castedo, L.; Murino, A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 118-123.

## 1.6.2 Irradiation UV d'un dérivé d'ergostérol

La voie de synthèse de dérivés de la vitamine D via des dérivés de l'ergostérol (provitamine D) est le procédé industriel breveté employé pour obtenir à grande échelle la vitamine D<sub>2</sub>, l'ergostérol provenant par exemple des champignons *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces uvarum*.

Cette méthode de synthèse s'inspire directement de la biosynthèse de la vitamine D. (voir §I.1.1.1 Voie endogène : production photochimique de vitamine D<sub>3</sub>)

L'irradiation UV de la provitamine D à -40°C simultanément par des longueurs d'onde dans la fourchette 285-300 nm et supérieures à 330 nm (lampe à vapeur de mercure haute pression TQZ1) engendre la prévitamine D. Le processus de photo-conversion doit être stoppé à 60% de conversion et les produits obtenus séparés par chromatographie. La prévitamine D est par la suite isomérisée thermiquement pour donner les dérivés de la vitamine D et la provitamine D peut alors être recyclée. Les rendements ne sont généralement pas très bons sans optimisation des conditions réactionnelles, en particulier des longueurs d'ondes du photo-clivage du cycle B.<sup>62</sup>

## 1.6.3 Hémisynthèse à partir de la vitamine D<sub>2</sub>

La chimie de modification structurale de la chaîne latérale de la vitamine D implique la fonctionnalisation de cette dernière qui pour les deux vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> est complètement hydrocarbonée. Les seuls dérivés naturels fonctionnalisés sur la chaîne latérale sont les métabolites de la vitamine D 24 ou 25 hydroxylés qui sont eux-même obtenus par synthèse pour préparer de grandes quantités.

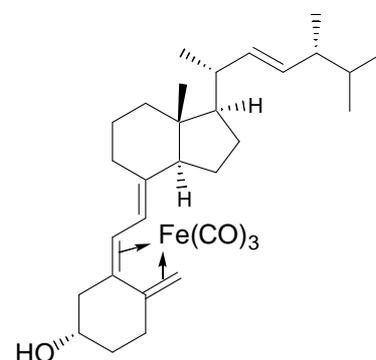
En partant de la vitamine D<sub>2</sub> comme produit de départ, il est possible de cliver la double liaison 22(23) par ozonolyse, mais le groupement fonctionnel triène, plus sensible, doit être protégé. (voir §II.1.1.1 Protection du triène et de l'alcool)

Les méthodes de protection du triène sont assez variées mais n'ont pas toutes la même facilité de mise en œuvre. Andrews *et al.* ont décrit plusieurs de ces techniques pour la synthèse de la vitamine D<sub>3</sub> à partir de la vitamine D<sub>2</sub>.<sup>63</sup>

### 1.6.3.1 Protection par le fer nonacarbonyle :

Le triène de la vitamine D peut être protégé sous forme d'un complexe de fer carbonyle par l'action du fer nonacarbonyle. Le triène de la vitamine D, riche en électrons, peut complexer un métal tel que le fer et agir en tant que ligand. La déprotection s'effectue par ajout de chlorure ferrique.<sup>63,64</sup>

Les complexes métalliques sont sensibles aux oxydants et sont très toxiques de même que le monoxyde de carbone.



<sup>62</sup> Scheddin, D.; Mayer, H.; Wittmann, S.; Schönecker, B.; Gliesing, S.; Reichenbacher, M. *Steroids* **1996**, *61*, 598-608. Scheddin, D.; Mayer, H.; Schonecker, B.; Gliesing, S.; Reichenbacher, M. *Steroids* **1998**, *63*, 633-643. Gliesing, S.; Ilge, H.-D.; Reichenbacher, M.; Fassler, D. Z. *Chem.* **1984**, *24*, 150-151. Reichenbacher, M.; Gliesing, S.; Lange, C.; Gonschior, M.; Schönecker, B. *J. Prakt. Chem.* **1996**, *338*, 634-641.

<sup>63</sup> Andrews, D. R.; Barton, D. H. R.; Hesse, R. H.; Pechet, M. M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4819-4828.

<sup>64</sup> Barton, D. H. R.; Patin *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1976**, 829.

### 1.6.3.2 Protection sous forme de 6(R)-hydroxy-3,5-cyclovitamine D :

Les dérivés de la vitamine D protégés sous forme de 6(R)-hydroxy-3,5-cyclovitamine D sont obtenus par solvolysé du tosylate en position 3 dans l'acétone aqueuse.<sup>63,65</sup> La déprotection en milieu acide régénère le triène sous forme de mélange de ses isomères 5(6)-*trans* et 5(6)-*cis* avec des rendements modestes. Ce type de protection permet toutefois la 1 $\alpha$ -hydroxylation par l'oxyde de sélénium, intéressante pour synthétiser l'hormone active et permet aussi la fonctionnalisation du carbone 6.

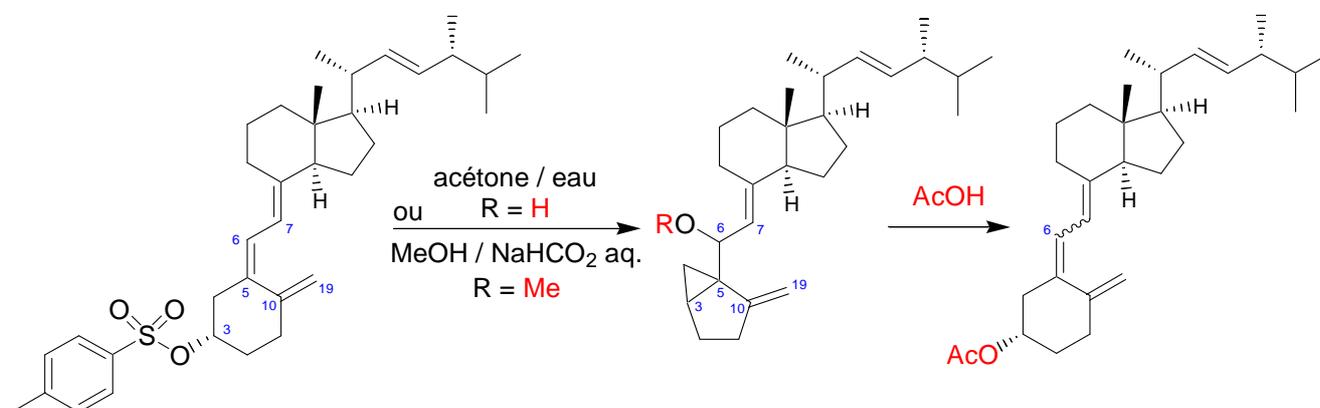
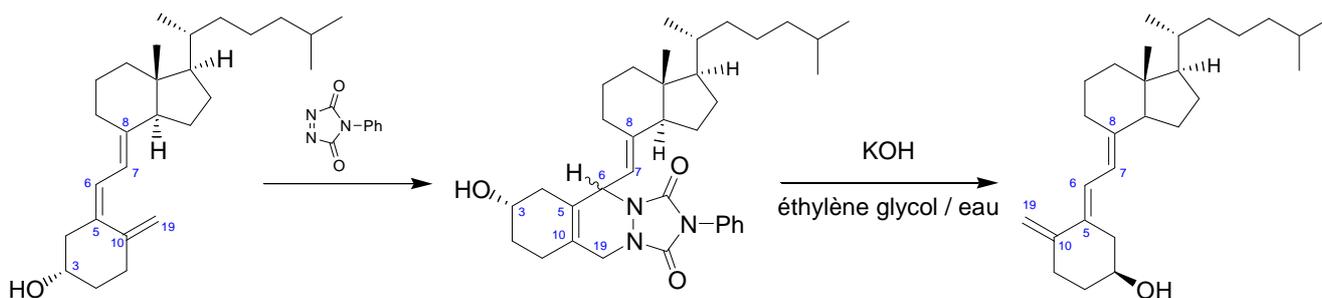


Figure 16 : Protection sous forme de 6(R)-hydroxy-3,5-cyclovitamine D<sub>2</sub> et déprotection

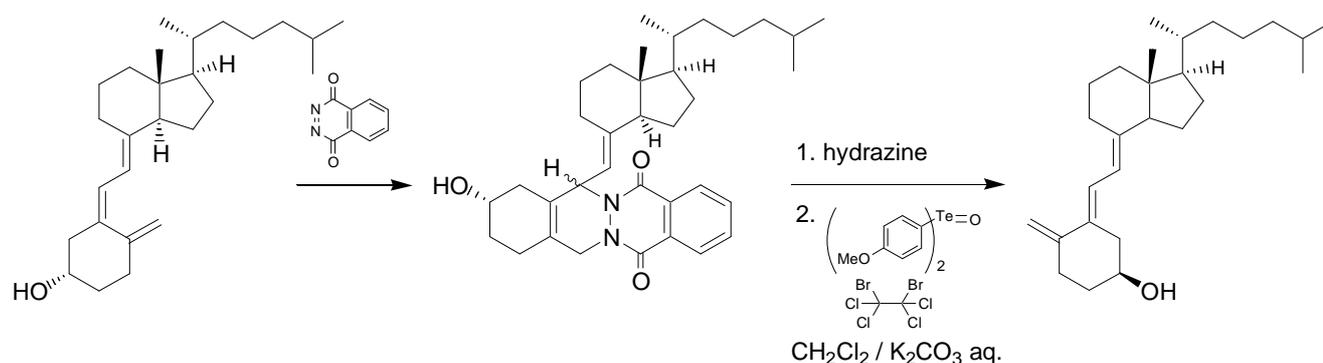
### 1.6.3.3 Protection par réaction de Diels-Alder :

La vitamine D forme des adduits avec la 4-phényl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) par réaction de Diels-Alder avec un rendement de 85%.<sup>63</sup> La réaction donne deux épimères sur le carbone 6. Dans l'acétate d'éthyle à 0°C le rapport entre les adduits est de 95:5 et dans le dichlorométhane à 0°C, ce ratio est de 3:1.<sup>63,66</sup> La déprotection s'effectue en présence de potasse dans un mélange d'éthylène glycol et d'eau, mais ne donne pas de bons rendements.



<sup>65</sup> Sheves; Mazur *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6249. Sheves; Mazur *Tetrahedron Lett.* **1976**, 1913-1915. Sheves; Mazur *Tetrahedron Lett.* **1976**, 2987-2988. Sheves, M.; et al. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 554-555. Addo, J. K.; Swamy, N.; Ray, R. *Steroids* **1999**, *64*, 273-282. Kutner, A.; Perlman, K. L.; Lago, A.; Sicinski, R. R.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3450-3457.

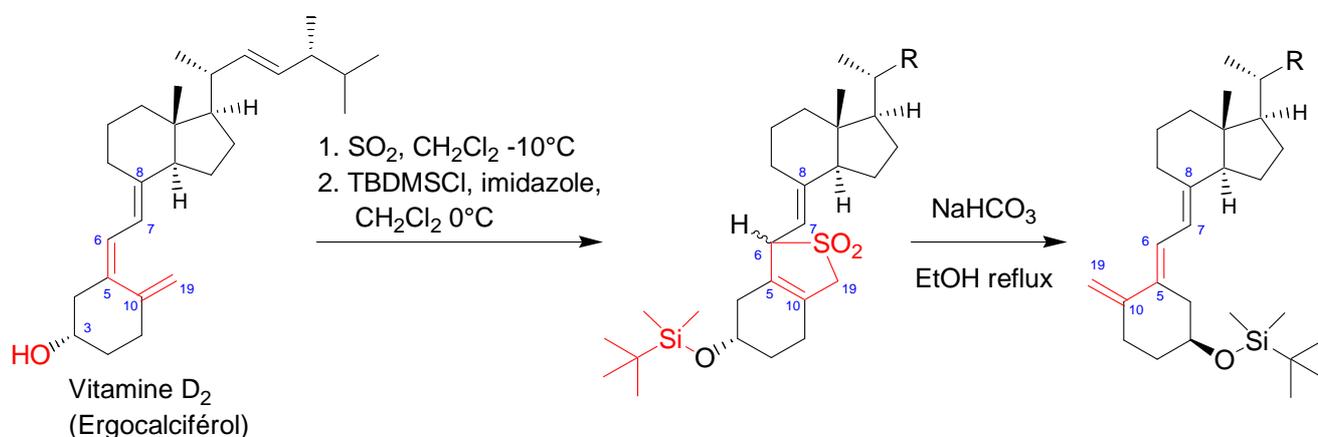
<sup>66</sup> Aberhart; Hsu *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2098. Reischl, W.; Zbiral, E. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1978**, 745-754. Kratky, C.; Reischl, W.; Altmann, E.; Zbiral, E. *Monatsh. Chem.* **1982**, *113*, 439-448.



La phthalazine-1,4-dione réagit dans les mêmes conditions avec un rendement de 82%. La déprotection de l'adduit est plus complexe. Dans un premier temps la partie phthalhydrazide est clivée par l'hydrazine puis dans un deuxième temps, on fait réagir l'oxyde de tellure dianisyle dans un milieu biphasique de 1,2-dibromotétrachloroéthane dans le dichlorométhane et de carbonate de potassium aqueux pour donner la 5(6)-*trans* vitamine D avec un rendement de déprotection de 90%.<sup>63</sup>

#### 1.6.3.4 Protection par formation d'adduit de l'anhydride sulfureux :

La première utilisation de l'anhydride sulfureux pour la protection du triène de la vitamine D<sub>2</sub> est décrite par Zbiral par barbotage de SO<sub>2</sub> dans un mélange de benzène et d'eau sous agitation vigoureuse.<sup>67</sup> L'alcool en 3 est ensuite protégé par le chlorure de triéthylsilyle avec un rendement sur les deux étapes de 77%. Les améliorations successives de ce protocole de protection et l'emploi de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle ont permis d'obtenir un rendement global quantitatif.<sup>68</sup>

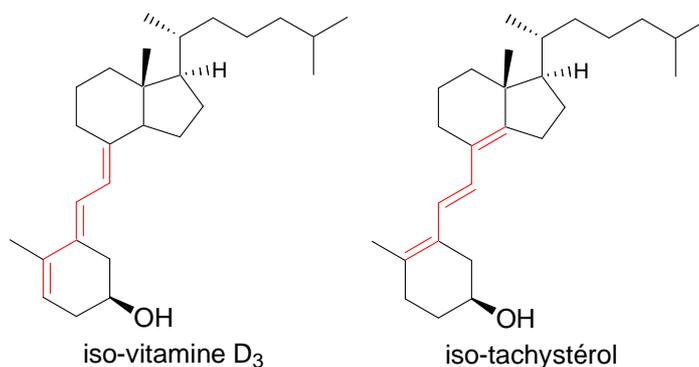


La déprotection de l'adduit s'effectue thermiquement par reflux dans l'éthanol en présence de bicarbonate de sodium en suspension pour donner la forme 5(6)-*trans* vitamine D comme produit principal avec un rendement de déprotection allant de 80 à 90% ainsi que des traces de l'isomère 5(6)-*cis*. Le bicarbonate de sodium agit en tant que base dans un solvant protique afin d'éviter les problèmes de réarrangements non-concertés du triène observés par Zbiral dans le benzène à reflux qui aboutissent aux formes iso-vitamine D ou iso-tachystérol dans le cas de la déprotection de la vitamine D<sub>3</sub>.<sup>67</sup> Dans un solvant protique (méthanol, éthanol, ...) et en présence de base (KOH, NaHCO<sub>3</sub>, ...), ce réarrangement par catalyse acide ne peut pas avoir lieu.<sup>69</sup>

<sup>67</sup> Reischl, W.; Zbiral, E. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 1763.

<sup>68</sup> Ando, K.; Koike, F.; Kondo, F.; Takayama, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 189-192.

<sup>69</sup> Inhoffen, H. H.; Quinkert, G.; Hess, J. J.; Erdmann, H. M. *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 2273.



C'est cette dernière méthode de protection qui est la plus efficace pour effectuer des hémisynthèses à partir de la vitamine D<sub>2</sub>, substrat commercial. En effet, la protection du triène par addition chélotropique de l'anhydride sulfureux est d'une mise en œuvre facile et la déprotection l'est toute aussi.

## 1.7 Stratégie

Nos travaux visent à obtenir des anticorps sans différence de reconnaissance des deux 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. L'étude bibliographique des haptènes de la vitamine D couplés par leur chaîne latérale tronquée révèle, comme attendu, que les anticorps correspondants n'ont pas de spécificité pour des dérivés de la chaîne latérale. Ils reconnaissent une grande partie des métabolites hydroxylés de cette dernière et croisent peu avec les métabolites de l'hormone. (Tableau 2 ; Figure 17)

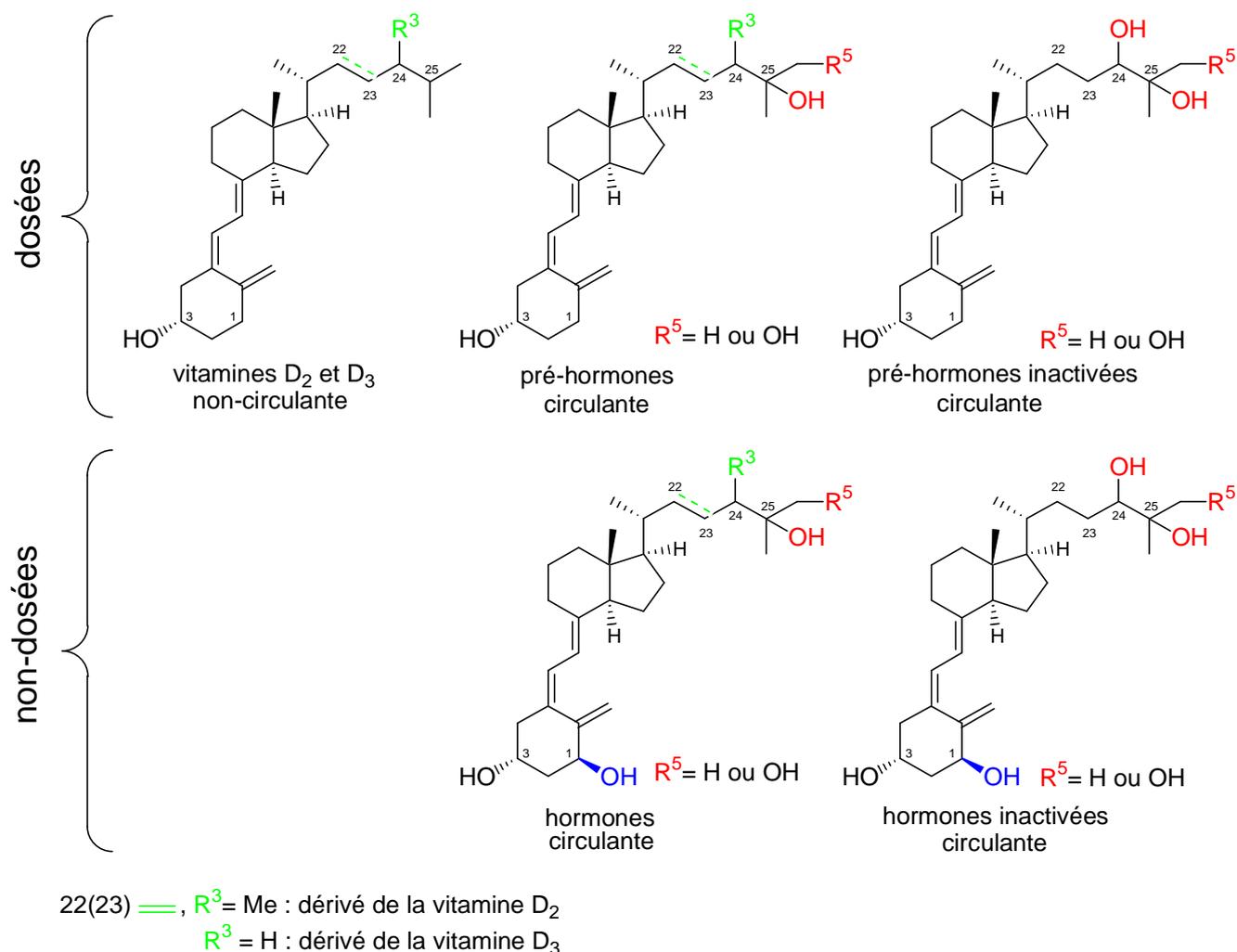


Figure 17 : Vitamine D et ses métabolites

La stratégie suivie dans ce travail consistera à étudier l'influence de diverses modifications de chaînons de couplage introduits sur la chaîne latérale de la 23,24,25,26,27-pentanorvitamine D et 24,25,26,27-tétranorvitamine D afin d'obtenir des haptènes susceptibles de conduire à des anticorps capables de reconnaître également les deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> qui ne diffèrent que par la structure de la chaîne latérale. (Figure 18)

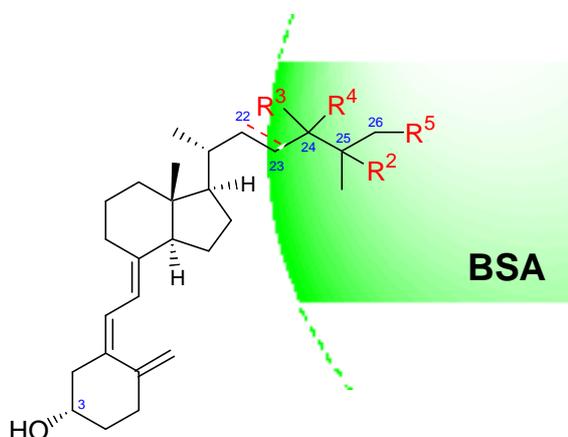


Figure 18 : Métabolites de la chaîne latérale de la vitamine D dans la zone de couplage de la BSA

Les caractéristiques requises pour notre dosage simultané de la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et de la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> nous amènent donc à mettre en œuvre, dans un premier temps, une stratégie d'obtention d'haptènes de la vitamine D modifiés sur la chaîne latérale. La voie de synthèse retenue est une hémisynthèse à partir de la vitamine D<sub>2</sub> dont le triène sera protégé sous forme d'adduit de l'anhydride sulfureux.

L'haptène 20-COOH-23,24,25,26,27-pentanorvitamine D sera la première cible à synthétiser et nous servira de référence pour la préparation et l'évaluation de nouveaux immunogènes et traceurs.

Les haptènes seront couplés sur la BSA et les immunogènes ainsi synthétisés serviront, dans un deuxième temps, pour des campagnes d'immunisations sur des lapins, des souris et des rats.

Dans le cas des souris et des rats immunisés, l'objectif est d'accéder à des anticorps monoclonaux à partir des animaux dont les immunosera testés en titre et en déplacement présenteront des caractéristiques similaires pour les deux gammes d'analytes à doser : la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et 25-OH vitamine D<sub>3</sub>.

Les concentrations sériques en 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> se situant de 2 ng/mL à des concentrations au-delà de 100 ng/mL, une concentration en 25-OH vitamine D de 20 ng/mL permettant un déplacement de 50% de la radioactivité (IC<sub>50</sub>) serait un bon compromis.

Enfin, il faudra envisager les problèmes d'inhibition des interférences liées à la DBP sérique des échantillons à doser qui lie très fortement la 25-OH vitamine D lors de dosages directs.



---

# **SYNTHESE ORGANIQUE : PREPARATION DES HAPTENES**

---



## Chapitre II – Synthèse organique : préparation des haptènes, immunogènes et traceurs

Afin de préparer des haptènes de la vitamine D qui seront couplés soit sur une protéine immunogénique, soit à une molécule précurseur susceptible d'être marquée radioactivement, ou qui pourront être transformés en marqueurs d'affinité, la chaîne latérale de la vitamine D<sub>2</sub> doit être fonctionnalisée chimiquement.

La méthode proposée est une hémisynthèse directement à partir de la vitamine D<sub>2</sub> **1**, commercialement disponible en grande quantité. Comme cela a été exposé dans la bibliographie (voir § I.6.1 Synthèses totales), une synthèse totale serait possible, mais avec un trop grand nombre d'étapes.

La voie proposée a l'avantage de conserver de nombreuses étapes de chimie communes ou transposables entre les haptènes ou autres dérivés fonctionnalisés sur la chaîne latérale.

### II.1 Voies d'accès aux 5 immunogènes préparés

#### II.1.1 Voie commune et étapes transposables

La fonctionnalisation de la chaîne latérale de la vitamine D passe par le clivage de la double liaison 22(23) de la vitamine D<sub>2</sub> par une réaction d'ozonolyse sélective. Or cette double liaison est moins réactive que le triène de la vitamine D, ce qui oblige à protéger ce dernier ainsi que l'alcool secondaire présent en position 3.

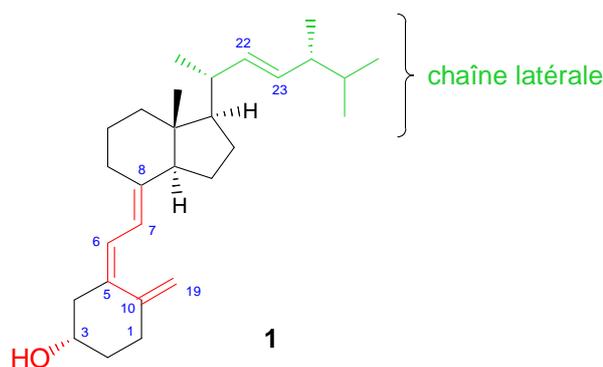
La déprotection du triène pour revenir à une géométrie de type vitamine D, nécessite deux étapes :

- la déprotection thermique qui donne des dérivés du type *trans*-vitamine D pour lesquels le triène, à nouveau visible en UV à 271 nm, et comporte la double liaison 5(6) de géométrie *trans* ou *E*,
- une réaction de photoisomérisation pour régénérer des dérivés de structure vitamine D, absorbant dans l'UV à 264 nm.

D'autres détails liés à la synthèse de produits particuliers seront explicités au fur et à mesure de la description du déroulement des synthèses des haptènes de la vitamine D.

##### II.1.1.1 Protection du triène et de l'alcool

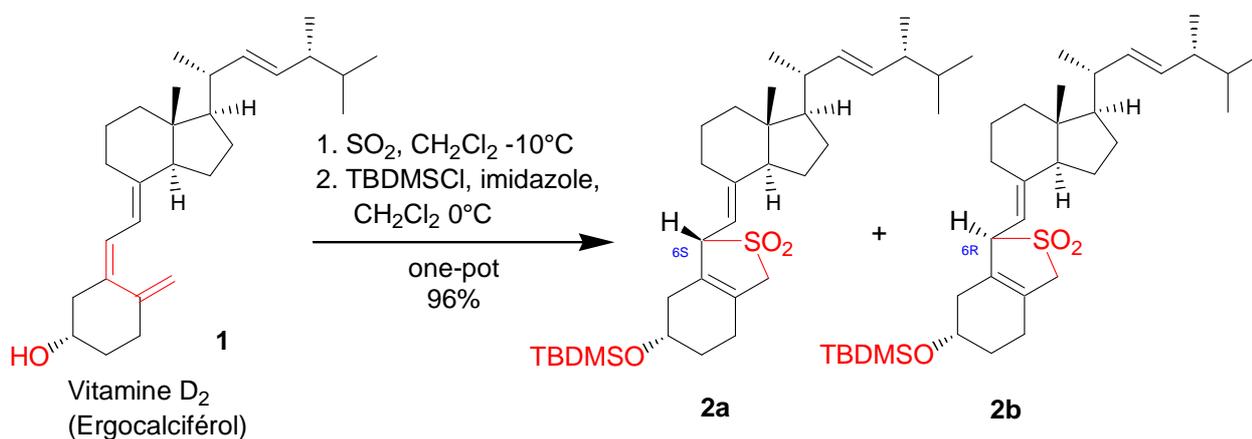
La fonctionnalisation de la chaîne latérale a été effectuée par une étape d'ozonolyse sélective de la double liaison 22(23). Pour cela, il faut auparavant protéger le triène constitué des double liaisons 10(19),5(6),7(8) et protéger l'alcool secondaire porté par le carbone 3. (Figure 19)

Figure 19 : vitamine D<sub>2</sub> (ergocalciférol)

Pour ces deux protections « one-pot », les réactions employées sont décrites dans la littérature pour la vitamine D<sub>2</sub>.<sup>70</sup> Le blocage du triène est réalisé par cycloaddition [4+1] de l'anhydride sulfureux (SO<sub>2</sub>) liquide à -10°C dans le dichlorométhane anhydre sur le diène 10(19),5(6). Le produit brut de la réaction est ensuite soumis à une silylation de l'alcool à 0°C par le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle en présence d'imidazole pour donner l'adduit-SO<sub>2</sub> silylé en position 3 avec d'excellents rendements (>96%). Le produit obtenu se présente sous forme de deux isomères en raison de la régiosélectivité de la cycloaddition de l'anhydride sulfureux sur les 2 faces présentées par la vitamine D<sub>2</sub>. (Figure 20)

Ces 2 épimères 6(*S*) et 6(*R*) sont obtenus dans des proportions équivalentes après analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H de ces adduits en série vitamine D<sub>2</sub> (singulet, 18-CH<sub>3</sub> : 6(*S*) ; δ 0,66 et 6(*R*) ; δ 0,57), conformément aux données de la littérature. Ils peuvent toutefois être séparés sur colonne de silice et par CCM, l'isomère 6(*S*) **2a** étant moins polaire que l'isomère 6(*R*) **2b**.<sup>71</sup>

Les premières synthèses, au laboratoire, à partir de la vitamine D<sub>2</sub> protégée ont été réalisées sur un des deux isomères purifiés par flash-chromatographie sur silice afin de pouvoir facilement contrôler la structure des produits par CCM et par RMN. Par la suite, lorsque les produits des différentes réactions sont bien identifiés, les synthèses sur des plus grandes quantités sont effectuées sur le mélange des épimères des adduits-SO<sub>2</sub>, pour lesquels aucune différence de réactivité n'a pu être décelée.

Figure 20 : Protection de la vitamine D<sub>2</sub>

### II.1.1.2 Clivage oxydatif de la double liaison 22(23)

L'ozonolyse est une méthode de clivage oxydatif des doubles liaisons carbone-carbone engendrant une coupure entre les deux carbones. Les conditions opératoires les plus utilisées consistent à faire réagir

<sup>70</sup> Choudhry, S. C.; Belica, P. S.; Coffen, D. L.; Focella, A.; Maehr, H.; et al. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1496-1500. Andrews, D. R.; Barton, D. H. R.; Hesse, R. H.; Pechet, M. M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4819-4828. Ando, K.; Koike, F.; Kondo, F.; Takayama, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 189-192.

<sup>71</sup> Calverley, M. J. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4609-4619.

l’ozone (O<sub>3</sub>) à -78°C dans le dichlorométhane ou le méthanol pour donner deux aldéhydes ou/et cétones en fonction des substituants présents sur la double liaison, après réduction de l’ozonide intermédiaire par le zinc, la triphénylphosphine, le diméthylsulfure ou d’autres réducteurs (Figure 21).

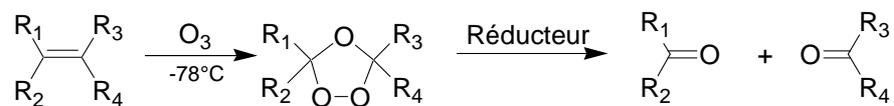


Figure 21 : Ozonolyse classique

Les aldéhydes sont souvent des produits instables et difficiles à conserver sans dégradation. Des variantes d’ozonolyse existent, aboutissant à deux alcools au lieu de deux aldéhydes ou/et cétones par une réduction supplémentaire au borohydrure de sodium par exemple ou encore à deux esters méthyliques par utilisation de soude méthanolique lors de la réaction.<sup>72</sup> (Figure 5)

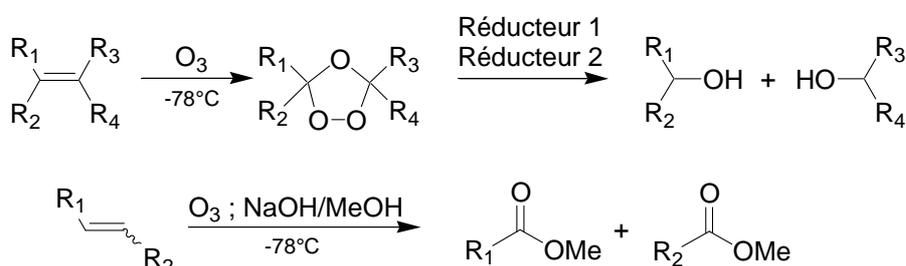


Figure 5 : Autres ozonolyses

Le choix parmi l’une de ces réactions s’effectue en fonction du produit désiré.

L’ozonolyse de la vitamine D<sub>2</sub> protégée **2a** et **2b**, pose un problème supplémentaire, trois double liaisons sont présentes dans la molécule (Figure 22), la plus réactive est bien la 22(23) du fait de la perte de conjugaison du triène de la vitamine D par le SO<sub>2</sub> qui donne des adduits dont les double liaisons 7(8) et 5(10) sont probablement moins réactives grâce à l’effet électroattracteur du SO<sub>2</sub> et de l’encombrement qu’il génère.

La réaction nécessite un suivi attentif pour ne pas cliver les deux autres doubles liaisons. Un arrêt de l’ozonolyse lorsque le milieu réactionnel se colore en bleu (une solution d’ozone dans le dichlorométhane est bleue) signifierait que la stœchiométrie est dépassée suite à l’ozonolyse complète de toutes les double liaisons du produit.

<sup>72</sup> Marshall, J. A.; Garofalo, A. W. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3675-3680. Trost, B. M.; Ariza, X. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10727-10737.

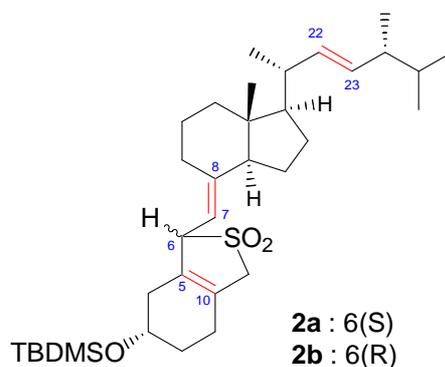


Figure 22 : Double liaisons de la vitamine D<sub>2</sub> protégée sensibles à l'ozonolyse

La quantité d'ozone ajoutée est difficile à maîtriser : sa concentration dans l'air à la sortie de l'ozoneur est approximative. Une élégante alternative à un suivi CCM long et fastidieux consiste à introduire dans le milieu réactionnel un colorant changeant de couleur à la fin de l'ozonolyse de la double liaison 22(23) mais avant l'ozonolyse des autres double liaisons.<sup>73</sup> Cette méthode n'a jamais été décrite dans le cas de la vitamine D<sub>2</sub>. Le « Reactive Blue 2 » (C.I. 61211, Procion Blue HB, Figure 23) remplit ces conditions ; de plus, sa forte polarité permet de l'éliminer par une filtration sur silice en fin de réaction ou lors des extractions. Bleu en solution aqueuse ou méthanolique, il vire au jaune lorsqu'il réagit avec l'ozone, d'où une couleur de virage verte.

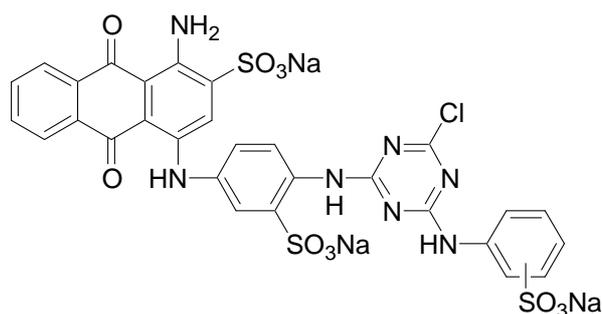
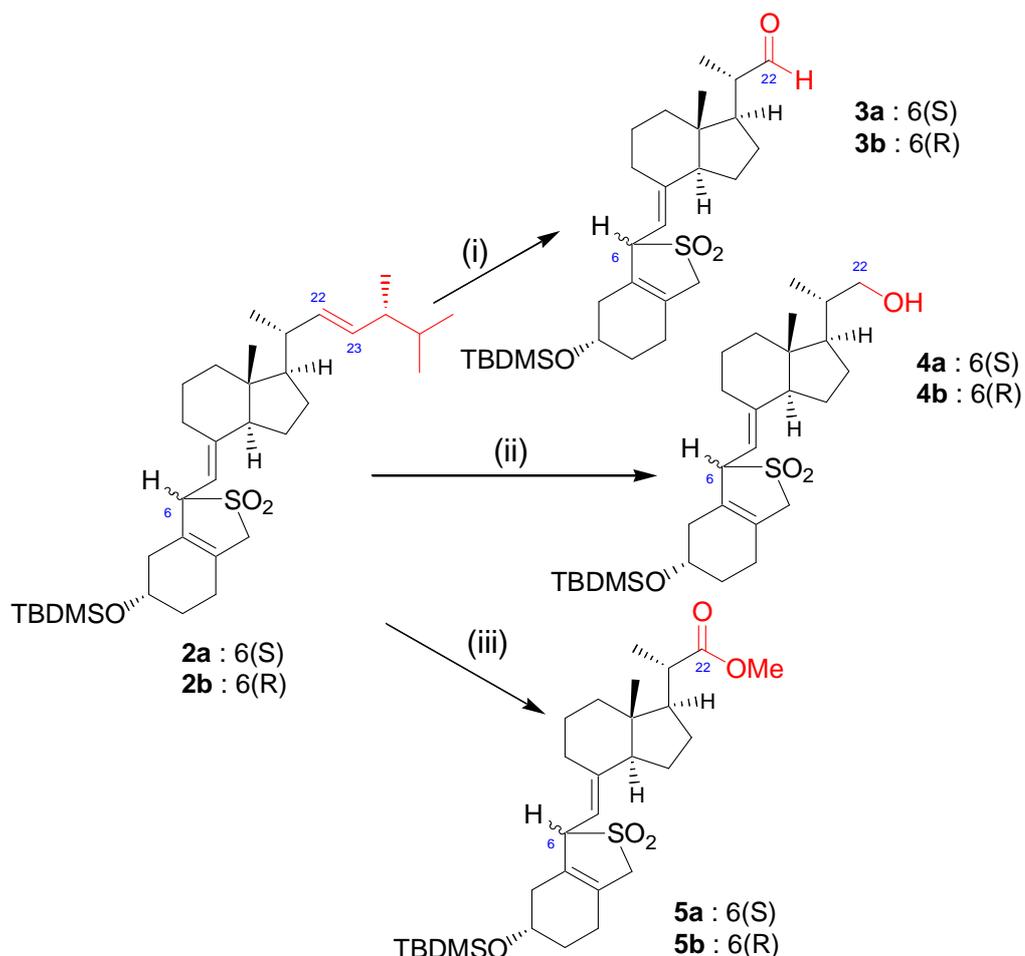


Figure 23 : Structure du Reactive Blue 2 (Procion Blue HB)

Trois produits issus des trois types d'ozonolyse mentionnés précédemment ont pu être isolés : l'aldéhyde **3**, l'alcool **4** et l'ester **5**, soit sous forme d'un seul isomère (**a** ou **b**) soit sous forme de mélange d'épimères de l'adduit-SO<sub>2</sub> (**a** et **b**). (Figure 24)

<sup>73</sup> Veysoglu, T.; Mitscher, L. A.; Swayze, J. K. *Synthesis* **1980**, October, 807-810.



(i) 1. O<sub>3</sub>, Reactive Blue 2/MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> -78°C. 2. PPh<sub>3</sub>. (ii) 1. O<sub>3</sub>, Reactive Blue 2/MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> -78°C. 2. PPh<sub>3</sub>. 3. NaBH<sub>4</sub>, MeOH, eau. (iii) 1. O<sub>3</sub>, NaOH/MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> -78°C. 2. PPh<sub>3</sub>.

Figure 24 : Méthodes d'ozonolyse et produits obtenus

L'étape d'ozonolyse de la double liaison 22(23) a fait l'objet d'optimisations au fur et à mesure de la réparation de l'aldéhyde **3**, de l'alcool **4** ou de l'ester **5**. Ainsi, l'aldéhyde **3a** a pu être préparé avec des rendements supérieurs à 91% et l'alcool **4** avec des rendements quasi quantitatifs.

L'analyse RMN plus approfondie des produits d'ozonolyse en présence de soude méthanolique a révélé que le produit secondaire obtenu lors de la réaction n'est pas l'épimère en 20 de l'ester **5a**, mais l'aldéhyde **3a**, problème souvent rencontré avec ce mode opératoire (Figure 25).<sup>74</sup>

<sup>74</sup> Griesbaum, K.; Neumeister, J. *Chem.Ber.* **1982**, *115*, 2697-2706.

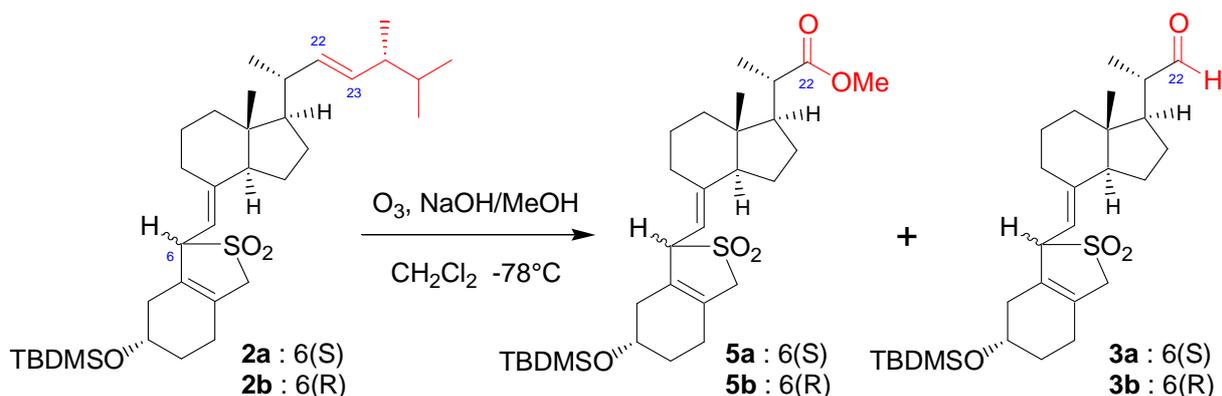
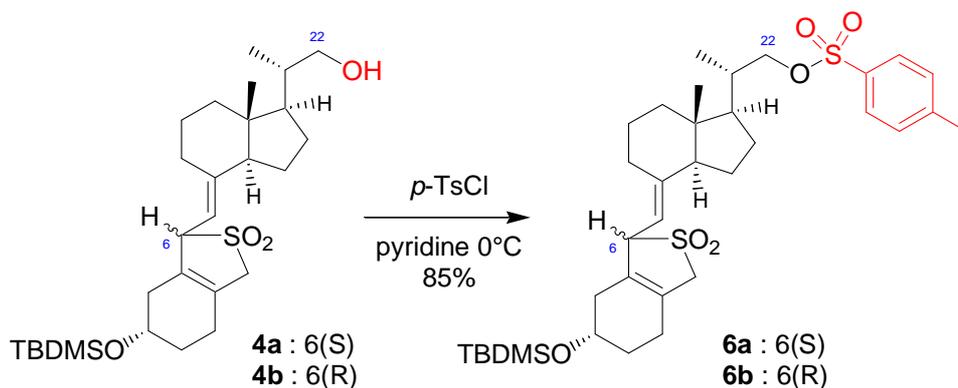


Figure 25 : Ozonolyse en présence de soude méthanolique

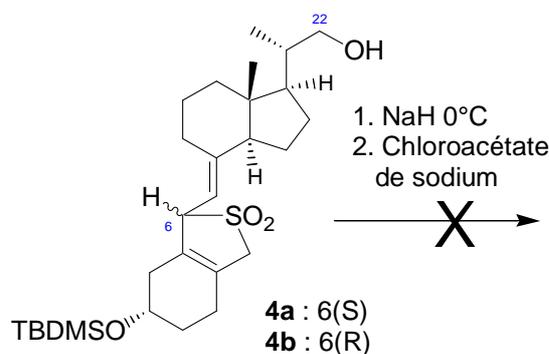
De plus, l'indicateur de fin de réaction ne peut être employé du fait du jaunissement du milieu réactionnel en présence d'ozone. Cette méthode d'ozonolyse n'est pas exploitée pas la suite.

### II.1.1.3 Utilisation de l'alcool 6

L'alcool **4** ne peut pas être directement couplé à la BSA. L'option retenue est un rallongement de la chaîne impliquant soit l'alkylation de l'alcool **4** soit une  $S_N2$  sur le tosylate **6** de l'alcool **4** avec un thiol par exemple. Le tosylate est obtenu par réaction du chlorure de *para*-toluènesulfonyle (*p*-TsCl) sur l'alcool **4** dans la pyridine. (Figure 26)


 Figure 26 : Tosylation de l'alcool **6**

Les essais d'alkylation par déprotonation de l'alcool **4** avec l'hydrure de sodium ou l'hydroxyde de tétrabutylammonium puis condensation avec le chloroacétate de sodium, l'acide iodoacétique ou l'iodoacétate de lithium n'ont abouti à aucun résultat exploitable, probablement à cause du manque de solubilité des sels dans le THF et de la déprotection des adduits-SO<sub>2</sub> lors de tout chauffage du milieu réactionnel qui donnent des mélanges inextricables de produits.



L'utilisation du tosylate **6** pour des réactions de  $S_N2$  pose le même problème que pour l'alcool précurseur : l'adduit-SO<sub>2</sub> se déprotège si le milieu réactionnel est chauffé. La  $S_N2$  par l'acide 4-mercaptobenzoïque, composé suffisamment réactif, a permis d'accéder au thioéther correspondant, détecté par spectroscopie de masse.

Les réactions d'alkylation ou de  $S_N2$  sur des substrats du type adduits-SO<sub>2</sub> n'ont pas été poursuivies de par leur instabilité thermique. En revanche, les réactions de  $S_N2$  sur un tosylate de la vitamine D seront décrites plus loin sur un produit plus en aval de la synthèse, ayant déjà été déprotégé au niveau du triène mais aussi photo-isomérisé.

#### II.1.1.4 Déprotection du triène et photo-isomérisation

La déprotection du triène sur un dérivé de type adduit-SO<sub>2</sub> **7** par chauffage dans l'éthanol en présence d'une suspension de bicarbonate de sodium ne pose pas de problème avec l'alcool **4**. En revanche, on observe l'apparition de nombreux sous-produits avec l'aldéhyde **3**, malgré l'utilisation d'éthanol pour limiter l'épimérisation au niveau du carbone 20.<sup>75</sup>

Sur l'alcool **4**, la déprotection du triène engendre le *trans*-triènole **8** (R = CH<sub>2</sub>OH) qui peut être photoisomérisé par irradiation à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure au travers d'un tube Corex<sup>®</sup>, filtrant une partie des UV de basses longueur d'ondes, pour donner le triènole **9** (R = CH<sub>2</sub>OH) de stéréochimie identique à la vitamine D. (Figure 27)

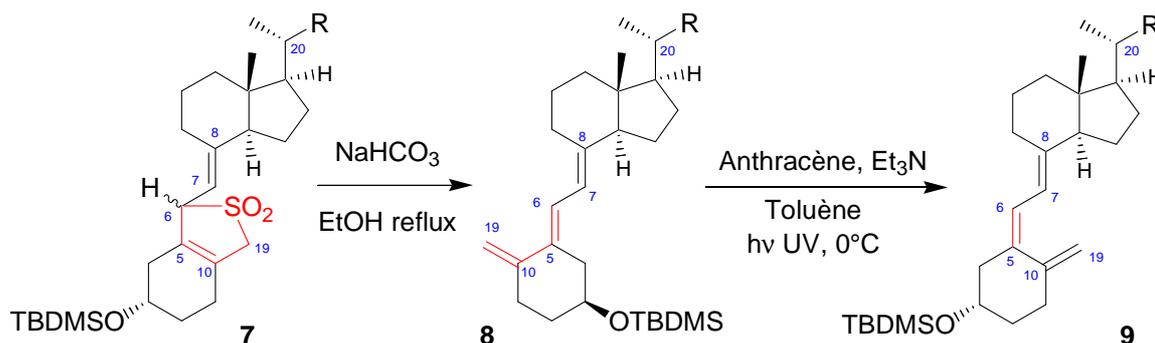


Figure 27 : Déprotection du triène et photo-isomérisation

Chacun des isomères du triène de la vitamine D possède un maximum d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ) dans l'ultra violet qui lui est propre et reflétant la planéité de l'enchaînement des trois doubles liaisons. Les dérivés de même structure que la vitamine D ont un  $\lambda_{\max}$  à 264,4 nm, alors que les isomères 5(*E*) (5(6)-*trans*), obtenus après la déprotection thermique du triène, ont un  $\lambda_{\max}$  à 271,1 nm.

<sup>75</sup> Calverley, M. J. *Tetrahedron* **1987**, 43, 4609-4619.

### II.1.1.5 Déprotection de l'alcool

Les groupements protecteurs *tert*-butyldiméthylsilyle peuvent être sélectivement clivés par l'ion fluorure pour redonner l'alcool **10** (Figure 28). Les sources de fluorure les plus couramment utilisées sont le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF), l'acide fluorhydrique aqueux concentré mis en solution dans un solvant (acétonitrile, THF par exemple), le fluorure de pyridinium, ...

Le choix de l'utilisation de HF par rapport au TBAF est lié à la stabilité des produits à déprotéger. HF est un acide faible, donc en équilibre avec sa forme ionique, ce qui a pour conséquence de le rendre moins nucléophile et donc moins réactif que le TBAF qui, lui, est basique.

HF devra être utilisé plus concentré dans le THF.

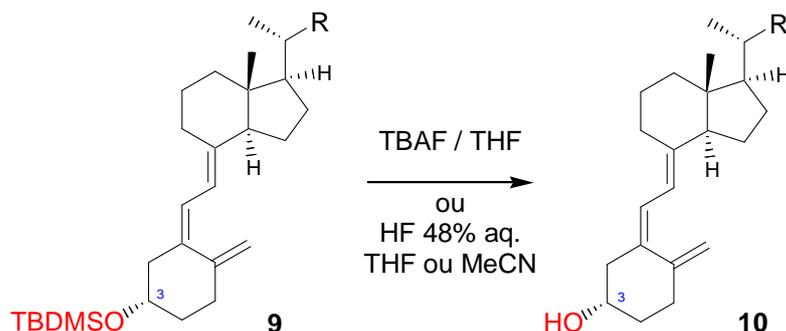


Figure 28 : Déprotection de l'alcool

Sauf dans le cas particulier des produits très polaires (histaminés) et donc peu solubles dans les solvants d'extraction tels que l'acétate d'éthyle, le diéthoxyde ou méthyl-*tert*-butyle oxyde (MTBE), il est préférable d'utiliser le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) qui réagit rapidement et sans dommage sur l'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle à déprotéger. En effet, les sels de tétrabutylammonium ne sont pas solubles dans ces solvants d'extraction et sont éliminés dans les phases aqueuses lors des extractions. Dans le cas de produits très polaires, qui ne sont solubles que dans le dichlorométhane qui solubilise également les sels de tétrabutylammonium, l'emploi de l'acide fluorhydrique entraîne une déprotection plus longue, mais le traitement du brut réactionnel est plus simple.

### II.1.2 Immunogène de la 20-COOH vitamine D

Le premier immunogène ciblé est le conjugué **22** de la 20-COOH de la vitamine D avec la BSA. La structure de son haptène est la plus courte possible et servira de référence par la suite pour comparer les anticorps obtenus après les immunisations.

Pour accéder au dérivé 20-COOH, plusieurs voies sont possibles, toutes en partant d'un produit d'ozonolyse de la double liaison 22(23), c'est-à-dire une vitamine D protégée dont la chaîne latérale tronquée est terminée soit par une fonction alcool, soit par une fonction aldéhyde, soit par une fonction ester méthylique.

Il faut noter la description dans la littérature d'un composé similaire au 1<sup>er</sup> haptène envisagé : la 20-COOMe vitamine D **12**.<sup>76</sup> Elle est obtenue avec un rendement global de 15% par photo-conversion de l'acide 3 $\beta$ -acétoxy-22,23-dinor-5-cholen-24-oïque **11** (Figure 29), selon une approche beaucoup moins polyvalente que celle choisie dans ce travail.

<sup>76</sup> Kutner, A.; Perlman, K. L.; Lago, A.; Sicinski, R. R.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3450-3457. Kutner, A.; Perlman, K. L.; Sicinski, R. R.; Phelps, M. E.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6129-6132.

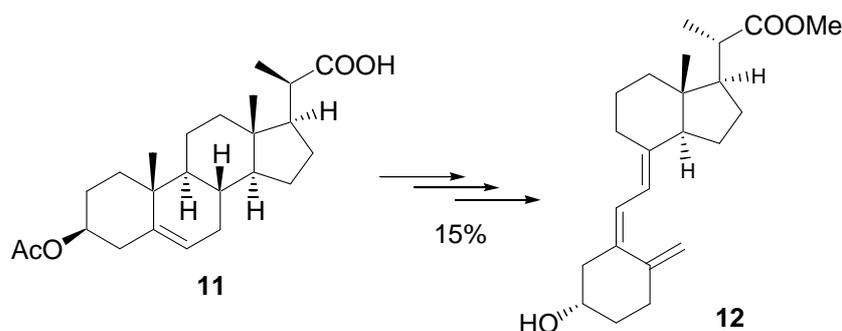


Figure 29 : Voie d'accès à l'ester méthylique **12** du 1<sup>er</sup> haptène par ouverture du cycle B

### II.1.2.1 Oxydation de l'alcool 4

Afin d'atteindre l'acide **13a** (ou **13b**), l'alcool **4a** (ou **4b**) doit être oxydé en acide carboxylique correspondant (Figure 30).

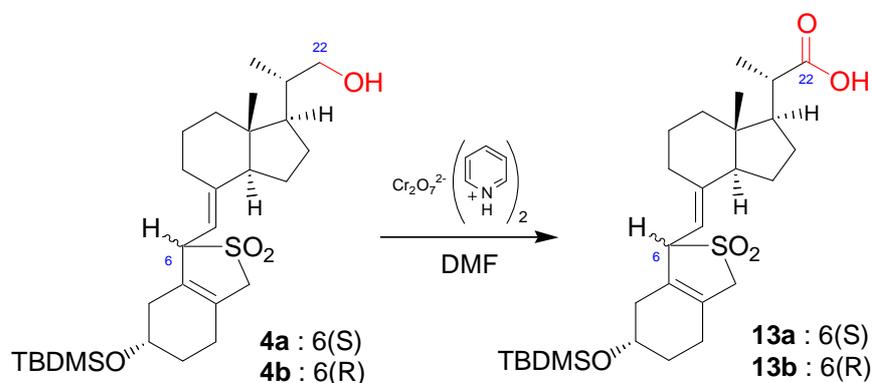


Figure 30 : Oxydation de l'alcool **4** en acide **13**

Diverses méthodes d'oxydation ont été testées :

- ☞  $\text{KMnO}_4$  (1 éq.)<sup>\*</sup>,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  33% (1gtte) ; acétone,  $c=0,2$  M,  $0^\circ\text{C}\rightarrow\text{Ta}$
- ☞  $\text{KMnO}_4$  (1 éq.)<sup>\*</sup>, 18-crown-6 (1 éq.),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  33% (1 gtte) ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $c=0,2$  M,  $0^\circ\text{C}\rightarrow\text{Ta}$ , 24 h
- ☞ Réactif de Jones (2 à 4 éq.)<sup>\*</sup> ; acétone,  $c=0,1$  M,  $-10^\circ\text{C}$ , 10 min à 1 h
- ☞ PDC (2,2 éq.)<sup>\*</sup> ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $c=1$  M ; pyridine,  $c=0,1$  M,  $0^\circ\text{C}\rightarrow\text{Ta}$
- ☞ PDC (5 éq.)<sup>\*</sup> ; DMF,  $c=0,2$  M,  $-5^\circ\text{C}\rightarrow\text{Ta}$ , 18 h

Les méthodes classiques d'oxydation (permanganate de potassium en milieu acide dans l'acétone ou dans le dichlorométhane avec un éther couronne permettant sa solubilisation<sup>77</sup>) n'ont pas donné de résultat positif : le permanganate est réduit sans que l'alcool **4** soit oxydé.

L'utilisation du réactif de Jones<sup>78</sup> (oxyde de chrome  $\text{CrO}_3$  dans l'acide sulfurique aqueux) dans l'acétone donne un produit majoritaire très polaire en CCM qui après analyse par RMN révèle la perte du groupe protecteur *tert*-butyldiméthylsilyle et un nombre trop important de carbones quaternaires.

Le dichromate de pyridinium (PDC), oxydant plus doux que le réactif de Jones, ne donne aucun résultat dans la pyridine et le dichlorométhane comme co-solvant. En revanche l'utilisation de DMF comme solvant conduit à l'acide **13a** (ou **13b**).<sup>79</sup> Les conditions utilisées entraînent un traitement assez lourd du brut réactionnel (fort excès de PDC dilué dans le DMF). De plus, l'oxydation de l'alcool en

<sup>77</sup> Sam, D. J.; Simmons, H. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4024-4025.

<sup>78</sup> Bowden; Heilbron; Jones, E. *J. Chem. Soc.* **1946**, 39.

<sup>79</sup> Corey, E. J.; Schmidt, G. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 399-402.

acide se fait par le passage par l'aldéhyde, la réaction ne peut être suivie par la seule disparition de l'alcool, mais par l'apparition de l'acide.

Une solution consisterait à oxyder d'abord l'alcool **4** en aldéhyde **3** puis dans un deuxième temps l'aldéhyde en acide carboxylique **13**. Mais l'aldéhyde **3** étant obtenu directement par l'ozonolyse, les investigations sur l'oxydation de l'alcool **4** n'ont pas été poursuivies.

### II.1.2.2 Oxydation de l'aldéhyde 3

Parallèlement aux essais d'oxydation de l'alcool **4**, des essais d'oxydation de l'aldéhyde **3** ont été menés en tenant compte des résultats précédents. (Figure 31)

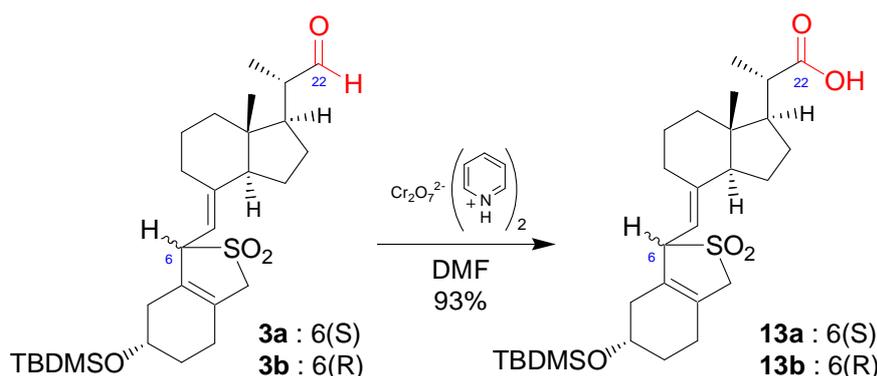


Figure 31 : Oxydation de l'aldéhyde **3** en acide **13**

Le réactif de Jones donne les mêmes résultats sur l'aldéhyde **3** que sur l'alcool **4** : les signaux du TBDMS disparaissent en RMN.

L'oxydation par le PDC dans le DMF stocké sur tamis moléculaire donne comme pour l'alcool **4**, l'acide **13a** (ou **13b**). La réaction est rapide mais semble difficile à mener à son terme : des traces d'aldéhyde persistent même lorsque le PDC est utilisé en large excès (8 équivalents molaires). Le traitement du milieu réactionnel est assez complexe du fait de la présence d'un large excès de PDC qui forme une glue noire et de DMF qui nécessite de nombreux lavages des phases organiques afin d'être éliminé. Les rendements de l'oxydation s'élèvent à 90%.

D'autres méthodes d'oxydation des aldéhydes en acides ont par la suite été testées, dont une oxydation par le système chlorure de ruthénium catalytique / périodate de sodium stœchiométrique<sup>80</sup> qui n'a pas donné de résultat positif, probablement à cause des doubles liaisons présentes sur le substrat et une oxydation au chlorite de sodium (NaClO<sub>2</sub>),<sup>81</sup> qui donne de très bons résultats mais ne fonctionne que sur les aldéhydes mais pas sur les alcools.

<sup>80</sup> Carlsen, P. H. J.; Katsuki, T.; Martin, V. S.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3936-3938.

<sup>81</sup> Haffner, C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4039-4042. Myles, D. C.; Danishefsky, S. J.; Schulte, G. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1636-1648. Dalcanale, E.; Montanari, F. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 567-569.

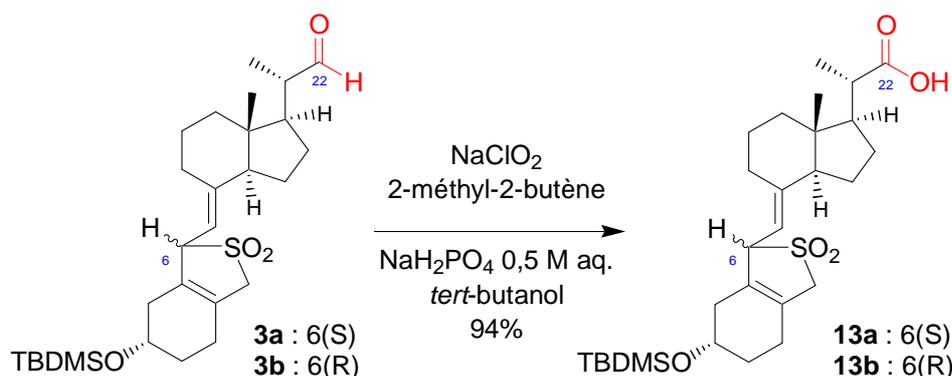


Figure 32 : Oxydation de l'aldéhyde **3** par le chlorite de sodium

L'oxydation de l'aldéhyde **3** par le chlorite de sodium ( $\text{NaClO}_2$ ) dans le dihydrogénophosphate de sodium 0,1 M aqueux et le *tert*-butanol en présence de 2-méthylbut-2-ène a permis d'obtenir, avec de très bons rendements de l'ordre de 94%, l'acide **13** qu'il faut alors purifier sur colonne de silice. (Figure 32)

Lors de cette réaction, le chlorite de sodium est l'oxydant, qui change de degré d'oxydation au cours de la réaction pour donner de l'hypochlorite de sodium (eau de Javel). Du fait du pH légèrement acide de la réaction, il y a un risque de dismutation de l'hypochlorite en chlore qui pourrait s'avérer dangereux pour la molécule, c'est pourquoi un piègeur de chlore est ajouté : le 2-méthylbut-2-ène.

La rapidité de réaction, la facilité du traitement du milieu réactionnel et les très bons rendements de cette réaction rendent l'utilisation du chlorite de sodium préférable à tout autre type d'oxydation.

### II.1.2.3 Déprotection du triène de l'acide **13a** (ou **13b**)

Les conditions de déprotection utilisées pour l'alcool **4** (voir § II.1.1.4 Déprotection du triène et photoisomérisation) ont été transposées pour l'acide **13**. (Figure 33)

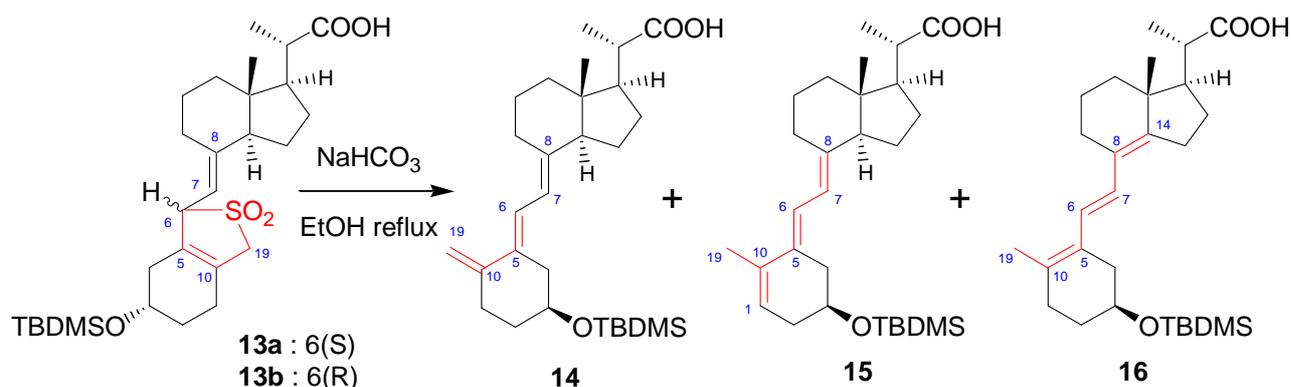


Figure 33 : Déprotection du triène du 20-COOH adduits- $\text{SO}_2$  **13a** et **13b**

Contrairement à la déprotection du triène de l'alcool **4**, la réaction est délicate pour l'acide **13a** et **13b**. La déprotection du triène à reflux de l'éthanol 96% dans une suspension de bicarbonate de sodium donne des résultats aléatoires. En effet, l'analyse rapide des spectres RMN des produits de la réaction montrent l'apparition en plus de l'acide du *trans*-triène **14**, des régio-isomères **15** et **16** du triène, respectivement de structures similaires à l'iso-vitamine D et à l'iso-tachystérol. (Figure 34)

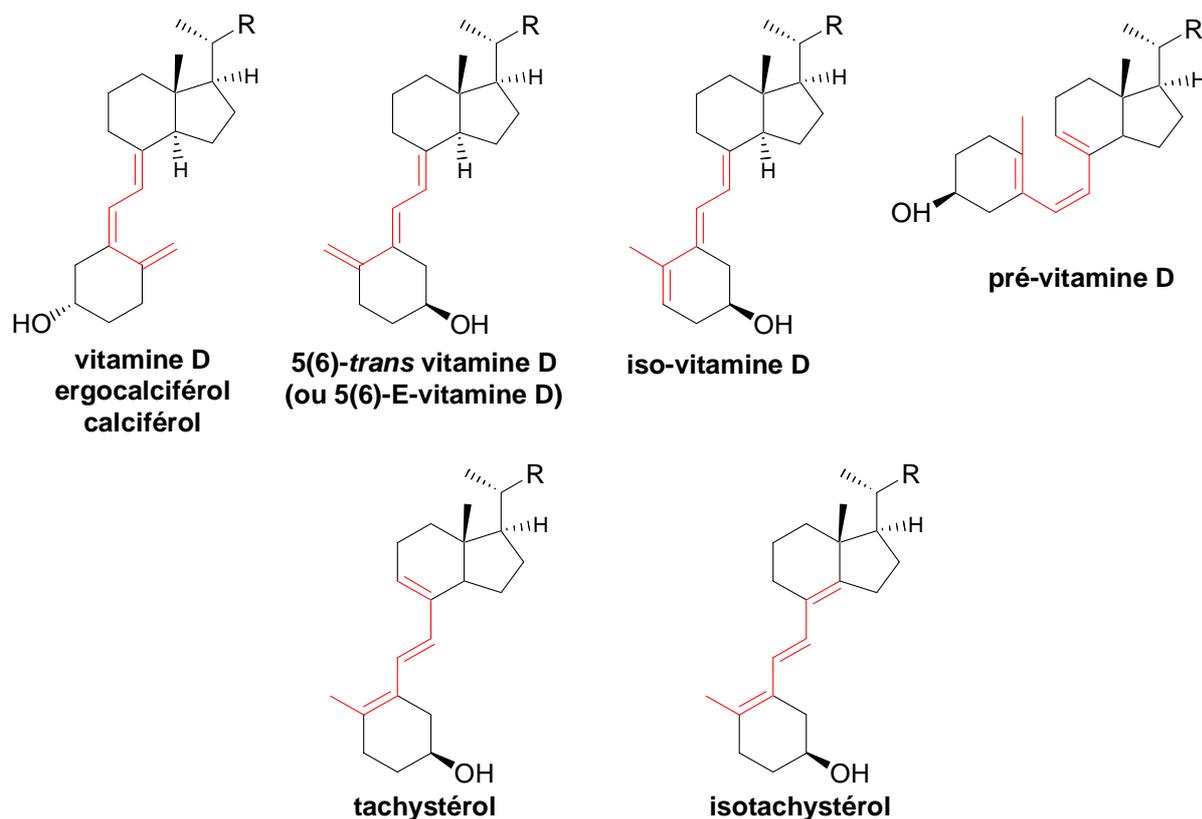


Figure 34 : Régio-isomères du triène

Le temps de réaction minimum se situerait aux alentours de 30 mn, il s'agit de la durée minimum pour la disparition quasi totale de l'adduit-SO<sub>2</sub>. Les rendements de déprotection sont très bons, s'il est fait abstraction de l'isomérisation du triène.

Andrews *et al.*<sup>82</sup> excluent toute réaction parasite en milieu basique dans un solvant polaire et expliquent que la présence des régio-isomères **15** et **16** par un réarrangement non-concerté par catalyse acide.<sup>83</sup> Ces régio-isomères avaient déjà été observés par Reischl et Zbiral lors de la déprotection dans le benzène à reflux.<sup>84</sup>

La présence de la fonction acide carboxylique de l'acide **13** pourrait effectivement interférer en l'absence d'un excès de base pour le déprotomer. Or le bicarbonate de sodium en suspension dans l'éthanol est présent en excès (7 éq.) et aurait dû permettre l'obtention de l'acide du *trans*-triène **14**, ce qui n'est pas tout le temps le cas.

Ces problèmes d'isomérisations intempestives amènent à se poser la question de l'influence d'un autre facteur.

Les isomères du triène ne sont pas séparables par CCM, les réactions sont donc menées en aveugle avec un contrôle par RMN après traitement de la réaction. Parallèlement, les chromatogrammes CLHP sont enregistrés sur une CLHP à barrettes de diodes afin de déterminer les conditions de séparation et le  $\lambda_{\max}$ , caractéristique de la géométrie du triène de chaque isomère, et pouvoir par la suite suivre la réaction par CLHP.

Ces problèmes d'isomérisations rencontrés lors de l'étape de déprotection du triène mais aussi lors de la photo-isomérisation du *trans*-triène, engendrent des difficultés supplémentaires lors de la

<sup>82</sup> Andrews, D. R.; Barton, D. H. R.; Hesse, R. H.; Pechet, M. M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4819-4828.

<sup>83</sup> Inhoffen, H. H.; Quinkert, G.; Hess, J. J.; Erdmann, H. M. *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 2273.

<sup>84</sup> Reischl, W.; Zbiral, E. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 1763.

purification du produit. En effet, la pureté des haptènes avant un couplage à la BSA (ou au précurseur de marquage par l'iode radioactif) est très importante, car elle conditionne en partie la spécificité des anticorps qui seront obtenus.

La présence des isomères du triène nécessite une première purification par flash-chromatographie puis une deuxième purification par CLHP préparative pour séparer les isomères.

L'analyse des bruts réactionnels par CLHP est une bonne méthode pour quantifier les isomères du triène. En effet, chaque configuration du triène possède un maximum d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ) propre : le *trans*-triène à 271,1 nm, le triène (cf vitamine D) à 264,4 nm et l'*iso*-triène à 287,7 nm. (Figure 35)

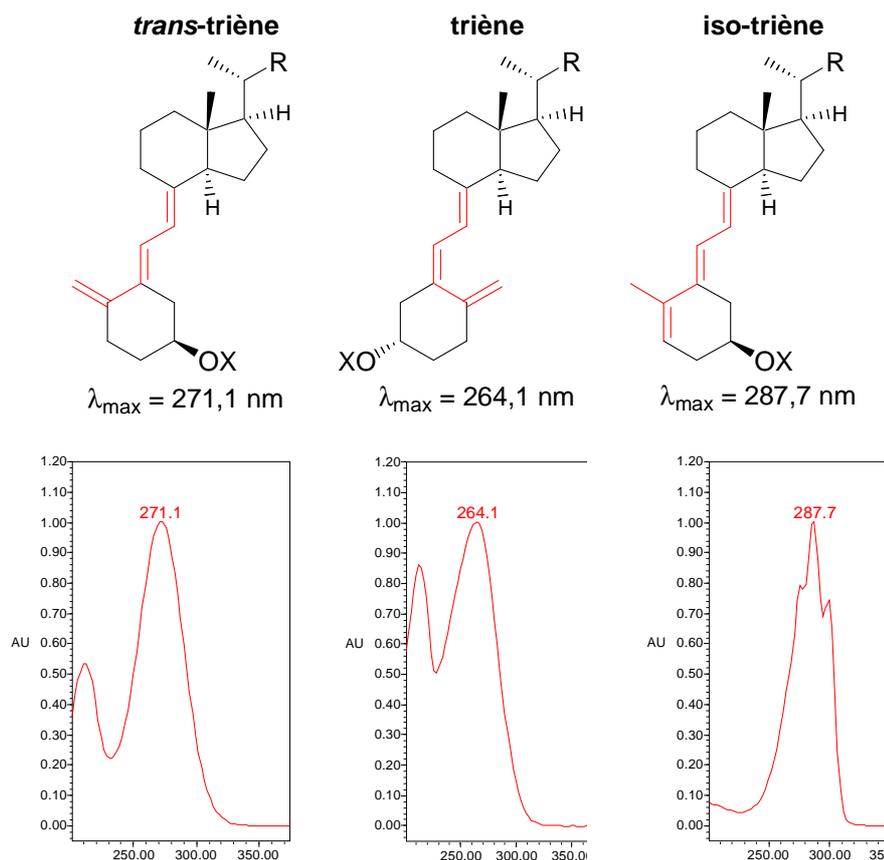


Figure 35 : Maximum d'absorption de chaque configuration du triène

Cette méthode d'analyse a permis de montrer qu'un produit de configuration correcte en fin de réaction (analyse CLHP) s'isomérisé au contact de la silice.

Cette observation confirme que l'acidité a une grande influence sur la stabilité du *trans*-triène et amène à se poser la question de l'efficacité de la déprotonation de l'acide carboxylique par le bicarbonate de sodium. La suspension de bicarbonate de sodium dans l'éthanol 96% est préalablement portée à reflux et dispersée par les ultra-sons, mais sans grande amélioration.

Après de nombreux tâtonnements, la déprotection du triène semble enfin maîtrisée dans les conditions opératoires suivantes (Figure 36) :

Les acides carboxyliques de l'adduit-SO<sub>2</sub> **13** sont dissous dans l'éthanol 96% et traités par une solution aqueuse de bicarbonate de sodium pour former le carboxylate de sodium **17**, basique. La solution est concentrée sous vide puis utilisée comme auparavant.

Lorsque ces conditions sont réunies, l'*iso*-triène est très minoritaire et le produit obtenu est bien le carboxylate de sodium du *trans*-triène **18** dans la bonne configuration.

Les différents produits de cette étape ne seront plus purifiés, mais utilisés en l'état pour la photo-isomérisation pour limiter au maximum le risque d'isomérisation.

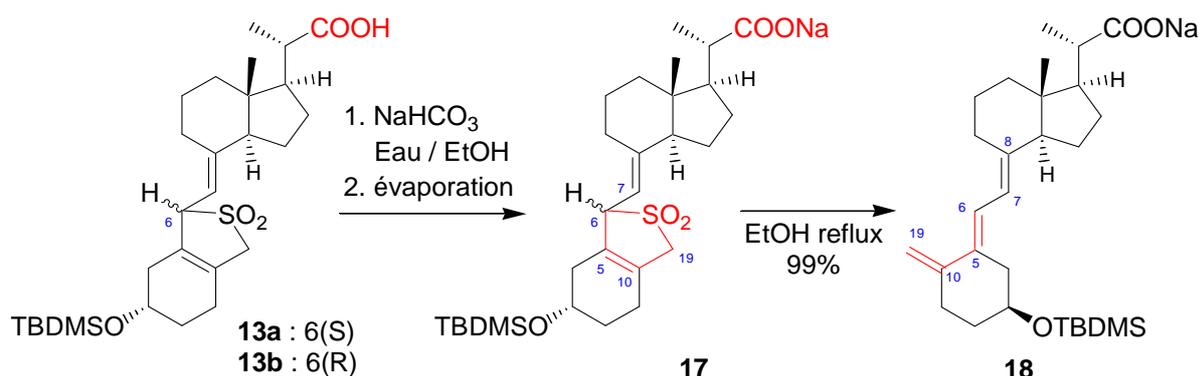


Figure 36 : Déprotection du triène

De manière générale, les méthodes usuelles de déprotection du triène donnent des résultats aléatoires, lorsque le substrat possède une fonction acide carboxylique. Mais les meilleurs résultats sont obtenus pour les dérivés déjà basiques (histaminé) ou avec déprotonation préalable de l'acide par transformation en sel de sodium. L'utilisation des ultra-sons avant le chauffage doit permettre de mieux disperser et solubiliser le bicarbonate de sodium.

#### II.1.2.4 Photo-isomérisation de l'acide du *trans*-triène 14

La photo-isomérisation du 20-COOH *trans*-triène 14 en 20-COOH triène 19 a été effectuée dans les conditions déjà expérimentées pour le passage du *trans*-triénol au triénol, dans le toluène à une concentration de 0,05 M et en présence de 0,4 équivalent d'antracène servant de photo-sensibilisateur. (Figure 37)

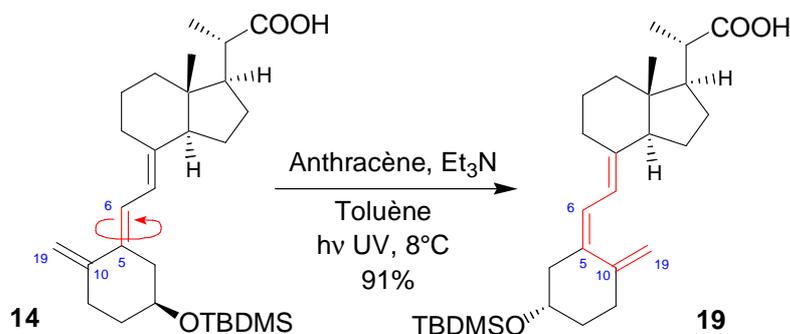


Figure 37 : Photo-isomérisation du 20-COOH *trans*-triène 14

L'influence de l'acidité lors de la phase de préparation de la photo-isomérisation met en cause, comme pour la déprotection du triène, l'extrême facilité d'isomérisation du triène par catalyse acide.

Lors de la photo-isomérisation, il est fréquent qu'un précipité apparaisse. Il s'agit probablement de l'antracène ajouté comme photo-sensibilisateur.

Pour les dérivés acides, la meilleure façon de procéder est la pré-solubilisation du sel carboxylate de sodium obtenu en fin de déprotection du triène dans le méthanol ou l'éthanol à 96%, puis dans le mélange de triéthylamine, d'antracène et de toluène. L'étape de pré-solubilisation dans un alcool

permet de conserver les traces basiques de bicarbonate de sodium et de faciliter la solubilisation des composés polaires et des sels carboxylates de sodium, peu solubles dans le toluène seul.

L'irradiation par la lampe à vapeur de mercure dure 3 heures ou plus, en tube Corex<sup>®</sup> filtrant les UV de basses longueurs d'ondes (<300 nm), et la température de réaction de 8°C évolue progressivement jusqu'à 25°C en fin de réaction, de par l'échauffement lié à la lampe.

A la suite de l'étape de photo-isomérisation, le triène a repris une configuration semblable à celle de la vitamine D et il n'est plus sensible au phénomène d'isomérisation par catalyse acide.

### II.1.2.5 Déprotection de l'alcool

Les premières réactions de déprotection de l'alcool en position 3 sous forme d'éther silylé **19** par le TBAF disponible dans le laboratoire se sont avérées longues, probablement à cause de la désactivation du TBAF par un séchage sous vide qui le dégrade. En effet, le TBAF n'est stable qu'en présence d'au moins un équivalent d'eau : en dessous de cette quantité, il se décompose.<sup>85</sup>

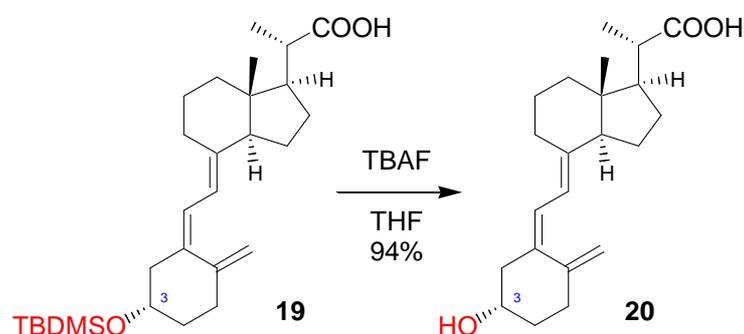


Figure 38 : Déprotection de l'alcool du 20-COOH triène **19**

La synthèse de la 20-COOH vitamine D **20** terminée, celle-ci a été reprise sur une plus grande quantité de produit afin d'atteindre le but précédemment fixé : l'obtention en quantité suffisante du premier immunogène de la vitamine D pour une première campagne d'immunisation de divers animaux (souris, rats, lapins et si besoin chèvres) à une échelle assez large. L'idée est de disposer au plus vite d'une base initiale de faisabilité de l'ensemble du projet à partir de la fonctionnalisation de vitamine D la plus simple, avant d'évaluer des stratégies immunochimiques plus complexes.

### II.1.2.6 Activation de l'acide carboxylique

Avant de le coupler à la BSA, l'acide doit être activé. Deux voies sont possibles (Figure 39) :

- L'activation par le DCC et couplage direct à la BSA. L'intermédiaire est très réactif et s'hydrolyse probablement partiellement dans les conditions du couplage (THF / NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M aqueux). De plus on ne connaît pas le comportement du dérivé de la vitamine D dans ces conditions. Il serait alors nécessaire de tester le produit de couplage avec l'histamine par exemple qui permettrait par la même occasion d'obtenir le premier dérivé à ioder homologue de cet immunogène.
- Le passage par l'ester activé du N-hydroxysuccinimide. Une étape supplémentaire est nécessaire. Le NHS est couplé à l'acide carboxylique activé par le DCC. L'ester activé intermédiaire peut être isolé, purifié, caractérisé et testé, puis couplé à la BSA.

<sup>85</sup> Sharma, R. K.; Fry, J. L. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2112-2114.

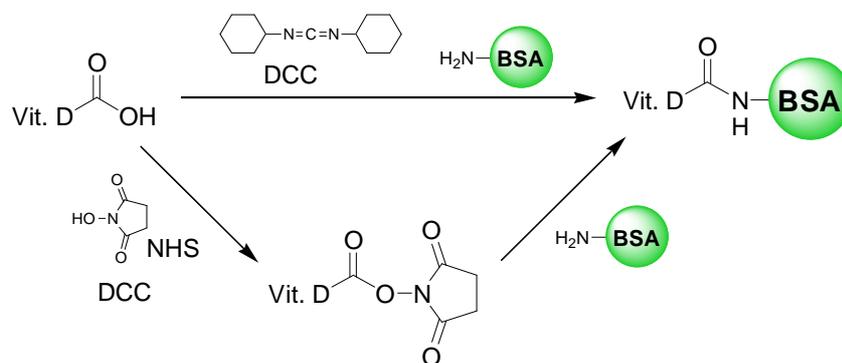


Figure 39 : Voies d'activation de l'acide

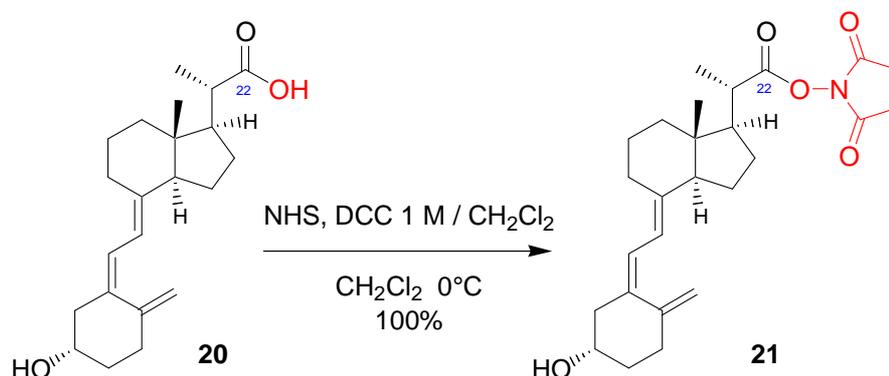
La deuxième voie est plus sûre et a fait ses preuves dans le laboratoire. L'ester activé est préparé à partir des dérivés 20-COOH avant et après photo-isomérisation.

L'activation du 20-COOH *trans*-triène **14** conduit à 100% d'iso-triène après 1 heure de réaction (analyse RMN), alors que le 20-COOH triène **19** donne l'ester de N-hydroxysuccinimide correspondant, sans apparition de sous-produit visible en RMN.

Il s'est avéré préférable de déprotéger l'alcool silylé avant la préparation de l'ester activé, ce dernier étant présumé non-réactif vis à vis des alcools secondaires comme cela a déjà été décrit pour d'autres stéroïdes.<sup>86</sup>

L'activation de la 20-COOH vitamine D **20** sous forme de 20-CO-NHS vitamine D **21** est la dernière étape de chimie avant le couplage peptidique sur la BSA (Figure 40). Il est préférable d'employer un ester activé NHS (ester de N-hydroxysuccinimide) pour plusieurs raisons :

- Un acide activé par le DCC seul, puis mis en présence de BSA en solution aqueuse s'hydrolyserait très rapidement en ne donnant pas des réactions reproductibles.
- Un acide activé sous forme d'ester NHS réagit en priorité sur les amines primaires et ne s'hydrolyse que très lentement dans l'eau.
- L'ester activé de la 20-COOH vitamine D **21** peut être purifié sur colonne de silice afin d'éliminer les sous-produits de l'activation : la dicyclohexylurée et les excès de réactifs, puis évaporé et stocké sec à  $-18^{\circ}\text{C}$ .


 Figure 40 : Ester activé **21** de la 20-COOH vitamine D **20**

L'activation de la 20-COOH vitamine D **20** se fait facilement avec des rendements quantitatifs.

<sup>86</sup> Pouzar, V.; Cerny, I. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1995**, *60*, 137-149. Idziak, I.; Gravel, D.; Zhu, X. X. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 9167-9170. Janout, V.; Lanier, M.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 640-647.

### II.1.2.7 Couplage à la BSA

La préparation du premier immunogène, le 20-CO-BSA vitamine D **22**, par couplage de la 20-CO-NHS vitamine D **21** sur la BSA (Figure 41) a été faite dans des conditions bien définies.

La BSA est préalablement dissoute dans un volume de solution aqueuse de bicarbonate de sodium, basique pour obtenir les epsilon-amines libres et réactives des lysines de la BSA. En effet, sur les 59 lysines présentes sur une BSA de 67000 Dalton ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), seulement 30 à 35 sont capables de réagir. Simultanément, ce milieu basique déprotone aussi les acides carboxyliques. Un demi-volume de THF est ajouté goutte à goutte, suivi de l'ester activé dissous dans un demi-volume de THF. Le milieu réactionnel final est donc constitué de 50% d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium et de 50% de THF.

Un tel protocole a pour but de placer la BSA dans les conditions du couplage où l'ester activé ne doit pas précipiter par manque de THF pour le solubiliser et où la BSA ne doit pas être dénaturée et précipitée par un ajout trop brutal ou trop important de THF.

La solubilisation de la BSA dans un milieu semi-organique composé de 50% de THF, miscible à l'eau, peut provoquer une dénaturation partielle de la protéine en cassant les liaisons faibles, responsables du repliement.<sup>87</sup>

Suivant les conditions de dilution du milieu réactionnel en fin de réaction et au cours des dialyses, la dénaturation est plus ou moins importante (BSA agrégée ou dimérisée). La forme dénaturée est elle aussi immunogénique mais dans de moindres proportions, probablement du fait de l'hétérogénéité des structures.<sup>88</sup>

Pour la vitamine D, si le couplage est effectué avec cette méthode, le milieu réactionnel reste limpide et la réaction homogène, ne donnant que peu ou pas de protéine dénaturée.

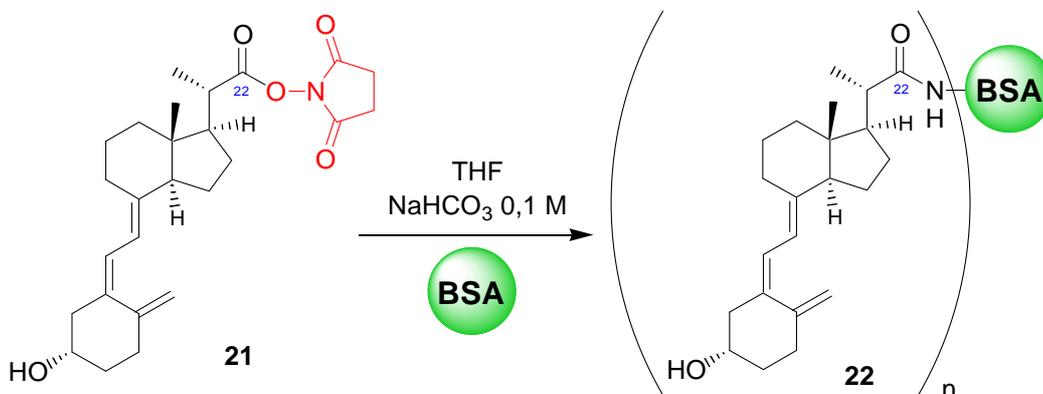


Figure 41 : Couplage de la 20-CO-NHS vitamine D **21** à la BSA

<sup>87</sup> Houen, G.; Svaerke, C.; Barkholt, V. *Acta Chem Scand* **1999**, 53, 1122-1126. Damodaran, S. *Biochim Biophys Acta* **1987**, 914, 114-121. Jacobson, A. L.; Krueger, P. J. *Biochim Biophys Acta* **1975**, 393, 274-283.

<sup>88</sup> Koch, C.; Jensen, S. S.; Oster, A.; Houen, G. *Apmis* **1996**, 104, 115-125.

Conditions	Remarques
Ester activé (25éq.) ; THF, c=50mg/mL, 28°C BSA déminéralisée (1éq.) ; NaHCO <sub>3</sub> 0,1M, c=25mg/mL ; THF, c=50mg/mL, 28°C 37,5h, 4°C 13,5h	Taux de couplage trop faible (3,4)
Ester activé (25éq.) ; THF, c=160mg/mL, 28°C BSA déminéralisée (1éq.) ; NaHCO <sub>3</sub> 0,1M, c=80mg/mL ; THF, c=160mg/mL, Ta, 22h	Taux de couplage trop faible (12-13)
Ester activé (50éq.) ; THF, c=160mg/mL, Ta BSA déminéralisée (1éq.) ; NaHCO <sub>3</sub> 0,1M, c=80mg/mL ; c=160mg/mL, Ta, 48h	
Ester activé (50éq.) ; THF, c=80mg/mL, Ta BSA déminéralisée (1éq.) ; NaHCO <sub>3</sub> 0,1M, c=40mg/mL ; THF, c=800mg/mL, Ta, 45h	Taux de couplage ≈15

Tableau 3 : Conditions de couplage de la 20-CO-NHS vitamine D **21** sur la BSA

Les deux premiers essais de couplage mettent en évidence l'influence de la concentration d'ester activé sur le taux de couplage, c'est à dire le nombre de molécules d'haptène couplées sur une BSA. Une fois ces deux paramètres ajustés, le couplage fonctionne sans encombre. (Tableau 3)

Le traitement du milieu réactionnel revêt une importance particulière, il faut purifier l'immunogène afin d'éliminer, notamment, les molécules de dérivés de vitamine D non couplées de manière covalente et le solvant.

Le brut réactionnel en fin de réaction est composé de l'immunogène, de NHS libre, d'ester activé n'ayant pas réagi ou hydrolysé en acide, le tout en solution dans un mélange 50/50 de bicarbonate de sodium 0,1 M et de THF. L'ensemble est dialysé trois fois contre une solution aqueuse de bicarbonate de sodium 0,1 M afin de séparer la protéine de la majorité des molécules de faible taille.

Il est important de diluer le milieu réactionnel dans une solution de même composition avant d'effectuer la première dialyse. Un milieu trop concentré provoque la dénaturation d'une partie de l'immunogène lors de la première dialyse, se traduisant par l'apparition d'un colloïde blanc à l'intérieur des sacs.

Le contenu du sac de dialyse est alors déposé sur une colonne de Sépharose<sup>®</sup> CL4B pour séparer l'immunogène à la fois de l'immunogène dénaturé et des restes d'haptène non couplé de manière covalente mais adsorbé sur la protéine.

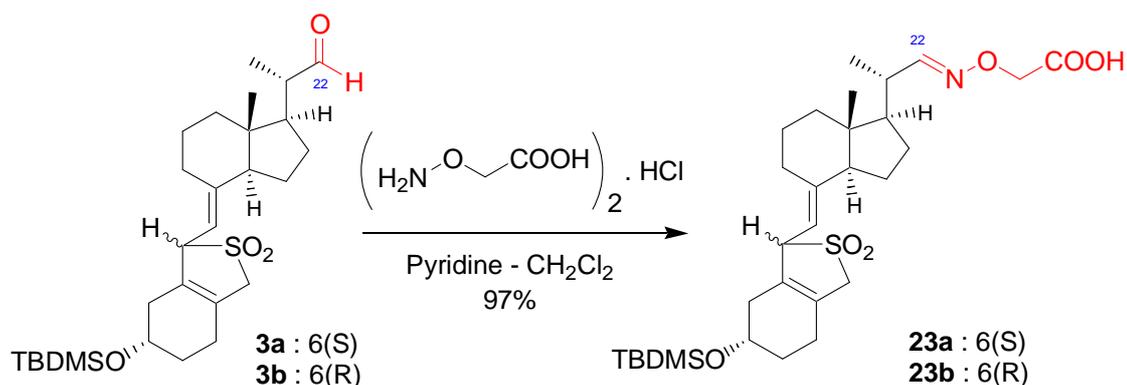
Une autre série de trois ou quatre dialyses contre de l'eau permet d'éliminer le bicarbonate de sodium avant la lyophilisation de la solution d'immunogène.

### II.1.3 Immunogène de la 22-CMO vitamine D

La préparation de dérivés 22-CMO vitamine D **27** (22-carboxyméthoxyloxime vitamine D), par condensation d'hémichlorhydrate de carboxyméthoxylamine sur le précurseur 20-aldéhyde **3** (voir § II.1.1.2 Clivage oxydatif de la double liaison 22(23)), a pour but d'obtenir d'un deuxième immunogène couplé par un chaînon court, rigide et non peptidique, potentiellement plus immunogénique que le dérivé initial.

#### II.1.3.1 O-Carboxyméthoxyloxime de l'aldéhyde 23 (22-CMO)

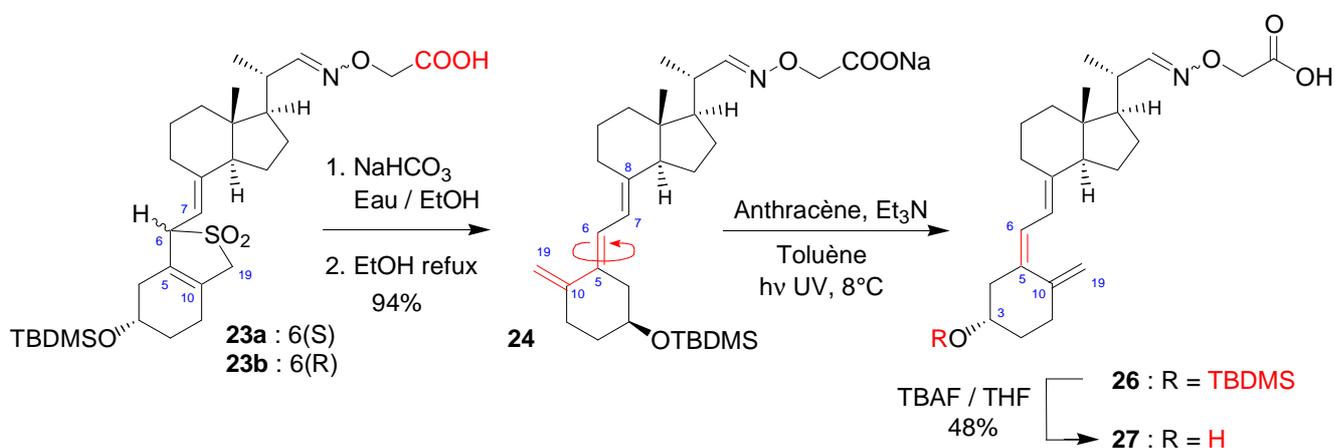
L'investigation d'un deuxième immunogène, le 22-CMO-BSA vitamine D **29**, passe par la réaction de l'hémichlorhydrate de carboxyméthoxylamine sur l'aldéhyde **3** en présence d'une base (la pyridine) et dans le dichlorométhane anhydre. (Figure 42)


 Figure 42 : Préparation du dérivé CMO **23** de l'aldéhyde **3**

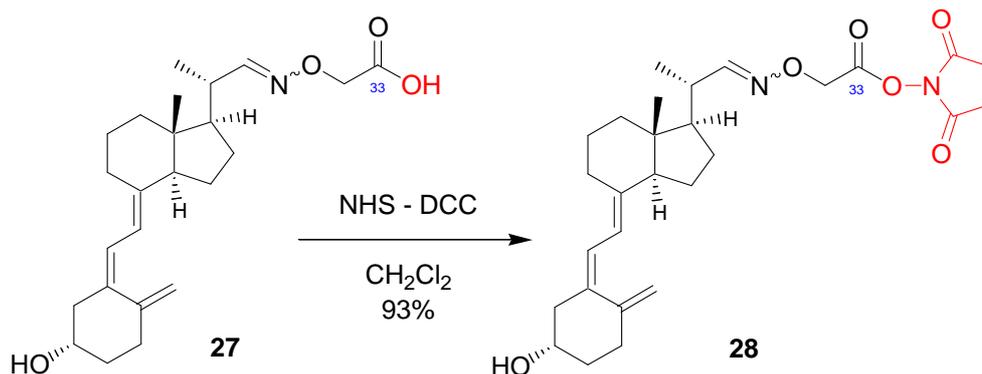
La réaction donne rapidement et proprement les produits 22-CMO **23** avec de très bons rendements de 97%. Aucune épimérisation au niveau du carbone 20 n'est visible. L'isomère (*E*) de l'oxime est majoritaire (76% par intégration des signaux RMN) contre 24% du deuxième isomère (*Z*) de l'oxime (voir § II.5 Analyse par RMN des dérivés de la vitamine D).

### II.1.3.2 Déprotection et photoisomérisation du triène du CMO **23**

Les étapes suivantes de déprotection thermique et de photoisomérisation du triène ont été effectuées dans les mêmes conditions que pour la préparation du 1<sup>er</sup> haptène 20-COOH vitamine D **20** précédemment décrit (voir § II.1.2.3 Déprotection du triène de l'acide **13a** (ou **13b**) et II.1.2.4 Photoisomérisation de l'acide du trans-triène **14**). La déprotection thermique fournit, après l'avoir débarrassé de l'excès de bicarbonate de sodium, le carboxylate de sodium **24** qui est photoisomérisé pour donner le 22-CMO triène **26** dont la géométrie du triène est semblable à celle de la vitamine D. (Figure 43)


 Figure 43 : Déprotection et photoisomérisation du triène du 22-CMO **23**

Par la suite, l'hydroxyle en position 3 est déprotégé par le TBAF pour donner le 2<sup>ème</sup> haptène : 22-CMO vitamine D **27**.

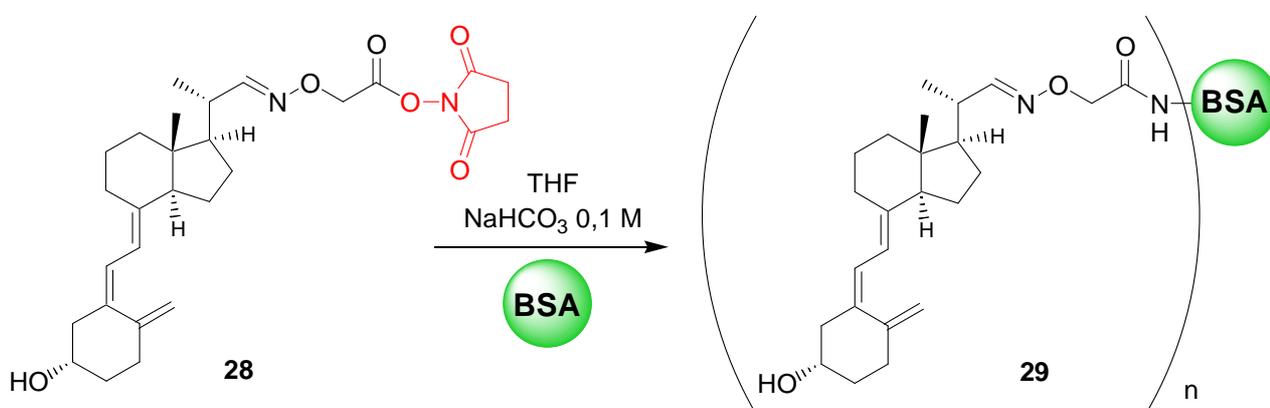
**II.1.3.3 Activation de l'acide carboxylique 27**Figure 44 : Activation de l'acide de la 22-CMO vitamine D **27**

L'activation de la fonction acide carboxylique du dérivé 22-CMO vitamine D **27** a été effectuée dans les mêmes conditions que pour la 20-COOH vitamine D **20** (Figure 44) :

A noter la présence systématique d'un produit polaire en CCM, même après purification sur colonne de silice, qui pourrait être un produit de dégradation, étant donné que l'ester activé **28** est plus réactif car moins encombré que celui de la 20-COOH vitamine D **21** ou plus simplement des restes de DCC qui s'hydratent pour donner de la dicyclohexylurée.

**II.1.3.4 Couplage à la BSA**

Les diastéréoisomères *E* et *Z* de l'oxime ne n'ont pas été séparés. Le couplage de l'ester de N-hydroxysuccinimide **28** à la BSA est donc effectué avec un mélange *E/Z* de 76/26.

Figure 45 : Couplage de la 22-CMO-NHS vitamine D **28** à la BSA

Conditions	Remarques
Ester activé (50 éq.) ; THF, c=160 mg/mL, Ta BSA déminéralisée (1 éq.) ; NaHCO <sub>3</sub> 0,1 M, c=80 mg/mL ; THF, c=160 mg/mL, Ta, 48h	Milieu réactionnel gélatineux, dénaturation
Ester activé (50 éq.) ; THF, c=80 mg/mL, Ta BSA déminéralisée (1 éq.) ; NaHCO <sub>3</sub> 0,1 M, c=40 mg/mL ; THF, c=80 mg/mL, Ta, 27h	Problème d'absorption UV de l'immunogène
Ester activé (50 éq.) ; THF, c=80 mg/mL, Ta BSA déminéralisée (1 éq.) ; NaHCO <sub>3</sub> 0,1 M, c=40 mg/mL ; THF, c=80 mg/mL, Ta, 38h	Taux de couplage ≈34

Tableau 4 : Conditions de couplage de la 22-CMO vitamine D **28** à la BSA

La préparation du deuxième immunogène **29** (Figure 45) a été effectuée pour la première fois dans les mêmes conditions que pour le premier immunogène. Le brut réactionnel gélatineux mais limpide en fin de réaction suggère qu'il faut diluer davantage (x 2) pour obtenir le moins possible d'immunogène dénaturé et maintenir un taux de couplage suffisant. (Tableau 4)

La disparité des taux de couplage entre les deux premiers immunogènes (15 et 34 mol/BSA), pourtant préparés dans les mêmes conditions, peut s'expliquer par l'encombrement des esters activés. La 20-CO-NHS vitamine D **21** comporte une fonction acide carboxylique « secondaire » et proche du squelette, alors que la 22-CMO-NHS vitamine D **28** comporte une fonction acide carboxylique « primaire » portée par un groupe CMO qui éloigne l'ester activé du squelette et le rend plus réactif vis à vis des résidus ε-amines des lysines.

#### II.1.4 Etapes chimiques communes aux trois autres nouveaux haptènes

Le tosylate **32** est un intermédiaire intéressant pour la préparation d'autres haptènes.

La chimie des étapes de protection du triène et de la fonction alcool de la vitamine D<sub>2</sub> et de photo-isomérisation du triène reste la même. (Figure 46)

De légères optimisations ont été apportées à l'ozonolyse-réduction, à la déprotection du triène et à la photo-isomérisation, consécutivement aux travaux précédemment effectués sur les immunogènes 20-COOH **22** et 22-CMO vitamine D **29**. La protection du triène et de l'hydroxyle 3 de la vitamine D reste inchangé, les épimères de l'adduit-SO<sub>2</sub> ne sont plus séparés.

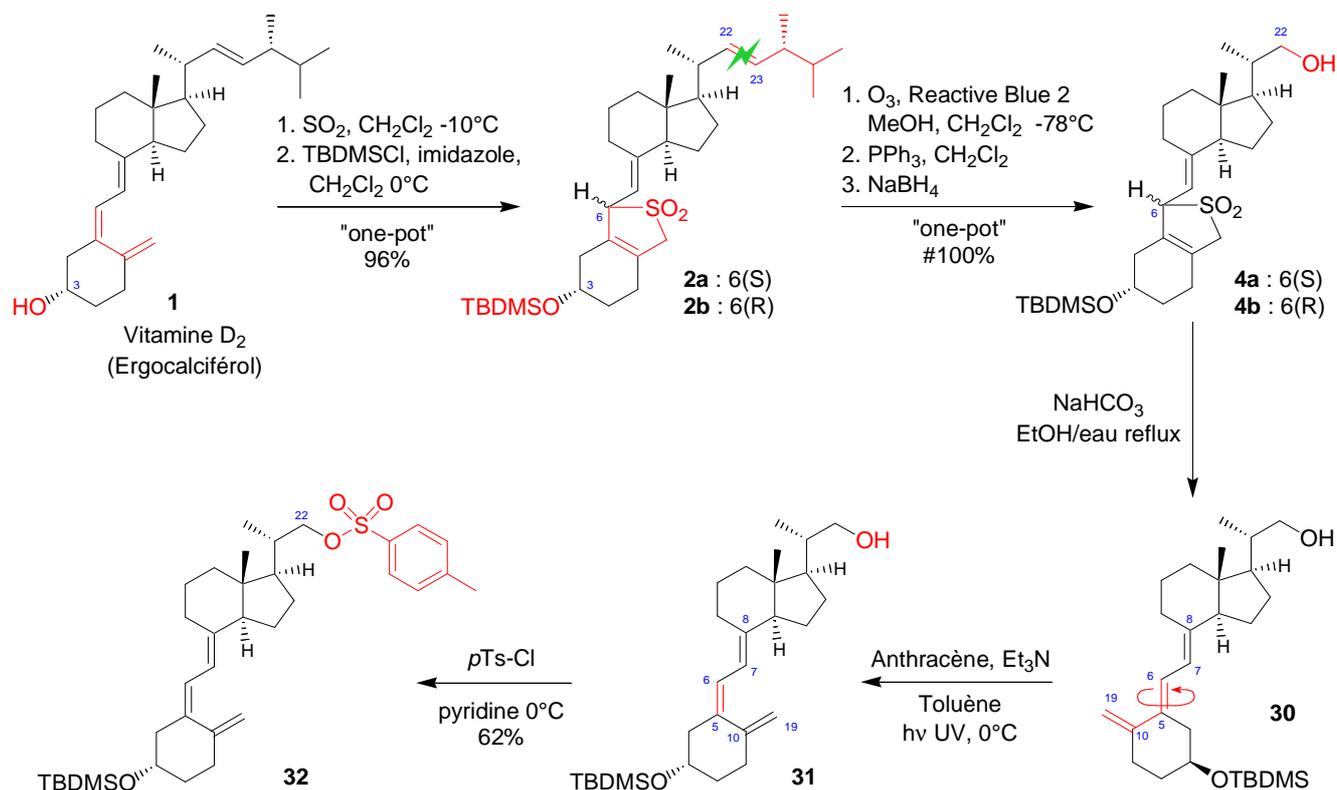


Figure 46 : Ensemble des étapes communes aux trois nouveaux haptènes

### II.1.4.1 Ozonolyse et réduction de l'aldéhyde « one-pot »

La seule amélioration de cette étape tient dans l'ajout du borohydrure de sodium en poudre directement sur le milieu réactionnel en fin d'ozonolyse des adduits- $\text{SO}_2$  **2a** et **2b** après la réduction des ozonides par la triphénylphosphine pour obtenir l'alcool 22-OH adduits- $\text{SO}_2$  **4a** et **4b**. (Figure 47)

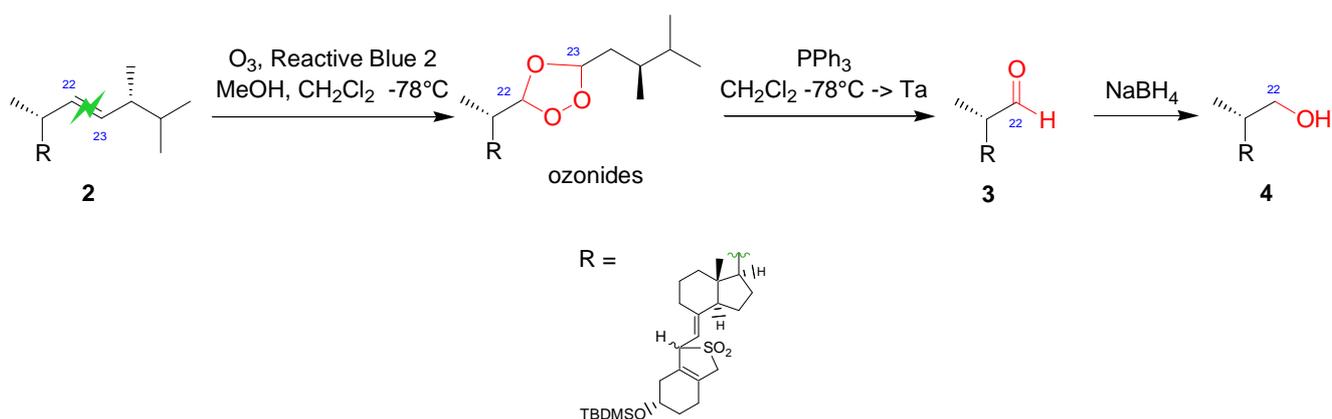


Figure 47 : Ozonolyse et réduction enchaînées

### II.1.4.2 Déprotection du triène

En raison de la sensibilité de la réaction de déprotection du triène au pH acide, l'adduit- $\text{SO}_2$  est dissous dans l'éthanol à 96% puis la solution aqueuse de bicarbonate de sodium est ajoutée ; il s'en suit une fine précipitation du sel qui reste en partie soluble pour maintenir le milieu réactionnel basique. (Figure 48)

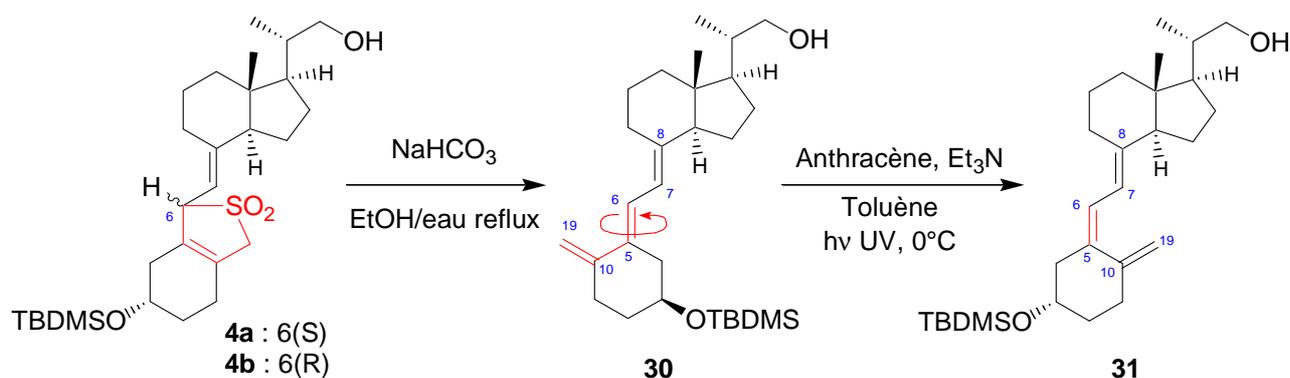


Figure 48 : Déprotection et photoisomérisation du triène de l'alcool des adduits-SO<sub>2</sub> 4

La quantité d'iso-triène détectée par CLHP à barrette de diode est infime par rapport au *trans*-triènone **30** et laisse penser qu'il s'agit de traces déjà présentes dans le substrat.

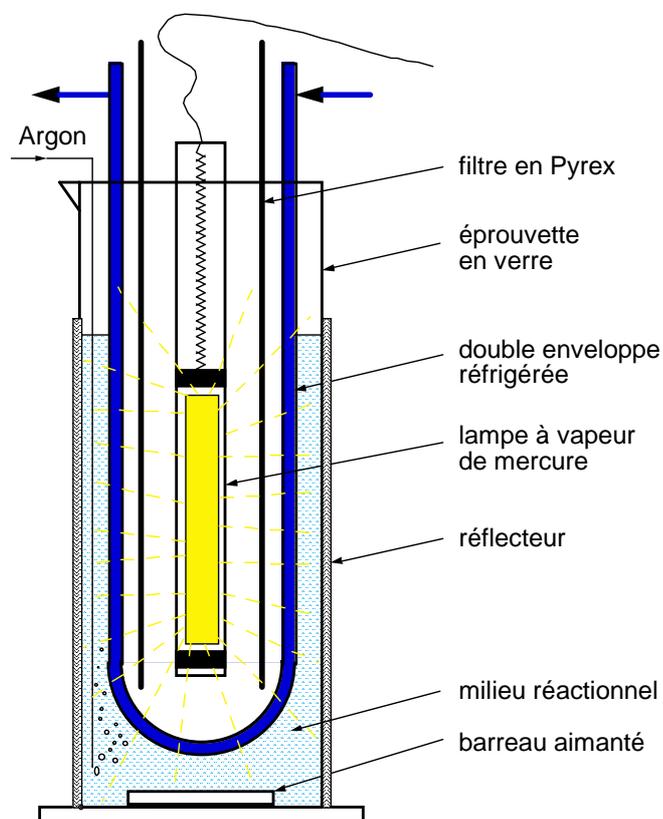
### II.1.4.3 Photo-isomérisation du triène

La photo-isomérisation du *trans*-triènone **30** en triènone **31** (Figure 48) a été facilitée par un nouveau montage qui évite l'emploi de nombreux tubes Corex<sup>®</sup> : la double enveloppe réfrigérée à  $-15^\circ\text{C}$ , contenant la lampe à vapeur de mercure est immergée directement dans le milieu réactionnel. L'irradiation est faite sur la totalité de la surface ( $360^\circ$ ) et non plus sur un angle limité. Le milieu réactionnel, constamment dégazé à l'argon, est placé dans une éprouvette en verre entourée d'une feuille d'aluminium et agité.

La réaction est plus rapide et n'est plus limitée en quantité de produit à photo-isomériser. La réaction de photoisomérisation du *trans*-triènone **30** peut ainsi se faire à l'échelle du gramme. (Figure 48)

La filtration des UV de courtes longueur d'ondes par le filtre en Pyrex<sup>®</sup> disposé entre la lampe et la double enveloppe réfrigérée semble suffisante pour la photo-isomérisation du triène.

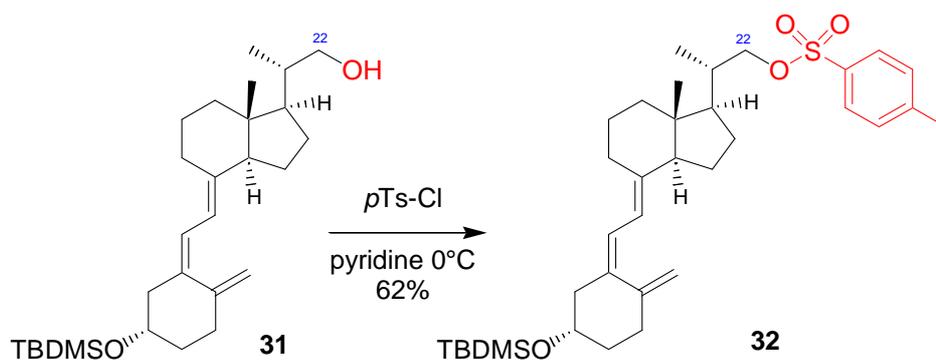
De plus, pour éviter toute formation de la forme iso-triène, le *trans*-triène **30** est d'abord dissous dans l'éthanol 96%, afin de solubiliser en partie les traces de bicarbonate de sodium qui stabilisent le produit, puis dilué dans le milieu de photo-isomérisation.



### II.1.4.4 Tosylation du triènone 31

La fonction 22-hydroxy du triènone **31** a été transformée en groupe partant *p*-toluènesulfonate par réaction du chlorure de tosylé dans la pyridine anhydre à  $0^\circ\text{C}$  pour donner le tosylate **32** avec un rendement de 93%. (Figure 49)

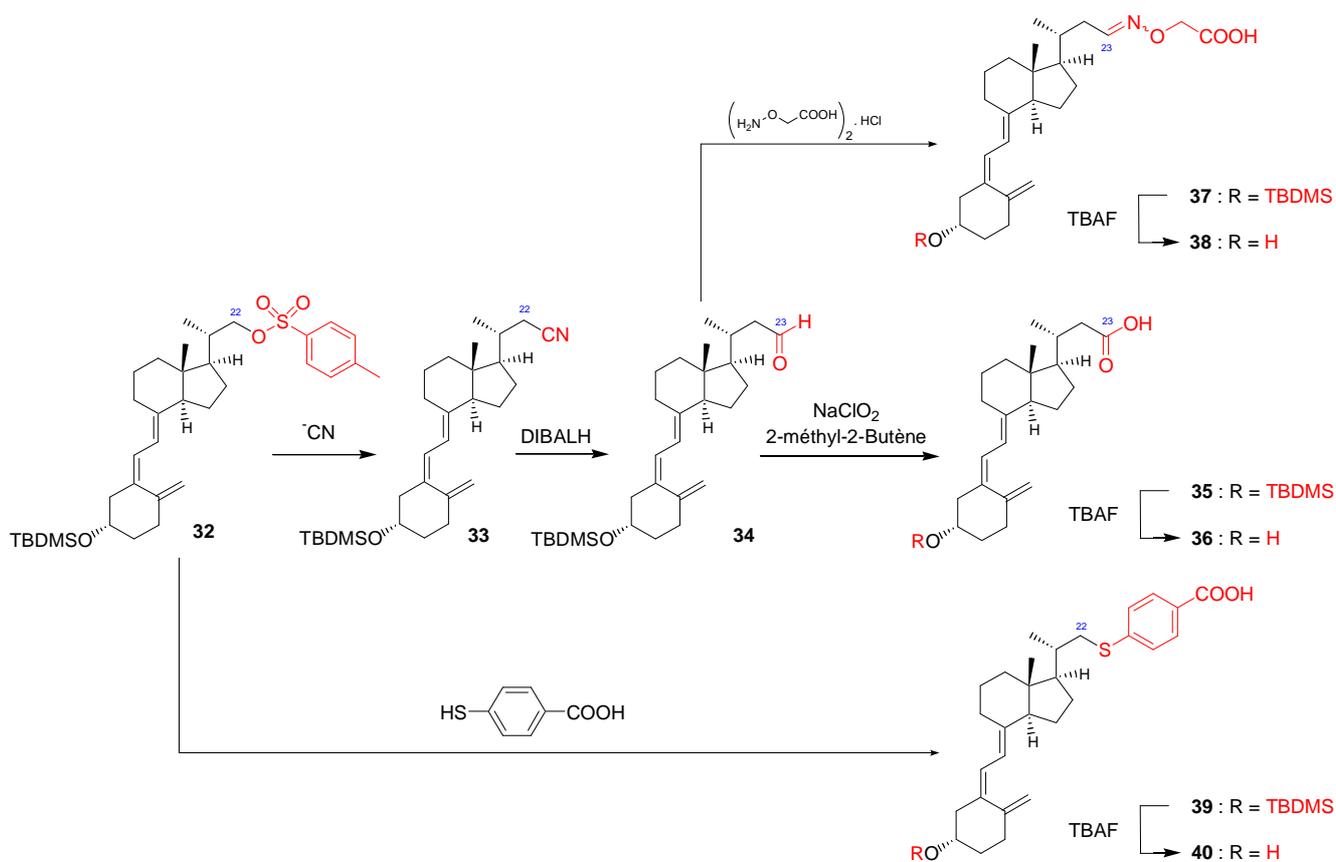
Le carbone 22 du tosylate **32** ainsi obtenu est alors rendu électrophile pour réagir avec les dérivés nucléophiles (donneurs d'électrons) tels que le cyanure, les amines, les alcoolates, les thiolates, un azoture, ...


 Figure 49 : Préparation du tosylate **32**

Lors de la réaction, il est préférable de ne pas utiliser trop de chlorure de *p*-toluènesulfonyl puisque en fin de réaction il faut le détruire par hydrolyse en milieu basique (p. ex. solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium). En effet, sa polarité semblable à celle du produit, le tosylate **32**, le rend difficilement séparable.

Une réaction trop longue ou à température ambiante dégrade le 22-*Op*Ts triène **32** en 22-chloro triène, le chlorure libéré lors de la réaction ayant tendance à réagir par  $S_N2$  pour donner le produit thermodynamiquement le plus stable. Cette réaction parasite est surtout constatée lors de l'utilisation de dichlorométhane comme solvant.

Le tosylate **32** sert de base à la synthèse de trois nouveaux haptènes. (Figure 50)


 Figure 50 : Trois haptènes à partir d'un intermédiaire commun, le tosylate **32**

Les préparations de ces trois nouveaux haptènes n'ont fait l'objet d'aucune optimisation. Une quantité suffisante de chaque haptène est synthétisée afin de procéder à un couplage. Les rendements ne sont donc pas optimisés.

### II.1.5 Immunogène de la 22-COOH vitamine D

Un troisième immunogène dont la dimension du bras espaceur serait intermédiaire entre la 20-COOH vitamine D **20** (pas de bras) et la 22-CMO vitamine D **27** (+3 atomes) serait intéressant.

Un tel antigène permettrait de rester suffisamment flou sur la structure de la chaîne latérale pour obtenir une réponse immunogénique dirigée contre les deux vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>.

Une méthode simple a été mise au point pour homologuer la chaîne latérale 20-COOH d'un méthylène (+1 groupement -CH<sub>2</sub>-) pour former la 22-COOH vitamine D **36**. (Figure 52)

A ce stade de la synthèse (tosylate **32**), il manque un carbone sur la chaîne latérale pour former l'haptène 22-COOH vitamine D **36**. Celui-ci peut être introduit classiquement de trois manières possibles (Figure 51) :

- Le tosylate **32**, converti en 22-iodo triène **41** par une réaction de Finkelstein est transformé en magnésien puis mis en présence de CO<sub>2</sub> pour donner directement le 22-COOH triène **35**.
- Le tosylate **32** est substitué par le cyanure lors d'une S<sub>N</sub>2 pour donner le nitrile **33** qui est hydrolysé pour donner le 22-COOH triène **35**.
- Le tosylate **32** est substitué par le cyanure lors d'une S<sub>N</sub>2 pour donner le nitrile **33** qui doit être réduit en aldéhyde **34** par l'hydruide de diisobutylaluminium (DIBALH) et oxydé pour aboutir au 22-COOH triène **35**.

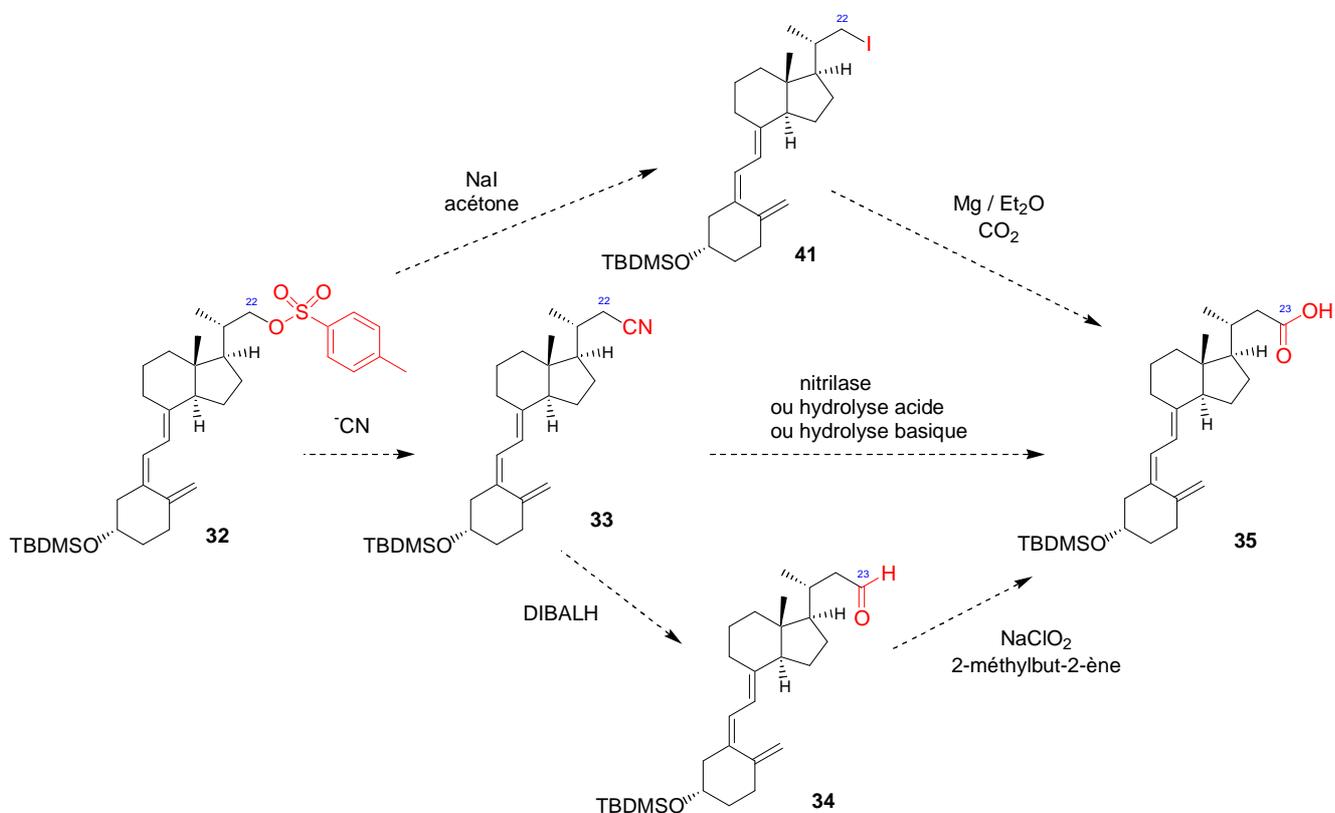


Figure 51 : Voies d'accès envisagées pour le 22-COOH triène **35**

La première voie semble donner de moins bons rendements dans la littérature sur les stéroïdes que les deux autres.<sup>89</sup> De plus, la dernière voie offre un panel de dérivés plus intéressants (nitrile, amine aldéhyde, acide). La deuxième voie plus rapide théoriquement, met en jeu une étape d'hydrolyse d'un nitrile qui chimiquement<sup>90</sup> est réalisée dans des conditions extrêmes de pH ou par voie enzymatique faisant appel à des nitrilases<sup>91</sup> dont la seule commercialisée a été retirée du marché ...

Par contre, le tosylate **32** par S<sub>N</sub>2 avec le cyanure fournit le nitrile **33**,<sup>92</sup> qui par réduction par l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBALH) conduit à l'aldéhyde **34**,<sup>93</sup> dont l'oxydation par le chlorite de sodium (NaClO<sub>2</sub>) permet d'accéder à l'acide **35**. (Figure 52)

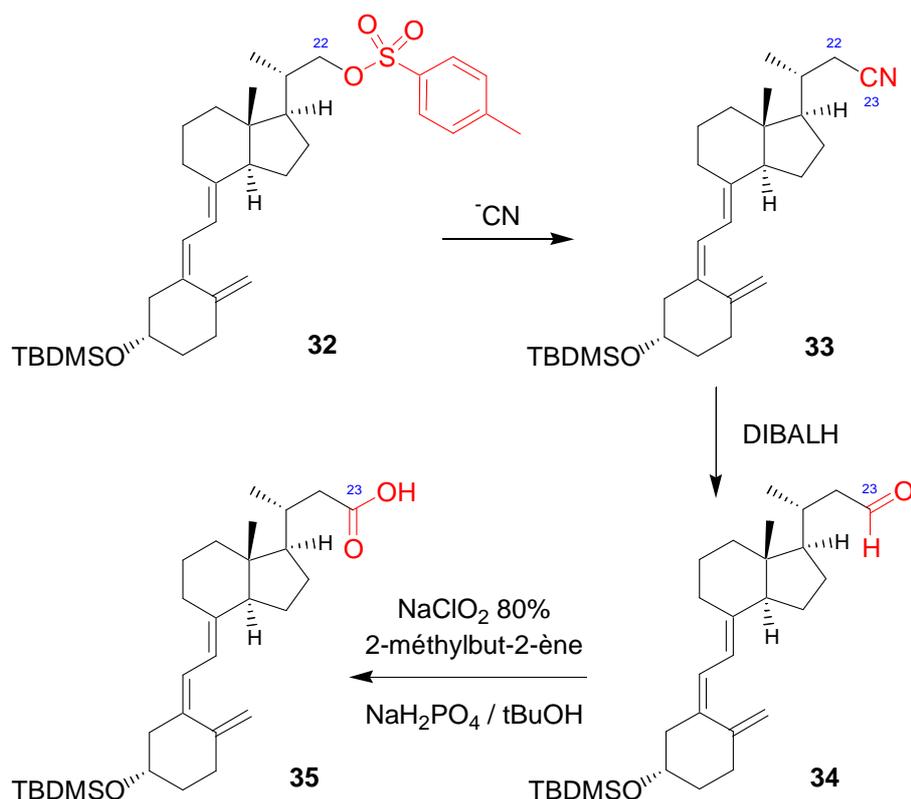


Figure 52 : Voie d'accès retenue à la 22-COOH vitamine D **35**

### II.1.5.1 S<sub>N</sub>2 par le cyanure

La préparation du nitrile **33** a d'abord été testée avec un sel de cyanure liposoluble : le cyanure de tétraéthylammonium, mais la réaction en présence de solvants chlorés (dichlorométhane et 1,2-dichloroéthane) s'est révélée plus rapide sur les groupes partants chloro- des solvants que sur le

<sup>89</sup> Baine, N. H.; Owings, F. F.; Kline, D. N.; Resnick, T.; Ping, L.-J.; et al. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5987-5989. Holt, D. A.; Levy, M. A.; Ladd, D. L.; Oh, H.-J.; Erb, J. M.; et al. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 937-942. Lovely, C. J.; Bhat, A. S.; Coughenour, H. D.; Gilbert, N. E.; Brueggemeier, R. W. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3756-3764.

<sup>90</sup> basique : Carroll, T. R.; Davison, A.; Jones, A. G. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1821-1826. Eguchi, T.; Sai, H.; Takatsuto, S.; Hara, N.; Ikekawa, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 2303-2311.

acide : Trost, B. M.; Kulawiec, R. J.; Hammes, A. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 587-590.

<sup>91</sup> Almatawah, Q. A.; Cowan, D. A. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 718-724. Osprian, I.; Jarret, C.; Strauss, U.; Kroutil, W.; Orru, R. V. A.; Felfler, U.; Willetts, A. J.; Faber, K. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 555-560. Klempier, N.; de Raadt, A.; Faber, K.; Griengl, H. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 341-344. Zaroni, G.; Vidari, G. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5319-5323.

<sup>92</sup> Ando, K.; Kondon, F.; Koike, F.; Takayama, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1662-1664. Ando, K.; Koike, F.; Kondo, F.; Takayama, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 189-192. Ikeda, M.; Takahashi, K.; Dan, A.; Koyama, K.; Kubota, K.; Tanaka, T.; Hayashi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1809-1817.

<sup>93</sup> Proudfoot, J. R.; Li, X.; Djerassi, C. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2026-2030. Zoretic, P. A.; Zhang, Y.; Fang, H.; Ribeiro, A. A.; Duba, G. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1162-1167.

tosylate **32**. Un mode opératoire plus standard a donc été employé par la suite avec l'action du cyanure de potassium dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour le solubiliser. Le nitrile **33** est ainsi obtenu avec des rendements quantitatifs (Figure 53).<sup>94</sup> En effet, dans une telle réaction l'un des facteurs limitants est la concentration en réactifs solubles : les sels cyanures de sodium et potassium n'étant pas très solubles dans les solvants organiques, il est nécessaire d'utiliser des solvants très polaires (p. ex. DMSO, DMF, ...) et de chauffer pour mieux solubiliser les sels.

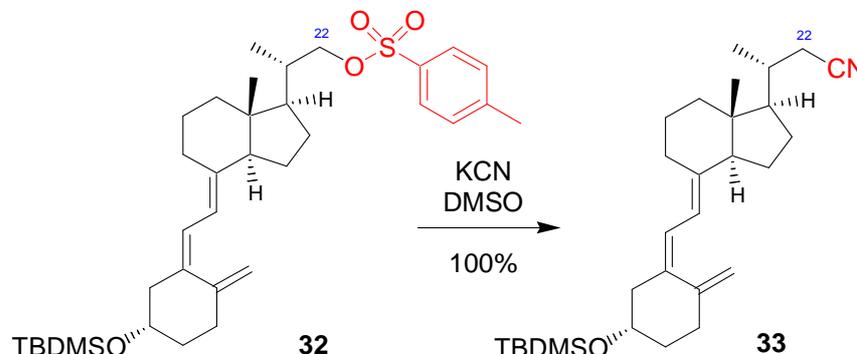


Figure 53 :  $S_N2$  du cyanure sur le tosylate **32**

Les essais menés dans le DMSO sont traités par extraction au MTBE et de nombreux lavages à l'eau sont nécessaires pour éliminer les dernières traces de DMSO ( $P_{eb}$  : 189°C).

Afin de faciliter l'isolement du produit, la réaction peut aussi être effectuée avec le cyanure de tétraéthylammonium dans l'acétonitrile.

### II.1.5.2 Réduction du nitrile **33** en aldéhyde **34**

L'absence de réaction lors de la tentative d'hydrolyse basique du nitrile **33** en l'acide correspondant oriente la synthèse vers une voie indirecte. L'intermédiaire est l'aldéhyde **34** obtenu par réduction du nitrile **33** à -78°C dans le dichlorométhane anhydre par un hydrure métallique suffisamment encombré (p. ex. DIBALH)<sup>94,95</sup> pour que la réaction s'arrête après consommation d'un seul équivalent d'hydrure (Figure 54). L'aldéhyde **34** peut ainsi être obtenu avec un rendement de 62%.

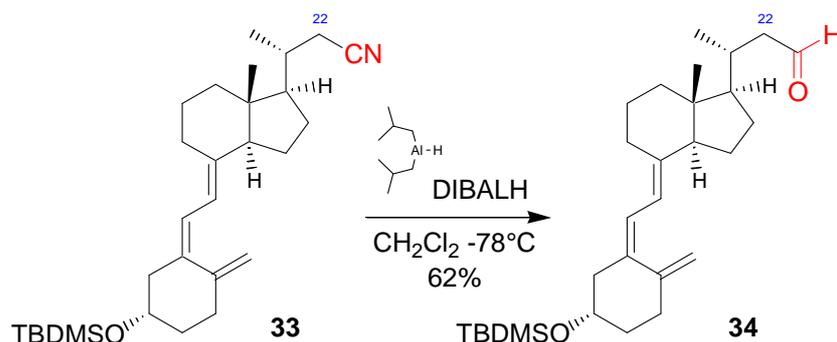


Figure 54 : Réduction du nitrile **33** en aldéhyde **34** par le DIBALH

<sup>94</sup> Ando, K.; Kondon, F.; Koike, F.; Takayama, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1662-1664. Ando, K.; Koike, F.; Kondo, F.; Takayama, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 189-192. Ikeda, M.; Takahashi, K.; Dan, A.; Koyama, K.; Kubota, K.; Tanaka, T.; Hayashi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1809-1817.

<sup>95</sup> Proudfoot, J. R.; Li, X.; Djerassi, C. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2026-2030. Zoretic, P. A.; Zhang, Y.; Fang, H.; Ribeiro, A. A.; Duba, G. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1162-1167.

Les conditions opératoires et le traitement du brut réactionnel sont simples mais le rendement reste encore assez faible, comparable à ceux observés dans la littérature. Il faut noter que le nitrile n'est pas purifié par chromatographie sur silice pour éliminer les dernières traces de DMSO.

Si le nitrile est pur, la réaction de réduction au DIBALH ne nécessite pas de purification et son rendement est meilleur.

Dans le cas d'une réduction d'un nitrile par l'hydrure de lithium-aluminium, la réaction se poursuit jusqu'à l'obtention de l'amine, qui peut être un intermédiaire intéressant pour la préparation de marqueurs d'affinité ou de traceurs avec un bras espaceur.

### II.1.5.3 Oxydation de l'aldéhyde 34 en acide carboxylique 35

L'oxydation du 22-CHO triène **34** en acide **35** a été effectuée dans les mêmes conditions déjà employées pour la synthèse du premier haptène (voir § II.1.2.2 Oxydation de l'aldéhyde 3). Les rendements sont quantitatifs et le produit de la réaction est pur. (Figure 55)

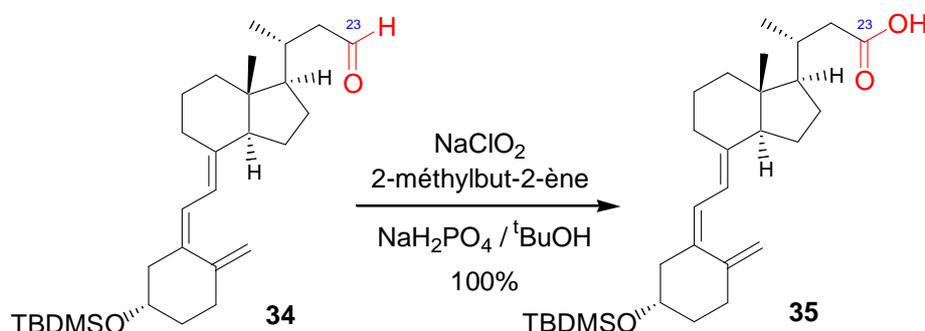


Figure 55 : Oxydation de l'aldéhyde **34** au chlorite de sodium

A l'inverse du 20-CHO, le 22-CHO **34** ne peut pas s'épimériser lors de la réaction, puisqu'il ne possède pas de carbone chiral en position  $\alpha$  de l'aldéhyde.

### II.1.5.4 Déprotection de l'alcool et activation de l'acide carboxylique

La fonction hydroxyle en position 3 est par la suite déprotégée par le TBAF dans le THF comme précédemment décrit (voir § II.1.2.5) pour donner le 3<sup>ème</sup> haptène : 22-COOH vitamine D **36** avec un rendement de 69%. L'acide carboxylique **36**, est activé en ester de N-hydroxysuccinimide **42** avec un rendement de 84%. (Figure 56)

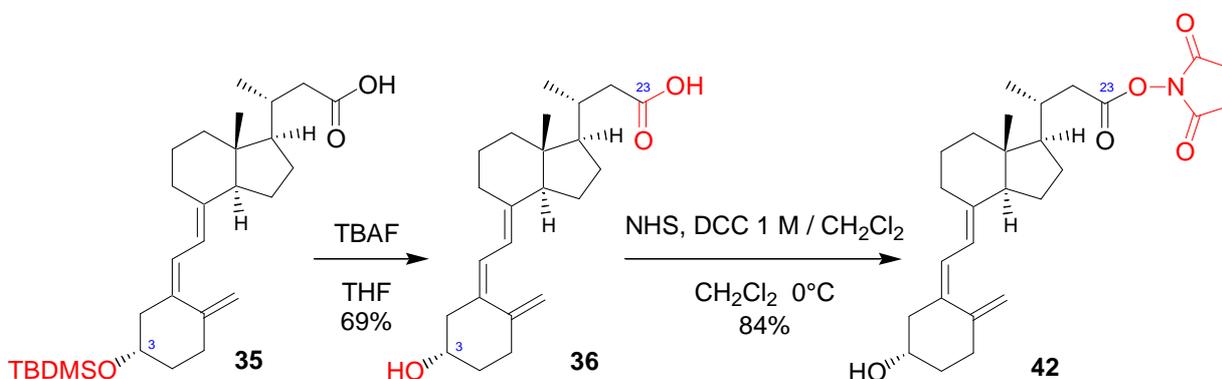


Figure 56 : Déprotection de l'alcool **35** et activation de l'acide **36**

L'ester de N-hydroxysuccinimide **42** ainsi isolé, est utilisé dans les réactions de couplage à la BSA pour obtenir le 3<sup>ème</sup> immunogène et à l'histamine pour préparer le dérivé à ioder (DAI) correspondant.

### II.1.5.5 Couplage à la BSA

Le couplage de l'ester activé de la 22-COOH vitamine D **42** à la BSA a été réalisé dans les mêmes conditions précédemment décrites (voir § II.1.2.7 Couplage à la BSA) (Figure 57). Il en est de même pour le traitement et la purification de l'immunogène.

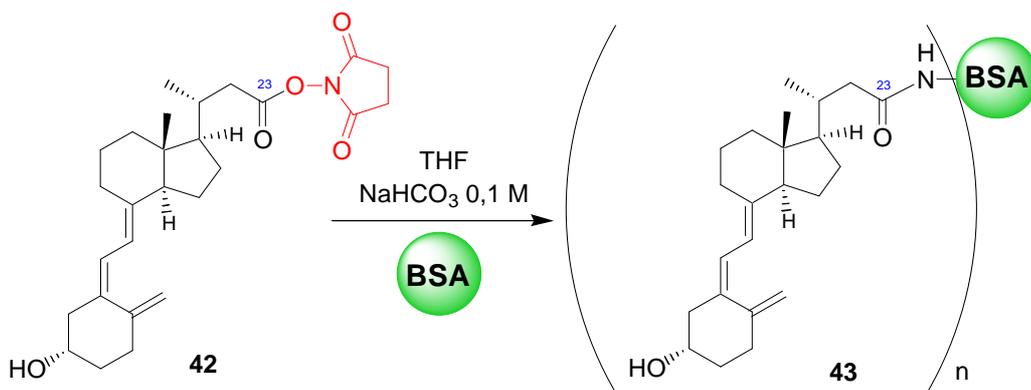


Figure 57 : Couplage de la 22-CO-NHS vitamine D **42** à la BSA

Ester activé (50 éq.) ; THF, c=80 mg/mL, Ta  
 BSA déminéralisée (1 éq.) ; NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, c=40 mg/mL ; THF, c=80 mg/mL, Ta, 42 h

### II.1.6 Immunogène de la 23-CMO vitamine D

Le 4<sup>ème</sup> haptène envisagé, 23-CMO vitamine D **38**, est l'homologue (+1 groupement -CH<sub>2</sub>-) de la 22-CMO vitamine D **27**. Tout comme ce dernier, il devrait induire une forte réponse immunitaire.

L'haptène 23-CMO vitamine D **38** provient de la condensation de l'hémichlorhydrate de carboxyméthoxylamine sur l'intermédiaire aldéhyde **34** (Figure 58) servant déjà à la préparation de la 22-COOH vitamine D **36**. (Figure 50)

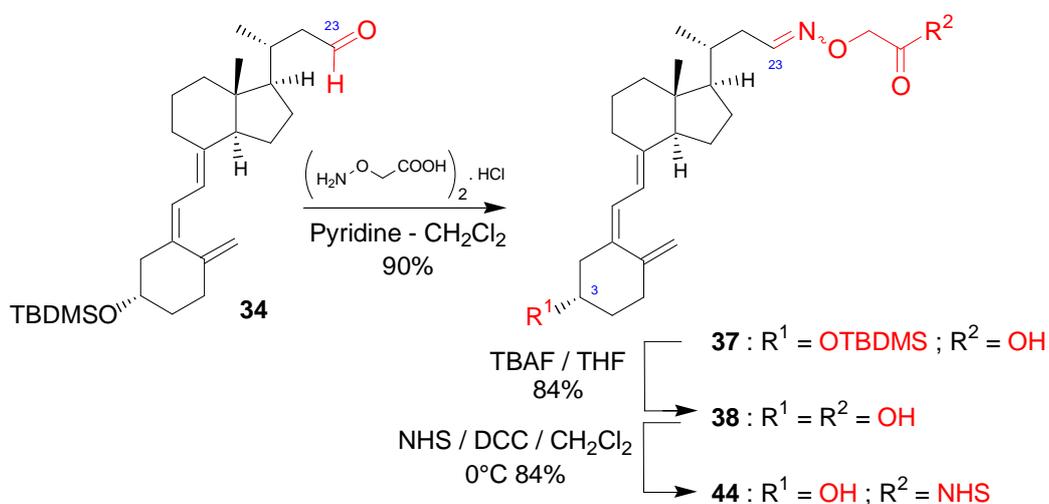


Figure 58 : Voie d'accès à la 23-CMO vitamine D **38**

Là aussi, les réactions restent les mêmes, seuls les substrats changent : pour obtenir la 22-CMO vitamine D **38**, la condensation de la carboxyméthoxylamine était effectuée sur l'aldéhyde des adduits, alors que pour obtenir la 23-CMO vitamine D **38**, la condensation est faite sur la vitamine déjà déprotégée et photo-isomérisée, avec un rendement de 90%.

La déprotection de l'éther silylé par le TBAF dans le THF aboutit au 4<sup>ème</sup> haptène, 23-CMO vitamine D **38** avec un rendement de 84% et un rapport *E/Z* des diastéréoisomères de l'oxime de 63/37, déterminé par intégration des signaux RMN. L'activation de ce dernier par le DCC en présence de NHS donne l'ester de N-hydroxysuccinimide avec un rendement de 84%.

Les diastéréoisomères *E* et *Z* de l'oxime ne sont pas séparés. Le couplage à la BSA de l'ester de N-hydroxysuccinimide de la 23-CMO vitamine D **44** est donc effectué avec un mélange *E/Z* de 63/37, selon les mêmes conditions précédemment décrites (voir § II.1.2.7) (Figure 59). Il en est de même pour le traitement et la purification de l'immunogène.

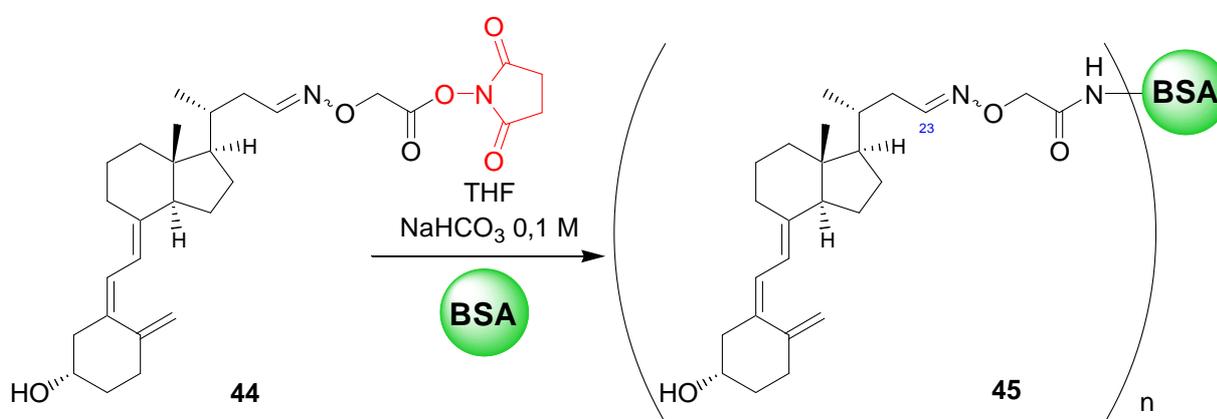


Figure 59 : Couplage de la 23-CMO-NHS vitamine D **44** à la BSA

Ester activé (50 éq.) ; THF, c=80 mg/mL, Ta

BSA déminéralisée (1 éq.) ; NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, c=40 mg/mL ; THF, c=80 mg/mL, Ta, 42 h

## II.1.7 Immunogène de la 22-S-Bz-COOH vitamine D

Le 5<sup>ème</sup> haptène (dérivé acide 22-(4-mercaptopbenzoïque) vitamine D **40**) est assez novateur : le bras espaceur acide 4-mercaptopbenzoïque est plutôt encombrant et rigide pour générer une zone de reconnaissance susceptible de ne pas induire de différence de réponse entre les deux vitamines D.

La présence du noyau aromatique pourrait faciliter une interaction avec des traceurs iodés aromatiques modifiés dans cette même position. Dans la littérature, il n'existe pas d'exemple d'haptènes couplés à une protéine immunogénique par ce type de chaînon rigide contenant un dérivé d'acide benzoïque ou d'acide phénylacétique.

### II.1.7.1 S<sub>N</sub>2 par un thiol et déprotection de l'alcool

La réaction d'un thiol sur un tosylate est plus facile que celle d'un alcool. De plus le thiol de l'acide 4-mercaptopbenzoïque possède un proton plus acide que le phénol analogue ce qui facilite la déprotonation et la réaction de l'anion ainsi formé sur le tosylate **32** par S<sub>N</sub>2 pour donner le « 22-(S-Bz-COOH) triène » **39** avec un rendement médiocre de 35%. (Figure 60)

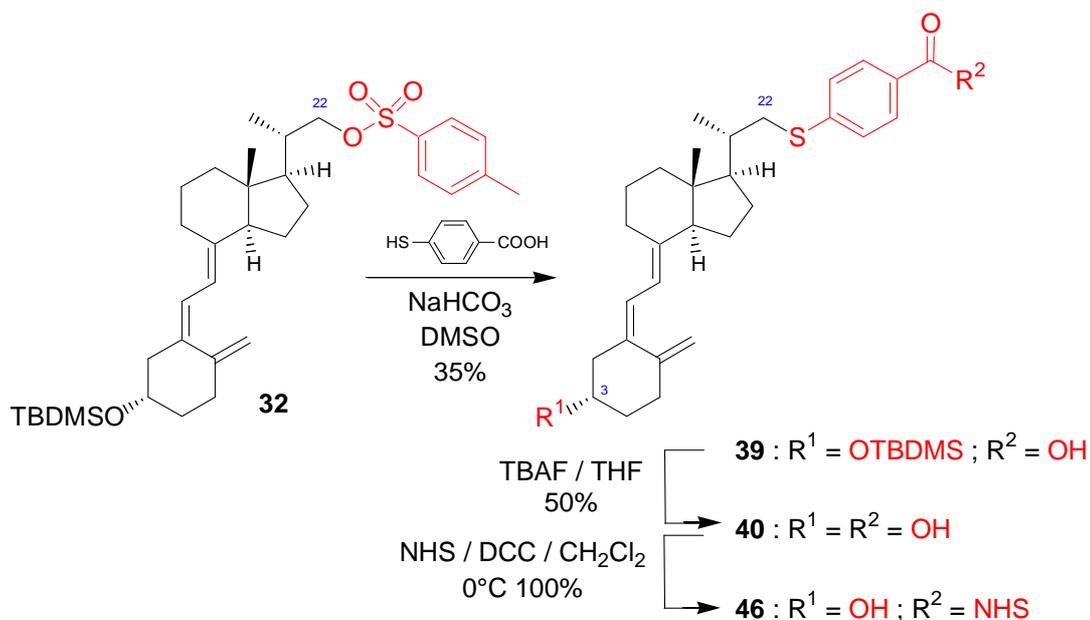


Figure 60 :  $\text{S}_{\text{N}}2$  par l'acide 4-mercaptobenzoïque

Le bicarbonate de sodium dans le DMSO (qui améliore sa solubilité), est une base suffisamment forte pour déprotoner le thio-phénol.

La déprotection de l'éther silylé **39** par le TBAF dans le THF aboutit au 5<sup>ème</sup> haptène, 22-(S-Bz-COOH) vitamine D **40** avec un rendement de 50%.

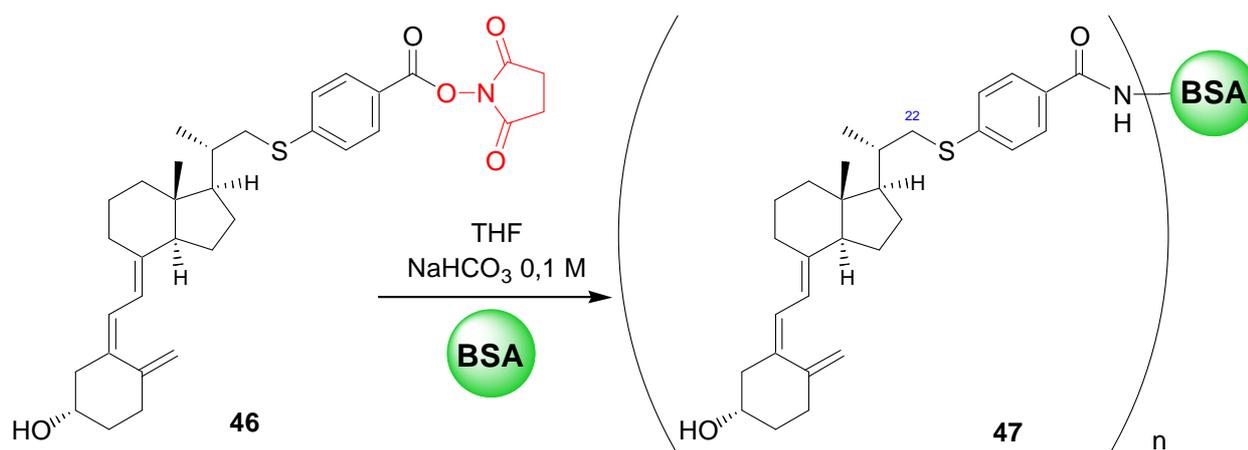
### II.1.7.2 Activation de l'acide carboxylique et couplage à la BSA

L'activation de la fonction acide carboxylique par le DCC en présence de NHS a donné l'ester de N-hydroxysuccinimide **46** avec un rendement quantitatif.

Le couplage de l'ester activé de la 22-(S-Bz-COOH) vitamine D **46** à la BSA a été réalisé selon les mêmes conditions précédemment décrites (voir § II.1.2.7 Couplage à la BSA) (Figure 61).

Cet ester semble toutefois moins soluble dans les solvants que les autres esters activés, ce qui provoque un léger trouble lors de son addition à la solution de BSA, ainsi qu'au cours du traitement et de la purification. Il en ressort une plus grande proportion d'immunogène **47** dénaturé qui pour les immunisations comparatives en série vitamine D ne sera pas utilisé.

La nouvelle campagne d'immunisation est réalisée uniquement avec les fractions solubles de chaque immunogène.



**Figure 61 : Couplage de la 22-S-Bz-CO-NHS vitamine D **46** à la BSA**

---

Ester activé (50 éq.) ; THF, c=80 mg/mL, Ta  
 BSA déminéralisée (1 éq.) ; NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, c=40 mg/mL ; THF, c=80 mg/mL, Ta, 3 j

---

### II.1.8 Taux de couplage des haptènes de la vitamine D sur la BSA

Les taux de couplage de chaque immunogène peut être défini comme étant le nombre de moles d'haptène couplé par mole de protéine immunogénique.

L'hypothèse de départ pour une quantification par absorption UV est l'additivité des absorbances de la contribution de l'haptène couplé et de la protéine immunogénique. Cette quantification est possible puisque les protéines et le triène de la vitamine D absorbent tous les deux dans l'UV.

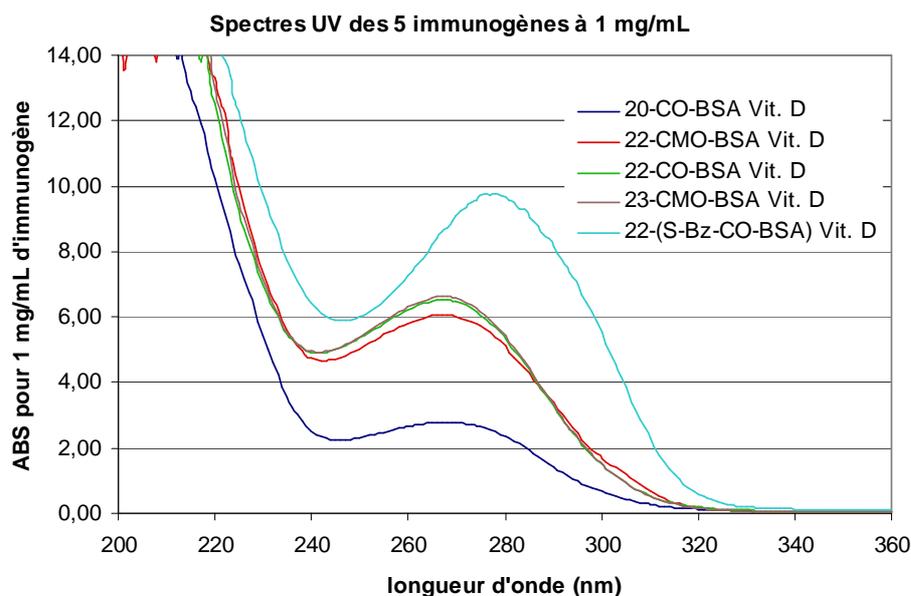
Les immunogènes comparés ont été obtenus dans les mêmes conditions réactionnelles :

Ester activé (50 éq.) ; THF, c=80 mg/mL, Ta  
 + BSA déminéralisée (1 éq.) ; NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, c=40 mg/mL ; THF, c=80 mg/mL, Ta

Puis ils ont été traités et purifiés selon le même protocole.

Chaque immunogène est pesé précisément, dissous dans l'eau, puis dilué avant détermination du spectre UV.

Les spectres sont ramenés à une absorbance pour 1 mg/mL d'immunogène pour être comparés entre eux par la suite. (Graphique 2)



Graphique 2 : Spectres d'absorption UV des 5 immunogènes dans l'eau ramenés à 1 mg/mL

La détermination du taux de couplage est basée sur l'hypothèse d'un même coefficient d'extinction ( $\epsilon$ ) pour tous les haptènes, sauf la 22-(S-Bz-COOH) vitamine D **40** contenant un noyau aromatique qui augmente le  $\epsilon$  et décale le  $\lambda_{\max}$  vers les plus grandes longueurs d'ondes.

Connaissant le  $\epsilon$  des haptènes, il est possible de calculer la contribution de la BSA et la contribution de l'haptène sur l'absorption totale de l'immunogène, d'après la loi de Beer-Lambert :

$$\text{ABS} = \epsilon \cdot C \cdot l$$

ABS : absorbance  
 $\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire (ou massique)  
 C : concentration en mol/L (ou en kg/L)  
 l : longueur de la cuve en cm, en général 1 cm

Le  $\epsilon$  massique ( $\text{cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de la BSA est déterminé à 264 nm par l'enregistrement des spectres UV pour plusieurs concentrations :  $\epsilon(\text{BSA})_{264 \text{ nm}} = 0,4205 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ .

L'hypothèse d'additivité pour une longueur d'onde donnée de l'absorption de la BSA et de l'absorption de l'haptène couplé à sa surface donne pour un immunogène :

$$\begin{aligned} \text{ABS}(\text{immunogène})_{264 \text{ nm}} &= \text{ABS}(\text{BSA})_{264 \text{ nm}} + \text{ABS}(\text{haptène})_{264 \text{ nm}} \\ &= \epsilon(\text{BSA})_{264 \text{ nm}} \cdot [\text{BSA}] \cdot l + \epsilon(\text{haptène})_{264 \text{ nm}} \cdot [\text{haptène}] \cdot l \end{aligned}$$

Pour calculer la concentration en haptène [haptène], la contribution de la BSA à l'absorption des immunogènes à 264 nm est retranchée :

$$\text{d'où } [\text{haptène}] = \frac{\text{ABS}(\text{immunogène})_{264 \text{ nm}} - \epsilon(\text{BSA})_{264 \text{ nm}} \cdot [\text{BSA}] \cdot l}{\epsilon(\text{haptène})_{264 \text{ nm}} \cdot l}$$

Si la masse d'haptène couplé sur la BSA est négligée, l'approximation  $[\text{BSA}] = [\text{immuno}]$  peut être faite avec les concentrations en mol/L :

$$\tau_{\text{couplage}} = \frac{[\text{haptène}]}{[\text{BSA}]} = \frac{\text{ABS}(\text{immuno})_{264 \text{ nm}} - \epsilon(\text{BSA})_{264 \text{ nm}} \cdot [\text{immuno}] \cdot l}{\epsilon(\text{haptène})_{264 \text{ nm}} \cdot [\text{immuno}] \cdot l}$$

$$\tau_{\text{couplage}} = \frac{\text{ABS(immuno)}_{264 \text{ nm}}}{\varepsilon(\text{haptène})_{264 \text{ nm}} \cdot [\text{immuno}]} - \frac{\varepsilon(\text{BSA})_{264 \text{ nm}}}{\varepsilon(\text{haptène})_{264 \text{ nm}}}$$

Immunogène	[immuno] (mg/mL)	ABS(immuno) <sub>264 nm</sub>	ABS(immuno) <sub>264 nm</sub> à 1mg/mL	taux de couplage
Immunogène 1 20-CO-BSA Vit. D <b>22</b>	0,229	0,6298	2,747	10
Immunogène 2 22-CMO-BSA Vit. D <b>29</b>	0,260	1,5628	6,019	25
Immunogène 3 22-CO-BSA Vit. D <b>43</b>	0,248	1,6010	6,446	27
Immunogène 4 23-CMO-BSA Vit. D <b>45</b>	0,249	1,6285	6,543	27
Immunogène 5 22-(S-Bz-CO-BSA) Vit. D <b>47</b>	0,235	1,8820	8,017	34

Tableau 5 : Détermination du taux de couplage de chaque immunogène

La concentration de BSA peut aussi être mesurée par un dosage BCA de l'immunogène, mais le résultat fourni ne donne que l'ordre de grandeur et n'est pas très précis.

Le taux de couplage de la BSA avec l'haptène 20-COOH vitamine D **20** est plus faible que les autres du fait de la proximité du squelette de la vitamine D qui encombre l'ester activé de N-hydroxysuccinimide et par conséquent diminue sa réactivité sur les lysines les plus inaccessibles de la BSA.

Lorsque la fonction acide carboxylique activée est primaire (22-CMO ; 22-COOH et 23-CMO vitamine D), les taux de couplages sont équivalents et plus importants que pour l'haptène 20-COOH vitamine D **20**. L'encombrement stérique lié au squelette de la vitamine D se fait alors moins ressentir. Le taux de couplage de l'haptène 22-(S-Bz-COOH) vitamine D **40** semble plus élevé que les autres, mais il est en réalité surestimé du fait de la présence d'un chromophore supplémentaire absorbant à 264 nm. ( $\varepsilon$  non corrigé)

## II.2 Nouvelle voie d'accès à tous les dérivés de la vitamine D déjà obtenus

Par souci de simplicité et d'optimisation de la synthèse de l'ensemble des dérivés fonctionnalisés sur la chaîne latérale de la vitamine D, le triènole **31** semble être la molécule clef de la synthèse. (Figure 62)

### II.2.1 Un intermédiaire clef : le triènole 31

En effet, le triènole **31** est un point de départ possible de toute la diversité des molécules déjà obtenues. C'est un substrat intéressant pour la préparation des autres dérivés de la vitamine D du fait du bon contrôle de sa préparation, de sa purification ainsi que de sa conservation. (Figure 62)

Les étapes lourdes d'ozonolyse, de déprotection et de photo-isomérisation du triène sont envisageables sur des grandes quantités de produit et la diversité des molécules déjà synthétisées pourrait ainsi être obtenue à partir de ce produit clef.

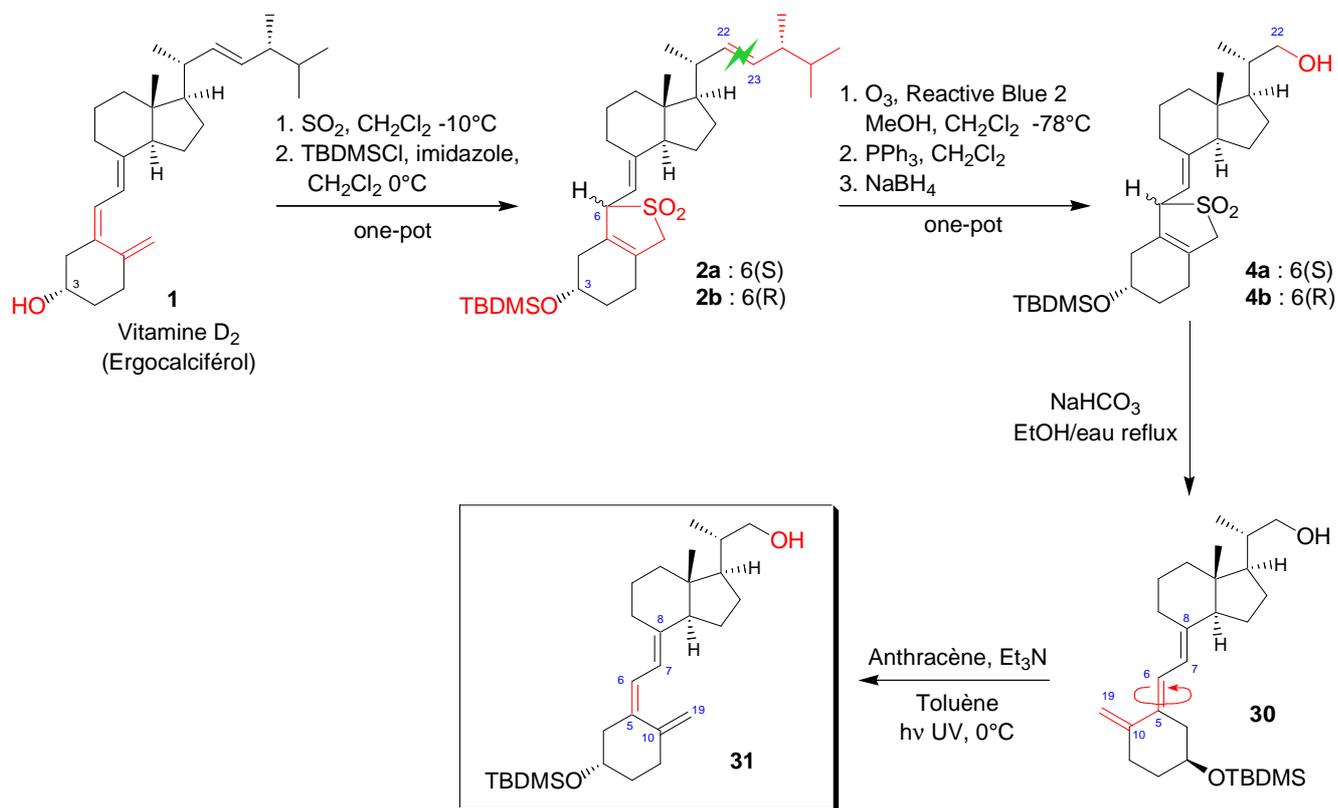


Figure 62 : Ensemble des étapes communes

Le triénol **31** servirait donc de base à la synthèse de tous les dérivés de la vitamine D fonctionnalisés sur la chaîne latérale, soit par oxydation en aldéhyde, l'étape manquante, soit par tosylation de l'hydroxyle en position 22. (Figure 63)

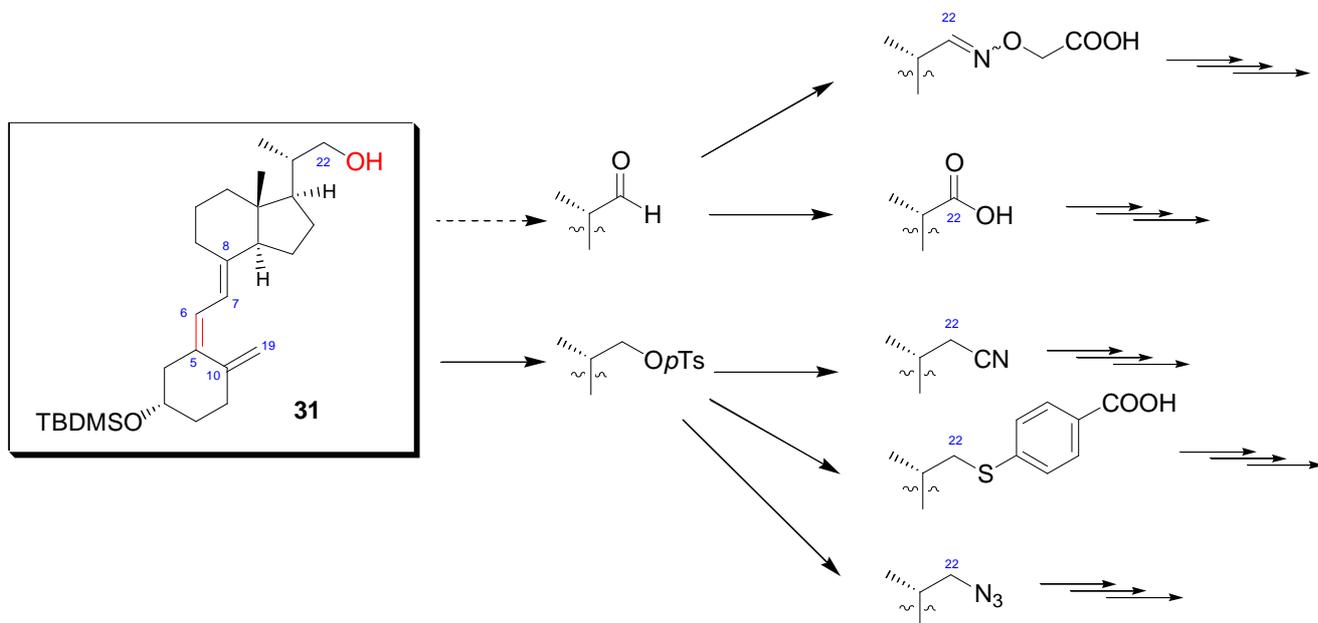


Figure 63 : Un unique intermédiaire commun, le triénol **31**

## II.2.2 Oxydation du triénol **31** en triénal **48**

L'étape manquante pour la simplification de la synthèse des dérivés de la vitamine D sur la chaîne latérale est l'oxydation de la fonction hydroxyle en 22 du triénol **31** pour donner l'aldéhyde correspondant : le triénal **48** (Figure 64).

Cette transformation est testée avec un réactif resté longtemps ignoré à cause de ses problèmes de solubilité dans les solvants organiques, l'acide 2-iodoxybenzoïque (IBX).<sup>96</sup> Il s'avère que l'IBX est tout de même soluble dans l'eau et dans le DMSO<sup>97</sup> dans lesquels la réaction d'oxydation peut être envisagée.

Dans l'eau, les produits organiques ne sont généralement pas solubles et des conditions opératoires particulières sont nécessaires : l'IBX est solubilisé dans une solution aqueuse de  $\beta$ -cyclodextrine et l'alcool à oxyder est ajouté en solution dans l'acétone.<sup>98</sup>

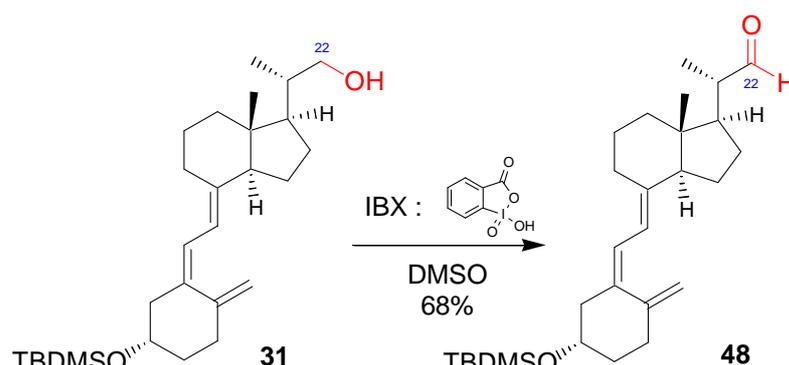


Figure 64 : Oxydation du triénol **11** par l'IBX dans le DMSO

L'utilisation des conditions aqueuses pour cette réaction s'est révélée infructueuse probablement de par la forte hydrophobicité du triénol : le substrat a en effet précipité lors de son introduction dans le milieu réactionnel. En revanche, la réaction dans le DMSO fonctionne correctement avec un rendement non-optimisé de 68%.

## II.3 Traceurs

L'évaluation de la qualité des anticorps (affinité et spécificité) et la mise au point de la trousse de dosage RIA nécessite un traceur iodé (<sup>125</sup>I:  $t_{1/2}$ =59,6 jours, 35 keV gamma) radioactif de la vitamine D.

Plusieurs dérivés de la vitamine D marqués à l'iode(125) sont décrits dans la littérature. Un dérivé de la 25-OH vitamine D existe, couplé par la position 3 au réactif de Bolton et Hunter préalablement marqué à l'iode(125).<sup>99</sup> Mais ce dérivé **49** est incompatible avec un développement industriel qui requiert un marquage direct d'un précurseur. De plus, le couplage par la position 3 n'est pas en accord avec la stratégie de couplage par la chaîne latérale mise en oeuvre.

<sup>96</sup> Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538.

<sup>97</sup> Frigerio, M.; Santagostino, M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8019-8022.

<sup>98</sup> Surendra, K.; Srilakshmi Krishnaveni, N.; Arjun Reddy, M.; Nageswar, Y. V. D.; Rama Rao, K. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2058-2059.

<sup>99</sup> Tanabe, M.; Harada, M.; Ikuta, S.; Nakagawa, N.; Otani, M. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1220-1221. Tanabe, M. EP0312360 **1988**. Tanabe, M.; Nakagawa, N.; Ikuta, S. US5075465 **1991**. Tanabe, M.; Nakagawa, N.; Ikuta, S. US5202266 **1993**.

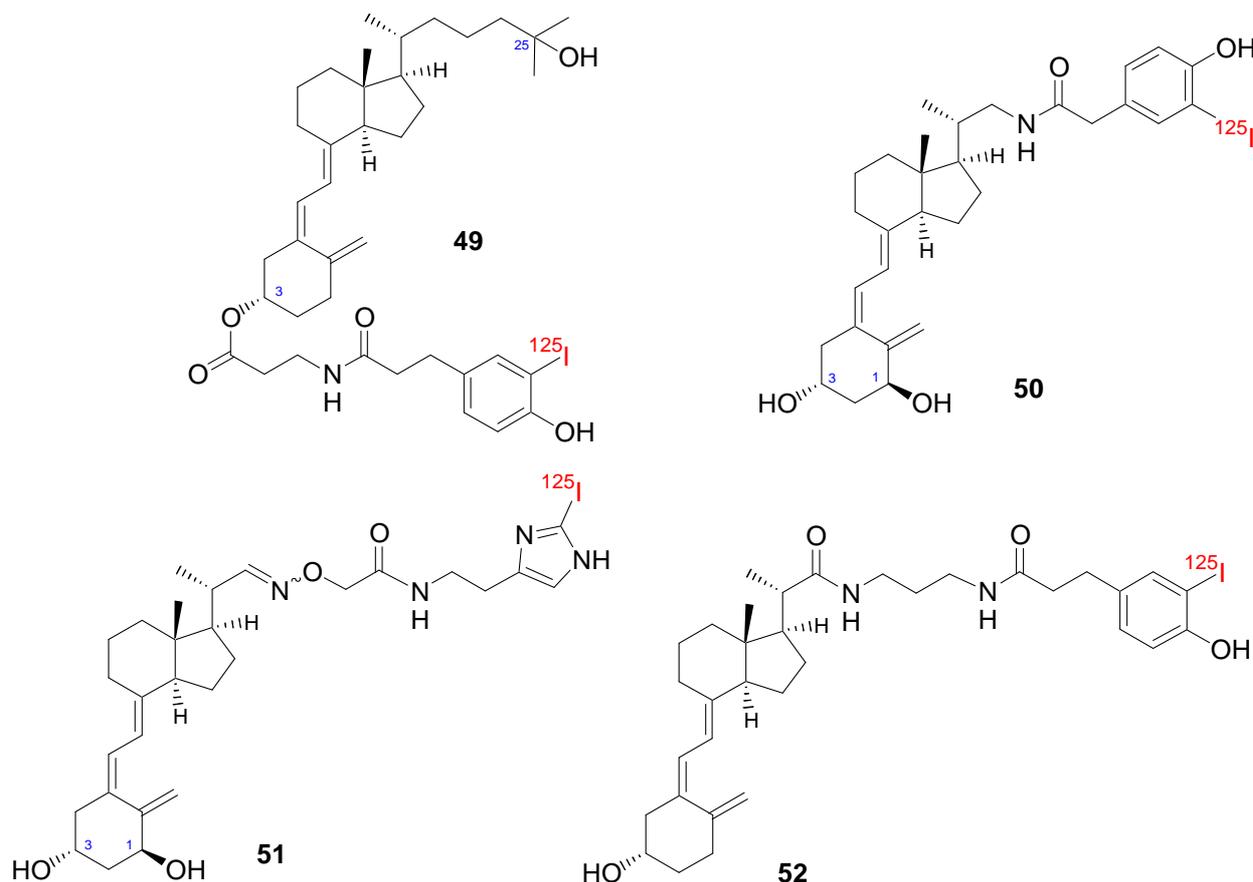


Figure 65 : Traceurs connus de la vitamine D

Le dérivé 22-CMO-(3-[<sup>125</sup>I]iodohistamine)-1 $\alpha$ -OH vitamine D **51**, très proche en structure du traceur 22-CMO-(5-[<sup>125</sup>I]iodohistamine) vitamine D **65** est breveté pour un dosage de la 1,25-dihydroxyvitamine D.<sup>100</sup> D'autres brevets ont été déposés pour des dosages de la 1,25-dihydroxyvitamine D.<sup>101</sup> (Figure 65)

Hollis *et al.* décrivent dans un article sur le dosage de la 25-OH vitamine D de DiaSorin, un traceur iodé obtenu par couplage du réactif de Bolton-Hunter déjà radioactif sur la 20-CO-NH-(3-aminopropyl) vitamine D **52**.<sup>102</sup> Mais un marquage direct d'un dérivé à ioder (DAI) reste préférable pour des raisons économiques.

### II.3.1 Dérivés à ioder

Des premiers traceurs iodés non radioactifs ont été synthétisés pour permettre l'optimisation des conditions de marquage et de séparation avec l'iode radioactif. La sélection de structures de traceurs adaptables aux anticorps est une étape cruciale pour mesurer l'affinité et la spécificité des anticorps puis pour établir la faisabilité d'une trousse de dosage RIA.

<sup>100</sup> David, L.; Kirkley, B. A. WO98/21580 **1996**.

<sup>101</sup> Hollis, B. W. EP0753743 **1996**. Tanabe, M.; Ikuta, S. US5214170 **1993**. Bouillon, R.; De Clerco, P. J.; Eliard, P.; Vanderwalle, M. US5232836 **1992**. Oshida, J.-I.; Nishikawa, O.; Tsuruta, H.; Takeshita, T.; Yamamoto, I.; Ishimaru, K. US4456553 **1983**. Oshida, J.-I.; Nishikawa, O.; Ishimaru, K.; Tsuruta, H.; Takeshita, T.; Yamamoto, I. EP0092004 **1982**.

<sup>102</sup> Hollis, B. W.; Kamerud, J. Q.; Selvaag, S. R.; Lorenz, J. D.; Napoli, J. L. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1993**, 39, 529-533.

### II.3.1.1 22-Iodo vitamine D

Le plus simple des dérivés iodés de la vitamine D est la 22-iodo vitamine D **54**,<sup>103</sup> obtenue par une réaction de Finkelstein de l'iodure de sodium sur le tosylate **53** (ou **32**).<sup>104</sup>

Son précurseur est le triénol **31**, synthétisé dès le début des travaux de recherche, dont l'alcool primaire en position 22 est transformé en groupe partant (tosylate, *para*-toluènesulfonate, *p*Ts) pour être ensuite substitué par l'iode dans une réaction de Finkelstein.

Cette réaction consiste à déplacer l'équilibre d'une réaction qui ne se fait pas naturellement dans ce sens. L'iodure de sodium est l'un des rares sels soluble dans l'acétone, en revanche le *para*-toluènesulfonate de sodium est insoluble. Ainsi, l'iode soluble réagit sur le tosylate par une S<sub>N</sub>2 et le *para*-toluènesulfonate de sodium, précipité dans l'acétone, ne peut plus réagir.

Dans le schéma de synthèse, il est préférable d'effectuer les réactions dans l'ordre : tosylation (Rdt : 97%), déprotection de l'alcool (Rdt : 47%), réaction de Finkelstein (Rdt : 56%). En effet, il faut d'être sûr de la substitution du tosylate par l'iode et non par le fluor, provenant du réactif TBAF de déprotection de l'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle (Figure 66). Cette vérification est facile par RMN. La réaction de Finkelstein reste possible sur le tosylate du triène **32** (Rdt : 89%).

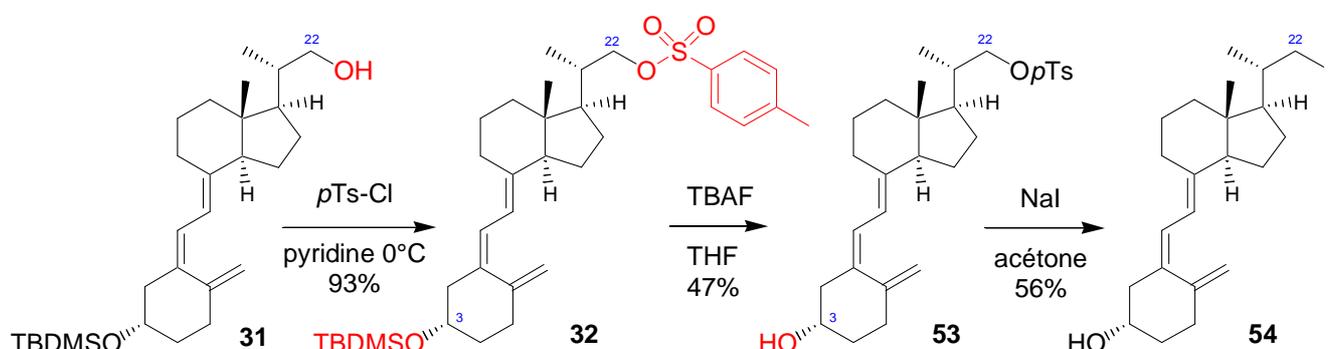


Figure 66 : Synthèse de la 22-iodo vitamine D **54**

Un élément déterminant remet en question l'utilisation industrielle de ce traceur iodé : la réaction de Finkelstein se fait dans l'acétone anhydre et avec de l'iodure de sodium solide ou séché. Or il n'est pas concevable industriellement de sécher de l'iode radioactif malgré ce qui est décrit dans la littérature.<sup>105</sup> Ce traceur est par conséquent abandonné.

### II.3.1.2 20-CO-(5-iodohistamine) vitamine D 59

La 22-[<sup>125</sup>I]iodo vitamine D **54** ne pouvant être préparée à grande échelle, il faut envisager des traceurs radioactifs plus classiques, par exemple un dérivé histaminé, iodé par l'association d'iodure de sodium et de chloramine T, réactif très utilisé pour ce type de marquages.

<sup>103</sup> Perez-Sestelo, J.; Mascarenas, J. L.; Castedo, L.; Mourino, A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 275-278.

<sup>104</sup> Mascarenas, J. L.; Mourino, A.; Castedo, L. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 1269-1272. Castedo, L.; Mascarenas, J. L.; Mourino, A.; Sarandeses, L. A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1203-1206. Scheddin, D.; Mayer, H.; Wittmann, S.; Schönecker, B.; Gliesing, S.; Reichenbacher, M. *Steroids* **1996**, 61, 598-608.

<sup>105</sup> Ali, H.; Rousseau, J.; Lafreniere, J.; van Lier, J. E. *Steroids* **2000**, 65, 74-84. Ali, H.; Rousseau, J.; Gantchev, T. G.; Lier, J. E. v. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 4255-4263. Labaree, D. C.; Hoyte, R. M.; Nazareth, L. V.; Weigel, N. L.; Hochberg, R. B. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2021-2034. Owoyale, J. A.; Szinai, S. S. *Steroids* **1981**, 37, 133-142.

### Préparation du dérivé à ioder

L'étape préliminaire est l'obtention du dérivé histaminé **58** du premier haptène, 20-COOH vitamine D **20**. Pour cela deux voies sont possibles :

- Le couplage de l'histamine à la forme protégée de la vitamine D (les adduits-SO<sub>2</sub> **13a** ou **b**), puis la poursuite de la synthèse : déprotection du triène, isomérisation du triène et déprotection de l'alcool. (Figure 67)

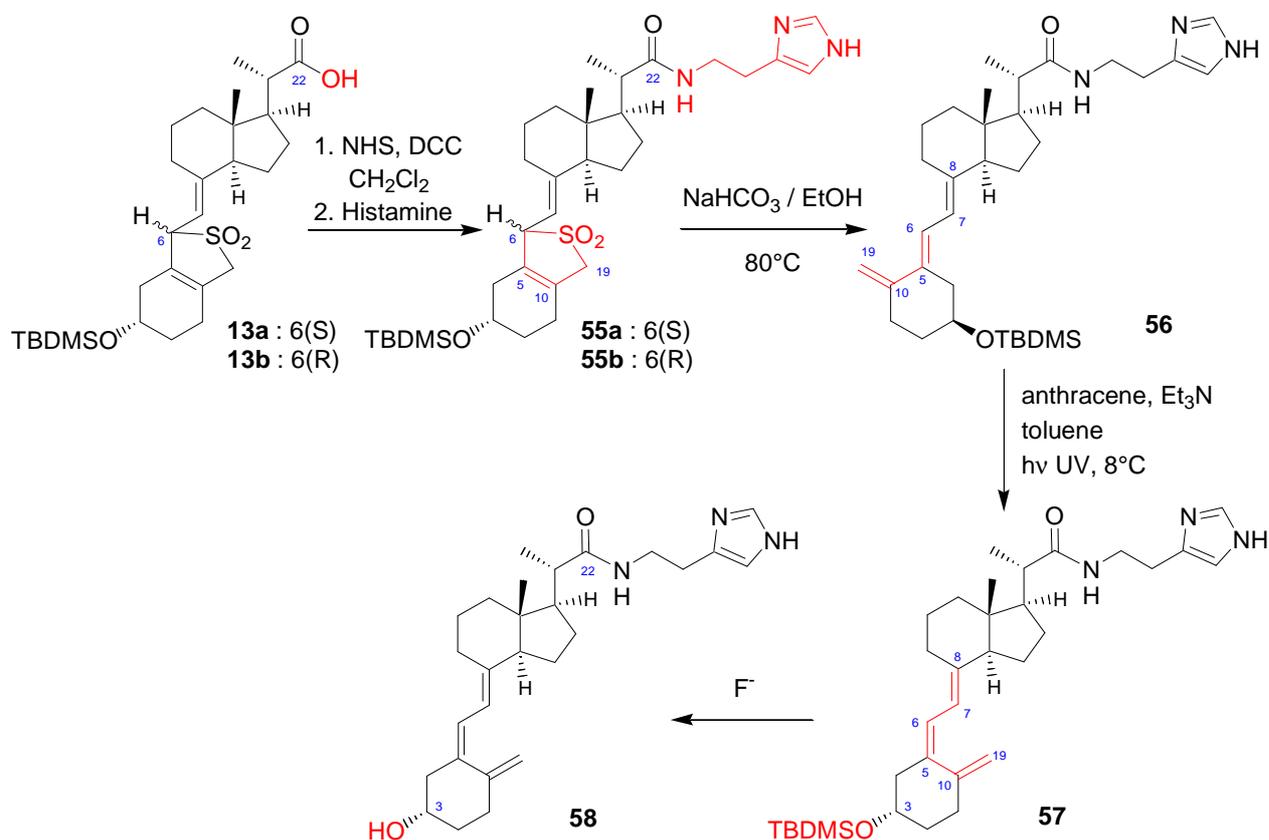


Figure 67 : Synthèse du dérivé histaminé **58** à partir des adduits-SO<sub>2</sub>

- Le couplage direct de l'histamine au même haptène que celui utilisé pour le couplage à la BSA. Les mêmes conditions sont utilisées, l'haptène activé sous forme d'ester de N-hydroxysuccinimide **21** est dissous dans le THF et l'histamine en solution aqueuse de bicarbonate de sodium 0,1 M est ajoutée en excès. (Figure 68)

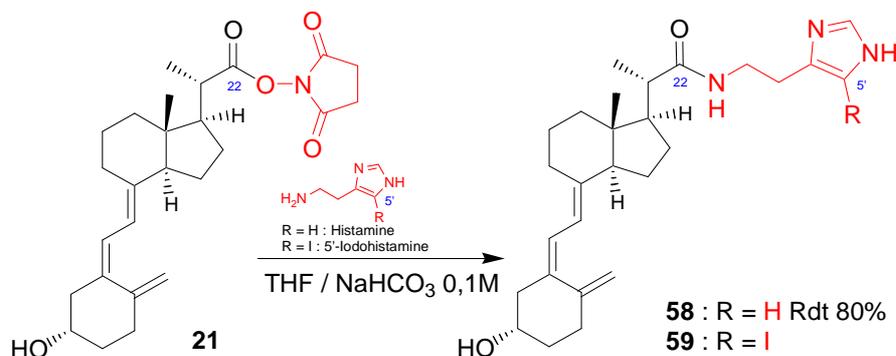


Figure 68 : Synthèse des dérivés histaminés **58** et **59** à partir de l'ester activé **21**

La première voie permet de travailler sur des produits intrinsèquement basiques et donc d'éviter les problèmes d'isomérisations du *trans*-triène en *iso*-triène rencontrés au début des travaux de recherche. Mais après les améliorations apportées à l'étape de déprotection du triène et à la photo-isomérisation, il est plus intéressant de garder un maximum d'étapes communes entre l'haptène et le traceur. Par la suite, les traceurs seront tous issus du couplage de l'histamine sur les haptènes.

### Marquage à froid

Préalablement à un marquage radioactif à l'iode(125), les premiers dérivés à ioder ont fait l'objet d'un marquage « froid » dans les mêmes conditions qu'un marquage radioactif. Une solution de NaI 1 mM a d'abord été employée, avant d'utiliser, en conditions réelles, une solution à 50  $\mu$ M. L'agent oxydant du NaI est la chloramine T et le milieu réactionnel est composé de méthanol et de tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7,4. En fin de réaction, un excès d'une solution de métabisulfite de sodium sert à réduire le I<sub>2</sub> volatil et susceptible de rester malgré le fait qu'il est présent en défaut par rapport au dérivé à ioder. (Figure 69) En effet, les quantités d'iode(125) sont très faibles et il est préférable que celui-ci soit entièrement consommé pour limiter les pertes de radioactivité. De plus la diiodation du dérivé à ioder doit être évitée.

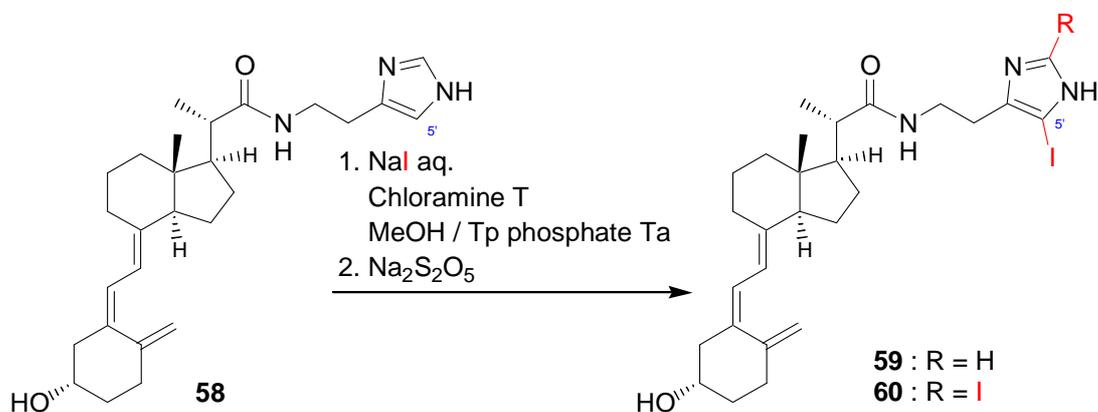


Figure 69 : Marquage à froid de la 20-CO-histamine vitamine D 25

Le facteur primordial pour l'efficacité du marquage radioactif des dérivés à ioder de la vitamine D semble être la solubilité du dérivé à ioder dans le milieu réactionnel d'iodation. Ainsi, trop peu de méthanol engendre un faible rendement de marquage probablement à cause de la forte hydrophobicité du squelette de la vitamine D. Ce type de problème est aussi rencontré fréquemment lors des dosages et nécessite des précautions particulières qui seront discutées plus loin.<sup>106</sup>

Le marquage à l'iode froid donne de bons résultats caractérisables en CLHP-UV à barrette de diode lorsque le substrat est pur et que l'iode est présent en quantité suffisante pour que le produit d'iodation soit visible en CLHP (voir Tableau 12 pour les conditions de séparation). Ce n'est pas le cas lors du marquage témoin froid avec 10  $\mu$ g de dérivé à ioder et NaI 50  $\mu$ M, pour lequel le pic d'iodation est perdu dans le bruit de fond du chromatogramme CLHP. Par contre, les essais d'iodation qui utilisent 0,5 équivalent d'iodure de sodium 1 mM pour 10  $\mu$ g de dérivé à ioder **58** et un excès de chloramine T donnent un chromatogramme en accord avec ce que l'on peut attendre : trois pics, le premier est le substrat en excès (**58** ; Tr 10 mn), le deuxième, de même dimension, est le produit de mono-iodation (**59** ; Tr 15 mn) et le dernier, minoritaire, est le produit di-iodé (**60** ; Tr 21 mn) (Figure 70).

<sup>106</sup> Kobayashi, N.; Ueda, K.; Shimada, K. *Clinica Chimica Acta* **1992**, *209*, 83-88.

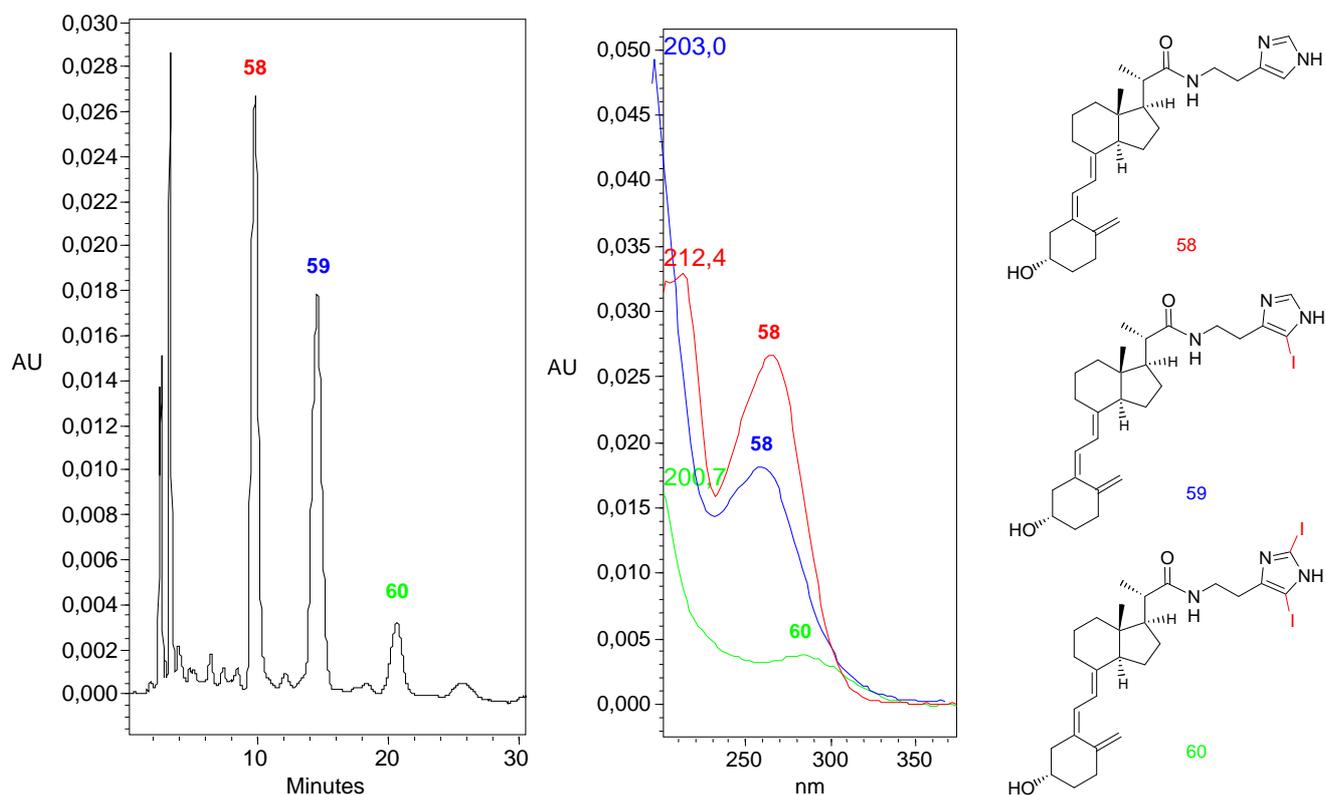


Figure 70 : Chromatogramme à 264 nm du marquage sur 10  $\mu$ g avec 0,5  $\text{eq.}$  de NaI froid 1 mn (injection de 20  $\mu$ L)

Il reste alors à adapter la quantité de dérivé à ioder **58** pour que la solution de NaI la plus diluée et se rapprochant le plus des conditions réelles d'iodation puisse être utilisée. (Figure 71)

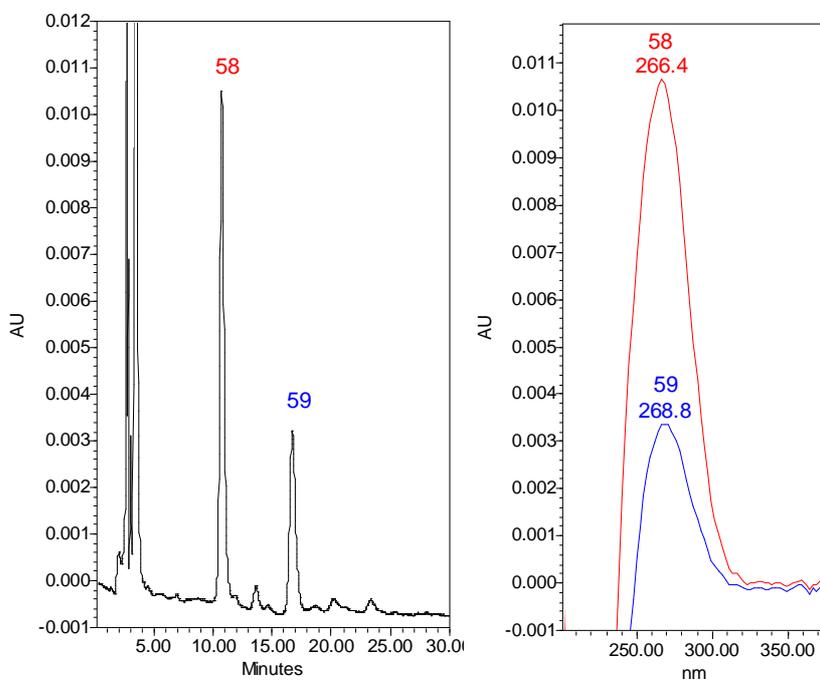


Figure 71 : Chromatogramme à 264 nm du marquage de 0,5  $\mu$ g de 20-CO-histamine vitamine D **58** (injection de 100  $\mu$ L)

Les essais préliminaires sont donc effectués sur 10 µg de dérivé à ioder **58** (DAI), puis les conditions opératoires sont par la suite adaptées à un marquage sur 0,5 µg de dérivé à ioder :

- Les volumes sont conservés, ainsi la concentration des réactifs (chloramine T et métabisulfite de sodium) est divisée par 20. La vitesse de réaction diminue avec la concentration du dérivé à ioder dans le milieu réactionnel.
- Le temps de réaction est passé à 2 mn.
- L'iode de sodium (≈10 µL) est utilisé en quantité équivalente à celle de la solution radioactive (50 µM en solution aqueuse de NaOH pH 8) soit 1 mCi.

Il est très important que la chloramine T ne soit pas en trop fort excès par rapport au dérivé à ioder pour ne pas provoquer de réactions parasites.<sup>107</sup>

Plusieurs facteurs ont été étudiés (Tableau 6) :

- Des solutions de chloramine T de dates différentes (0 à 1 semaine) n'ont montré aucune différence d'iodation dans les chromatogrammes CLHP.
- La présence d'un excès d'iode de sodium par rapport au dérivé à ioder engendre une forte augmentation du pic du produit de diiodation, jusqu'alors négligeable.
- L'utilisation de l'iode de sodium en quantité équivalente au radioactif sur 10 µg de dérivé à ioder donne un pic de produit de mono-iodation de très faible intensité, à peine visible dans le bruit de fond dû aux impuretés, pourtant très minoritaires, du dérivé à ioder.
- La diminution de la quantité de dérivé à ioder de 10 µg à 0,5 µg et l'utilisation de l'iode froid rend le produit de mono-iodation visible sur le chromatogramme CLHP. Mais les réactifs utilisés sont trop dilués et ralentissent la vitesse de réaction.
- L'utilisation de la même quantité de réactifs sur 0,5 µg que sur 10 µg avec l'iode froid et toujours 2 mn de temps de réaction donne deux fois plus de produit de mono-iodation, sans dégradation visible.

ESSAI	1	2	3	4	5	6 (Figure 71)
20-CO-histamine vitamine D <b>58</b>	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	0,5 µg	0,5 µg
Iodure de sodium	1 mM 0,5 éq.	1 mM 0,5 éq.	1 mM 1,5 éq.	"froid" 50 µM 0,5 éq.	"froid" 50 µM 0,5 éq.	"froid" 50 µM 0,5 éq.
Chloramine T dans tampon phosphate 0,1M pH 7,4	1 mg/mL 2 éq. (1 semaine)	1 mg/mL 2 éq. (nouvelle)	1 mg/mL 2 éq.	1 mg/mL 2 éq.	0,05 mg/mL 2 éq.	1 mg/mL 40 éq.
Méthanol	23 µL	23 µL	23 µL	23 µL	23 µL	23 µL
Métabisulfite de sodium dans tampon phosphate 0,1M pH 7,4	5 mg/mL 10 éq.	5 mg/mL 10 éq.	5 mg/mL 10 éq.	5 mg/mL 10 éq.	0,5 mg/mL 10 éq.	5 mg/mL 200 éq.
Temps de réaction	1 mn	1 mn	1 mn	1 mn	2 mn	2 mn

Tableau 6 : Paramètres testés lors des marquages de la 20-CO-histamine vitamine D **58**

Afin de faciliter le repérage et l'authentification du produit marqué, la 20-CO-(5-iodohistamine) vitamine D **59** a été synthétisée de manière indirecte par le couplage de l'ester activé **21** à la 5-iodohistamine **62** (Figure 68), préparée par iodation de l'histamine **61** pour ne pas utiliser le système iodure de sodium / chloramine T et pouvoir déceler ainsi d'éventuels artefacts.

La 5-iodohistamine **62** est préparée selon la méthode décrite par Tominaga.<sup>108</sup> L'histamine est iodée en mélange biphasique hexane/solution aqueuse de soude 0,5 M par de l'iode en proportions stœchiométriques, qui après un traitement assez lourd, permet d'obtenir une fraction précipitée du

<sup>107</sup> Farah, K.; Farouk, N. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1998**, *41*, 255-260.

<sup>108</sup> Tominaga, M.; Paiva, A. C. M. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 693-694.

dichlorhydrate en mélange avec un peu de produit de diiodation **63** (Figure 72). Une purification plus poussée des eaux-mères permet d'obtenir suffisamment de dichlorhydrate de 5-iodohistamine pur pour effectuer des couplages avec les esters de N-hydroxysuccinimide des haptènes de la vitamine D.

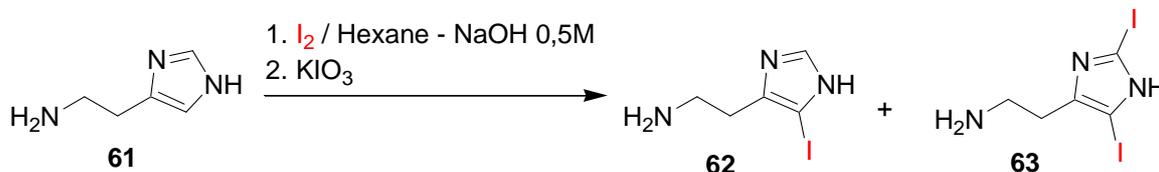


Figure 72 : Iodation de l'histamine

### II.3.1.3 22-CMO-(5-iodohistamine) vitamine D 65

#### Préparation du dérivé à ioder

De même que pour le traceur du 1<sup>er</sup> immunogène, les dérivés histaminé **64** et 5-iodohistaminé **65** ont été préparés par condensation des histamines correspondantes sur l'ester activé de la 22-CMO vitamine D **28**. (Figure 73)

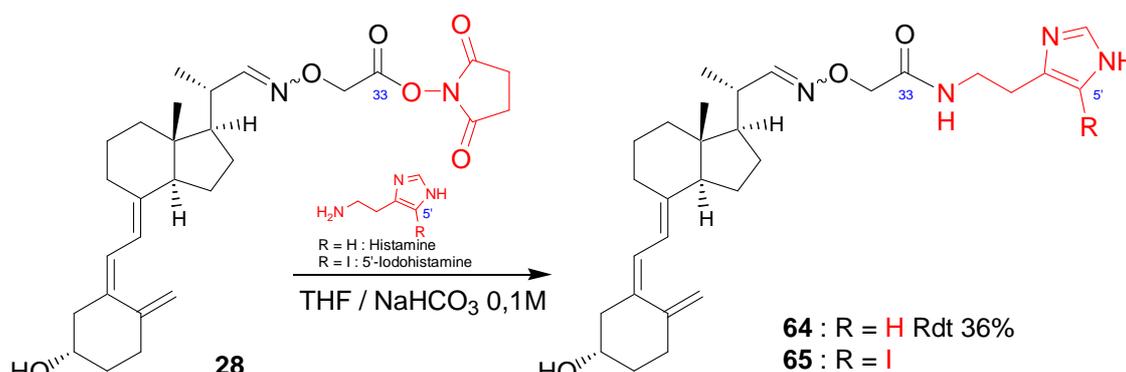


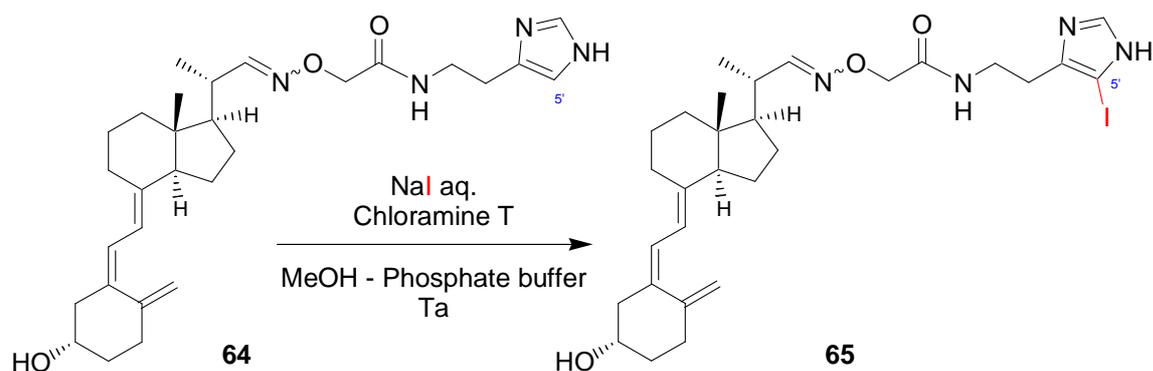
Figure 73 : Synthèse des dérivés histaminés **64** et **65** à partir de l'ester activé **28**

Une fraction de dérivé à ioder **64** est purifiée par CLHP analytique afin de garantir sa pureté pour des marquages à l'iode(125).

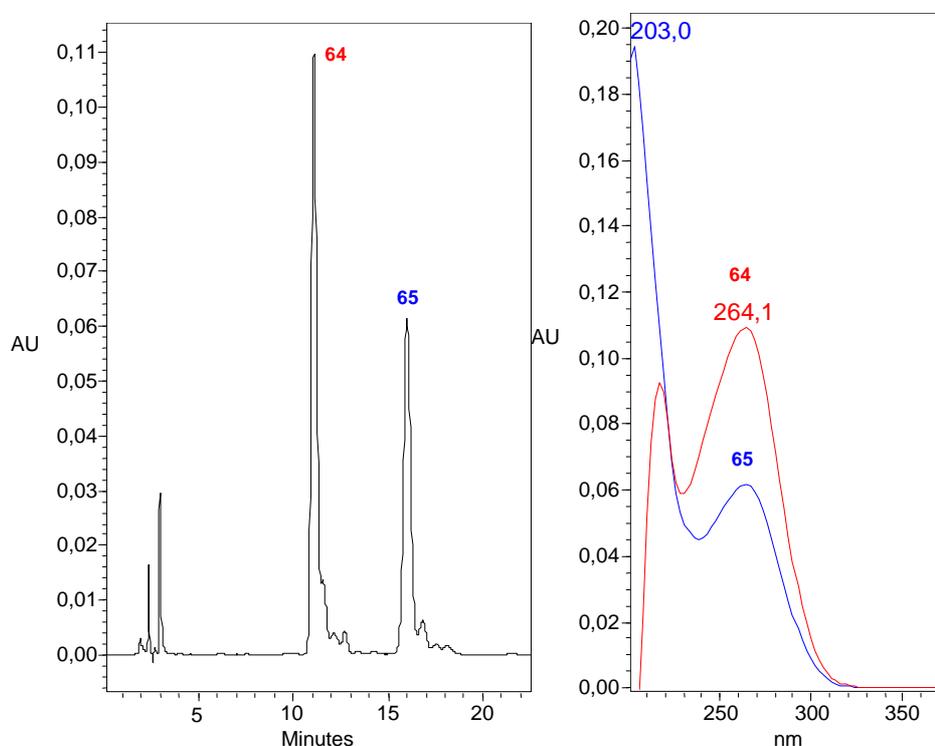
#### Marquage à froid

Le marquage de la 22-CMO-histamine vitamine D **64** est testé dans les mêmes conditions que pour le premier traceur (Figure 74). Les chromatogrammes CLHP ne montrent aucun produit d'iodation et le pic du dérivé à ioder (dérivé à ioder) est anormalement faible. L'explication provient du manque de solubilité du dérivé à ioder dans le milieu réactionnel lors du marquage.

Si les produits sont peu ou pas solubles au moment de la réaction ou avant l'injection dans en CLHP, ils précipitent ou s'adsorbent sur les parois du tube. En effet, il faut un mélange méthanol/eau plus riche en méthanol pour éluer le dérivé 22-CMO-histamine **64** en CLHP que pour le dérivé 20-CO-histamine **58** ce qui suggère la plus faible solubilité de la 22-CMO-histamine vitamine D **64** dans le milieu réactionnel.


 Figure 74 : Marquage à froid de la 22-CMO-histamine vitamine D **64**

ESSAI	1	2	3	4	5 (Figure 75)
22-CMO-histamine vitamine D <b>64</b>	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg
Iodure de sodium	1 mM 0,5 éq.	1 mM 0,5 éq.	1 mM 0,5 éq.	1 mM 0,5 éq.	1 mM 0,5 éq.
Chloramine T dans tampon phosphate 0,1M pH 7,4	1 mg/mL 2 éq.	1 mg/mL 2 éq.	1 mg/mL 2 éq.	1 mg/mL 2 éq.	1 mg/mL 2 éq.
Methanol	20 µL	20 µL	20 µL <i>dilution avant injection</i>	40 µL	40 µL
Métabisulfite de sodium dans tampon phosphate 0,1M pH 7,4	5 mg/mL 10 éq.	5 mg/mL 10 éq.	5 mg/mL 10 éq.	5 mg/mL 10 éq.	0,5 mg/mL 10 éq.
Temps de réaction	1 mn	1 mn	1 mn	2 mn	2 mn

 Tableau 7 : Paramètres testés lors des marquages de la 22-CMO-histamine vitamine D **64**

 Figure 75 : Chromatogramme à 264 nm du marquage de 10 µg de 22-CMO-histamine vitamine D **64** (injection de 20 µL)

Le paramètre le plus influent pour l'iodation du dérivé à ioder CMO **64** est donc la solubilité des dérivés de la vitamine D. Deux fois plus de méthanol lors de la réaction donne un chromatogramme CLHP correct. (Figure 75 ; Tableau 7)

La transposition à un marquage sur 0,5 µg de dérivé à ioder n'a pas été testée, mais il ne fait aucun doute que les conditions du marquage du premier traceur, adaptées à la solubilité du CMO fonctionnent.

L'ensemble de ces considérations servira à la iodation des autres dérivé à ioder.

### II.3.1.4 Préparation du dérivé à ioder 22-CO-histamine vitamine D **66**

Le dérivé à ioder 22-CO-histamine vitamine D **66** a été préparé de la même manière que les précédents :

L'ester activé NHS **42** est mis en présence d'un excès d'histamine dans un mélange de THF et de bicarbonate de sodium 0,1 M aqueux. (Figure 76)

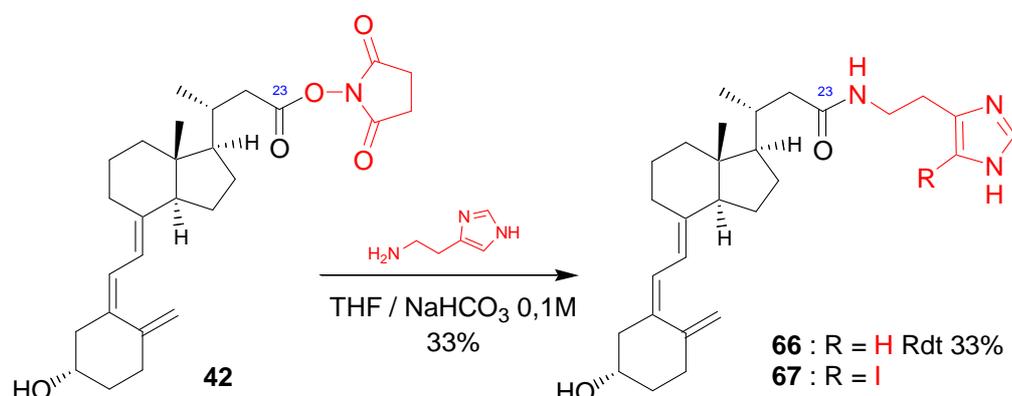


Figure 76 : Préparation du dérivé à ioder 22-CO-histamine vitamine D **66**

Une fraction de dérivé à ioder **66** est purifiée par CLHP analytique afin de garantir sa pureté pour les marquages à l'iode(125).

#### Marquage à froid

Le marquage est effectué sur une solution de dérivé à ioder **66** dans l'éthanol 96%, dont la concentration a été évaluée par dosage CLHP à 0,3 mg/mL. La quantité introduite correspond à environ 1 µg. L'éthanol est évaporé et remplacé par le méthanol pour se placer dans des conditions proches de celles déjà utilisées pour les essais de marquage des précédents dérivés à ioder à l'INSERM et à Immunotech. Ces conditions d'iodation à froid fonctionnent normalement pour le dérivé à ioder 22-CO-histamine vitamine D **66**.

ESSAI	1
22-CO-histamine vitamine D <b>66</b>	1 µg
Iodure de sodium	"froid" 50 µM 0,5 éq.
Chloramine T dans tampon phosphate 0,1M pH 7,4	1 mg/mL 20 éq.
Méthanol	23 µL
Métabisulfite de sodium dans tampon phosphate 0,1M pH 7,4	5 mg/mL 85 éq.
Temps de réaction	2 mn

### II.3.1.5 Préparation du dérivé à ioder 23-CMO-histamine vitamine D **68**

Le dérivé à ioder 23-CMO-histamine vitamine D **68** a été préparé de la même manière que les précédents :

L'ester activé de N-hydroxysuccinimide **44** est mis en présence d'un excès d'histamine dans un mélange de THF et de bicarbonate de sodium 0,1 M aqueux. (Figure 77) Le produit est obtenu quantitativement.

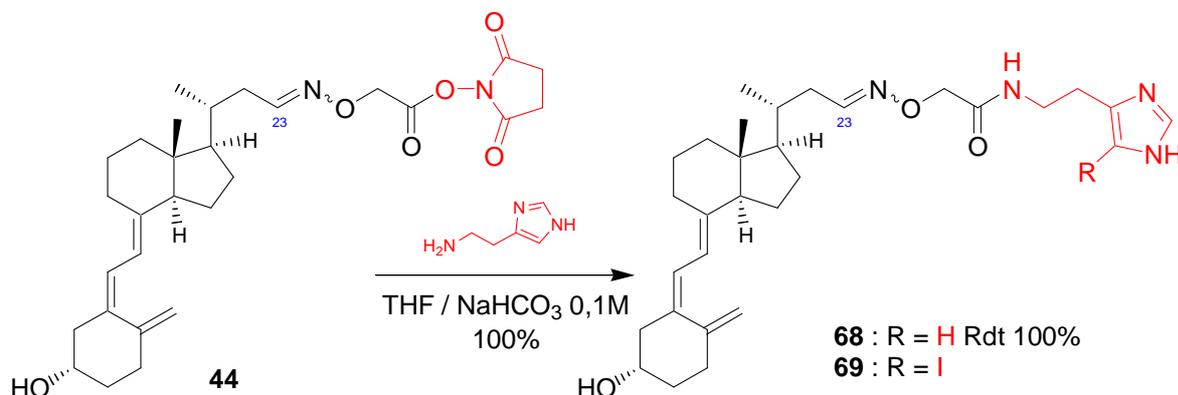


Figure 77 : Préparation du dérivé à ioder 23-CMO-histamine vitamine D **68**

Une fraction de dérivé à ioder **68** est purifiée par CLHP analytique afin de garantir sa pureté pour les marquages à l'iode(125).

### II.3.1.6 Préparation du dérivé à ioder 22-(S-Bz-CO-histamine) vitamine D **70**

Le dérivé à ioder 22-(S-Bz-CO-histamine) vitamine D **70** a été préparé de la même manière que les précédents :

L'ester activé NHS **46** est mis en présence d'un excès d'histamine dans un mélange de THF et de bicarbonate de sodium 0,1 M aqueux. (Figure 78)

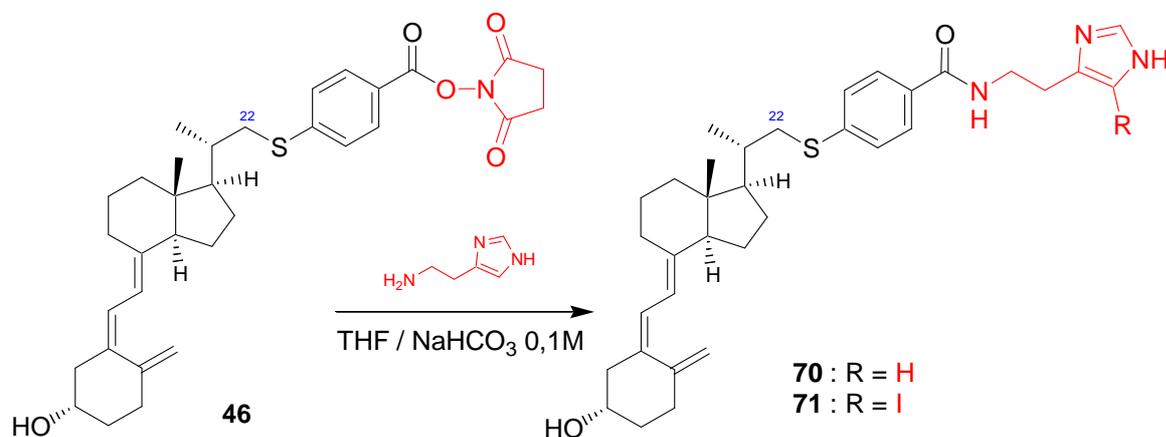


Figure 78 : Préparation du dérivé à ioder 22-(S-Bz-CO-histamine) vitamine D **70**

Une fraction de dérivé à ioder **70** est purifiée par CLHP analytique afin de garantir sa pureté pour les marquages à l'iode(125).

## II.3.2 Autres dérivés à ioder non-histaminés

Il est important de diversifier les traceurs (radioactifs ou autres) pour ne pas passer à côté d'un très bon anticorps qui ne peut se révéler qu'en présence d'un traceur associé de structure optimale permettant son exploitation dans un dosage. En pratique, dans un premier temps, chaque traceur histaminé

homologue des immunogènes est testé avec chaque anticorps. Il est possible par la suite de faire varier la structure du chaînon et la partie iodable.

### II.3.2.1 Hydrogénation de l'acide urocanique

L'histamine peut être couplée sur les acides carboxyliques activés puis iodée sur son noyau imidazole. Dans le cas de traceurs comportant un bras espaceur de type diamine, l'histamine ne peut plus être employée et il faut trouver un synthon de type acide carboxylique contenant un noyau imidazole. Une molécule possible ayant cette analogie de structure avec l'histamine est l'acide 3-(1H-imidazol-4-yl)-propionique **73** facilement obtenu par hydrogénation catalytique de la double liaison de l'acide urocanique **72** sur palladium sur charbon dans l'eau avec des rendements quantitatifs.<sup>109</sup> (Figure 79)

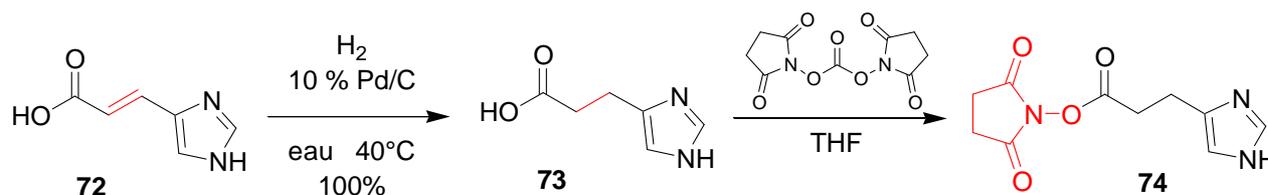


Figure 79 : Hydrogénation de l'acide urocanique **72**

Par la suite, l'acide 3-(1H-imidazol-4-yl)-propionique **73** est activé sous forme d'ester de N-hydroxysuccinimide **74** par le carbonate de N,N'-disuccinimide dans le THF.

### II.3.2.2 22-NH-[3-(1H-imidazol-4-yl)-propionamido] vitamine D **84**

La première mise en application des légères variations de structure des traceurs afin d'adapter le mieux possible le couple anticorps – traceur est la préparation du dérivé à iodé 22-NH-[3-(1H-imidazol-4-yl)-propionate] vitamine D **84** dont la ressemblance avec le dérivé à ioder 22-CO-histamine vitamine D **66** se remarque par l'inversion de sens de la fonction amide (Figure 80). Ce 6<sup>ème</sup> dérivé à ioder est préparé par couplage de l'ester activé de N-hydroxysuccinimide **74** à la 22-amino vitamine D **84** dont la synthèse est détaillée plus loin (II.4.3 Transformation d'une fonction chimique en fonction amine).

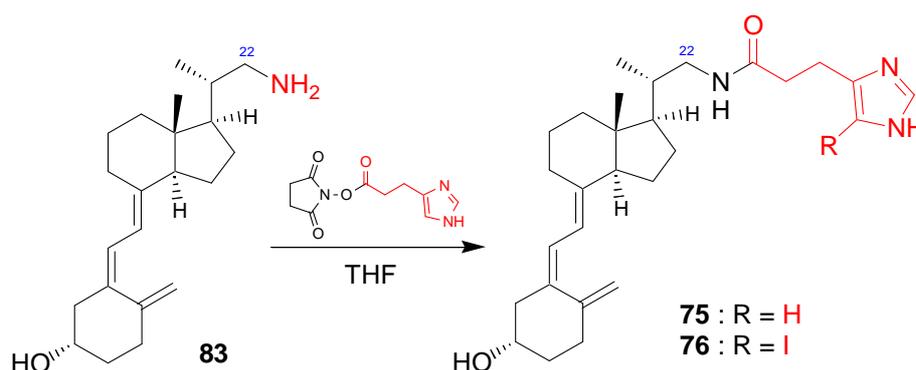


Figure 80 : Dérivé à ioder 22-NH-[3-(1H-imidazol-4-yl)-propionate] vitamine D **75**

Une fraction de dérivé à ioder **75** est purifiée par CLHP analytique afin de garantir sa pureté pour les marquages à l'iode(125).

<sup>109</sup> Ganellin, C. R.; Fkyerat, A.; Bang-Andersen, B.; Athmani, S.; Tertiuk, W.; et al. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3806-3813.

### II.3.3 Marquage à l'iode(125)

Les marquages à l'iode(125), émetteur de rayons gamma et de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de 60 jours ont été réalisés avec une solution aqueuse basique (NaOH, pH  $\approx$  8) à environ 50  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  en présence de chloramine T comme oxydant dans les conditions précédemment mises au point.

Le rendement de la iodation est déterminé par rapport à l'iode(125) et sa radioactivité. Ainsi, la radioactivité théorique engagée dans la réaction de marquage est calculée à partir de la date du marquage à l'iode et de la date de la calibration de la solution de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  employée. L'activité suit une loi à décroissance exponentielle :

$$A = A_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t} \quad \text{avec} \quad \lambda = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}}$$

soit  $A = A_0 \cdot e^{-\frac{\ln(2)}{t_{1/2}} \cdot (\text{date}_{\text{cal}} - \text{date})}$

A : activité

$\lambda$  : constante de radioactivité du radioélément

$t_{1/2}$  : demi-vie du radioélément

$\text{date}_{\text{cal}}$  : date de la calibration de  $A_0$

La radioactivité contenue dans les fractions collectées du pic attendu d'iodation est mesurée après dilution sur un aliquot de 100  $\mu\text{L}$ , puis calculée sur l'ensemble.

Les rendements obtenus sur l'ensemble des 6 traceurs sont tous de l'ordre de 50%. Ils dépendent de la durée de la réaction ainsi que de la solubilité du dérivé à ioder et donc de la quantité de méthanol lors de la réaction de marquage et lors de la dilution du milieu réactionnel avant la purification. Un temps de réaction plus long et un milieu réactionnel plus concentré favoriseraient le rendement, mais les réactifs ( $\text{Na}^{125}\text{I}$  et chloramine T) en solutions aqueuses, à des volumes fixes, affecteraient la solubilité du dérivé à ioder, solubilisé dans trop peu de méthanol par rapport au volume aqueux total.

### II.3.4 Dérivés biotinylés

Lors du premier criblage de la fusion du rat R1-30, les 16 plaques de cultures issues de cette fusion ont été testées par une méthode RIA à l'aide de plaques 96 puits sécables pré-coatées par la BSA biotinylée, puis coatées par un anticorps biotinylé de chèvre anti-anticorps de rat (GAR Fc). Cette méthode de screening s'est avérée très longue et fastidieuse à cause de la radioactivité à aspirer puits par puits et du comptage de la radioactivité liée en cassant les micro-puits un par un.

Afin de faciliter le processus de criblage, les dérivés biotinylés de la vitamine D (20-CO-NH-PEO-biotine vitamine D **77** et 22-CMO-NH-PEO-biotine vitamine D **78**) ont été synthétisés par couplage d'un dérivé de biotine aminé aux esters activés des deux premiers haptènes (20-CO-NHS **21** et 22-CMO-NHS vitamine D **28**) (Figure 81). Le criblage pourrait alors être effectué par une méthode de type EIA avec un conjugué streptavidine - horseradish peroxydase (SPOD) comme révélateur.

Le dérivé aminé de la biotine est formé d'une biotine elle-même couplée par sa fonction acide carboxylique à une diamine. Parmi les produits commerciaux, il en existe deux chez Pierce-Perbio dont l'un est rendu plus soluble dans les milieux aqueux par un bras espaceur de type triéthylèneglycol (Pierce-Perbio ref. 21346 EZ-Link™ Biotin-PEO-amine). Il a donc été utilisé pour améliorer la solubilité globale des traceurs EIA.

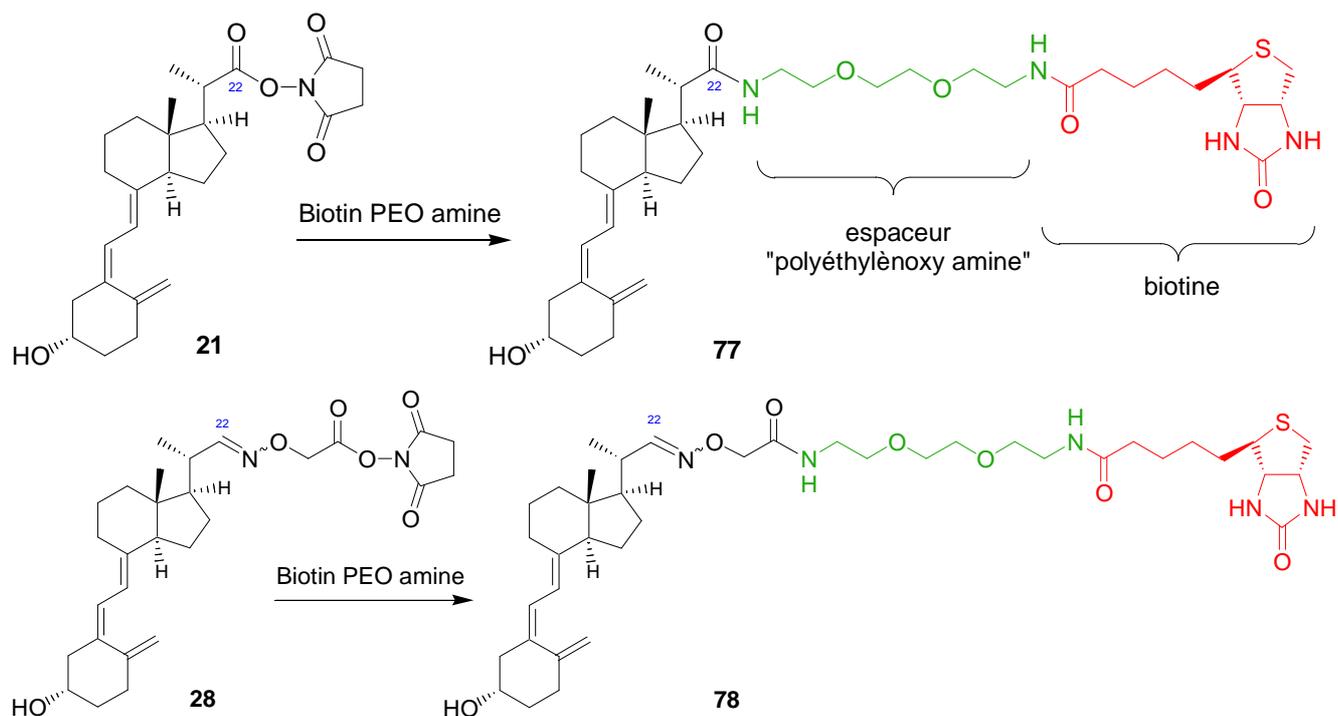


Figure 81 : Couplage du dérivé de la biotine sur les esters activés des deux 1<sup>er</sup> haptènes

Les rendements du couplage biotine – vitamine D ne sont pas optimisés. Les milieux réactionnels sont, soit évaporés à sec, soit extraits au dichlorométhane et dans tous les cas purifiés par CLHP sur une colonne phase inverse (C18) en collectant les pics d'absorption au  $\lambda_{\max}$  caractéristique de la vitamine D (264 nm). Chacune des fractions est diluée puis testée en EIA avec des anticorps purifiés de lapin, « coâtés » passivement sur une plaque 96 puits, incubation des fractions biotine - vitamine D, lavages et révélation par streptavidine-HRP puis TMB. (Figure 82)

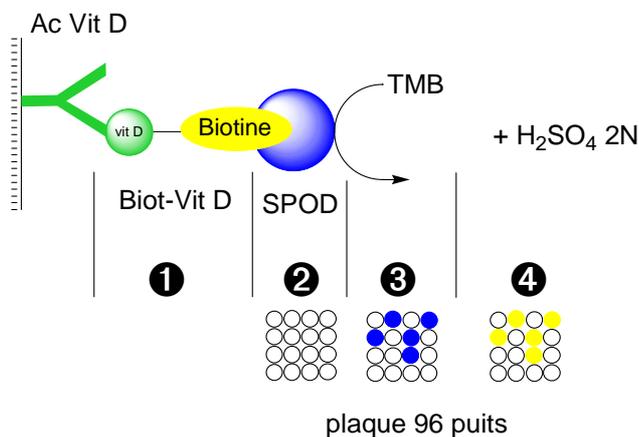


Figure 82 : Recherche des dérivés biotine - vitamine D

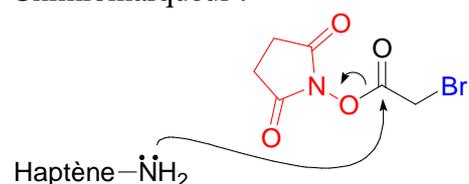
Cette méthode de détection des dérivés biotinylés de la vitamine D s'est révélée très efficace pour déterminer lesquelles des fractions collectées en sortie de colonne CLHP contenait le produit. Chacune des fractions positives par ce test a été évaporée et reprise dans 5 mL d'éthanol de manière à se situer à une concentration maximale de 1 mg/mL dans le cas extrême où tout le dérivé biotinylé se trouverait dans une seule fraction.

## II.4 Marqueurs d'affinité

La préparation des marqueurs d'affinité de la DBP et des anticorps monoclonaux nécessite le couplage covalent de la vitamine D à une petite molécule (**en rouge**) susceptible de générer une fixation covalente à certains acides aminés du site protéique de reconnaissance à étudier (**en bleu**).

Il est souvent très utile pour accéder à un marqueur d'affinité de disposer de précurseur aminés qui permettent ensuite soit un couplage peptidique par réaction sur l'ester de N-hydroxysuccinimide de l'acide bromoacétique ou de l'acide 5-azido-2-nitro-benzoïque, soit une substitution nucléophile aromatique ( $S_{N_{Ar}}$ ) par le 4-azido-1-fluoro-2-nitro-benzène. (**en rouge**)

Chimiomarqueur :

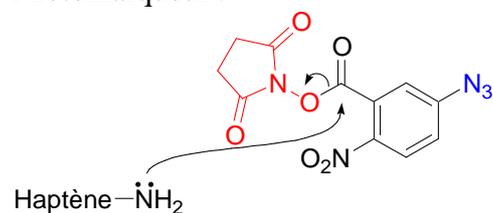


**couplage peptidique à l'haptène**

Couplage sur les acides aminés nucléophiles par SN

Ester de N-hydroxysuccinimide de l'acide bromoacétique

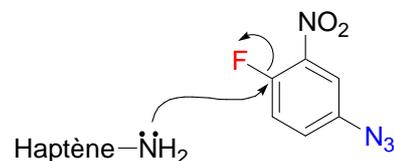
Photomarqueur :



**couplage peptidique à l'haptène**

Couplage sur les acides aminés via le nitrène généré par irradiation UV

Ester de N-hydroxysuccinimide de l'acide 5-Azido-2-nitrobenzoïque



**SN<sub>Ar</sub> par l'haptène**

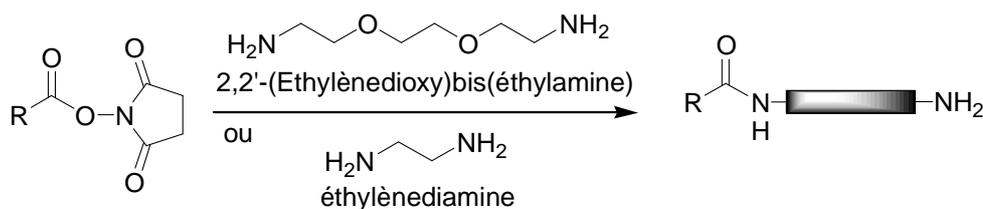
Couplage sur les acides aminés via le nitrène généré par irradiation UV

4-Azido-1-fluoro-2-nitrobenzène

### II.4.1 Accès aux dérivés aminés

Pour accéder aux dérivés aminés de la vitamine D plusieurs voies sont possibles dont l'emploi comme produit de départ des haptènes déjà préparés ou la synthèse de nouvelles molécules aminées :

- Couplage d'une diamine sur l'un des haptènes, lui-même activé sous forme d'ester de N-hydroxysuccinimide. La deuxième extrémité de la diamine servira ensuite à coupler le marqueur.



- Transformation d'une fonction chimique en fonction amine : la vitamine D est fonctionnalisée par des équivalents synthétiques des amines (azoture, nitro, cyano, ...)



Les analyses structurales (spectroscopies RMN et de masse) confirment leur présence.

### II.4.3 Transformation d'une fonction chimique en fonction amine

A l'inverse de la méthode précédente qui utilise un bras espaceur diamine, l'amine peut être directement introduite sur la vitamine D par réduction d'un azoture ou d'un nitrile eux même synthétisés par substitution nucléophile du tosylate **32** par l'azoture de sodium ou par le cyanure de potassium. (Figure 84)

La réaction de  $S_N2$  par le cyanure est déjà décrite (voir § II.1.5.1  $S_N2$  par le cyanure). Elle est utilisée comme voie d'accès au 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> immunogènes (22-CO-BSA **43** et 23-CMO-BSA vitamine D **45**).

La  $S_N2$  du tosylate **32** par l'azoture de sodium (très toxique, explosif) est basée sur le même principe. L'anion nucléophile azoture vient déplacer le groupe partant tosylate pour donner le produit de substitution, le 22-azido triène **77** (potentiellement explosif) avec un rendement de 82%. La réaction est effectuée dans le DMF afin d'augmenter la solubilité de l'azoture de sodium en large excès.

L'ordre d'enchaînement des réactions de déprotection de l'hydroxyle 3 suivies de la réduction par l'hydrure de lithium-aluminium s'avère préférable pour les deux raisons suivantes :

- Les produits de déprotection de l'alcool (22-azido **82** et 22-cyano **85**) sont moins polaires que les produits aminés et par conséquent plus facilement isolables,
- Les dérivés aminés, très polaires, sont obtenus à la dernière étape de synthèse, limitant ainsi les pertes.

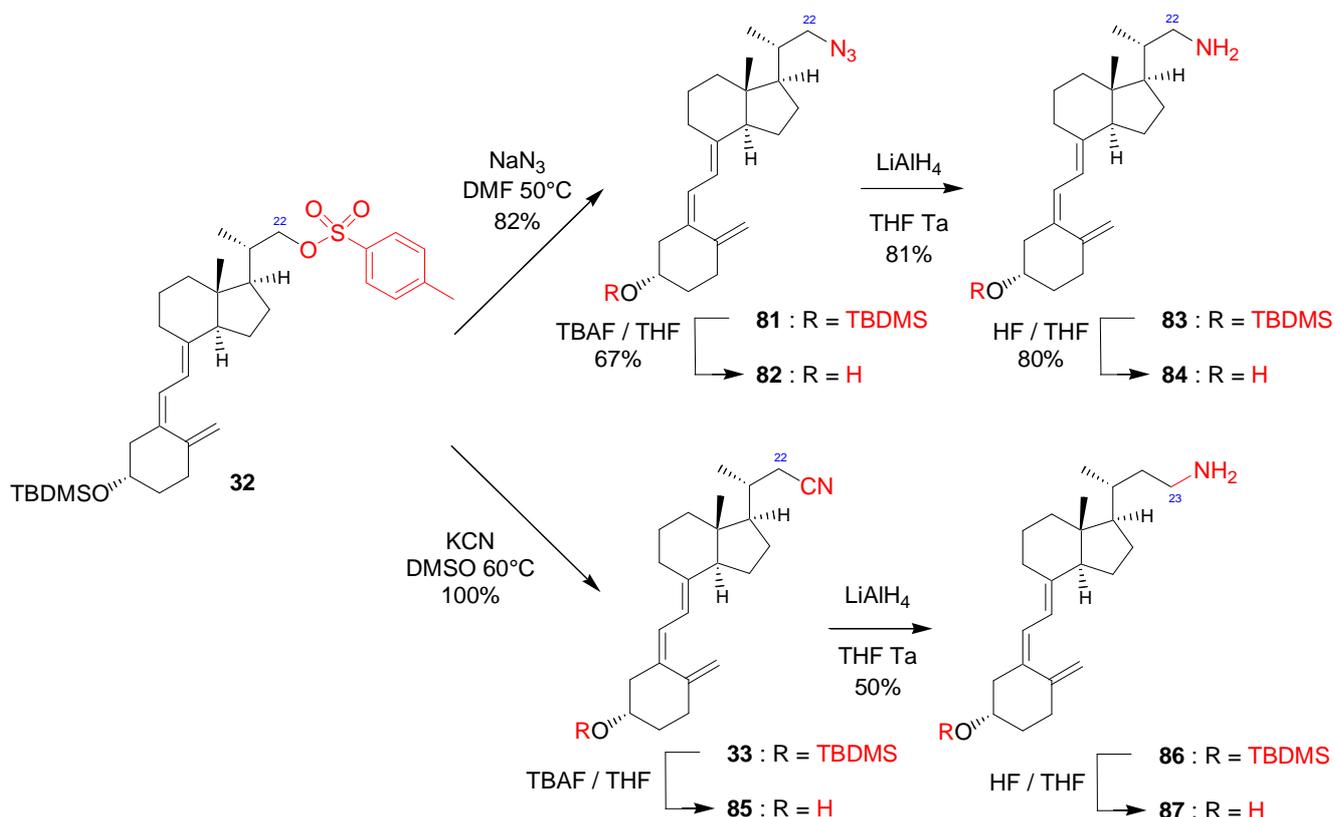
La déprotection de l'hydroxyle en position 3 des deux dérivés 22-azido **81** et 22-cyano **33** par le TBAF fournit la 22-azido **82** et la 22-cyano vitamine D **85**.

La réduction des deux dérivés 22-azido **82** et 22-cyano **85** vitamine D par l'hydrure de lithium aluminium dans le THF anhydre conduit respectivement aux 22-amino **84** et 23-amino **87** vitamine D, qui diffèrent d'un groupement méthylène (-CH<sub>2</sub>-). (Figure 84)

Si l'ordre, réduction par l'hydrure de lithium aluminium puis déprotection de l'hydroxyle 3 est retenu, il est préférable d'employer l'acide fluorhydrique dans le THF pour effectuer la déprotection.

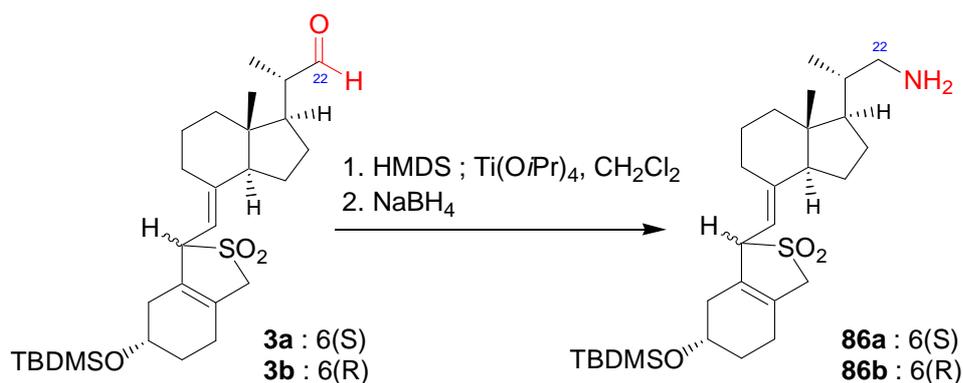
La réduction des deux dérivés 22-azido **81** et 22-cyano **33** triène par l'hydrure de lithium aluminium dans le THF anhydre conduit respectivement aux 22-amino **83** et 23-amino **86** triène, qui diffèrent d'un groupement méthylène (-CH<sub>2</sub>-).

La déprotection de l'hydroxyle en position 3 des deux dérivés 22-amino **83** et 22-amino **86** par le l'acide fluorhydrique aqueux dilué dans le THF fournit la 22-amino **84** et la 22-amino **87** vitamine D. (Figure 84)


 Figure 84 : 22 et 23-amino vitamines D via la réduction des produits de SN du tosylate **32**

**Remarque :**

D'autres voies sont possibles : l'amino-réduction directe en amine d'un aldéhyde ou d'une cétone appliquée dans un premier temps à l'aldéhyde des adduits- $\text{SO}_2$  **3a** et **3b** semble fonctionner avec l'hexamethyldisilazane (HMDS) comme source d'azote, l'isopropylate de titane comme acide de Lewis et piège à eau et le borohydrure de sodium pour réduire l'hémiaminal intermédiaire.<sup>111</sup> (Figure 85)


 Figure 85 : Amino-réduction de l'aldéhyde des adduit- $\text{SO}_2$  **3a** et **3b**

Cette voie n'a pas été exploitée sur l'aldéhyde des adduits- $\text{SO}_2$  **3** afin de conserver un maximum d'étapes communes entre toutes les molécules : il resterait encore à déprotéger et photo-isomériser le triène. En revanche, le 20-CHO triène **48** serait un bon substrat pour cette réaction.

<sup>111</sup> Résultats non-publiés de Rhône-Poulenc Industrialisation

Basé sur le même type de transformation chimique, l'ammoniac en solution dans l'isopropanol peut servir de source d'azote, avec encore l'isopropylate de titane comme acide de Lewis et piège à eau.<sup>112</sup> Parmi l'ensemble des réducteurs disponibles pour une telle réaction l'un d'entre eux (cyanoborohydrure de sodium) réduit sélectivement les imines intermédiaires en amines, mais ne réduit pas le substrat carbonyle en alcool. Ainsi tous les réactifs peuvent être introduits en même temps.

Une telle voie de synthèse des dérivés 22- et 23-amino vitamine D **84** et **87** reste à développer.

## II.5 Analyse par RMN des dérivés de la vitamine D

Il est important d'effectuer une analyse structurale afin de confirmer la présence des produits attendus ou de sous-produits de réaction. La résonance magnétique nucléaire (RMN) sur des noyaux tel que les protons et les carbones(13) est la technique de référence dans ce domaine pour les comparer.

Dans le cas des stéroïdes et de la vitamine D, le squelette hydrocarboné est rarement modifié profondément. Par conséquent, les spectres RMN <sup>1</sup>H et surtout <sup>13</sup>C montrent de grandes analogies par familles de composés. (Annexe A)

Pour la vitamine D, ces familles de dérivés sont liées à la géométrie et à la nature du triène composé de l'enchaînement des trois double liaisons 10(19),5(6),7(8) :

- vitamine D : les dérivés ont la même géométrie du triène que celle rencontrée dans la vitamine D,
- adduit-SO<sub>2</sub> : tous les composés dont le triène est protégé sous forme d'adduit-SO<sub>2</sub>,
- *trans*-vitamine D : tous les produits issus de la déprotection thermique des adduits-SO<sub>2</sub>,
- iso-vitamine D : les autres isomères géométriques du triène, en équilibre entre eux.

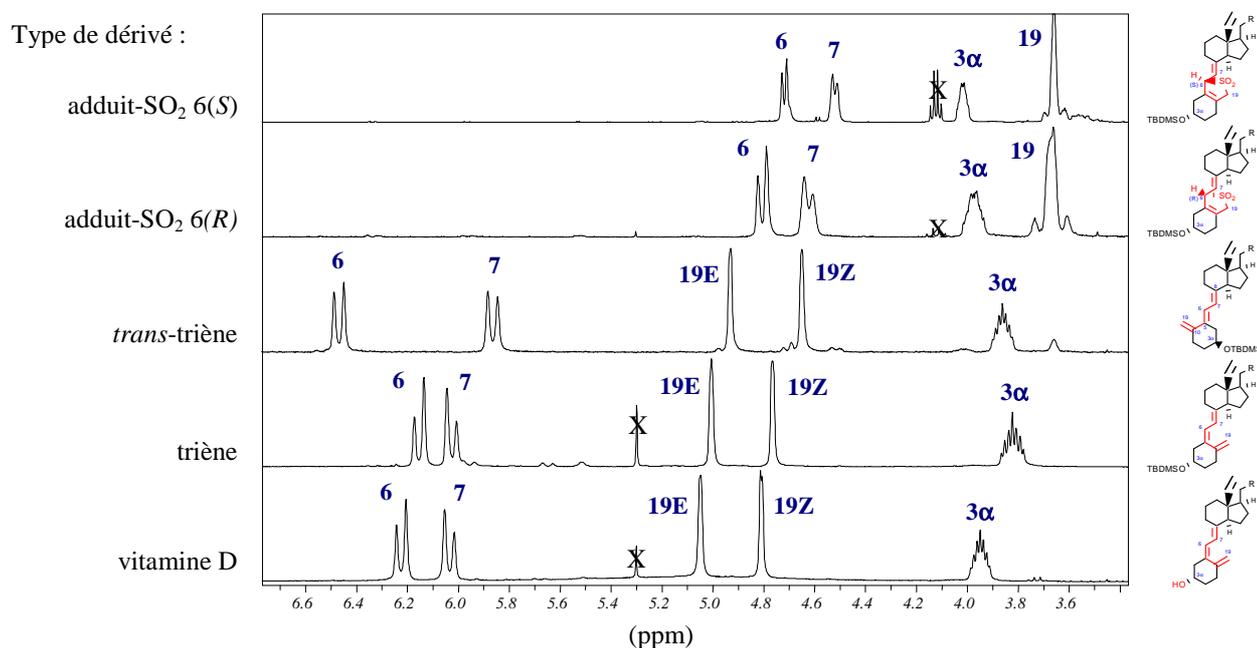


Figure 86 : Région des protons éthyléniques sur les spectres RMN <sup>1</sup>H des dérivés adduits-SO<sub>2</sub>, *trans*-triène, triène et vitamine D

Dans le cas d'une géométrie *trans*, le proton 6 se trouve très proche du proton 19(Z) ce qui a pour effet de le déblinder. Inversement, pour une géométrie *cis*, telle que la vitamine D, c'est le proton 7 qui se

<sup>112</sup> Mattson, R. J.; Pham, K. M.; Leuck, D. J.; Cowen, K. A. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2552-2554.

déblindé légèrement, mais le rapprochement sur le spectre des protons 6 et 7 peut s'expliquer par la perte d'une partie de leur différence d'environnement.

La différence de déplacements chimiques des deux protons portés par le méthylène 19 est due à leur environnement : le proton 19(*Z*) subit des contraintes stériques et électroniques de la part du triène mais pas le proton 19(*E*). L'attribution du déplacement chimique le plus déblindé pour le proton 19(*E*) est basé sur les analyses structurales de Mizhiritskii *et al.*<sup>113</sup> et de Okamura *et al.*<sup>114</sup>

De nombreux spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont rassemblés en Annexe B.

Pour les dérivés CMO contenant une fonction oxime soit *E*, soit *Z*, le rapport entre les deux isomères géométriques peut être déterminé par RMN du proton grâce au rapport entre les intégrations du signal du proton CH=N qui pour chacune des géométries possède un déplacement caractéristique. L'isomère majoritaire *E* possède un déplacement vers 7,4 ppm alors que celui de l'isomère *Z* est situé vers 6,6 ppm. L'écart reste voisin de 1 ppm comme cela a déjà été constaté dans la littérature pour les oximes<sup>115</sup> et les O-alkyloximes.<sup>116</sup> Les isomères *E* et *Z* s'interconvertissent à température ambiante et le rapport entre les deux formes dépend du solvant, de la lumière et du pH.

Les spectres 2D COSY et HSQC-TOCSY de l'isomère 6(*S*) de l'adduit-SO<sub>2</sub> de la vitamine D<sub>2</sub> **2a**, et les spectres HSQC-TOCSY du triénol **31** et de la 22-(*S*-Bz-COOH) vitamine D **40** ont permis de confirmer la structure des différents intermédiaires de synthèse et des haptènes. (voir Annexe C)

<sup>113</sup> Mizhiritskii, M. D.; Konstantinovskii, L. E.; Vishkaitsan, R. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 1239-1252.

<sup>114</sup> Okamura, W. H.; Zhu, G. D.; Hill, D. K.; Thomas, R. J.; Ringe, K.; Borhardt, D. B.; Norman, A. W.; Mueller, L. J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1637-50. Wing, R. M.; Okamura, W. H.; Rego, A.; Pirio, M. R.; Norman, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4980-4985.

<sup>115</sup> Pejkovic-Tadic, I.; Hanisavljevic-Jakovljevic, M.; Nestic, S.; Pascual, C.; Simon, W. *Helv. Chim. Acta* **1965**, *48*, 1157-1159.

<sup>116</sup> Hegarty, A. F.; Tuohey, P. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1980**, 1313-1317.



---

# **IMMUNISATIONS & SELECTION DES ANTICORPS**

---



# Chapitre III – Immunisations & Sélection des anticorps

## III.1 Immunisations

Les immunogènes 20-CO-BSA vitamine D **22** et 22-CMO-BSA vitamine D **29**, décrits au début de la thèse, ont servi pour une campagne d'immunisations sur des lapins, souris et rats à Immunotech (Marseille, France).

Animal	Nb et Race	[immuno]	Adjuvant	Fréquence	Mode d'injection
<b>Souris</b>	10 A/J 10 Balb/C	50 µg/100 µL	100 µL AFC (1 <sup>ère</sup> immunisation) puis AFI	4 semaines	IP et SC
<b>Rat</b>	9 WISTARS	100 µg/200 µL	200 µL AFC (1 <sup>ère</sup> immunisation) puis AFI	4 semaines	IP
<b>Lapin</b>	10 White-New-Zealand	250 µg/500 µL	500 µL AFC	4 semaines	SC

AFC : adjuvant complet de Freund ; AFI : adjuvant incomplet de Freund ; IP : intrapéritonéale ; SC : sous-cutané

Tableau 8 : Méthodes d'immunisation des animaux

Les immunisera prélevés sur les lapins 15 jours à 3 semaines après chaque immunisation assurent un stock d'anticorps polyclonaux dont les propriétés ont été évaluées avec le traceur tritié de la 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub>.

Les immunisera prélevés sur les souris et les rats ont été testés à l'aide des traceurs tritié et iodés pour sélectionner les animaux susceptibles de conduire, après fusion, clonage et sélection des hybridomes, à des anticorps monoclonaux de propriétés satisfaisantes pour ce dosage.

Les trois autres immunogènes (22-CO-BSA vitamine D **43**, 23-CMO-BSA vitamine D **45** et 22-(S-Bz-CO-BSA) vitamine D **47**), préparés dans un second temps, n'ont été utilisés jusqu'à présent que pour comparer les anticorps obtenus après immunisation de souris Balb/C par chacun des 5 immunogènes préparés.

## III.2 Anticorps polyclonaux de lapins

Pour chacun des deux premiers immunogènes, dix lapins ont été immunisés pour l'obtention d'anticorps polyclonaux. Les prélèvements sanguins, à la suite des immunisations, fournissent d'importants volumes d'immunisera qui regroupés peuvent servir à l'élaboration d'un dosage, après une vérification des caractéristiques de chaque prélèvement (titres, déplacements, réactions croisées, ...) en fonction des divers types de traceurs (tritié ou iodés).

Les titres\* et déplacements avec le traceur tritié de la 25-OH vitamine D ont été déterminés sur l'ensemble des lapins afin de sélectionner les meilleurs d'entre eux.

### III.2.1 Lapins immunisés par la 20-CO-BSA vitamine D **22**

Sur les 10 lapins immunisés, 7 ont survécu après 2 ans d'immunisation par la 20-CO-BSA vitamine D **22**.

\* Le titre d'un immunisera est la dilution pour laquelle l'anticorps lie 50% de la totalité du traceur radioactif. Il permet de normaliser les anticorps entre eux pour leur étude ultérieure. Plus le titre est élevé (plus l'immunisera doit être dilué), plus il contient d'anticorps liant le traceur.

Les immunisera des lapins immunisés par la 20-CO-BSA vitamine D **22** ont, pour la plupart, une trop faible affinité pour la 25-OH vitamine D. Leur IC<sub>50</sub> se situant au niveau de 100 ng/mL.

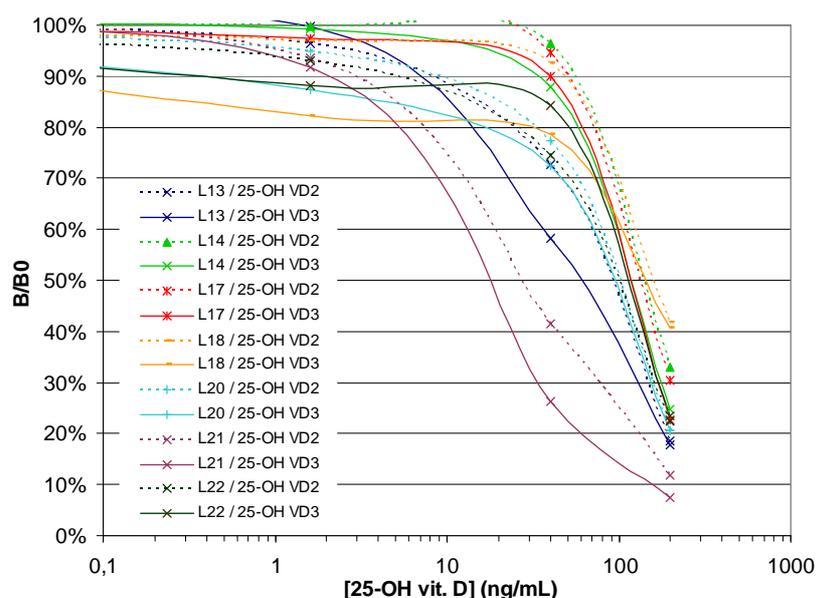
Cette observation peut s'expliquer par des titres en anticorps polyclonaux trop faibles. La DBP présente dans les immunisera de lapins interfère lors de la compétition. Ceci se manifeste par une absence de baisse de la radioactivité lors du passage des deux gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. En effet, la DBP lie une grande partie de la gamme 25-OH vitamine D et du traceur tritié.

Dans le cas des lapins immunisés par la 20-CO-BSA vitamine D **22**, seul le lapin L21 possède un titre en anticorps suffisamment élevé (1/6800) pour permettre un déplacement convenable du traceur tritié par les deux gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. Mais les différences de reconnaissance des deux gammes sont assez significatives. (Graphique 3)

20-CO-BSA vit. D	
Lapin	Titre
L13	2 000
L14	400
L17	1 000
L18	400
L20	800
L21	6 800
L22	1 000

Il serait alors nécessaire de purifier les immunisera sur colonne de protéine A ou G afin d'éliminer la DBP et de ne conserver que les anticorps polyclonaux purifiés pour pouvoir par la suite les évaluer dans de bonnes conditions.

Les immunisera de titres faibles et non-purifiés ne sont donc pas adaptés pour un dosage de la 25-OH vitamine D.



Graphique 3 : Déplacements par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la liaison du traceur tritié aux immunisera des lapins 20-CO-BSA vitamine D **22**

### III.2.2 Lapins immunisés par la 22-CMO-BSA vitamine D 29

Sur les 10 lapins immunisés, 9 ont survécu après 2 ans d'immunisation par la 22-CMO-BSA vitamine D 29.

L'effet du bras CMO, connu pour donner une meilleure réaction immunogénique, s'observe sur les titres obtenus à l'aide du traceur tritié de la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> pour les lapins immunisés par la 22-CMO-BSA vitamine D 29. Ils sont en effet au minimum 10 fois plus élevés que sur les lapins immunisés par la 20-CO-BSA vitamine D 22. Seuls 3 lapins (L27 ; L28) ont des titres en anticorps polyclonaux trop faibles pour minimiser les interférences dues à la présence de DBP de lapin. Les immunisés des autres lapins donnent des bons déplacements du traceur tritié par les deux gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. (Graphique 4)

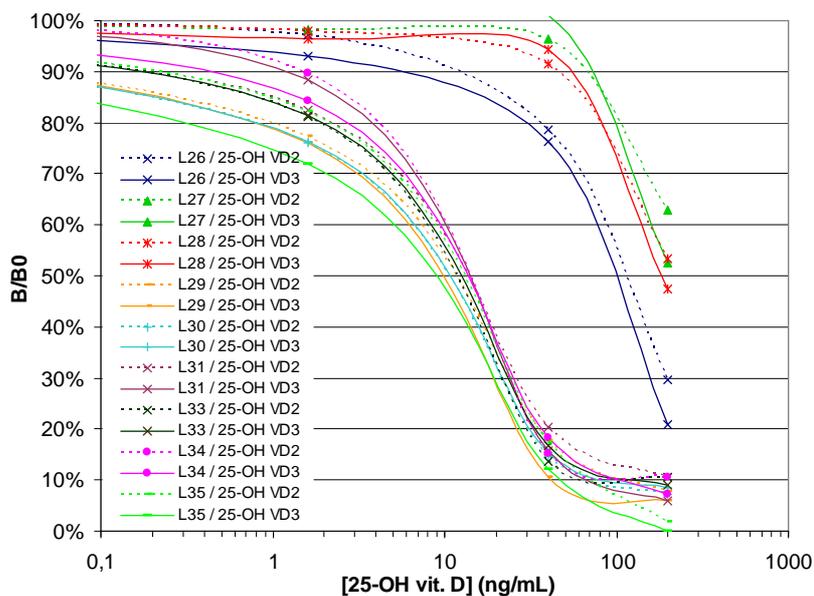
Les lapins L31 ; L34 ; L35 montrent des différences de reconnaissance des 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et 25-OH vitamine D<sub>3</sub> dès le début des gammes ce qui peut s'avérer gênant lors du dosage et entraîner une erreur de diagnostic.

A l'inverse, le lapin L29 reconnaît bien les deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> dans les faibles concentrations, mais une légère différence apparaît dans les fortes concentrations, ce qui n'est pas forcément gênant pour un diagnostic correct.

Pour les lapins L30 ; L33 les deux courbes d'étalonnage des 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et 25-OH vitamine D<sub>3</sub> sont superposées. C'est le cas idéal.

22-CMO-BSA vit. D	
Lapin	Titre
L26	1 500
L27	400
L28	400
L29	25 000
L30	17 000
L31	28 000
L33	15 000
L34	23 000
L35	50 000

De plus, pour ces deux derniers lapins, le lapin L30 est plus sensible dans les faibles concentrations en 25-OH vitamine D que le lapin L33.



Graphique 4 : Déplacements par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la liaison du traceur tritié aux immunisera des lapins 22-CMO-BSA vitamine D 27

Les immunisés des lapins L30 et L33 feraient donc d'excellents candidats pour un dosage de la 25-OH vitamine D par des anticorps polyclonaux.

Dans la pratique, étant donné la bonne réponse aux immunogènes de la vitamine D observée pour les rats, l'obtention d'hybridomes a été envisagée afin de pouvoir produire en quantité illimitée des anticorps monoclonaux de caractéristiques requises. En effet, un stock d'immuniserum de lapin n'est

pas inépuisable et un redéveloppement de la méthode de dosage et une nouvelle homologation sont nécessaires après chaque changement de lot d'anticorps.

### **III.3 Obtention d'hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux**

#### **III.3.1 Immortalisation de plasmocytes**

Les souris et les rats ne sont pas à même de fournir suffisamment d'immunoserum pour des dosages à grande échelle. De plus, les cellules spléniques, productrices d'anticorps, ne peuvent pas être cultivées longtemps *in vitro*. La solution pour produire des anticorps de ces animaux en grande quantité consiste à immortaliser les cellules sécrétrices d'anticorps (plasmocytes B). Plusieurs méthodes sont possibles :

- fusion membranaire en présence de polyéthylène glycol ou par électroporation avec un myélome compatible,
- immortalisation par un agent chimique,
- immortalisation par un virus (Epstein-Barr EBV, SV40).

La technique retenue est une fusion membranaire avec un myélome, tumeur maligne du système immunitaire. Après un criblage des hybridomes, les colonies sélectionnées sont clonées par dilution limite pour ne garder qu'un seul clone par puits sécrétant un seul anticorps, d'où le terme d'anticorps monoclonal. L'anticorps monoclonal peut ensuite être produit en grande quantité à partir de liquide d'ascite ou en fermenteur à partir de l'hybridome sélectionné. (Figure 87)

Le choix des animaux immunisés susceptibles de fournir des anticorps monoclonaux doit se faire parmi les souris ou les rats, en effet il n'existe pas de myélome de lapin ayant donné des résultats satisfaisants à ce jour.

Dans un premier temps, la sélection, parmi les animaux immunisés, de ceux les plus aptes pour une fusion est importante. Ils doivent sécréter des anticorps de bonne qualité et en quantité suffisante pour augmenter les chances d'obtenir un clone positif. L'immunoserum de la souris ou du rat immunisé doit avoir un bon titre en anticorps pour l'haptène à doser, afin de s'assurer de la présence de nombreux plasmocytes sécréteurs d'anticorps dans sa rate. Dans le cas particulier de la vitamine D, les animaux doivent répondre de manière identique à la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et à la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> et ne pas montrer de réaction croisée trop élevée avec la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D.

Dans un second temps, l'animal subit deux immunisations de rappel (« boosts »), l'une intrapéritonéale, l'autre intraveineuse qui ont pour but de stimuler les cellules mémoires et les amener à un stade de différenciation (blaste) propice à l'hybridation avec des cellules myéломateuses.

La fusion membranaire des cellules spléniques (plasmocytes B) de souris (ou de rat) avec le myélome de souris P3 X63ag8.653 est effectuée en présence de polyéthylène glycol (PEG) qui a pour rôle de perméabiliser les membranes des cellules (voir Protocole de fusion dans la Partie expérimentale). Les hybridomes souris – souris (ou mixtes rat – souris) qui conserveront, du plasmocyte B, sa capacité à synthétiser et sécréter un anticorps et du myélome, sa capacité à se diviser *in vitro* sont cultivés en plaque 96 puits. (Figure 87)

Dans un troisième temps, les hybridomes sont sélectionnés en présence d'hypoxanthine, aminoptérine et thymidine (milieu HAT). L'aminoptérine bloque la synthèse d'ADN mais les cellules possédant l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transférase (HGPRT) et la thymidine kinase (TK) peuvent utiliser les deux autres voies de synthèse de l'ADN en présence d'hypoxanthine et de thymidine. Les cellules de myélomes sont déficientes en enzymes HGPRT et TK et sont ainsi détruites dans le milieu HAT. Par contre, les hybridomes qui ont l'enzyme HGPRT par l'apport génétique du parent normal (plasmocytes B) peuvent donc survivre. Les cellules spléniques non fusionnées ne se divisent pas en milieu de culture et meurent.

Seuls les hybridomes plasmocyte B – myélome se développent dans les puits. Après 15 jours, les surnageants de culture peuvent alors être prélevés et testés par criblage à l'aide d'une méthode, le plus souvent, RIA ou EIA pour vérifier la présence d'anticorps spécifiques.

Au fur et à mesure que des surnageants de culture sont contrôlés positifs au cours des criblages, les hybridomes correspondants sont cultivés en puits de plus grande capacité et la colonie est congelée dans l'azote liquide dès que possible.

Par la suite, les colonies dont les anticorps présents dans les surnageants de culture montrent les caractéristiques voulues, sont clonées par dilution limite. Cette étape permet de s'assurer de la présence d'un seul clone ou le cas échéant de séparer les clones afin de conserver indéfiniment un clone sécrétant un anticorps monoclonal aux propriétés de liaisons constantes, ce qui n'est pas le cas pour les anticorps polyclonaux.

Enfin, la production de l'anticorps monoclonal à grande échelle peut se faire en liquide d'ascite ou en fermenteur.

Pour la production en liquide d'ascite, des souris Balb/C

(dans le cas d'hybridomes souris Balb/C – souris) ou des souris « nude » (dans le cas d'hybridomes rat – souris) sont préalablement traitées au pristane, un hydrocarbure ramifié à longue chaîne (2,6,10,14-tétraméthylpentadécane), afin qu'après l'injection du clone, ces souris développent une tumeur maligne liquide. La concentration en anticorps monoclonaux du liquide d'ascite est généralement 100 fois supérieure à celle des surnageants de culture d'origine.

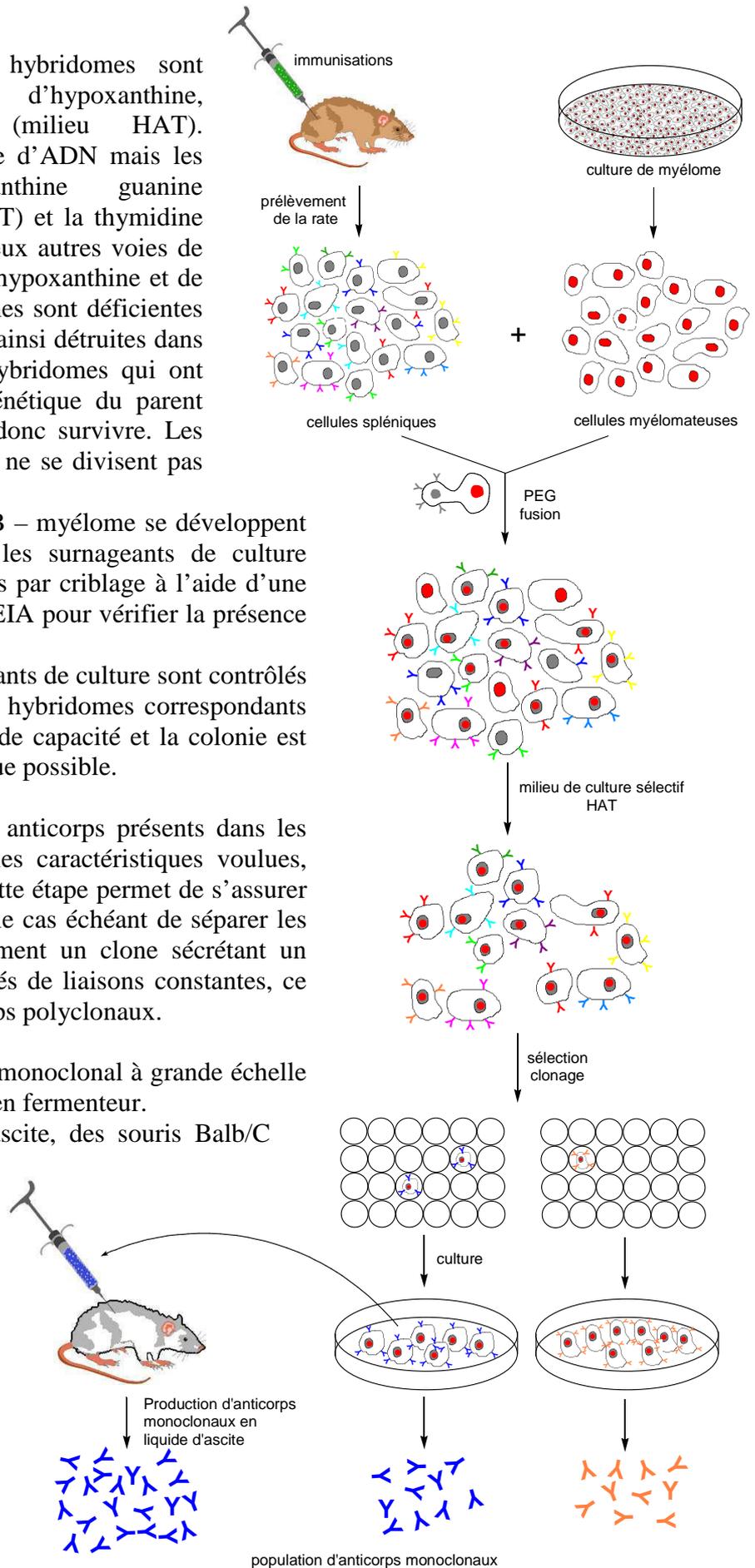


Figure 87 : Schéma d'obtention d'anticorps monoclonaux

Le liquide d'ascite est alors régulièrement prélevé tout en veillant à ce que les souris ne souffrent pas trop.

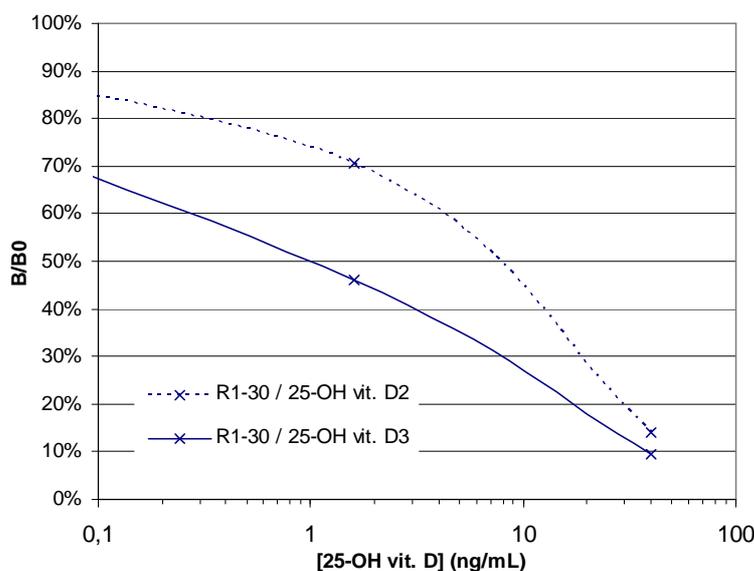
En fermenteur, le clone est ensemencé dans un bio-réacteur en milieu de culture et le surnageant, contenant l'anticorps monoclonal, est régulièrement prélevé et renouvelé. Il est parfois nécessaire de concentrer le milieu de culture pour l'enrichir en anticorps.

Une fusion a été réalisée sur le rat R1-30 et une double fusion sur le mélange des deux rates des rats R4-30 et R5-30, tous les trois immunisés par le premier immunogène (20-CO-BSA vitamine D **22**) dont la synthèse a été décrite plus haut.

### III.3.2 Fusion à partir du rat R1-30 immunisé par la 20-CO-BSA vitamine D **22**

#### III.3.2.1 Fusion

Le rat sélectionné pour la 1<sup>ère</sup> fusion est une femelle (R1-30) immunisée par le 1<sup>er</sup> immunogène : 20-CO-BSA vitamine D **22**. Son titre avant fusion a été évalué à 1/100000 sur l'immunoserum du 2<sup>ème</sup> prélèvement à l'aide du traceur <sup>125</sup>I homologue (20-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D **59**). La similarité de reconnaissance des 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> est imparfaite, mais ce rat présente le meilleur titre en anticorps anti-25-OH vitamine D parmi tous les autres de la série. Il sert de témoin pour une deuxième fusion sur un autre rat dont les immunosera possèdent les caractéristiques adéquates de reconnaissance des deux vitamines.



Graphique 5 : Déplacements par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la liaison du traceur 20-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D **59** à l'immunoserum du rat R1-30

La fusion du 20 septembre 2002 a été précédée de deux immunisations de rappel, une intrapéritonéale à 200 µg/400 µL en adjuvant incomplet de Freund (AIF), 8 jours avant la fusion et une intraveineuse à 75 µg/150 µL dans le serum physiologique, 3 jours avant.

Les 2,5x10<sup>8</sup> cellules spléniques de rat ont été fusionnées avec 6x10<sup>7</sup> cellules du myélome P3 X63ag8.653 de souris. 16 plaques de 96 puits ont ainsi été ensemencées et ont donné un rendement de pousse de l'ordre de 80%.

### III.3.2.2 Protocole de screening en RIA

Un préalable à une fusion cellulaire sur un rat ou une souris est la mise au point d'un test de criblage. A la suite de la fusion, les hybridomes sont cultivés dans plusieurs plaques 96 puits. Les surnageants de cultures cellulaires de chaque puits doivent être testés afin de vérifier la présence ou non d'anticorps spécifiques de la vitamine D.

L'ensemble des 16 plaques de fusion a fait l'objet de 2 criblages sur la totalité des plaques (criblage primaire) à j+13 et à j+20. Deux criblages ont ensuite été réalisés à j+17 et j+24 sur l'ensemble des puits positifs (criblage secondaire) décelés lors des criblages primaires.

13 jours après la fusion, les cellules spléniques non fusionnées n'ont pas survécu alors que les cellules de myélome non hybridées à une cellule splénique sont mortes à cause du milieu sélectif HAT. Il est alors possible de cribler les surnageants de culture des micro-puits pour savoir s'ils contiennent ou pas des anticorps anti-25-OH vitamine D. Le 2<sup>ème</sup> criblage de la totalité des plaques issues de la fusion permet de s'assurer qu'aucun hybridome positif n'est passé au travers du criblage, mais aussi que des hybridomes à croissance lente ou ayant eu du mal à pousser au début n'ont pas été oubliés.

Quelques jours après chacun des deux criblages, les surnageants qui se sont avérés positifs sont testés à nouveau afin de confirmer la présence d'anticorps anti-25-OH vitamine D ou d'infirmer les artéfacts (faux positifs).

Le protocole de criblage en RIA utilise des plaques sécables 96 puits « pré-coatées » par la BSA biotinylée – streptavidine, puis « coatées » par un anticorps biotinylé de chèvre anti-anticorps de rat qui permet de capter l'ensemble des anticorps de rat (Figure 88). Les anticorps anti-vitamine D sont par la suite détectés par RIA à l'aide du traceur iodé homologue (20-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D **59**) en cassant chaque plaque et en comptant les puits 10 par 10 avec un compteur à rayons  $\gamma$ .

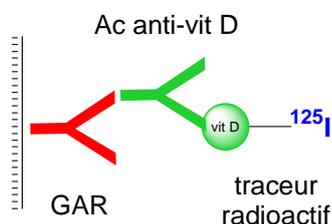


Figure 88 : Méthode de criblage de la fusion en RIA

### III.3.2.3 Résultats

- 1<sup>er</sup> criblage primaire des 16 plaques de fusion (J+13)
  - 87 puits positifs : testés dans un 1<sup>er</sup> criblage secondaire (J+17)
    - 33 puits confirmés
- 2<sup>ème</sup> criblage primaire des 16 plaques de fusion (J+20)
  - +27 puits positifs et 24 puits Costar<sup>®\*</sup> : testés dans un 2<sup>ème</sup> criblage secondaire (J+24)
    - 11 puits confirmés, 9 congelés

Au final, la fusion du rat R1-30 aura donné 11 puits positifs. La diminution du nombre initial de puits positifs peut s'expliquer de plusieurs manières :

\* Plaques de culture comportant 16 puits de plus grande capacité que ceux des plaques 96 puits.

- l'hybridome a dégénéré : l'hybridome, possédant un nombre de chromosomes anormal, pousse, mais ne sécrète plus l'anticorps du fait du réarrangement du noyau,
- les cellules spléniques résiduelles sont mortes ou un hybridome positif est mort,
- le puits contenait deux hybridomes : l'un négatif diluant l'autre positif,
- faux positif : le puits ne contient pas de cellules, la contamination se fait au prélèvement.

Au fur et à mesure que des micro-puits sont confirmés et contiennent suffisamment de cellules, les hybridomes sont transférés dans des puits plus grands sur des plaques Costar® de 16 puits.

Ces derniers, lorsqu'ils sont confirmés par un nouveau test, sont ensuite dédoublés puis congelés en présence de DMSO dans l'azote liquide à -196°C pour une bonne conservation et une utilisation ultérieure.

Les surnageants des cultures des hybridomes positifs sont conservés pour être par la suite caractérisés par un titre en anticorps anti-vitamine D et par une compétition entre le traceur tritié 26,27-[<sup>3</sup>H<sub>6</sub>]-25-OH vitamine D<sub>3</sub> et les deux gammes de 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>.

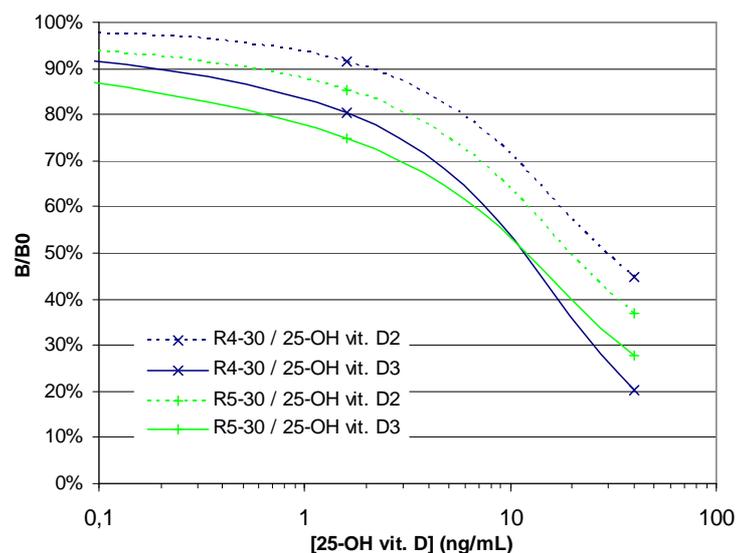
9 puits se sont révélés positifs : 1B5 ; 3C3 ; 3F5 ; 5E10 ; 9C6 ; 13C6 ; 13C7 ; 14G10 ; 15B10 ; 15E8.

De légères différences de reconnaissance entre les vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> ont pu être constatées après l'optimisation des conditions de solubilisation du traceur tritié et par conséquent des gammes 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> par l'adjonction de surfactants (p. ex. : alcool polyvinylique, cyclodextrines, Triton X100, Tween, ...). Le meilleur résultat pour des liaisons non spécifiques faibles et une reconnaissance anticorps anti-25-OH vitamine D – traceur tritié optimum est obtenu par l'ajout de 2,5 g.L<sup>-1</sup> d'alcool polyvinylique hydrolysé à 80% de masse moléculaire comprise dans la fourchette 9000-10000 g.mol<sup>-1</sup>.

### **III.3.3 Fusion à partir du rat R4-30 et R5-30 immunisés par la 20-CO-BSA vitamine D 22**

#### **III.3.3.1 Fusion**

La 2<sup>ème</sup> fusion a été effectuée sur 2 rats femelles (R4-30 et R5-30) immunisées avec le 1<sup>er</sup> immunogène : 20-CO-BSA vitamine D 22. Leurs titres avant fusion avaient été évalués à 1/63000 et 1/32000 sur les immunisera du 2<sup>ème</sup> prélèvement à l'aide du traceur <sup>125</sup>I homologue (20-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D 59). La caractérisation de leurs anticorps anti-vitamine D avant fusion a été réévaluée plus finement par titration et compétition avec le traceur vitamine D tritié.



Graphique 6 : Déplacements par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la liaison du traceur 20-CO-[125I]iodohistamine vitamine D 59 à l'immunserum des rats R4-30 et R5-30

Ces 2 rats se sont révélés plus intéressants que le premier en terme de reconnaissance simultanée des 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. Etant donné leur âge avancé et la période de repos nécessaire avant une fusion, leurs rates ont donc été prélevées pour une fusion simultanée le 15 novembre 2002.

La procédure de fusion ne change pas, seule la quantité de cellules de myélome X63 de souris varie. 30 plaques de 96 puits ont ainsi étéensemencées.

### III.3.3.2 Protocole de screening en EIA

Sur une telle quantité de puits (2880 puits), il n'est pas envisageable d'effectuer le screening en RIA (lavage et comptage manuels trop longs). La méthode EIA, dont la mise au point sur les surnageants de culture de la 1<sup>ère</sup> fusion est décrite ci-dessous, a été choisie comme alternative. Les introductions de réactifs se font à la multipipette, les aspirations et lavages à l'aide du laveur automatique et la lecture des plaques après révélation sur un lecteur de plaque à la longueur d'onde d'absorption du polymère de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). (Figure 89)

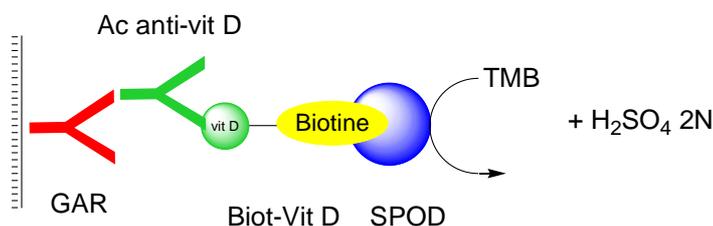


Figure 89 : Méthode de criblage de la fusion en EIA

(GAR : anticorps de chèvre anti-anticorps de rat ; SPOD : streptavidine – horseradish peroxydase ; TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine)

Cette méthode permet des manipulations simples et rapides par transfert des surnageants de cultures à partir des plaques 96 puits et l'utilisation de laveurs et d'un lecteur colorimétrique pour plaques 96 puits.

La mise au point du test de screening des anticorps monoclonaux murins anti-vitamine D en EIA nécessite une bonne évaluation des paramètres influents du système (type de « coating », dilution du

conjugué biotine – vitamine D, temps d'incubation, ordre d'addition des réactifs, ...) en adéquation avec le milieu à doser : milieu de culture d'hybridomes.

Deux types de surnageants de culture de la précédente fusion du rat R1-30, l'un positif et l'autre négatif avec le test RIA ont servi, avec deux témoins, à l'optimisation des paramètres. Le témoin positif est un immunosérum de rat immunisé par un immunogène de la vitamine D dilué au 1/25000, testé positivement à l'aide d'un traceur radioactif et le témoin négatif est un immunosérum de rat castré dilué aussi au 1/25000.

### Coating des plaques 96 puits

De nombreux systèmes de « coating » ainsi que de détection font appel à la forte affinité entre la biotine (vitamine H) et l'avidine ou la streptavidine. Ces dernières possèdent 4 sites de liaison pour la biotine. La biotine possède une fonction acide carboxylique qui permet de la coupler sur d'autres petites molécules comme la vitamine D, mais aussi sur les protéines comme la BSA et les anticorps sans pour autant modifier son affinité pour l'avidine et la streptavidine.

La solution retenue est d'effectuer un « coating » passif d'un anticorps de chèvre anti-anticorps de rat GAR par simple adsorption sur les parois en plastique des micro-puits, puis de saturer les sites libres restants avec un tampon de saturation caséine à 0,5 g/L, sans BSA afin d'éviter les risques d'interférences avec les anticorps anti-BSA générés par les immunisations. Ainsi, la seule biotine présente dans le micro-puits est celle amenée par le traceur et la seule streptavidine est celle du conjugué streptavidine-HRP (SPOD).

En effet, les autres méthodes de « coating » risquent de provoquer des interférences avec la détection de l'anticorps anti-vitamine D :

- le « pré-coating » classique utilise la BSA biotinylée – streptavidine pour fixer un anticorps biotinylé de chèvre anti-anticorps de rat (GAR). Mais le traceur biotine – vitamine D qui est une petite molécule pourrait alors se fixer sur la phase de « pré-coating » augmentant ainsi le bruit de fond. Il serait alors nécessaire de saturer la phase de « pré-coating » avec un dérivé de la biotine,
- le traceur biotine – vitamine D, potentiellement instable pendant une longue période à température ambiante, en présence d'oxygène ou de lumière, pourrait ne pas être fixé sur la phase de coating à cause d'une possible dégradation.

### Dilution du traceur biotine – vitamine D

La dilution du traceur doit être ajustée afin que le signal soit maximum et le signal non-spécifique minimum.

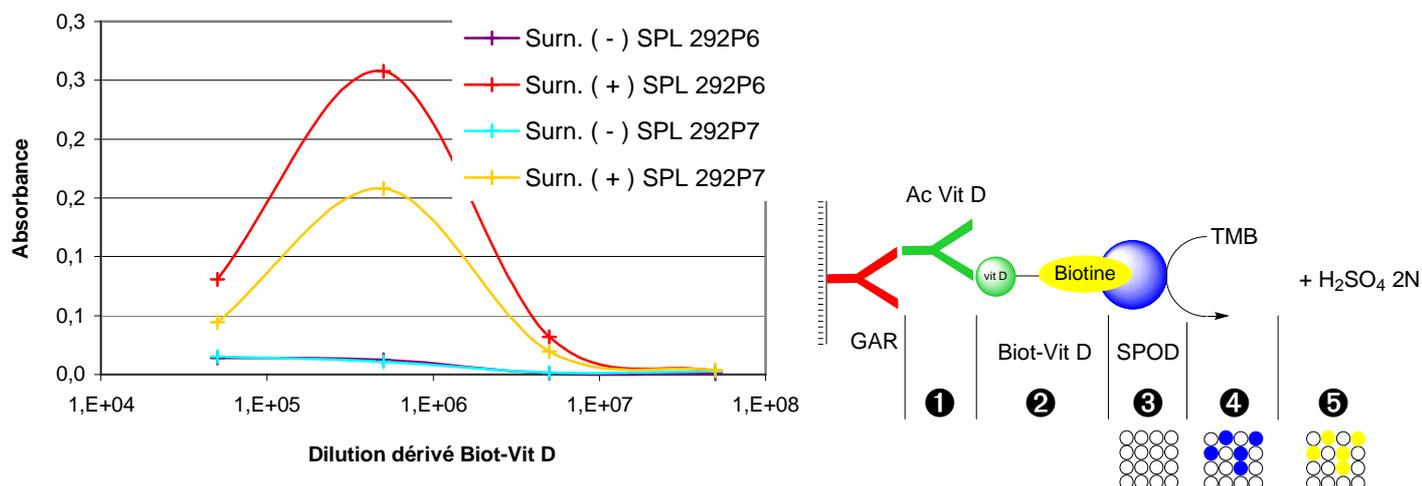
Cette dilution est calculée de manière à ce qu'un « coating » d'un micro-puits à 1 µg/mL par 100 µL d'anticorps GAR qui fixerait deux anticorps anti-vitamine D puisse fixer tout le marqueur biotine – vitamine D disponible soit une concentration maximale de 20 ng/mL.

La quantité maximale de dérivé biotine – vitamine D présente dans chacune des fractions de la purification par CLHP est estimée dans le cas limite où tout le produit synthétisé se trouve dans une seule fraction (env. 5 mg/5 mL) soit une solution mère à 1 mg/mL.

Il faut donc atteindre une concentration inférieure à 20 ng/mL soit une dilution au 1/50000 et au-delà. Cette hypothèse très grossière donne la dilution minimum à effectuer.

A titre indicatif, il est aussi possible, par le calcul, d'évaluer la quantité de traceur iodé introduite dans un tube pour une compétition à 0,15 ng/mL.

L'anticorps GAR « coaté » passivement sur le fond des puits capte les anticorps de rat contenus dans les surnageants de culture lors d'une 1<sup>ère</sup> incubation. A la suite d'une série de lavages, le conjugué biotine – vitamine D **77** à diverses concentration en tampon phosphate – gélatine est incubé à son tour en même temps que la SPOD. La vitamine D biotinylée fixée sur l'anticorps est détectée par la SPOD qui se fixe sur la partie biotine du traceur EIA. Une série de lavages élimine l'excès de SPOD et la révélation se fait par transformation enzymatique du substrat TMB en un polymère dont la coloration est proportionnelle au temps d'incubation et à la quantité des réactifs introduits et fixés les uns aux autres sur la phase.



**Graphique 7 : Effet de la dilution du traceur biotinylé sur l'absorbance pour des surnageants négatif et positif dans le cas de l'incubation simultanée de 2 et 3**

La dilution optimale du traceur biotine – vitamine D **77**, de même structure que l'haptène correspondant au 1<sup>er</sup> immunogène, est déterminée pour un surnageant positif de culture d'hybridome de la 1<sup>ère</sup> fusion (R1-30 13C7). Le maximum du signal se situe donc pour une dilution au 1/500000 (Graphique 7). Pour les dilutions inférieures, les courbes d'intensité du signal pour le surnageant positif montrent un effet crochet très prononcé, lié à l'incubation simultanée d'une quantité trop grande de traceur par rapport à la streptavidine-HRP, ce qui amène à se poser la question de l'ordre d'incubation des réactifs, traitée ci-dessous.

### Ordre d'addition des réactifs

Pour le criblage primaire des hybridomes, il est important de simplifier les étapes soit en diminuant le nombre de manipulations, soit en combinant certaines étapes entre elles. Ainsi, le nombre d'étapes d'incubations ainsi que le nombre de lavages pourrait être réduit en incubant simultanément certains réactifs pour gagner du temps sur l'ensemble de plaques 96 puits. Le nombre de lavages entre les étapes, actuellement de trois, pourrait être facilement baissé à un seul lavage, sauf le lavage de l'étape 3 (après incubation de la streptavidine-HRP), essentielle pour diminuer le bruit de fond. (Figure 90)

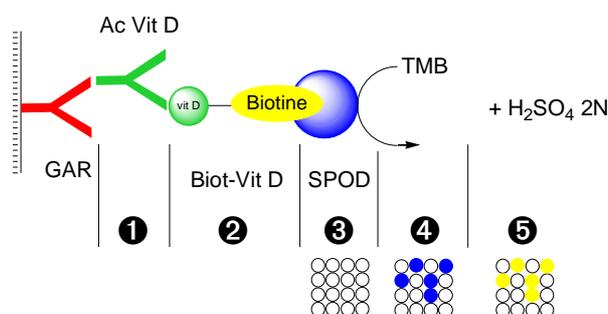
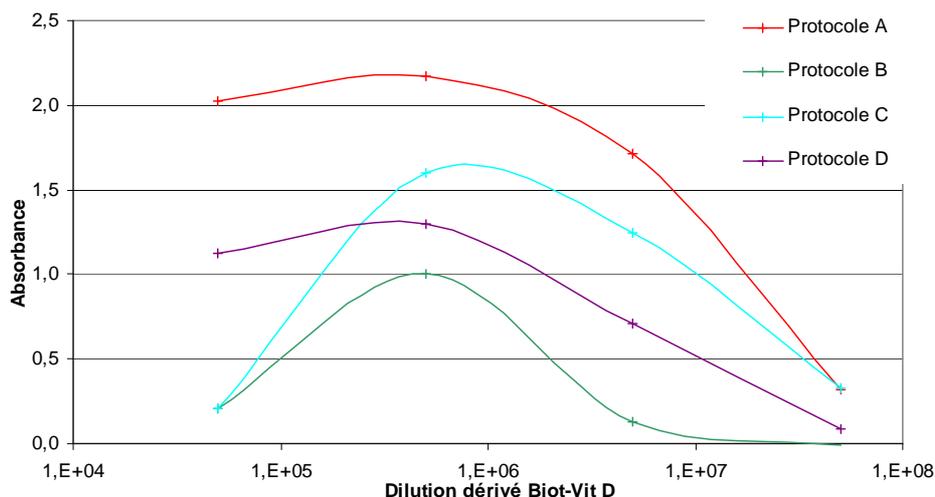


Figure 90 : Etapes nécessaires pour la détection des anticorps anti-vitamine D



Graphique 8 : Effet de l'ordre d'introduction des réactifs sur le signal

Protocole A : en 3 incubations :

❶ (2 h) ; aspiration ; ❷ (1 h) ; aspiration ; ❸ (30 mn) ; aspiration

Les 3 étapes d'incubation sont séparées par 3 lavages. Le signal est maximum et l'effet crochet se fait peu sentir.

Protocole B : en 2 incubations :

❶ (2 h) ; aspiration ; ❷ + ❸ (1 h) ; aspiration

Le traceur et la SPOD sont incubés en même temps. Le signal baisse significativement.

Protocole C : 2 dernières incubations enchaînées :

❶ (2 h) ; aspiration ; ❷ (1 h) + ❸ (30 mn) ; aspiration

Le traceur est pré-incubé 1 h puis la SPOD est ajoutée sans étape de lavage intermédiaire. Le signal est plus intense que pour le protocole B, mais moins que pour le protocole A.

Protocole D : 2 premières incubations enchaînées :

❶ (2 h) + ❷ (1 h) ; aspiration ; ❸ (30 mn) ; aspiration

L'anticorps anti-vitamine D est pré-incubé 2 h puis le dérivé biotine – vitamine D est ajouté sans étape de lavage intermédiaire. Le signal est plus intense que pour le protocole B, mais moins que pour le protocole A. L'effet crochet est moins prononcé que sur les protocoles B et C, mais le signal reste moins intense que pour les protocoles A et C.

La densité optique pour plusieurs dilutions du traceur biotine – vitamine D permet de comparer les protocoles en terme de signal (Graphique 8) :

Protocole A > Protocole C > Protocole D > Protocole B

L'effet crochet des protocoles A et D est similaire (même pente). L'incubation préalable de l'anticorps anti-vitamine D puis le rajout du dérivé biotine – vitamine D n'a donc de réelle influence que sur l'intensité du signal.

En revanche, l'incubation simultanée du mélange du traceur et de la SPOD (protocole B) et l'incubation de la SPOD 1 heure après l'incubation du traceur (protocole C) montrent une perte de signal quand la concentration de dérivé biotine – vitamine D augmente. En effet, la quantité de SPOD étant constante, elle se retrouve en défaut, saturée par le traceur qui n'est pas forcément lié à l'anticorps anti-vitamine D (effet crochet). (Figure 91)

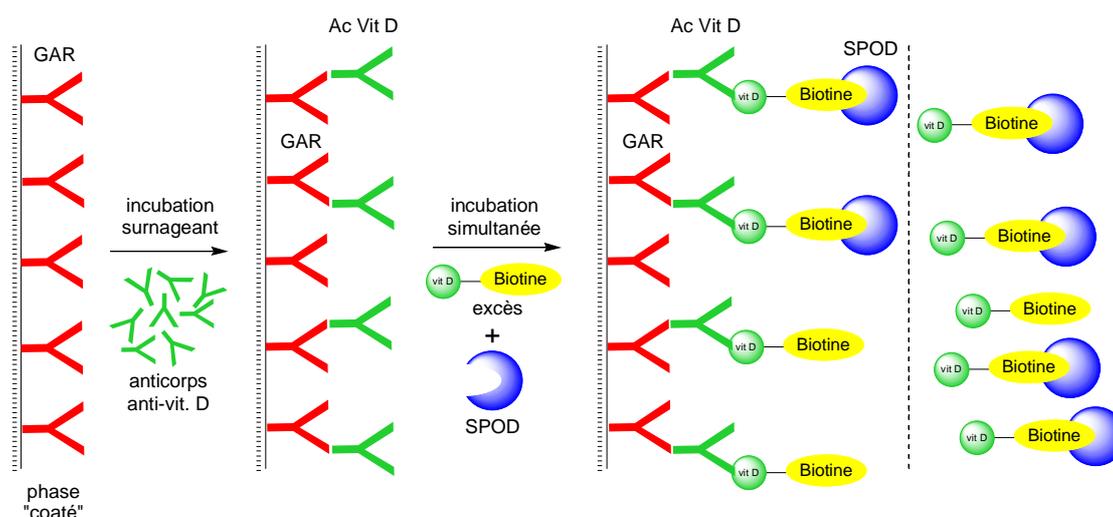


Figure 91 : Effet crochet dû à l'excès de dérivé vitamine D biotinylé

De tous les protocoles, le protocole A, correspondant à toutes les étapes d'incubations séparées par des lavages, donne le signal le plus intense et sera, par conséquent, retenu pour le criblage.

L'un des inconvénients du test en EIA est la diminution du signal dans le temps après l'ajout d'acide sulfurique 2 N. Les plaques devront être lues après le même temps d'arrêt.

Les étapes ④ (30 mn) et ⑤ restent inchangées quelque soit le protocole.

### III.3.3 Résultats

Il s'avère que contrairement à la 1<sup>ère</sup> fusion, le bruit de fond est élevé sur la 2<sup>ème</sup> fusion, y compris en RIA, utilisé comme contrôle sur une plaque.

L'explication peut provenir de plusieurs raisons :

- Liaisons non spécifiques, non observées lors de la première fusion,
- Contamination lors de la fusion elle-même.

D'autres facteurs sont à écarter car :

- Le « coating » des plaques semble identique,
- Le bruit de fond est observé aussi bien en EIA qu'en RIA,
- Le protocole fonctionne sur les surnageants de la 1<sup>ère</sup> fusion.

Sur les 2880 puits testés, un total de 65 puits positifs ont pu être congelés pour une utilisation ultérieure :

1C10 ; 1F11 ; 1G2 ; 1G9 ; 3D12 ; 4E5 ; 5D2 ; 5D4 ; 6B8 ; 7D11 ; 7F8 ; 7G9 ; 7H9 ; 8D8 ; 9B6 ; 9B7 ; 9C3 ; 9E11 ; 9F10 ; 10B11 ; 10D2 ; 10F8 ; 10G7 ; 11E4 ; 11G4 ; 11G5 ; 12B9 ; 13D11 ; 13E5 ; 13G3 ; 14E11 ; 14F11 ; 14G5 ; 15B4 ; 15C2 ; 15C9 ; 15F10 ; 15G9 ; 16B8 ; 16D5 ; 16F8 ; 16G4 ; 17A9 ; 17B2 ; 17B11 ; 17G9 ; 18G2 ; 19B7 ; 19G3 ; 19G6 ; 25B6 ; 25E8 ; 27D4 ; 27E3 ; 27G7 ; 27G8 ; 28B9 ; 28C9 ; 28G4 ; 28G11 ; 29F5 ; 29F9 ; 29G6 ; 29G11 ; 30H4.

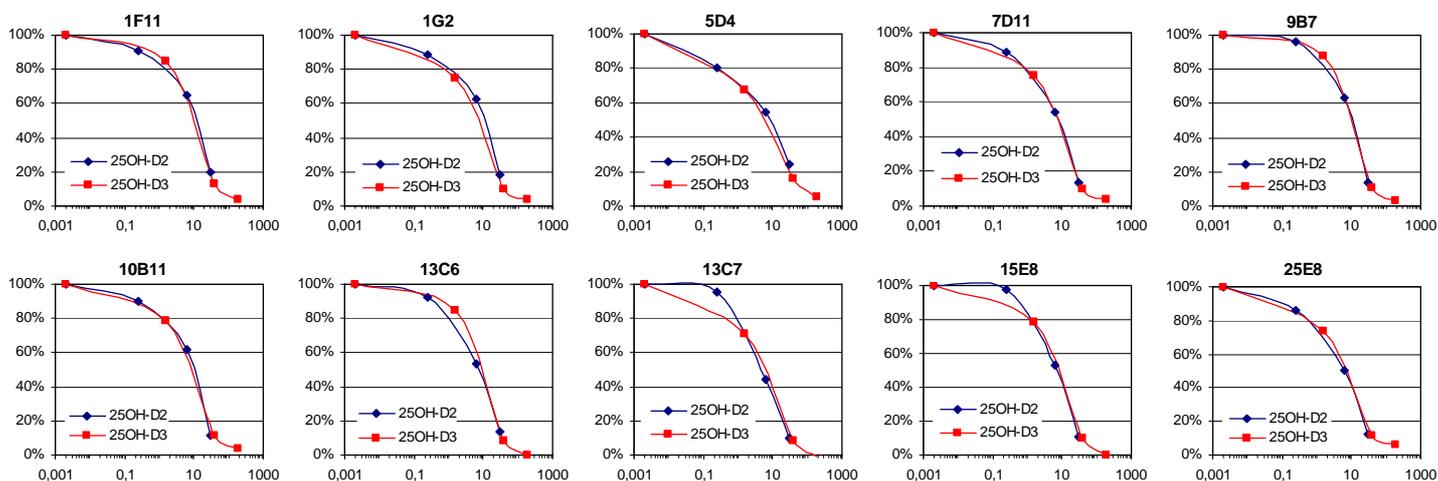
Le test des surnageants de culture des hybridomes de la 2<sup>ème</sup> fusion par compétition avec le traceur tritié, en présence de Triton X-100 pour limiter l'adsorption, a montré une reconnaissance des 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> variable selon les hybridomes.

Si les titres déterminés à l'aide du traceur tritié 25-OH vitamine D<sub>3</sub>, sont trop faibles, il est possible que la DBP présente dans le milieu de culture à base de serum de veau fœtal interfère lors de la compétition. Comme cela a déjà été mentionné pour les immunisera de lapin, la DBP peut lier la totalité de la vitamine D radioactive et de la gamme. Il serait alors nécessaire de purifier les anticorps contenus dans les surnageants de culture sur colonne de protéine A pour pouvoir par la suite les évaluer après élimination de la DBP. Dans la pratique, étant donné le nombre élevé de puits positifs lors des criblages, les surnageants avec des titres trop faibles n'ont pas été exploités.

### III.3.4 Caractérisation des anticorps sécrétés par les hybridomes des rats 20-CO-BSA vitamine D 22

#### III.3.4.1 Titres et déplacements des surnageants de cultures

Des titres et déplacements par le traceur tritié ont été réalisés sur les surnageants des 9 + 65 puits congelés de la 1<sup>ère</sup> fusion et de la 2<sup>ème</sup> fusion respectivement, afin de sélectionner les 10 meilleurs pour un clonage (1<sup>ère</sup> fusion : 13C6 ; 13C7 ; 15E8 / 2<sup>ème</sup> fusion : 1F11 ; 1G2 ; 5D4 ; 7D11 ; 9B7 ; 10B11 ; 25E8).



Graphique 9 : Déplacements par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la liaison du traceur tritié 26,27-[<sup>3</sup>H]-25-OH vitamine D<sub>3</sub> aux surnageants des puits primaires positifs et décongelés

Les courbes de déplacement ne se superposent pas toujours du fait de l'utilisation de concentrations différentes entre les deux gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. (Graphique 9)

Les anticorps contenus dans ces 10 surnageants de cultures ont tous comme point commun une même affinité pour la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et la 25-OH vitamine D<sub>3</sub>. D'autres surnageants possèdent aussi

cette caractéristique et leur hybridomes pourront être décongelés au besoin mais ils sont toutefois moins sensibles dans la zone des faibles concentrations en 25-OH vitamine D.

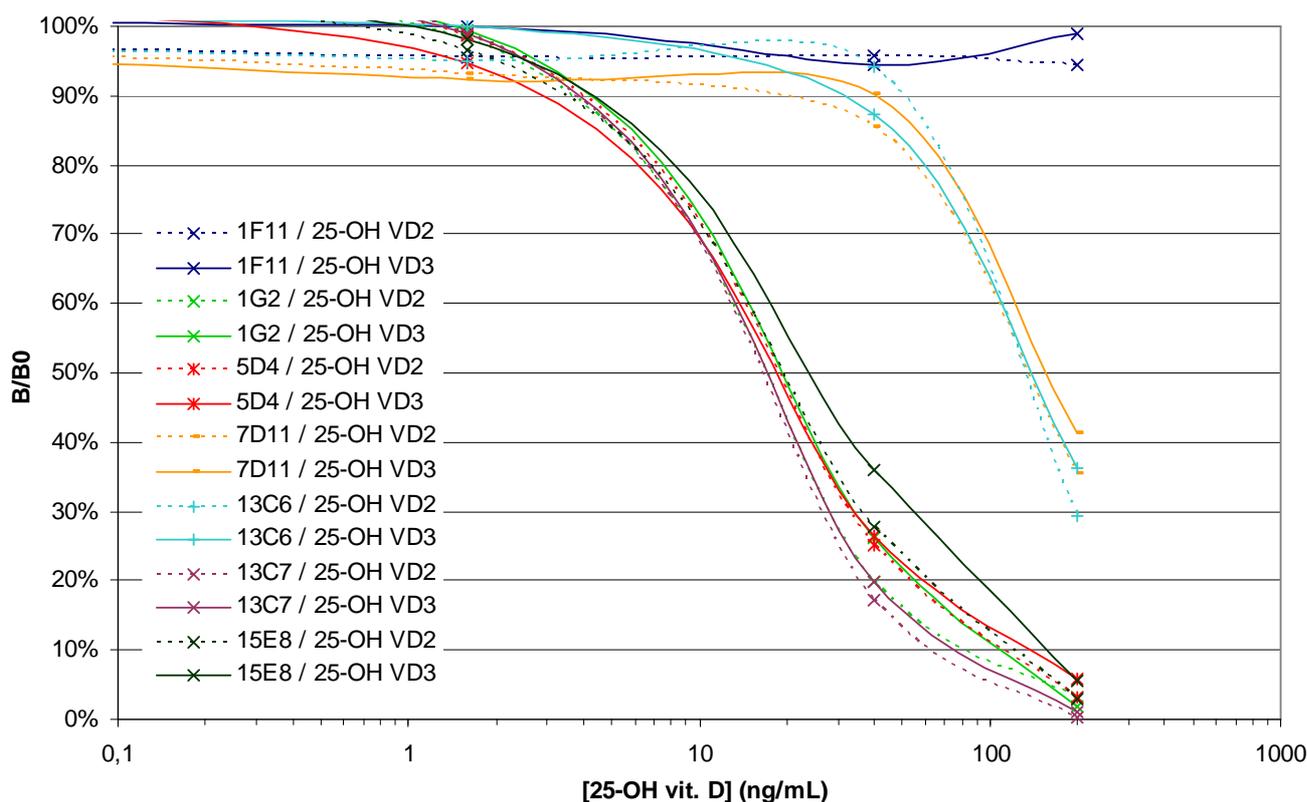
Les 10 hybridomes sélectionnés ont été décongelés et placés en culture. Mais les trois puits 10B11 ; 25E8 et 9B7 ayant mal redémarré après la décongélation, n'ont pas été testés.

Lorsque le titre en anticorps dans les surnageants de culture en présence de serum de veau fœtal est supérieur à 1/100 pour le traceur tritié (1G2 ; 5D4 ; 13C7 ; 15E8), les courbes de déplacement sont similaires pour les deux gammes 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> et sont très proches d'un hybridome à l'autre. Cela peut signifier, soit que les hybridomes ont des caractéristiques très proches, soit que le même anticorps monoclonal est sécrété dans ces puits.

Hybridome	Titre
1F11	pur
1G2	163
5D4	153
7D11	15
13C6	19
13C7	181
15E8	109

En revanche, lorsque le titre est trop faible (1F11 ; 7D11 ; 13C6) (Graphique 10) et comme dans le cas des lapins, la DBP présente dans le milieu de culture peut lier jusqu'à la totalité du traceur tritié et de la 25-OH vitamine D apportée par les gammes. Le déplacement est alors perturbé ou absent, ce qui ne signifie pas que l'anticorps est mauvais, mais simplement insuffisamment concentré dans le milieu de culture par rapport à la DBP bovine. Deux solutions sont possibles :

- laisser plus de temps à l'hybridome pour sécréter davantage d'anticorps dans le surnageant,
- purifier l'anticorps sur colonne de protéine A.



Graphique 10 : Déplacements du traceur tritié par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> sur des surnageants des hybridomes de rat (20-CO-BSA vit. D 22) sélectionnés pour un clonage

### III.3.4.2 Clonages

Les puits 1F11 ; 13C6 et 7D11 n'ont pas été clonés dans un premier temps, afin de concentrer les efforts sur les puits dont les surnageants fournissent des déplacements corrects. (Graphique 10)

Ainsi, les hybridomes, dont les anticorps contenus dans les surnageants présentent les propriétés requises, ont été clonés pour aboutir à la présence d'un seul hybridome permettant la sécrétion d'un anticorps monoclonal. De cette manière, le clone peut être exploité à l'infini et gardera toujours les mêmes caractéristiques.

Quatre puits 1G2 ; 5D4 ; 13C7 ; 15E8 ont été clonés une première fois par dilution limite dans le milieu de culture sur des plaques 96 puits. Le criblage a été réalisé par la méthode RIA (voir § III.3.2.2 Protocole de screening en RIA).

A la suite de ce premier clonage, les surnageants des hybridomes 1G2, 5D4 et 15E8 restent positifs alors que l'hybridome 13C7 a perdu sa capacité à sécréter l'anticorps.

Afin de s'assurer que les hybridomes restants sont bien monoclonaux, un 2<sup>ème</sup> clonage a été effectué, à la suite duquel il ne reste plus que deux hybridomes (1G2 et 5D4) sécrétant chacun un anticorps monoclonal.

### **III.3.4.3 Production des anticorps monoclonaux en liquide d'ascite et caractérisation**

Les anticorps monoclonaux de ces clones (1G2 et 5D4) ont été produits en liquide d'ascite à partir de souris « nude » athymiques traitées préalablement au pristane. Un aliquot de chaque liquide d'ascite a été purifié sur colonne de protéine A pour donner des concentrations en anticorps monoclonaux de 0,797 mg/mL pour le 1G2 et de 0,442 mg/mL pour le 5D4. Les titres de ces anticorps monoclonaux ont été déterminés pour chacun des 6 traceurs iodés (Tableau 9) :

Traceur iodé	Clone	
	1G2	5D4
20-CO-[ <sup>125</sup> I]iodohistamine vitamine D <b>59</b>	12500	95
22-CMO-[ <sup>125</sup> I]iodohistamine vitamine D <b>65</b>	6600	74
22-CO-[ <sup>125</sup> I]iodohistamine vitamine D <b>67</b>	8000	42
23-CMO-[ <sup>125</sup> I]iodohistamine vitamine D <b>69</b>	7000	87
22-(S-Bz-CO-[ <sup>125</sup> I]iodohistamine) vitamine D <b>71</b>	280	0
22-NH-[3-(1H-[ <sup>125</sup> I]iodoimidazol-4-yl)- propionamide] vitamine D <b>76</b>	8600	95

Tableau 9 : Titres des surnageants de culture des clones pour chaque traceur iodé

La concentration en anticorps après purification du liquide d'ascite du clone 5D4 sur une colonne de protéine A conjugué sur Sépharose<sup>®</sup> est quasiment 2 fois plus faible que celle du clone 1G2, pourtant les titres pour les traceurs iodés sont 100 à 200 fois plus faibles. L'anticorps monoclonal 5D4 a probablement perdu son activité de liaison pour les 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>.

Le titre déterminé pour l'anticorps monoclonal 5D4 par le traceur 22-(S-Bz-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine) vitamine D **71** n'est pas suffisant pour effectuer une compétition pour les deux gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. Les autres titres obtenus avec les autres traceurs iodés sont aussi bas mais reflètent tout de même la tendance observée pour le clone 1G2, c'est-à-dire des titres meilleurs pour les traceurs

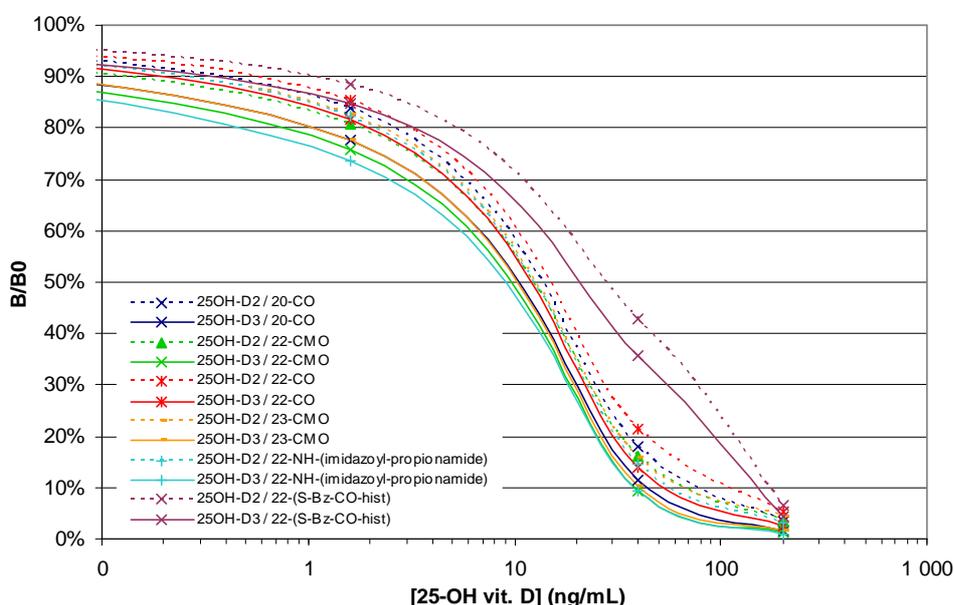
20-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D **59** et 22-NH-[3-(1H-[<sup>125</sup>I]iodoimidazol-4-yl)-propionamide] vitamine D **76** que pour les autres traceurs. Des titres élevés ont l'avantage de réduire la quantité d'anticorps nécessaire pour une compétition dans un tube.

Une compétition pour chacun des traceurs iodés à l'aide des deux gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> permet de sélectionner le meilleur couple anticorps monoclonal – traceur.

La combinaison devra être sensible dans la zone des faibles concentrations en 25-OH vitamine D. Pour ce faire, la pente des courbes d'étalonnage dans cette zone du graphique doit être suffisante ou encore les variations de concentration doivent engendrer une variation significative du rapport B/B<sub>0</sub>. Ce dernier est le rapport de la radioactivité liée à l'anticorps en présence du standard (ou de l'échantillon) sur la radioactivité liée à l'anticorps sans le standard (ou en présence du Std 0).

Les concentrations les plus élevées de la gamme (200 ng/mL) qui sont bien supérieures aux valeurs normales donnent un aperçu de l'étendue de la gamme de dosage.

Bien sûr, le couple anticorps monoclonal – traceur devra reconnaître de manière similaire les 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>.

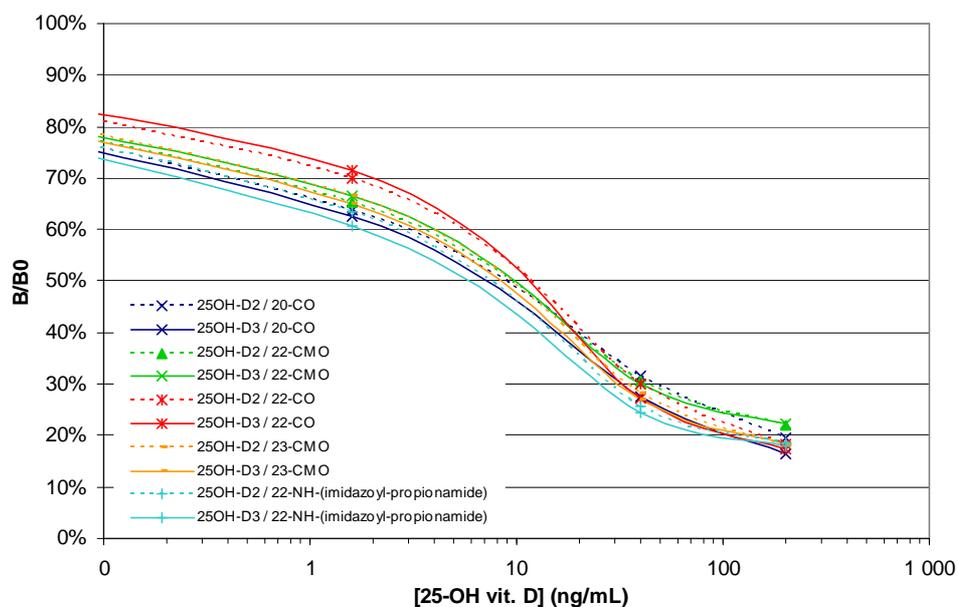


Graphique 11 : Déplacements par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la liaison des traceurs iodés à l'hybridome 1G2

Le clone 1G2 reconnaît mieux la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> que la 25-OH vitamine D<sub>2</sub>, ce clone aura donc tendance, tout comme la trousse IDS, à sous-estimer la concentration de 25-OH vitamine D<sub>2</sub> dans les échantillons. L'écart entre les deux gammes est difficilement appréciable sur une échelle logarithmique. Quelque soit le traceur utilisé, un décalage persiste en faveur d'une meilleure reconnaissance pour la 25-OH vitamine D<sub>3</sub>. (Graphique 11)

La sensibilité du dosage dans les faibles concentrations de 25-OH vitamine D est satisfaisante, sauf pour le traceur 22-(S-Bz-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine) vitamine D **71**. Ce dernier a une trop forte affinité pour l'anticorps, il faut donc des quantités plus grandes de 25-OH vitamine D<sub>2</sub> ou de 25-OH vitamine D<sub>3</sub> pour le déplacer.

Les courbes ont toutes la même allure et reflètent une similitude de reconnaissance pour les traceurs iodés, pourtant de structures différentes, ce qui suggère une faible discrimination de la zone de fixation des chaînons, sauf pour le traceur 22-(S-Bz-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine) vitamine D **71** possédant un chaînon aromatique plus volumineux.



Graphique 12 : Déplacements par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la liaison des traceurs iodés à l'hybridome 5D4

Les courbes de compétition des deux gammes pour chacun des autres traceurs montrent une reconnaissance identique du clone 5D4 pour les deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. (Graphique 12)

Les 5 traceurs (20-CO-[<sup>125</sup>I]iodohist. ; 22-CMO-[<sup>125</sup>I]iodohist. ; 22-CO-[<sup>125</sup>I]iodohist. ; 23-CMO-[<sup>125</sup>I]iodohist. et 22-NH-[3-(1H-[<sup>125</sup>I]iodoimidazol-4-yl)-propionamide] vitamine D) ne montrent aucune différence de déplacement pour les deux gammes et les courbes de compétition inter-traceurs sont très proches, étant données les variations de structure des traceurs entre eux. Cet anticorps monoclonal 5D4 réagit comme s'il ne distinguait aucune différence au niveau de la chaîne latérale et se comporte donc de façon identique quelque soit le traceur utilisé.

Ces résultats restent à confirmer par une 2<sup>ème</sup> purification de l'ascite 5D4 pour obtenir une plus grande quantité d'anticorps monoclonaux et une plus forte concentration de cet anticorps.

### III.4 Conclusion sur la 1<sup>ère</sup> campagne d'immunisation

La première campagne d'immunisation avec les deux premiers immunogènes **22** et **29** sur des souris, des rats et des lapins a donné d'excellents résultats. Les animaux ont bien répondu aux immunisations, les lapins mieux que les rats, eux-mêmes mieux que les souris, aussi bien en titre d'anticorps dans les immunisera qu'en terme de similitude de reconnaissance des deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>.

Les immunisera des lapins sont conservés par précaution, alors que l'exploitation des anticorps monoclonaux anti-25-OH vitamine D est sur la bonne voie. A l'heure actuelle, deux anticorps monoclonaux ont été obtenus et d'autres pourraient venir par la suite pour étoffer le choix des clones. En effet, de nombreuses colonies d'hybridomes pourraient être décongelées pour être ensuite clonées.

Les deux premières fusions jusqu'à présent ont porté sur des rats immunisés par le 1<sup>er</sup> immunogène synthétisé, la 20-CO-BSA vitamine D **22**. Ultérieurement, il s'est avéré que les immunisera des animaux immunisés avec le 2<sup>ème</sup> immunogène synthétisé, la 22-CMO-BSA vitamine D **29** ont des meilleures caractéristiques de liaison que ceux issus du 1<sup>er</sup> immunogène de référence, la 20-CO-BSA vitamine D **22**.

Sur tous les immunisera de la première campagne d'immunisations, les anticorps générés à partir de la 22-CMO-BSA vitamine D **29** sont présents en plus grande quantité et reconnaissent la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> de la même manière. Ainsi, une fusion sur des rats immunisés

par cet immunogène laisse espérer l'accès à de nouveaux clones possédant des caractéristiques améliorées de reconnaissance simultanée des 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> par rapport aux premiers résultats acquis à partir de l'immunogène 20-CO-BSA vitamine D **22**.

Ces rats sont trop âgés pour une fusion. La nouvelle campagne d'immunisations de souris afin de comparer les 5 immunogènes de la vitamine D pourrait permettre de sélectionner une souris pour effectuer une fusion et d'orienter le choix du meilleur immunogène à utiliser pour immuniser des rats qui semblent mieux répondre que les souris.



---

**COMPARAISON DES ANTICORPS OBTENUS POUR  
CHACUN DES IMMUNOGENES**

---



# Chapitre IV – Comparaison des anticorps obtenus pour chacun des immunogènes

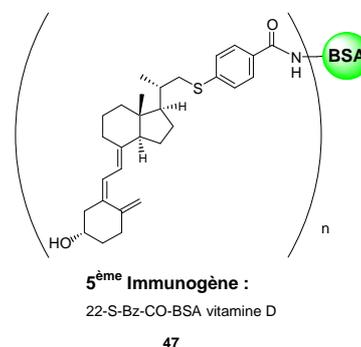
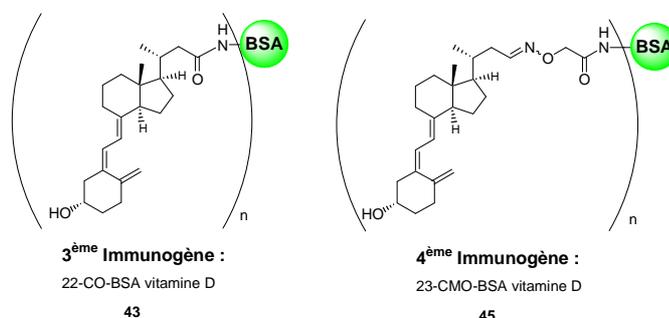
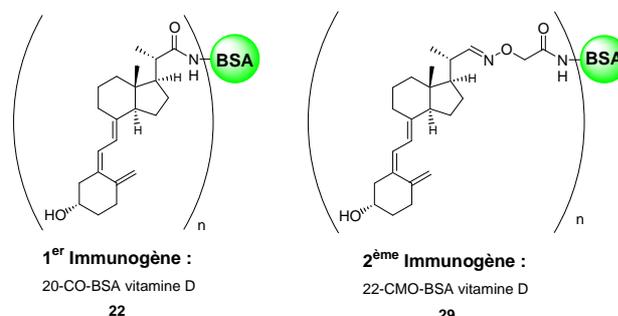
Les 5 immunogènes dont la préparation a été détaillée plus haut, ont fait l'objet d'immunisations comparatives sur 3 souris Balb/C AnN chacun. Au total, 15 souris ont été immunisées au cours de la 2<sup>ème</sup> campagne d'immunisations.

Les immunisations ont suivi le protocole suivant :  
Toutes les souris sont immunisées toutes les 3 à 4 semaines avec 50 µg d'immunogène dans 100 µL de serum physiologique en émulsion dans 100 µL d'adjuvant de Freund (complet pour la première immunisation, incomplet pour les suivantes) par injections intrapéritonéale et sous-cutanée simultanément.

L'étude des anticorps de ces souris porte sur le 4<sup>ème</sup> prélèvement après 8 immunisations sur une durée de 6 mois. Sur les 15 souris immunisées, 2 immunisées par la 22-(S-Bz-CO-BSA) vitamine D **47** sont mortes rapidement.

Immunogène	Souris		
Immunogène 1 20-CO-BSA Vit. D <b>22</b>	S1-7	S2-7	S3-7
Immunogène 2 22-CMO-BSA Vit. D <b>29</b>	S1-8	S2-8	S3-8
Immunogène 3 22-CO-BSA Vit. D <b>43</b>	S1-5	S2-5	S3-5
Immunogène 4 23-CMO-BSA Vit. D <b>45</b>	S1-4	S2-4	S3-4
Immunogène 5 22-(S-Bz-CO-BSA) Vit. D <b>47</b>	S1-6	<del>S2-6</del>	<del>S3-6</del>

Tableau 10 : Souris et immunogènes utilisés



Les titres des immunisera de l'ensemble des souris pour les 6 traceurs iodés ont été déterminés sur ce prélèvement.

Une fois les titres déterminés, des déplacements ont été effectués avec les gammes 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. Celles-ci sont préparées en tampon phosphate 20 mM pH 7,2 – EtOH 50/50 v/v puis contrôlées sur deux sera de lapins répondant expérimentalement de manière identique pour les 25-OH vitamines D.

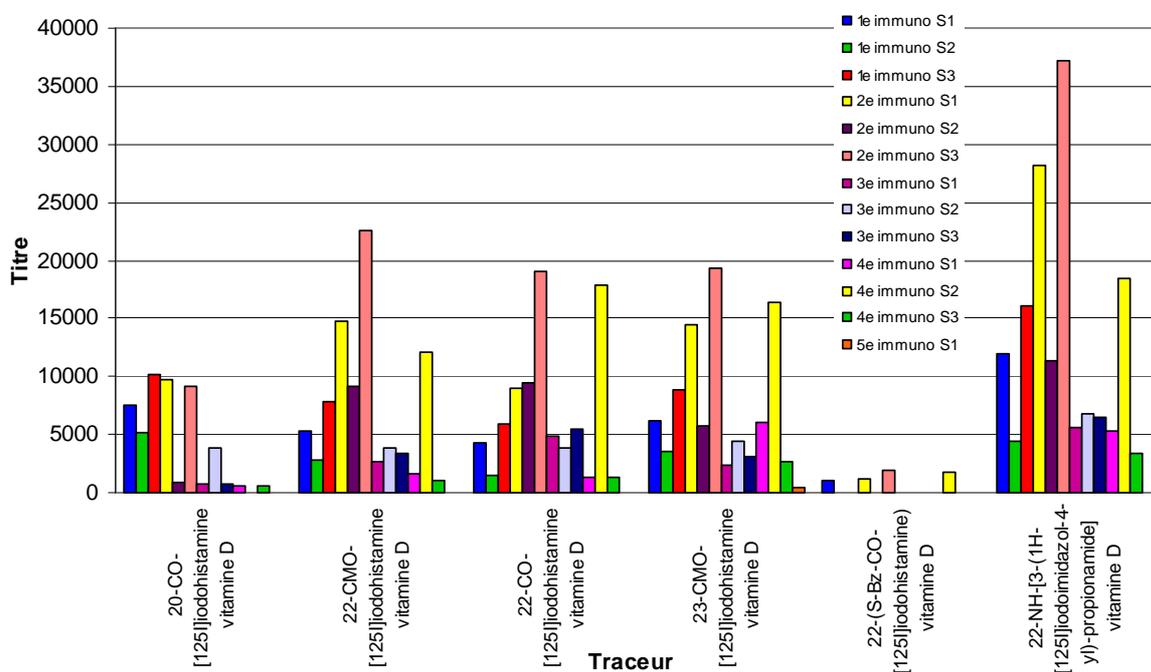
## IV.1 Titres des immunisera

Les titres pour 50% de liaison du traceur à l'anticorps ont été déterminés pour les 13 souris (S1-7 ; S2-7 ; S3-7 ; S1-8 ; S2-8 ; S3-8 ; S1-5 ; S2-5 ; S3-5 ; S1-4 ; S2-4 ; S3-4 ; S1-6) et pour chacun des 6 traceurs. Le tout est réalisé en phase homogène pour des dilutions des immunisera de x500 ; x2500 ; x12500 ; 62500 ; x312500 :

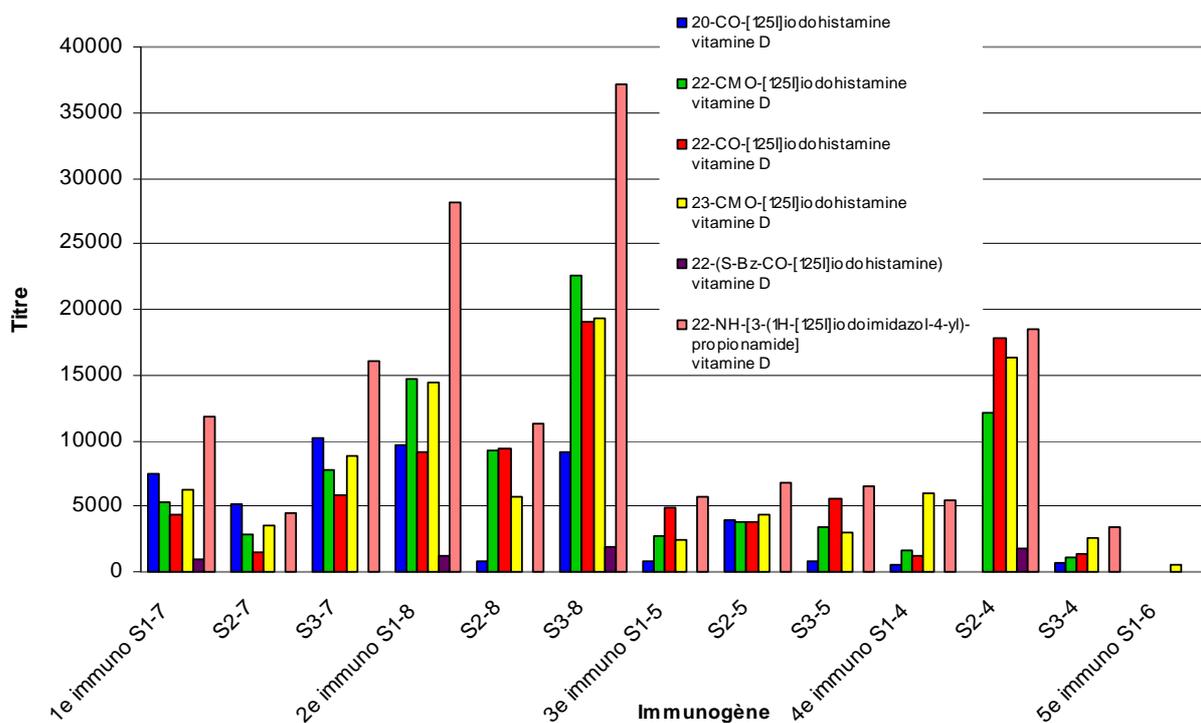
- traceur 20-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D **59**
- traceur 22-CMO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D **65**
- traceur 22-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D **67**
- traceur 23-CMO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D **69**
- traceur 22-(S-Bz-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine) vitamine D **71**
- traceur 22-NH-[3-(1H-[<sup>125</sup>I]iodoimidazol-4-yl)-propionamide] vitamine D **76**

Immunogène	n° souris	Immunogène 1 20-CO-BSA Vit. D			Immunogène 2 22-CMO-BSA Vit. D			Immunogène 3 22-CO-BSA Vit. D			Immunogène 4 23-CMO-BSA Vit. D			Immunogène 5 22-(S-Bz-CO-BSA) Vit. D
		S1-7	S2-7	S3-7	S1-8	S2-8	S3-8	S1-5	S2-5	S3-5	S1-4	S2-4	S3-4	
20-CO-[ <sup>125</sup> I]iodohistamine vitamine D	<b>59</b>	7538	5190	10172	9723	826	9104	804	3902	763	533	<500	640	<500
22-CMO-[ <sup>125</sup> I]iodohistamine vitamine D	<b>65</b>	5267	2874	7775	14717	9206	22578	2704	3804	3414	1617	12076	1024	<500
22-CO-[ <sup>125</sup> I]iodohistamine vitamine D	<b>67</b>	4345	1523	5865	9069	9397	19095	4885	3854	5528	1288	17869	1379	<500
23-CMO-[ <sup>125</sup> I]iodohistamine vitamine D	<b>69</b>	6210	3526	8834	14469	5707	19354	2426	4366	3041	6050	16349	2613	512
22-(S-Bz-CO-[ <sup>125</sup> I]iodohistamine) vitamine D	<b>71</b>	1014	<500	<500	1159	<500	1926	<500	<500	<500	<500	1752	<500	<500
22-NH-[3-(1H-[ <sup>125</sup> I]iodoimidazol-4-yl)- propionamide] vitamine D	<b>76</b>	11894	4473	16081	28132	11302	37184	5665	6847	6547	5377	18502	3442	<500

Tableau 11 : Résultats des titres des immunosera des 13 souris en fonction des 6 traceurs



Graphique 13 : Titres des immunosera des souris classés par traceur



Graphique 14 : Titre des immunosera des souris classés par immunogène

Toutes les souris immunisées par les immunogènes de la vitamine D ne réagissent pas de la même manière en terme de quantité et de qualité d'anticorps sécrétés. Ainsi, visuellement, l'analyse du Graphique 13 montre clairement que le traceur homologue du 5<sup>ème</sup> immunogène utilisé (22-S-Bz-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine) vitamine D **71** ne donne quasiment aucun titre exploitable sur l'ensemble des 13 souris testées. Ils sont tous inférieurs au 1/2000, même avec la souris S1-6, immunisée par la (22-S-Bz-CO-BSA) vitamine D **47**. L'objectif de cet immunogène à chaînon rigide (phényle) de créer une zone floue pour la reconnaissance identique des deux chaînes latérales des 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> est un échec.

Par contre, une bonne réponse immunitaire est observée pour les souris immunisées par la 22-CMO-BSA vitamine D **29**, en particulier les souris S3-8 et S1-8. La souris S2-4 immunisée par l'immunogène 23-CMO-BSA vitamine D **45** donne aussi de bons titres.

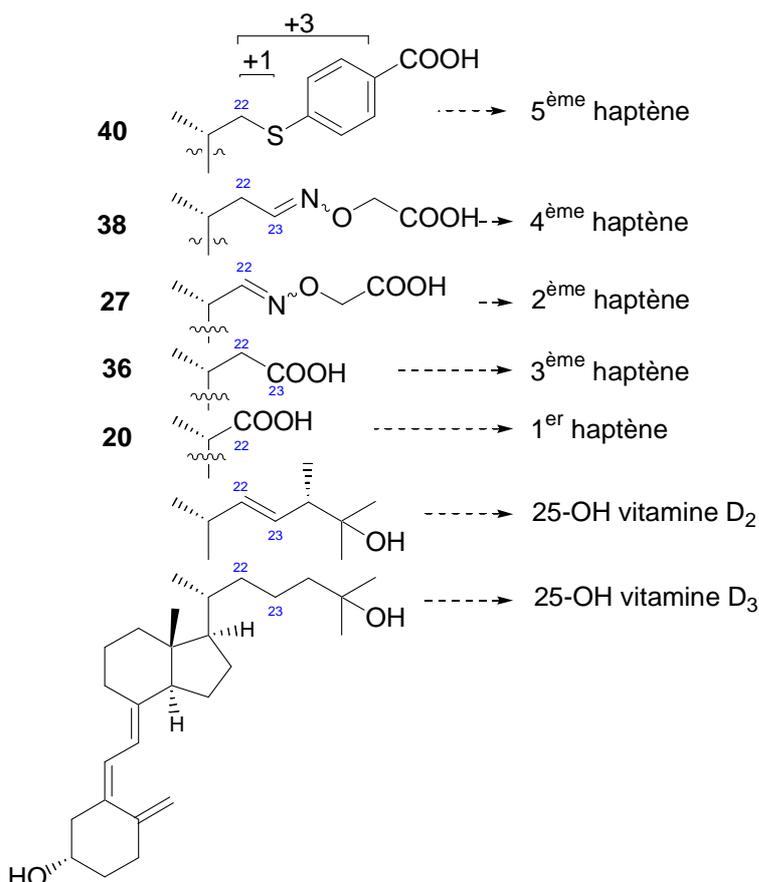


Figure 92 : Chaînon des haptènes synthétisés

D'un point de vue général, l'homologation de la chaîne latérale d'un méthylène comme c'est le cas entre la 20-CO-BSA **22** et la 22-CO-BSA vitamine D **43** et entre la 22-CMO-BSA **29** et la 23-CMO-BSA vitamine D **45** ne fait que baisser le titre de ces souris.

Un immunogène dont l'haptène est couplé par un bras 22-CO de longueur intermédiaire entre le 20-CO et le 22-CMO ne donne finalement pas de meilleurs titres que ce dernier, réputé empiriquement pour donner de bonnes réponses immunitaires.<sup>117</sup>

Il faut noter que le seul traceur ne provenant pas du couplage d'un haptène et de l'histamine, le traceur 22-NH-[3-(1H-[<sup>125</sup>I]iodoimidazol-4-yl)-propionamide] vitamine D **76**, donne des titres plus élevés sur quasiment toutes les souris.

Ainsi, en comparant les titres des souris immunisées par la 20-CO-BSA **22** et la 22-CO-BSA vitamine D **43** et par la 22-CMO-BSA **29** et la 23-CMO-BSA vitamine D **45**, un chaînon court semble donc préférable du point de vue de la réponse immunitaire. De plus, une structure inconnue pour l'organisme immunisé comme le sont les dérivés de carboxyméthylxime (CMO) engendre une plus forte réaction immunogénique.

Les titres reflètent la quantité d'anticorps obtenus mais ne préjugent pas de leur qualité. Les anticorps sécrétés doivent pouvoir reconnaître de manière identique les deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. Les immunisera possédant un titre exploitable sont testés en compétition avec les deux gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>.

## IV.2 Compétition avec les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>

Les immunisera des souris dont le titre est suffisant (> 1/500) sont testés en compétition avec 4 points de chacune des deux gammes 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> (0 ; 1,6 ; 40 et 200 ng/mL).

Les deux gammes sont préparées à partir de solutions de 25-OH vitamine D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub> dans de l'éthanol absolu. Les concentrations cibles sont obtenues par dilution en cascade d'une solution mère, dont la concentration exacte est calculée à partir de la densité optique mesurée au  $\lambda_{\max}$  de la vitamine D à 264 nm avec les coefficients d'extinction donnés par la littérature :

$$\epsilon_{264\text{nm}} (25\text{-OH vit. D}_2) = 19400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{264\text{nm}} (25\text{-OH vit. D}_3) = 18300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

La fourchette des concentrations usuelles de 25-OH vitamines D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub> à doser dans les sera est comprise entre 25 et 100 pmol/mL soit entre 10 et 40 ng/mL. En dessous des ces valeurs, il y a carence et au delà de 100 ng/mL, il y a risque d'intoxication par la vitamine D. Avec une IC<sub>50</sub> de 20 ng/mL, le dosage devrait permettre de mesurer aussi bien les concentrations pathologiques faibles que les fortes.

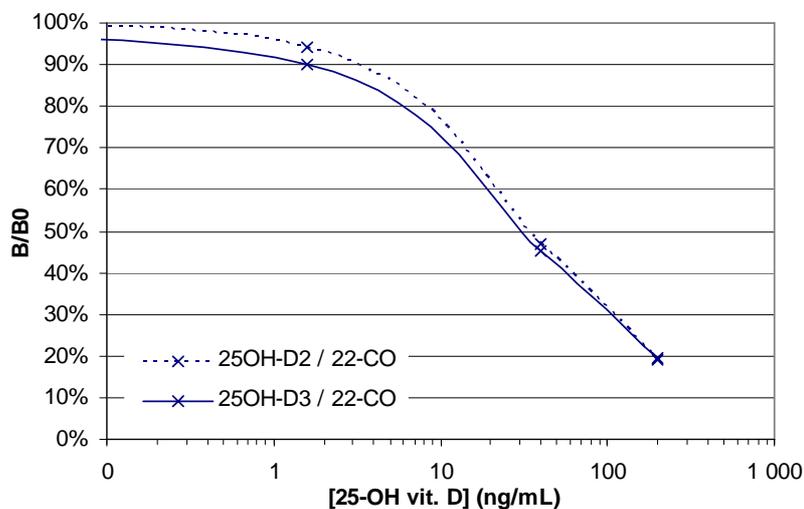
Les concentrations (en ng/mL) étant identiques pour les deux gammes, une erreur négligeable est faite correspondant au rapport entre les masses moléculaires des deux vitamines, soit 412,65/400,64 = 3%.

L'ensemble des courbes de compétition des deux gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> montrent que toutes les souris ne répondent pas de manière similaire (voir Annexe D). Globalement, la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> déplace moins bien les traceurs que la 25-OH vitamine D<sub>3</sub>. En effet, les faisceaux de courbes correspondant à la gamme 25-OH vitamine D<sub>2</sub> (en pointillé - - - -) ont un rapport B/B<sub>0</sub> souvent supérieur à ceux de la 25-OH vitamine D<sub>3</sub> pour un même traceur et une même concentration.

<sup>117</sup> Observation non-publiée de l'ERM 0322

### IV.2.1 Souris immunisées par la 20-CO-BSA vitamine D 22

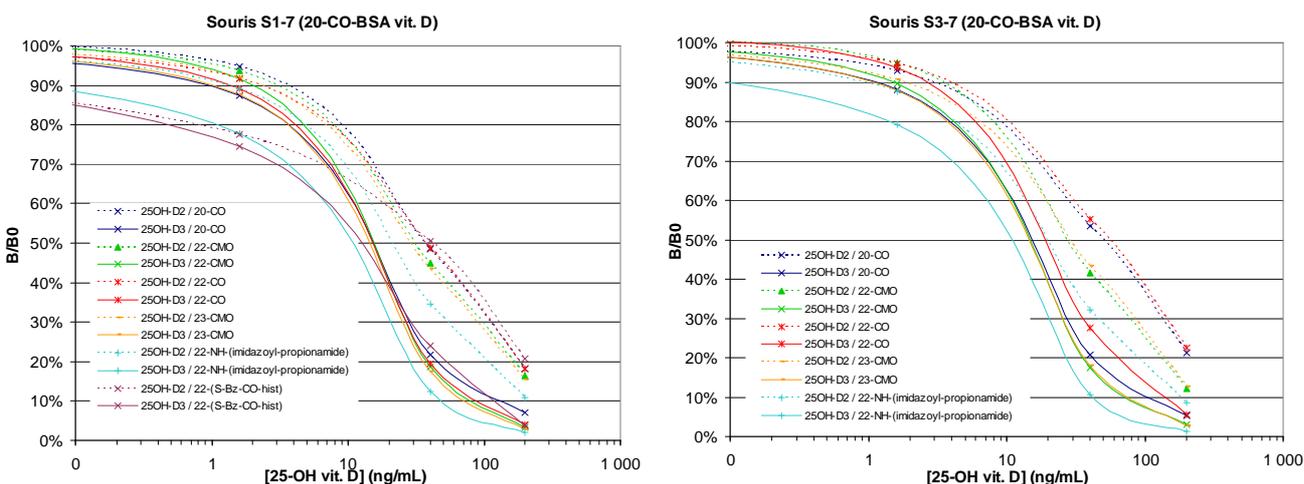
Parmi les souris immunisées par la 20-CO-BSA vitamine D 22, une seule répond de manière quasi identique pour les deux gammes avec le traceur homologue 20-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D 59, il s'agit de la souris S2-7. (Graphique 15)



Graphique 15 : Déplacements par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la liaison du traceur 20-CO-hist vit D 59 à l'immunoserum de la souris S2-7 (20-CO-BSA vitamine D 22)

L'IC<sub>50</sub> de cette souris reste tout de même élevé (30 ng/mL de 25-OH vitamine D). A 200 ng/mL, l'anticorps lie encore 20% de la radioactivité du standard 0 ng/mL (B/B<sub>0</sub> = 20%).

Les deux autres souris ont de trop fortes différences de reconnaissance des deux vitamines, leurs anticorps ne peuvent être exploités. (Graphique 16)



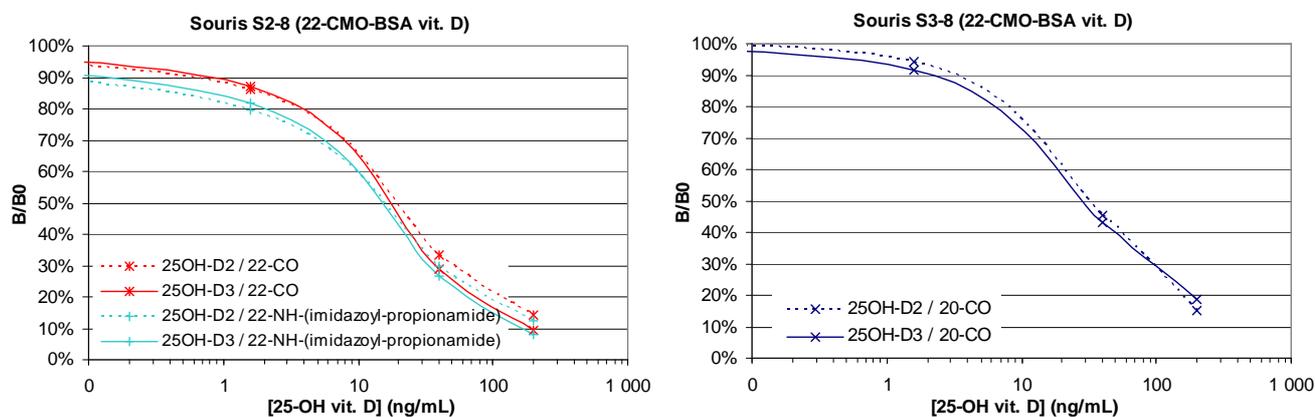
Graphique 16 : Autres souris immunisées par la 20-CO-BSA vitamine D 22

### IV.2.2 Souris immunisées par la 22-CMO-BSA vitamine D 29

Les souris immunisées par la 22-CMO-BSA vitamine D 29, dont les titres sont plus élevés en moyenne que pour les autres souris, donnent des résultats satisfaisants en terme de reconnaissance des deux 25-OH vitamine D. Ainsi les souris S2-8 et S3-8 associées aux traceurs 22-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine

vitamine D **67** et 22-NH-[3-(1H-[<sup>125</sup>I]iodoimidazol-4-yl)-propionamide] vitamine D **76** et au traceur 20-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D **59** (Graphique 17), respectivement, remplissent ces conditions.

Les traceurs à l'exception du traceur 20-CO-[<sup>125</sup>I]iodohistamine vitamine D **59** sont déplacés correctement par les deux gammes pour les anticorps de la souris S2-8 qui forment un faisceau de courbe d'IC<sub>50</sub> à 20 ng/mL compatibles avec la gamme de concentrations plasmatique à doser. (voir Annexe D, graphique S2-8)



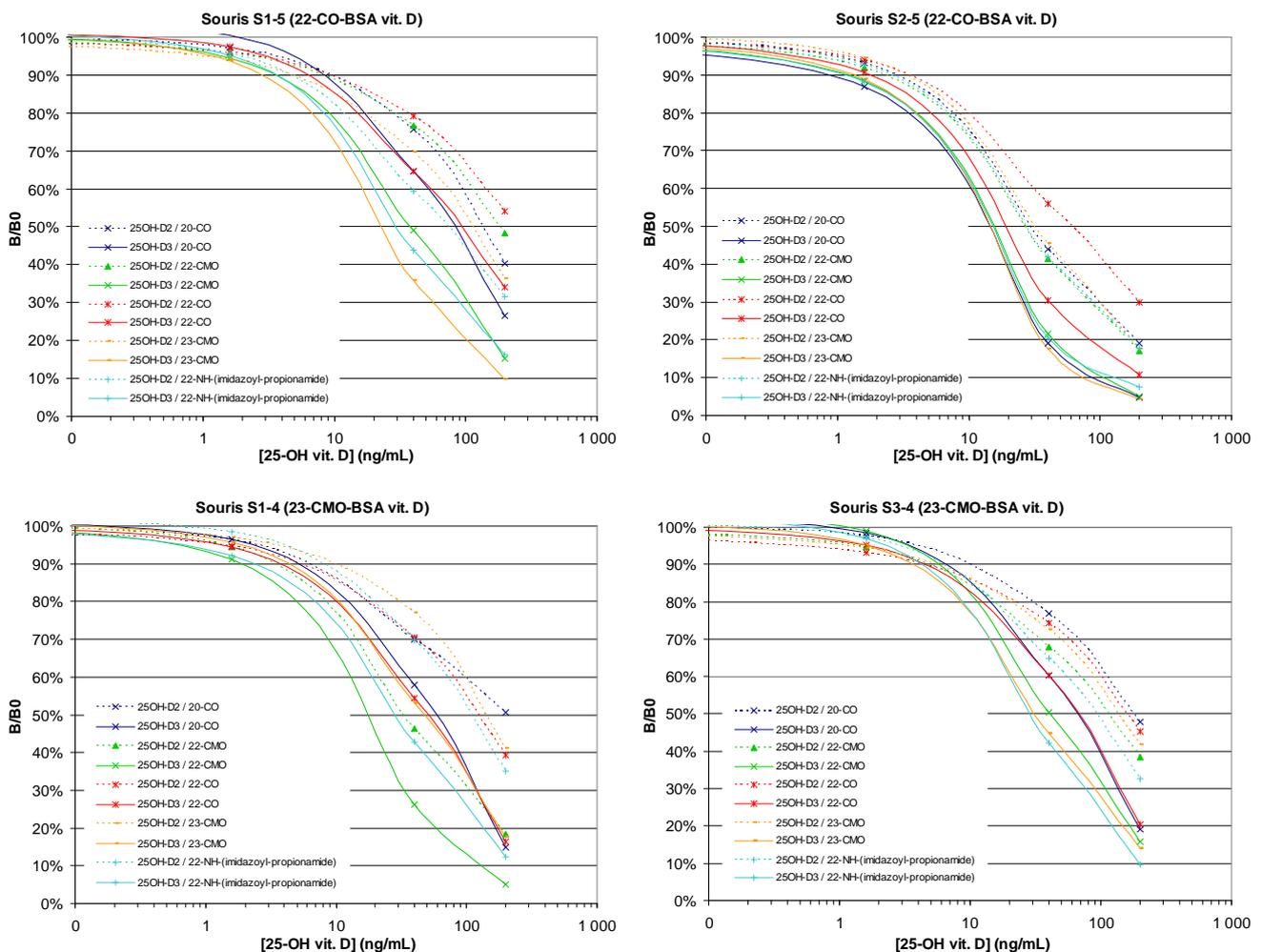
Graphique 17 : Déplacements par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la liaison des traceurs iodés aux immunosera des souris S2-8 et S3-8 (22-CMO-BSA vitamine D)

De ces trois combinaisons, la meilleure est celle qui est la plus sensible dans la zone des faibles concentrations en 25-OH vitamine D. La souris S2-8 associée au traceur 22-NH-[3-(1H-[<sup>125</sup>I]iodoimidazol-4-yl)-propionamide] vitamine D **76** offre les meilleurs déplacements pour les faibles concentrations. Pour la suite des travaux de recherche, une fusion sur cette souris est à envisager. Pour l'autre souris (S1-8), la gamme 25-OH vitamine D<sub>2</sub> est systématiquement moins bien reconnue que la gamme 25-OH vitamine D<sub>3</sub>.

### IV.2.3 Souris immunisées par les autres immunogènes

Le reste des souris immunisées par les immunogènes 22-CO-BSA **43**, 23-CMO-BSA **45** et 22-(S-Bz-CO-BSA) vitamine D **47** fournit des anticorps avec de fortes différences de reconnaissance pour les deux vitamines D et de faibles sensibilités sur le début des courbes d'étalonnage.

La souris S2-5 immunisée par la 22-CO-BSA vitamine D **43** répond de manière identique pour la gamme 25-OH vitamine D<sub>3</sub> quelque soit le traceur iodé excepté le 22-(S-Bz-CO-histamine) vitamine D **71**. (Graphique 18)



Graphique 18 : Exemples de courbes de déplacement d'autres souris possédant des défauts de reconnaissance

### IV.3 Conclusion sur les immunisations comparatives

Une majorité de souris (9/13), quelque soit l'immunogène utilisé et quelque soit le traceur, montrent une moins bonne reconnaissance de la gamme 25-OH vitamine D<sub>2</sub> que de la gamme 25-OH vitamine D<sub>3</sub>.

L'ensemble des résultats obtenus à partir de l'immunisation comparative de souris par les 5 immunogènes précédemment synthétisés montre que la réponse immunitaire des souris immunisées par la 22-CMO-BSA vitamine D **29** avec un chaînon non peptidique et court est plus forte que pour les autres immunogènes utilisés. De plus la reconnaissance des deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> est identique et laisse le choix du traceur iodé. Comme attendu, les chaînons CMO sont plus immunogéniques que les chaînons acide carboxylique (COOH) simples.

De nombreuses souris n'ont pas de différence de reconnaissance pour les traceurs iodés dont les différences de structures s'expriment sur la chaîne latérale, mais discriminent tout de même les deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>.

L'homologation d'un groupement méthylène des haptènes 20-COOH vitamine D **20** et 22-CMO vitamine D **27** conduisant respectivement aux 22-COOH vitamine D **36** et 23-CMO vitamine D **38** dégage la liaison simple C22-C23 similaire à la vitamine D<sub>3</sub> (Figure 92). Les anticorps issus de l'ensemble de ces immunogènes semblent, de manière générale, mieux reconnaître la 25-OH

vitamine D<sub>3</sub> que la 25-OH vitamine D<sub>2</sub>, mais cette différence de reconnaissance paraît diminuer avec les deux premiers immunogènes (20-CO-BSA **22** et 22-CMO-BSA vitamine D **29**). (Annexe D)

Ainsi, pour ces deux haptènes à chaînon court, il est possible de trouver un immunosérum de souris qui, associé à un traceur, donne une reconnaissance identique des deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. L'haptène 22-CMO vitamine D **27** qui possède la double liaison de l'oxime comme élément d'analogie avec celle de la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> semble favoriser la reconnaissance de la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> qui paraît pénalisée avec les anticorps obtenus à partir des autres haptènes.

Par contre, l'homologue d'un carbone supplémentaire (23-CMO vitamine D **38**) ne présente plus la double liaison de l'oxime mais une liaison saturée C22-C23 qui affecte la reconnaissance des anticorps correspondants pour les deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> au profit de la 25-OH vitamines D<sub>3</sub>.

Un autre point intéressant est le traceur 22-NH-[3-(1H-[<sup>125</sup>I]iodoimidazol-4-yl)-propionamide] vitamine D **76** qui semble favoriser la reconnaissance de la vitamine D avec des titres plus élevés et quelque soit l'immunogène.

---

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---



## Conclusion et perspectives

Cinq immunogènes de la vitamine D ont pu être obtenus par couplage à la BSA d'haptènes de la vitamine D sur laquelle un chaînon à fonction acide carboxylique terminale a été introduit sur la chaîne latérale : 20-CO-BSA **22** ; 22-CMO-BSA **29** ; 22-CO-BSA **43** ; 23-CMO-BSA **45** et 22-(S-Bz-CO-BSA) vitamine D **47**. Ces cinq haptènes ont aussi permis la préparation de dérivés à ioder, indispensables pour le développement d'une trousse de dosage RIA ( $^{125}\text{I}$ ).

La synthèse de tous les dérivés de la chaîne latérale de la vitamine D a été améliorée par divers perfectionnements portant sur l'usage d'un colorant pour suivre la réaction d'ozonolyse de la chaîne latérale, sur des procédés permettant l'absence d'isomérisation du triène de la vitamine D et sur un nouveau montage de photoisomérisation.

L'optimisation de ces étapes d'hémisynthèse de dérivés sur la chaîne latérale à partir de la vitamine D<sub>2</sub> a permis d'obtenir de nombreux composés tel que les haptènes eux-mêmes, les dérivés à ioder ainsi que des précurseurs de marqueurs d'affinité.

Les immunisations menées sur des souris, des rats et des lapins ont toutes donné des anticorps anti-25-OH vitamine D.

Les lapins ainsi que les rats, ont de manière générale mieux répondu que les souris aux immunisations, conduisant à des immunisera de meilleure qualité.

Seul le dernier immunogène préparé (22-(S-Bz-CO-BSA) vitamine D **71**) n'a pas donné les résultats escomptés et s'est même révélé toxique sur les souris.

Les autres immunogènes permettent de conclure que la longueur de la chaîne latérale est importante en terme de quantité d'anticorps sécrétés dans les immunisera et mais surtout en terme de spécificité de reconnaissance des deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. Une chaîne latérale courte et si possible possédant un bras non peptidique de type carboxyméthylxime (CMO) semble préférable à des bras plus longs. En fait, les deux premières structures d'haptène proposées (20-COOH **20** et 22-CMO vitamine D **27**) donnent les meilleurs résultats.

Ainsi, les deux premières fusions réalisées jusqu'à présent uniquement sur trois rats immunisés par la 20-CO-BSA vitamine D **22** ont permis l'obtention de deux hybridomes sécréteurs d'anticorps anti-25-OH vitamine D (1G2 et 5D4). L'un de ces deux anticorps monoclonaux présente la caractéristique nécessaire de reconnaissance similaire des deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> (5D4).

La comparaison des anticorps obtenus à partir des 5 immunogènes permet d'affirmer que le meilleur d'entre eux est le 22-CMO-BSA vitamine D **29**. Les titres des immunisera sur ces souris sont les plus élevés et il n'y a que très peu de différence de reconnaissance entre la 25-OH vitamine D<sub>2</sub> et la 25-OH vitamine D<sub>3</sub>. Une fusion serait envisageable sur l'une des trois souris utilisées pour les immunisations comparatives (p. ex. S2-8 ou S3-8) afin d'obtenir de nouveaux anticorps monoclonaux. Les rats ayant des réponses immunitaires plus fortes contre les immunogènes de la vitamine D, il serait peut être préférable d'immuniser à nouveau des rats par la 22-CMO-BSA vitamine D **29**. En effet, l'étude à posteriori des immunisera de la 1<sup>ère</sup> campagne d'immunisation avec la 20-CO-BSA vitamine D **22** et la 22-CMO-BSA vitamine D **29** montrait déjà des très bons résultats sur les rats immunisés par la 22-CMO-BSA vitamine D **29**. Ces rats sont trop vieux pour envisager une fusion.

L'étude structurale par marquage d'affinité, séquençage et modélisation moléculaire des anticorps monoclonaux issus d'immunisations par la 20-CO-BSA vitamine D **22** et la 22-CMO-BSA vitamine D **29** permettrait alors de commencer à comprendre les caractéristiques essentielles du site de liaison des anticorps monoclonaux obtenus.

Les voies d'accès aux précurseurs de synthèse des haptènes et des traceurs de la vitamine D ont permis, en complément de ces travaux, de proposer une synthèse de marqueurs d'affinité qui pourront être employés pour l'analyse structurale de site d'anticorps anti-vitamine D, mais aussi pour des marquages d'affinité de la DBP.

La préparation d'immunogènes de la DBP stabilisée dans sa forme « holo », par liaison covalente à une vitamine D par marquage d'affinité pourra alors être envisagée. Les anticorps dirigés contre cette forme de DBP permettraient alors la mise au point d'un dosage direct des deux 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> sans extraction, ni précipitation des protéines sériques, ni emploi d'un inhibiteur de la liaison à la DBP.

Des voies d'accès à des marqueurs d'affinité ont aussi permis l'obtention d'un 6<sup>ème</sup> dérivé à ioder, la 22-NH-[3-(1H-imidazol-4-yl)-propionamide] vitamine D **75**.

Le savoir-faire acquis en série 25-hydroxyvitamine D pourrait faire l'objet d'adaptations de la stratégie de synthèse pour mettre au point le dosage de la 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>, très intéressante d'un point de vue clinique puisqu'il s'agit de la forme hormone active de la vitamine D. Par ailleurs, les mises au point effectuées dans ce travail pour permettre aisément de synthétiser des familles de molécules à squelette vitamine D modifiées sur la chaîne latérale sont susceptibles d'applications potentielles pour la recherche de molécules à activité pharmacologique.

---

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

---

# Partie expérimentale

## Matériels et méthodes

### Produits et solvants commerciaux

Les produits chimiques commerciaux proviennent de Sigma-Aldrich-Fluka, St Quentin Fallavier, France sauf précision. Les solvants de SDS, de qualité pour analyses, sont utilisés en l'état sauf précision.

Le THF anhydre est obtenu par distillation sur sodium-benzophénone ou sur hydrure de lithium-aluminium. Le dichlorométhane anhydre est distillé sur hydrure de calcium.

### Purification sur silice

La silice pour chromatographie préparative 60Å 35-70 µm est fournie par SDS.

Les plaques de gel de silice 60F<sub>254</sub> sur aluminium pour CCM sont découpées dans des rouleaux 500x20 mm Merck 1.05562.

### Purification des immunogènes

La purification des immunogènes est effectuée sur une colonne de Sépharose® CL4B (Amersham Pharmacia Biotech) ref : 17-0150-01 et billes de verre Ø6 mm de Ø3,5x80 cm. La détection se fait à 280 nm sur un spectrophotomètre (LC spectrophotometer, range 0,64 ; enregistreur Kipp et Zonen BD 41, sensibilité 10 mV) muni d'un enregistreur (Kipp et Zonen BD 41, sensibilité 10 mV, papier 0,2 mm/mn). Les fractions sont collectées par un collecteur de fractions (ISCO Retriever II).

Les immunogènes sont lyophilisés par un lyophilisateur Christ alpha 1-4.

### Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres sont enregistrés à 300 MHz sur un spectromètre Bruker ALS 300 ou à 500 MHz sur un spectromètre Bruker DRX 500 pour les <sup>1</sup>H et à 75 MHz ou à 125 MHz pour les <sup>13</sup>C dans le chloroforme-*d* (ou autres solvants précisés). Les déplacements (δ) sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) à 0 ppm, les constantes de couplage (J) en hertz (Hz), et la multiplicité par s (singulet), d, dd, dt (doublet, doublet de doublets, doublet de triplets), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), c (complexe), lr (large).

### Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est un outil d'analyse structurale qui associé avec la RMN permet la détermination de la structure des molécules par l'étude des fragments issus d'impacts électroniques sur le produit analysé. La mesure de la masse exacte permet la vérification de la formule brute du composé.

Les spectres de masse (MS) et les masses haute résolution (HRMS) ont été mesurés sur un spectromètre Finnigan MAT 95 XL selon les techniques suivantes :

- Impact électronique (EI), 70 eV,
- Ionisation chimique (CI), isobutane (gaz réactant),
- LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry).

Les spectres électrospray (ESI) ont été enregistrés sur un spectromètre Finnigan LCQ Advantage avec comme solvant d'infusion un mélange : MeOH/eau/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/HCOOH.

## Spectres infra-rouge

Les spectres IR sont enregistrés en solution dans le tétrachlorure de carbone dans une cellule de chlorure de sodium sur un Bruker Vector 22 à transformée de Fourier.

## Spectres ultra-violet

Les spectres UV sont enregistrés sur un spectromètre Safas Monaco UV mc<sup>2</sup> ou sur un spectromètre Beckman-Coulter DU 800.

## Chromatographie liquide haute performance

Les analyses ou les séparations préparatives sont faites sur une CLHP Waters (pompe 600E ; détecteur UV à barrette de diode 996) piloté par un PC.

### Analytique :

Pré-colonne :  $\mu$ Bondapak C18 Guard-Pak.

Colonne : Hypersil 56105-060 ; 250x4,6 mm 5 $\mu$ m Kromasil C18.

Boucle : 20  $\mu$ L.

Débit : 1 mL/mn.

### Préparatif :

Pack à compression radial : PrepLC 25 mm Module.

Pré-colonne : Waters, Guard-Pak Cartridge 25x10 mm,  $\mu$ Bondapak C18 10  $\mu$ m 125 Å.

Colonne : Waters, PrepPak Cartridge 25x100 mm,  $\mu$ Bondapak C18 10  $\mu$ m 125 Å.

Boucle : 2000  $\mu$ L.

Débit : 8 mL/mn.

## Partie expérimentale

	Produit	Temps de rétention (mn)	Méthode
1 <sup>e</sup> immuno	acide du <i>trans</i> -triène	10	MeOH/AcOH 100:0,5‰
	acide du triène	9,5	MeOH/AcOH 100:0,5‰
	acide de l'iso-triène	11,5	MeOH/AcOH 100:0,5‰
	20-COOH vitamine	9	MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰
	20-COOH iso-vitamine	19,5	MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰
2 <sup>e</sup> immuno	22-CMO du <i>trans</i> -triène	9,5	MeOH/AcOH 100:0,5‰
	22-CMO du triène	9	MeOH/AcOH 100:0,5‰
	22-CMO de l'iso-triène	10,5	
	22(E)-CMO vitamine D	11	MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰
	22(Z)-CMO vitamine D	12	MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰
	22(E)-CMO iso-vitamine D	22	MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰
22(Z)-CMO iso-vitamine D	23,5	MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰	
3 <sup>e</sup> immuno	22-cyano triène	10,5	MeOH 100%
	23-CHO triène	12	MeOH 100%
	22-COOH triène	11	MeOH/AcOH 100:0,5‰
	22-COOH vitamine D	10	MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰
4 <sup>e</sup> immuno	23(E)-CMO triène	10,5	MeOH/AcOH 100:0,5‰
	23(Z)-CMO triène	11	MeOH/AcOH 100:0,5‰
	23(E)-CMO vitamine D	15,5	MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰
	23(Z)-CMO vitamine D	16,5	MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰
5 <sup>e</sup>	22-(S-Bz-COOH) triène	22	MeOH/AcOH 100:0,5‰
	22-(S-Bz-COOH) vitamine D	10,5	MeOH/eau/AcOH 90:10:0,5‰
traceurs	20-CO-histamine du <i>trans</i> -triène	8	MeOH 100%
	20-CO-histamine du triène	6,5	MeOH 100%
	20-CO-histamine vitamine D	10,7	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 70:30:0,1‰
	20-CO-(5-iodohistamine) vitamine D	14,5	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 70:30:0,1‰
	22-CMO-histamine vitamine D	12,5	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 75:25:0,1‰
	22-CMO-(5-iodohistamine) vitamine D	15	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 75:25:0,1‰
	22-CO-histamine vitamine D	16	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 70:30:0,1‰
		8,5	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 75:25:0,1‰
	23-CMO-histamine vitamine D	15,3	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 75:25:0,1‰
	22-(S-Bz-CO-histamine) vitamine D	7,5	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 90:10:0,1‰
	22-NH-[3-(1H-imidazol-4-yl)-propionamide] vitamine D	9	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 80:20:0,1‰
		11,3	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 75:25:0,1‰
	20-CO-PEO biotine vitamine D	11,2	MeOH/eau 70:30
	22-CMO-PEO biotine vitamine D	26	MeOH/eau/ 70:30
	trans-trièno	11,5	MeOH 100%
trièno	10,5	MeOH 100%	
22-OH vitamine D	5,75	MeOH/eau 90:10	
22-Op Ts du trièno	13,5	MeOH 100%	
22-Op Ts vitamine D	9,5	MeOH/eau 90:10	
22-iodo vitamine D	15	MeOH/eau 95:5	
20-CO-éthylènediamine-BOC vitamine D	10,3	MeOH/eau 80:20	
20-CO-éthylènediamine vitamine D	7,5	MeOH/eau/Et <sub>3</sub> N 80:20:0,1‰	
22-amino triène	32,8	MeOH/Et <sub>3</sub> N 100:0,1‰	
22-azido vitamine D	19	MeOH/eau 90:10	

Tableau 12 : Méthodes de séparation CLHP pour les dérivés absorbants dans l'UV

## Protocole de fusion

Rate	Myélome
3 boîtes de Pétri : 7 mL de RPMI 3% SVF (ou DMEM) par boîte Dilacérer la rate, placer en tube Laisser décanter 5 mn, éliminer les blocs	Prendre la quantité nécessaire de myélome
Centrifuger 7 mn à 1000 rpm	
Éliminer le surnageant, tapoter le culot Resuspendre le culot dans 20 mL de RPMI sans SVF (ou DMEM) (rate souris) Rate de rat : lyse des globules rouges dans 7 mL de Tris NH <sub>4</sub> Cl 4 mn à 37°C en bain marie, puis compléter à 20 mL de RPMI sans SVF (ou DMEM)	Éliminer le surnageant, tapoter le culot Resuspendre le culot dans 20 mL de RPMI sans SVF (ou DMEM)
Centrifuger 7 mn à 1000 rpm	
Éliminer le surnageant Resuspendre le culot dans 10 mL de RPMI sans SVF (ou DMEM) Filtrer sur tamis pour éliminer les débris cellulaires Sur un aliquot dilué au 1/10, compter les cellules, puis compléter à 20 mL	Éliminer le surnageant Resuspendre le culot dans 10 mL de RPMI sans SVF (ou DMEM) Sur un aliquot dilué au 1/10, compter les cellules, puis compléter à 20 mL
Centrifuger 7 mn à 1000 rpm	
Resuspendre le culot dans 10 mL de RPMI sans SVF (ou DMEM)	Resuspendre le culot dans 10 mL de RPMI sans SVF (ou DMEM)
Prendre un ratio rate/myélome de 4:1 Mélanger à la pipette Compléter à 25 mL de RPMI sans SVF (ou DMEM)	
Centrifuger 7 mn à 1250 rpm	
Éliminer le surnageant, tapoter très délicatement le culot Ajouter progressivement 700 µL de PEG 1500 (50% m/v ds PBS) en 1 mn à 37°C (bain marie) en "triturer" le culot Laisser tube ouvert à 37°C Ajouter 5 mL RPMI sans SVF (ou DMEM) en 3 mn à 37°C Ajouter 2x7 mL RPMI sans SVF (ou DMEM) en 2 mn à 37°C	
Centrifuger 10 mn à 1250 rpm	
Éliminer le surnageant Resuspendre le culot après l'avoir décollé au préalable à raison de 10 <sup>6</sup> cellules de rate/mL dans du RPMI 20% SVF - HAT (ou DMEM - HAT) Distribuer 100 µL/puits dans les plaques 96 puits contenant les macrophages Compléter les puits par du RPMI 20% SVF - HAT (ou DMEM - HAT)	

### Figure 93 : Protocole de fusion

#### Milieu de base RPMI 1640 :

- Glutamine
- Acides aminés non-essentiels
- Pyruvate de sodium
- (Pénicilline – streptomycine)

Dérivés du milieu RPMI utilisés au cours de la fusion :

- RPMI sans SVF (100-150 mL)
- RPMI – 3% SVF (50 mL)
- RPMI – HAT – 20% SVF (250 mL)

**Protocole de criblage en RIA**

« Coating » :

- + 100 µL/puits Anticorps chèvre anti-rat dilué à 5 µg/mL
- Incubation à Ta une nuit ; Puits aspirés et lavés

Criblage :

- + 100 µL surnageant culture
- Incubation 2 h à 25°C, agitation ; Puits aspirés
- Lavage à l'eau 2x
- + 200 µL traceur à 60000 cpm
- Incubation 1 h à 25°C, agitation ; Puits aspirés
- Lavage à l'eau 3x
- Comptage de la radioactivité liée

**Modes opératoires**

Vitamine D <sub>2</sub> <b>1</b> : .....	158
Vitamine D <sub>2</sub> protégée 6(S) <b>2a</b> et 6(R) <b>2b</b> (adduits-SO <sub>2</sub> ) : .....	159
20-CHO adduits-SO <sub>2</sub> <b>3a</b> et <b>3b</b> : .....	160
22-OH adduits-SO <sub>2</sub> <b>4a</b> et <b>4b</b> : .....	161
20-COOMe adduit-SO <sub>2</sub> 6(S) <b>5a</b> : .....	162
22-OpTs adduits-SO <sub>2</sub> <b>6a</b> et <b>6b</b> : .....	162
20-COOH adduits-SO <sub>2</sub> 6(S) <b>13a</b> et <b>13b</b> : .....	163
20-COOH trans-triène <b>14</b> : .....	164
20-COOH triène <b>19</b> : .....	164
20-COOH vitamine D <b>20</b> : .....	165
20-CO-NHS vitamine D <b>21</b> : .....	166
1 <sup>er</sup> Immunogène : conjugué 20-CO-BSA vitamine D - BSA <b>22</b> : .....	166
22-CMO adduits-SO <sub>2</sub> <b>23a</b> et <b>23b</b> : .....	167
22-CMO trans-triène <b>24</b> : .....	168
22-CMO triène <b>26</b> : .....	168
22-CMO vitamine D <b>27</b> : .....	169
22-CMO-NHS vitamine D <b>28</b> : .....	169
2 <sup>ème</sup> Immunogène : conjugué 22-CMO-BSA vitamine D - BSA <b>29</b> : .....	170
trans-Triènole <b>30</b> (22-OH triène): .....	170
Triènole <b>31</b> : .....	171
22-OH vitamine D : .....	172
22-OpTs triène <b>32</b> : .....	172
22-OpTs vitamine D <b>53</b> : .....	173
22-Iodo vitamine D <b>54</b> : .....	174
22-Cyano triène <b>33</b> : .....	174
22-CHO triène <b>34</b> : .....	175
22-COOH triène <b>35</b> : .....	176
22-COOH vitamine D <b>36</b> : .....	176
22-CO-NHS vitamine D <b>42</b> : .....	177
3 <sup>ème</sup> Immunogène : conjugué 22-CO-BSA vitamine D - BSA <b>43</b> : .....	177
23-CMO triène <b>37</b> : .....	178
23-CMO vitamine D <b>38</b> : .....	178
23-CMO-NHS vitamine D <b>44</b> : .....	179
4 <sup>ème</sup> Immunogène : conjugué 23-CMO-BSA vitamine D - BSA <b>45</b> : .....	179
22-(S-Bz-COOH) triène <b>39</b> : .....	180
22-(S-Bz-COOH) vitamine D <b>40</b> : .....	181
22-(S-Bz-CO-NHS) vitamine D <b>46</b> : .....	181
5 <sup>ème</sup> immunogène : conjugué 22-(S-Bz-CO-BSA) vitamine D - BSA <b>47</b> : .....	182
Triènole <b>48</b> (20-CHO triène) : .....	182
20-CO-histamine triène <b>57</b> : .....	183
20-CO-histamine vitamine D <b>58</b> : .....	183
20-CO-(5-iodohistamine) vitamine D <b>59</b> : .....	184
22-CMO-histamine vitamine D <b>64</b> : .....	185
22-CMO-(5-iodohistamine) vitamine D <b>65</b> : .....	185

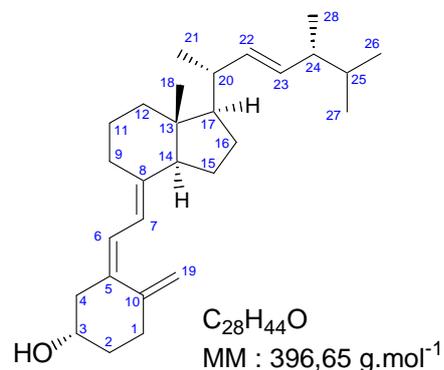
22-CO-histamine vitamine D <b>66</b> :.....	186
23-CMO-histamine vitamine D <b>68</b> :.....	186
22-(S-Bz-CO-histamine) vitamine D <b>70</b> :.....	187
Acide 3-(1H-imidazol-4-yl)-propionique <b>73</b> :.....	188
N-hydroxysuccinimide 3-(1H-imidazol-4-yl)-propionate <b>74</b> :.....	188
22-NH-[3-(1H-Imidazol-4-yl)-propionate] vitamine D <b>75</b> :.....	189
20-CO-NH-PEO-biotine vitamine D <b>77</b> :.....	189
22-CMO-NH-PEO-biotine vitamine D <b>78</b> :.....	190
20-CO-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NHBOC vitamine D <b>79</b> :.....	191
20-CO-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> vitamine D <b>80</b> :.....	191
22-azido triène <b>81</b> :.....	192
22-azido vitamine D <b>82</b> :.....	193
22-amino triène <b>83</b> :.....	193
22-amino vitamine D <b>84</b> :.....	194
23-amino triène <b>86</b> :.....	195
Conditions générales de marquage à l'iode(125) .....	195
Purification d'anticorps sur colonne de Protéine A.....	195

### Vitamine D<sub>2</sub> **1** :<sup>118</sup>

#### 3β-hydroxy-9,10-secoergosta-5,7(E),10(19),22(E)-tétraène

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 6,23 (1H, d, J= 11,4 Hz, 6-CH) ; 6,04 (1H, d, J= 11,4 Hz, 7-CH) ; 5,20 (2H, m, 22,23-CH) ; 5,05 (1H, d, J= 2,3 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 4,82 (1H, t, J= 2,3 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 3,95 (1H, m, J= 7,5 ; 3,8 Hz, 3α-CHOH) ; 2,83 (1H, dd, J= 11,8 ; 3,7 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,58 (1H, dd, J= 13,0 ; 3,8 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,42 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,30 (1H, dd, J= 13,0 ; 7,5 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,18 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 2,01 (1H, c, 20-CH) ; 1,99 (1H, c, 14-CH) ; 1,97 (1H, c, 12β-CH<sub>2</sub>) ; 1,94 (1H, c, 2α-CH<sub>2</sub>) ; 1,86 (1H, c, 24-CH) ; 1,73 (1H, c, 16α-CH<sub>2</sub>) ; 1,69 (1H, c, 2β-CH<sub>2</sub>) ; 1,69 (1H, c, 9α-CH<sub>2</sub>) ; 1,67 (1H, c, 11α-CH<sub>2</sub>) ; 1,54 (1H, c, 11β-CH<sub>2</sub>) ; 1,54 (1H, c, 15β-CH<sub>2</sub>) ; 1,48 (1H, c, 25-CH) ; 1,44 (1H, c, 15α-CH<sub>2</sub>) ; 1,33 (1H, c, 12α-CH<sub>2</sub>) ; 1,33 (1H, c, 17-CH) ; 1,29 (1H, c, 16β-CH<sub>2</sub>) ; 1,02 (3H, d, J= 6,6 Hz, 28-CH<sub>3</sub>) ; 0,92 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,84 (3H, d, J= 4,7 Hz, 27-CH<sub>3</sub>)a ; 0,82 (3H, d, J= 4,7 Hz, 26-CH<sub>3</sub>)a ; 0,56 (3H, c, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 145,7 (C-10) ; 142,9 (C-8) ; 136,3 (C-22) ; 135,7 (C-5) ; 132,6 (C-23) ; 123,1 (C-6) ; 118,1 (C-7) ; 113,1 (C-19) ; 69,8 (C-3) ; 57,1 (C-17) ; 57,1 (C-14) ; 46,6 (C-4) ; 46,4 (C-13) ; 43,5 (C-24) ; 41,0 (C-12) ; 41,0 (C-20) ; 35,8 (C-2) ; 34,7 (C-25) ; 32,6 (C-1) ; 29,7 (C-9) ; 28,4 (C-16) ; 24,2 (C-11) ; 22,9 (C-15) ; 21,8 (C-28) ; 20,6 (C-27) ; 20,3 (C-26) ; 18,2 (C-21) ; 12,9 (C-18)

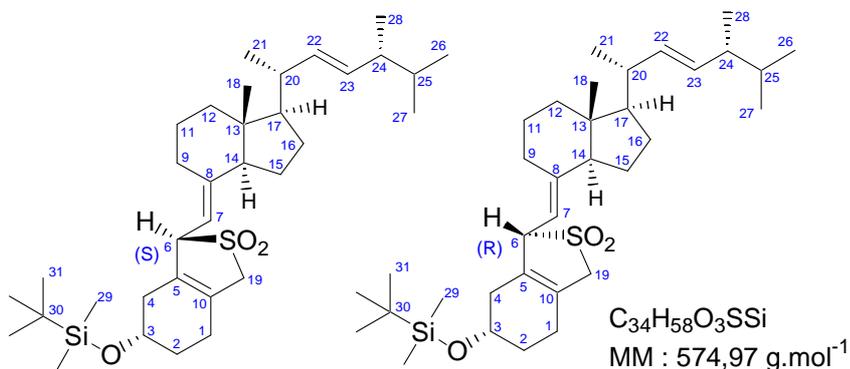


<sup>118</sup> D'après : Mizhiritskii, M. D.; Konstantinovskii, L. E.; Vishkautsan, R. *Tetrahedron* **1996**, 52, 1239-1252.

Vitamine D<sub>2</sub> protégée 6(S) **2a** et 6(R) **2b** (adduits-SO<sub>2</sub>) :

Adduits-SO<sub>2</sub> 6(S) et 6(R) du 3β-[(*t*-butyldiméthylsilyloxy)-9,10-secoergosta-5,7(E),10(19),22(E)-tétraène

L'ergocalciférol **1** (12,5 g ; 31,5 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 63 mL (c=0,5 M) de dichlorométhane anhydre sous agitation à température ambiante puis refroidi à -78°C. Un large excès d'anhydride sulfureux liquide est ajouté sous agitation, le milieu réactionnel passe alors de jaune pâle à orange et la température est laissée remonter jusqu'à ébullition de l'anhydride sulfureux (-10°C) pendant



1,25 h (suivi CCM éther de pétrole-AcOEt 7:3). L'ensemble est ensuite réchauffé à température ambiante et dégazé à l'azote. L'imidazole (5,1 g ; 75,6 mmol ; 2,4 éq.) est ajouté à température ambiante, suivi du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (5,7 g ; 37,8 mmol ; 1,2 éq.) à 0°C, dissous dans (32 mL ; c=1 M) de dichlorométhane anhydre. Après 2 h de réaction, (1,9 g ; 12,6 mmol ; 0,4 éq.) de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle sont rajoutés puis le milieu réactionnel est traité 1 h après par l'ajout d'une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium et d'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est séparée et lavée deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, lavées deux fois par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (saumure), séchées sur sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>), partiellement évaporées sous vide, filtrées sur silice et évaporées sous vide à 30°C jusqu'à obtenir un solide jaunâtre contenant encore de l'imidazole. Ce solide est purifié sur colonne de silice 35-70 μm, éluée par un mélange éther de pétrole-AcOEt 9:1 pour collecter trois fractions par polarités croissantes : 4,101 g de **2a** ; 10,687 g d'un mélange de **2a** et **2b** ; 2,552 g de **2b** soit 17,34 g ; (Rdt : 96%), tous des solides blancs.

CCM (Ether de pétrole/AcOEt 80/20) isomère 6(S) : Rf = 0,37

CCM (Ether de pétrole/AcOEt 80/20) isomère 6(R) : Rf = 0,27

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(S) : δ = 5,20 (1H, c, 23-CH) ; 5,19 (1H, c, 22-CH) ; 4,69 (1H, d, J= 8,8 Hz, 7-CH) ; 4,52 (1H, d, J= 9,1 Hz, 6-CH) ; 4,02 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,65 (2H, m, 19-CH<sub>2</sub>) ; 2,61 (1H, c, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,22 (1H, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 2,10 (1H, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,10 (1H, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,05 (1H, m, 20-CH) ; 2,02 (1H, 14-CH) ; 1,99 (1H, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 1,96 (1H, 12β-CH<sub>2</sub>) ; 1,85 (1H, 24-CH) ; 1,83 (1H, 2β-CH<sub>2</sub>) ; 1,73 (1H, 11α-CH<sub>2</sub>) ; 1,72 (1H, 9α-CH<sub>2</sub>) ; 1,72 (1H, 16α-CH<sub>2</sub>) ; 1,71 (1H, 2α-CH<sub>2</sub>) ; 1,68 (1H, 11β-CH<sub>2</sub>) ; 1,52 (1H, 15α-CH<sub>2</sub>) ; 1,48 (1H, 25-CH) ; 1,42 (1H, 15β-CH<sub>2</sub>) ; 1,35 (1H, 17-CH) ; 1,32 (1H, 12α-CH<sub>2</sub>) ; 1,30 (1H, 16β-CH<sub>2</sub>) ; 1,02 (3H, d, J= 6,9 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,92 (3H, d, J= 6,6 Hz, 28-CH<sub>3</sub>) ; 0,88 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,83 (2x3H, t, J= 7,3 Hz, 26,27-CH<sub>3</sub>) ; 0,66 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,05 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(S) : δ = 150,6 (C-8) ; 135,6 (C-23) ; 132,1 (C-22) ; 130,8 (C-5) ; 126,4 (C-10) ; 110,2 (C-7) ; 67,7 (C-6) ; 66,6 (C-3) ; 58,1 (C-19) ; 56,5 (C-14) ; 56,4 (C-17) ; 46,1 (C-13) ; 42,9 (C-24) ; 40,3 (C-20) ; 40,3 (C-12) ; 34,3 (C-4) ; 33,1 (C-25) ; 30,7 (C-2) ; 29,9 (C-9) ; 27,7 (C-16) ; 25,8 (C-31) ; 24,3 (C-1) ; 24,0 (C-11) ; 22,1 (C-15) ; 21,1 (C-21) ; 20,0 (C-27) ; 19,7 (C-26) ; 18,1 (C-30) ; 17,7 (C-28) ; 12,0 (C-18) ; -4,7 (C-29)

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(R) : δ = 5,20 (1H, c, 23-CH) ; 5,20 (1H, c, 22-CH) ; 4,77 (1H, d, J= 10,1 Hz, 7-CH) ; 4,63 (1H, d, J= 10,1 Hz, 6-CH) ; 3,97 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,66 (2H, m, 19-CH<sub>2</sub>) ; 2,58 (1H, d, J= 13,9 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,22 (1H, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 2,10 (1H, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 1,03 (3H, d, J= 6,6

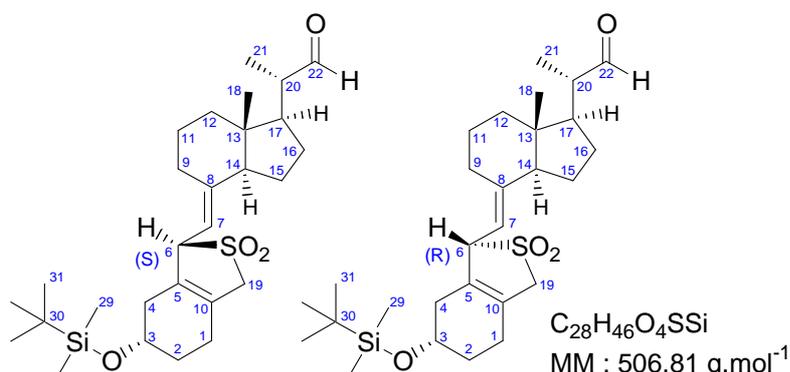
Hz, 28-CH<sub>3</sub>) ; 0,92 (3H, d, J= 6,9 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,88 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,83 (2x3H, t, J= 7,3 Hz, 26,27-CH<sub>3</sub>) ; 0,58 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,06 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(R) : δ = 150,0 (C-8) ; 135,4 (C-23) ; 132,2 (C-22) ; 130,5 (C-5) ; 126,7 (C-10) ; 109,6 (C-7) ; 66,9 (C-6) ; 66,9 (C-3) ; 58,2 (C-19) ; 56,3 (C-14) ; 56,2 (C-17) ; 45,5 (C-13) ; 42,9 (C-24) ; 40,3 (C-20) ; 40,0 (C-12) ; 34,1 (C-4) ; 33,1 (C-25) ; 31,0 (C-2) ; 29,4 (C-9) ; 27,6 (C-16) ; 25,8 (C-31) ; 24,7 (C-1) ; 23,6 (C-11) ; 22,1 (C-15) ; 21,2 (C-21) ; 20,0 (C-27) ; 19,7 (C-26) ; 18,2 (C-30) ; 17,7 (C-28) ; 12,3 (C-18) ; -4,7 (C-29)

20-CHO adduits-SO<sub>2</sub> **3a** et **3b** :

Adduits-SO<sub>2</sub> 6(S) et 6(R) du 3β-[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5,7(E),10(19)-trièn-22-al

L'aldéhyde de l'adduit-SO<sub>2</sub> 6(R) **3b** est obtenu par ozonolyse de l'adduit-SO<sub>2</sub> 6(R) **2b** par la même méthode que les 22-OH adduits-SO<sub>2</sub> **4a** et **4b**, mais sans ajout de borohydrure de sodium. 4.14 g d'adduits-SO<sub>2</sub> (7,2 mmol ; 1 éq.) fournissent ainsi 3,307 g d'aldéhyde de l'adduits-SO<sub>2</sub> 6(R) **3b** (91%) sous forme de solide blanc.



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 80/20) isomère 6(S) : R<sub>f</sub> = 0,40

**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 80/20) isomère 6(R) : R<sub>f</sub> = 0,30

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(S) **3a** : δ = 9,60 (1H, d, J= 3,2Hz, 20-CHO) ; 4,72 (1H, d, J= 9,5 Hz, 7-CH) ; 4,52 (1H, d, J= 9,5 Hz, 6-CH) ; 4,02 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,66 (2H, m, 19-CH<sub>2</sub>) ; 2,64 (1H, m, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, m, J= 6,9 ; 3,2 Hz, 20-CH) ; 2,22 (1H, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 1,14 (3H, d, J= 6,9 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,88 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,71 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,06 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(S) **3a** : δ = 204,9 (C-22) ; 149,8 (C-8) ; 130,6 (C-5) ; 126,6 (C-10) ; 110,9 (C-7) ; 67,6 (C-6) ; 66,5 (C-3) ; 58,1 (C-19) ; 55,5 (C-14) ; 51,4 (C-17) ; 49,7 (C-20) ; 46,6 (C-13) ; 40,1 (C-12) ; 34,3 (C-4) ; 30,7 (C-2) ; 29,8 (C-9) ; 26,6 (C-16) ; 25,8 (C-31) ; 24,3 (C-1) ; 23,8 (C-11) ; 22,5 (C-15) ; 18,1 (C-30) ; 13,5 (C-21) ; 12,2 (C-18) ; -4,7 (C-29)

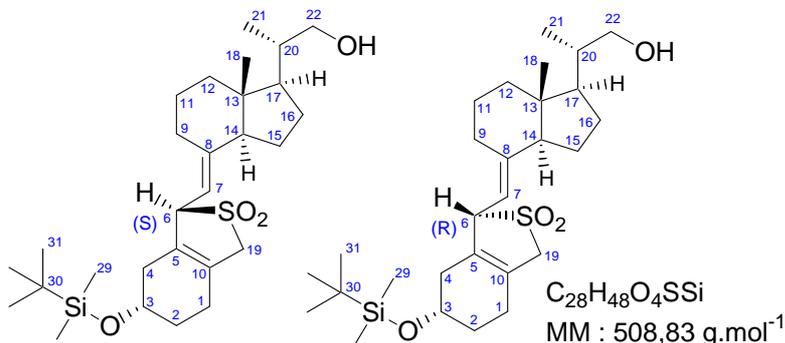
**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(R) **3b** : δ = 9,58 (1H, d, J= 3,3 Hz, 20-CHO) ; 4,81 (1H, d, J= 10,2 Hz, 7-CH) ; 4,62 (1H, d, J= 10,2 Hz, 6-CH) ; 3,96 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,66 (1H, c, 19-CH<sub>2</sub>) ; 2,61 (1H, dd, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,37 (1H, c, J= 7,0 ; 3,3 Hz, 20-CH) ; 1,15 (3H, d, J= 7,0 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,88 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,62 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,06 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(R) **3b** : δ = 204,6 (C-22) ; 149,1 (C-8) ; 130,3 (C-5) ; 126,9 (C-10) ; 110,4 (C-7) ; 66,8 (C-3) ; 66,8 (C-6) ; 58,2 (C-19) ; 55,3 (C-14) ; 51,2 (C-17) ; 49,6 (C-20) ; 45,9 (C-13) ; 39,8 (C-12) ; 34,1 (C-4) ; 31,0 (C-2) ; 29,3 (C-9) ; 26,4 (C-16) ; 25,8 (C-31) ; 24,7 (C-1) ; 23,4 (C-11) ; 22,5 (C-15) ; 18,2 (C-30) ; 13,6 (C-21) ; 12,5 (C-18) ; -4,7 (C-29)

**22-OH adduits-SO<sub>2</sub> 4a et 4b :**

Adduits-SO<sub>2</sub> 6(S) et 6(R) du 3β-[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5,7(E),10(19)-trièn-22-ol

Le mélange des deux isomères protégés de la vitamine D<sub>2</sub>, **2a** et **2b** (5,633 g ; 9,8 mmol ; 1 éq.), est placé dans un tricol de 500 mL, puis dissous dans le dichlorométhane anhydre (330 mL ; 0,03 M). Une solution contenant suffisamment de Reactive Blue 2 dans le méthanol (20 mL ; 0,5 M) pour colorer le milieu réactionnel est ajoutée puis l'ensemble est placé à -78°C sous



agitation. Un flux d'air contenant l'ozone produit par un générateur d'ozone Trailigaz<sup>®</sup> LabO<sup>3</sup> 70 est passé dans le milieu réactionnel jusqu'au virage de l'indicateur coloré du bleu au jaune. Une solution de triphénylphosphine (2,7 g ; 10,3 mmol ; 1,05éq.) dans le dichlorométhane (20 mL ; 0,5 M) est alors ajoutée à -78°C, puis la température est laissée remonter à 0°C. Après 1 h de réaction, le borohydrure de sodium (1,482 g ; 39,2 mmol ; 4éq.) est ajouté à 0°C et laissé réagir 2 h à 0°C. De l'eau est alors ajoutée au milieu réactionnel suivie une solution d'HCl 1 N goutte à goutte jusqu'à ce que le pH reste acide. La phase organique est séparée et la phase aqueuse est extraite trois fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont regroupées, extraites à l'eau acidifiée par HCl, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous vide en présence de silice. Le solide est alors déposé sur une courte colonne de silice et élué par de l'éther de pétrole pour éliminer l'alcool résiduel résultant de l'ozonolyse (2,3-diméthylbutan-1-ol P<sub>éb.</sub> 141°C) puis par un mélange MTBE-cyclohexane (50/50) pour décrocher le produit. L'éluat est évaporé sous vide pour obtenir les deux alcools des adduit-SO<sub>2</sub> **4a** et **4b** précipités (5,193 g ; Rdt : >100% à cause des restes de la chaîne latérale) sous forme d'un solide blanc.

**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 70/30) isomère 6(S) : R<sub>f</sub> = 0,33

**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 70/30) isomère 6(R) : R<sub>f</sub> = 0,20

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(S) **4a** : δ = 4,70 (1H, d, J= 9,5 Hz, 7-CH) ; 4,52 (1H, d, J= 9,5 Hz, 6-CH) ; 4,01 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,66 (2H, c, 19-CH<sub>2</sub>) ; 3,64 (1H, c, 20-CH<sub>2</sub>OH) ; 3,40 (1H, dd, J= 10,7 ; 6,9 Hz, 20-CH<sub>2</sub>OH) ; 2,61 (1H, c, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,22 (1H, c, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,12 (1H, c, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,02 (1H, c, 12β-CH<sub>2</sub>) ; 2,00 (1H, c, 14-CH) ; 1,97 (1H, c, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 1,89 (1H, c, 16α-CH<sub>2</sub>) ; 1,82 (1H, c, 2α-CH<sub>2</sub>) ; 1,73 (1H, c, 9α-CH<sub>2</sub>) ; 1,73 (1H, c, 11α-CH<sub>2</sub>) ; 1,71 (1H, c, 2β-CH<sub>2</sub>) ; 1,68 (1H, c, 11β-CH<sub>2</sub>) ; 1,57 (1H, c, 15α-CH<sub>2</sub>) ; 1,57 (1H, m, 20-CH) ; 1,49 (1H, c, 15β-CH<sub>2</sub>) ; 1,40 (1H, c, 17-CH) ; 1,36 (1H, c, 16β-CH<sub>2</sub>) ; 1,34 (1H, c, 12α-CH<sub>2</sub>) ; 1,08 (1H, c, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 1,06 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,87 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,68 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(S) **4a** : δ = 150,4 (C-8) ; 130,7 (C-5) ; 126,4 (C-10) ; 110,4 (C-7) ; 67,9 (C-22) ; 67,6 (C-6) ; 66,6 (C-3) ; 58,1 (C-19) ; 56,0 (C-14) ; 52,8 (C-17) ; 46,3 (C-13) ; 40,2 (C-12) ; 38,9 (C-20) ; 34,3 (C-4) ; 30,7 (C-2) ; 29,9 (C-9) ; 27,1 (C-16) ; 25,8 (C-31) ; 24,3 (C-1) ; 23,9 (C-11) ; 22,1 (C-15) ; 18,1 (C-30) ; 16,9 (C-21) ; 11,9 (C-18) ; -4,7 (C-29)

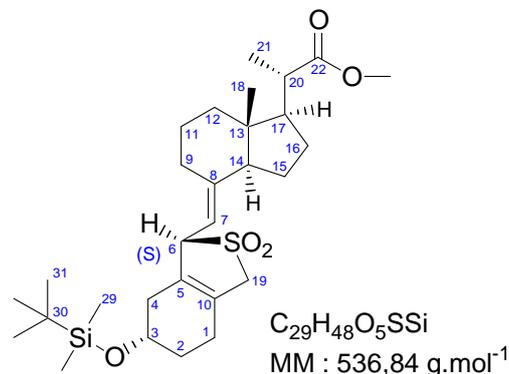
**20-COOMe adduit-SO<sub>2</sub> 6(S) 5a :**

Adduits-SO<sub>2</sub> 6(S) et 6(R) du 3β-[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5,7(E),10(19)-trièn-22-oate de méthyle

L'ester méthylique de l'adduits-SO<sub>2</sub> 6(S) **5a** est obtenu à partir de l'ozonolyse de l'adduits-SO<sub>2</sub> 6(S) dans les mêmes conditions opératoires que les 22-OH adduits-SO<sub>2</sub> **4a** et **4b**, mais en présence de soude méthanolique. 0,40 g d'adduit-SO<sub>2</sub> 6(S) **2a** (0,70 mmol ; 1 éq.) fournit ainsi après purification sur colonne de silice 0,208 g d'ester méthylique de l'adduit-SO<sub>2</sub> **5a** 6(S) (56%) sous forme de solide blanc.

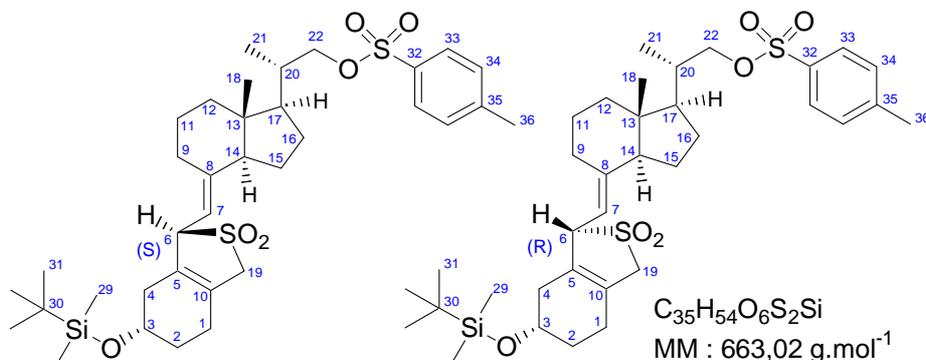
**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 4,72 (1H, d, J= 9,5 Hz, 7-CH) ; 4,53 (1H, d, J= 9,5 Hz, 6-CH) ; 4,03 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,67 (2H, c, 19-CH<sub>2</sub>) ; 3,67 (3H, s, 32-CH<sub>3</sub>) ; 2,64 (1H, m, J= 9,8 ; 4,1 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,47 (1H, qd, J= 6,9 ; 2,8 Hz, 20-CH) ; 1,60 (1H, dq, J= 12,0 ; 6,0 Hz) ; 1,43 (1H, td, J= 12,9 ; 3,8 Hz) ; 1,22 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,89 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,69 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 177,7 (C-22) ; 150,4 (C-8) ; 131,1 (C-5) ; 126,9 (C-10) ; 111,1 (C-7) ; 68,0 (C-6) ; 66,9 (C-3) ; 58,5 (C-19) ; 56,2 (C-14) ; 53,7 (C-17) ; 51,8 (C-32) ; 46,5 (C-13) ; 43,1 (C-20) ; 40,5 (C-12) ; 34,7 (C-4) ; 31,1 (C-2) ; 30,2 (C-9) ; 27,0 (C-16) ; 26,2 (C-31) ; 24,7 (C-1) ; 24,2 (C-11) ; 22,5 (C-15) ; 18,5 (C-30) ; 17,7 (C-21) ; 12,3 (C-18) ; -4,3 (C-29)

**22-OpTs adduits-SO<sub>2</sub> 6a et 6b :**

Adduits-SO<sub>2</sub> 6(S) et 6(R) du 3β-[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-22-*p*-tolylsulfonate-23,24-dinor-9,10-secochola-5,7(E),10(19)-triène

L'alcool des adduits-SO<sub>2</sub> **4a** et **4b** (0,2 g ; 0,39 mmol ; 1 éq.) est dissous dans la pyridine conditionnée sur tamis moléculaire (390 μL ; 1 M) puis le chlorure de tosyloxy (0,090 g ; 0,47 mmol ; 1,2 éq.) est ajouté à 0°C puis laissé réagir à température ambiante. Après 5 h de réaction, le chlorure de tosyloxy (0,090 g ; 0,47 mmol ; 1,2 éq.) est à nouveau ajouté. Après 2 h de réaction, une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium et de l'acétate d'éthyle sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées sur silice et évaporées sous vide (ajout d'heptane pour former l'azéotrope pyridine-heptane) jusqu'à obtenir le tosylate des adduits-SO<sub>2</sub> **6a** et **6b** (0,223 g ; Rdt : 85%) sous forme d'un solide rosé.

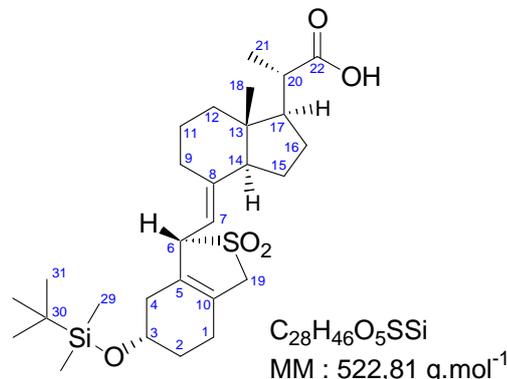


**20-COOH adduits-SO<sub>2</sub> 6(S) 13a et 13b :**

Adduits-SO<sub>2</sub> 6(S) et 6(R) de l'acide 3β-[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5,7(E),10(19)-trièn-22-oïque

**PDC :**

L'aldéhyde de adduit-SO<sub>2</sub> 6(S) **3a** (1,5 g ; 2,96 mmol ; 1 éq.) est dissous dans le DMF (15 mL ; c=0,2 M) stocké sur tamis moléculaire puis une solution orange de PDC (8,908 g ; 23,7 mmol ; 8 éq.) dans le DMF (15 mL ; c=0,2 M) est coulée lentement à 0°C sur la solution d'aldéhyde. Le milieu réactionnel fonce progressivement. Le suivi CCM montre la disparition de l'aldéhyde et l'apparition d'un produit polaire qui traîne sur la plaque avec (éther de pétrole-AcOEt 80:20), qui ne migre pas avec (éther de pétrole-AcOEt-Et<sub>3</sub>N 80:20:0,5) et qui migre avec (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 80:20:0,5). Après 22 h de réaction à 0°C, le milieu réactionnel est versé dans un mélange de MTBE et de saumure sous agitation vigoureuse puis acidifié par une solution de HCl 1 M. Une filtration sur célite permet d'éliminer la glue noire. La phase aqueuse est séparée, extraite deux fois par du MTBE. Cette phase organique est lavée à la saumure avant d'être regroupée aux autres. A nouveau, la phase organique est lavé à la saumure, la phase aqueuse contre-extraite par du MTBE qui est regroupé avec la phase organique. Enfin la phase organique est lavée deux fois à l'eau avec contre-extraction par du MTBE. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous vide à 30°C pour donner l'acide de l'adduit-SO<sub>2</sub> 6(S) **13a** (1,446 g ; Rdt : 93%) sous forme une meringue blanche quasi-pure.

**NaClO<sub>2</sub> :**

L'aldéhyde de l'adduit-SO<sub>2</sub> **3a** (0,136 g ; 0,27 mmol ; 1 éq.) est dissous dans le *tert*-butanol (1,3 mL ; c=0,2 M) puis le 2-méthyl-2-butène 90% technique (250 µL ; 2,68 mmol ; 10 éq.) est ajouté à température ambiante suivi d'une solution aqueuse 0,5 M de dihydrogénophosphate de sodium (1,3 mL ; c=0,2 M) dans laquelle a été dissous le chlorite de sodium (0,061 g ; 0,54 mmol ; 2 éq.). Le milieu biphasique est agité vigoureusement 30 mn à température ambiante. Du MTBE et de la saumure sont alors ajoutés, la phase aqueuse séparée est extraite par du MTBE. Les phases organiques regroupées sont lavées deux fois à la saumure, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous vide à 40°C pour donner l'acide de l'adduit-SO<sub>2</sub> **13a** (0,131 g ; Rdt : 94%) sous forme une meringue blanche quasi-pure.

**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 80/20/0,5) isomère 6(S) : Rf = 0,21

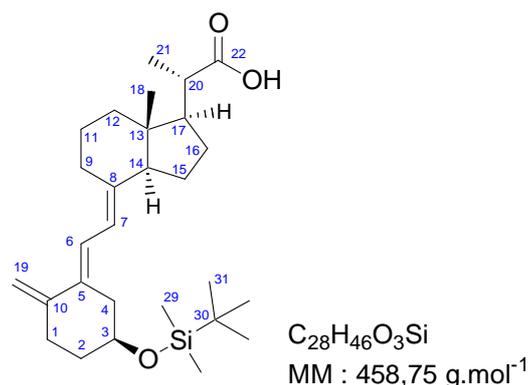
**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 80/20/0,5) isomère 6(R) : Rf = 0,14

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 4,71 (1H, d, J = 9,5 Hz, 7-CH) ; 4,52 (1H, d, J = 9,5 Hz, 6-CH) ; 4,01 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,66 (2H, c, 19-CH<sub>2</sub>) ; 2,62 (1H, m, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,44 (1H, m, J = 7,0 Hz, 20-CH) ; 1,26 (3H, d, J = 7,0 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,87 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,69 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,05 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 182,6 (C-22) ; 150,0 (C-8) ; 130,7 (C-5) ; 126,5 (C-10) ; 110,8 (C-7) ; 67,6 (C-6) ; 66,5 (C-3) ; 58,1 (C-19) ; 55,8 (C-14) ; 52,8 (C-17) ; 46,2 (C-13) ; 42,8 (C-20) ; 40,2 (C-12) ; 34,3 (C-4) ; 30,7 (C-2) ; 29,8 (C-9) ; 26,7 (C-16) ; 25,8 (C-31) ; 24,3 (C-1) ; 23,8 (C-11) ; 22,2 (C-15) ; 18,1 (C-30) ; 17,2 (C-21) ; 12,0 (C-18) ; -4,7 (C-29)

**20-COOH trans-triène 14 :****acide 3β-[(t-butyl diméthylsilyl)oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5(Z),7(E),10(19)-trièn-22-oïque**

L'acide de l'adduit-SO<sub>2</sub> **13a** ou **13b** (0,200 g ; 0,38 mmol ; 1 éq.) est dissous dans une suspension de bicarbonate de sodium dans l'éthanol à 96% (38 mL ; c=0,01 M), préalablement portée à reflux 20 mn sous agitation puis refroidie. Cette solution est agitée 10 mn à température ambiante puis chauffée à reflux pendant 30 mn. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi avant d'être tiré à sec puis repris un mélange de MTBE et de saumure. L'ensemble est acidifié par une solution aqueuse de dihydrogène phosphate de sodium concentré jusqu'à ce que le dégagement de CO<sub>2</sub> cesse, la phase aqueuse est séparée. La phase organique est alors lavée à la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée sur silice et évaporée sous vide à 30°C pour donner l'acide du *trans*-triène **14** (0,173 g ; Rdt : 99%) sous forme d'une meringue blanche pure en RMN.



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 80/20/0,5) : R<sub>f</sub> = 0,48

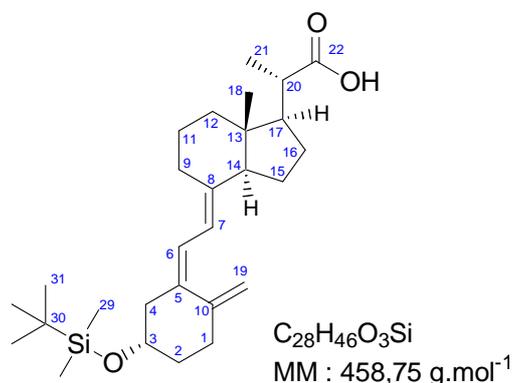
**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 6,47 (1H, d, J= 11,7 Hz, 6-CH) ; 5,86 (1H, d, J= 11,7 Hz, 7-CH) ; 4,93 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,65 (1H, s, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,86 (1H, m, J= 4,0 Hz, 3α-CHOH) ; 2,88 (1H, dd, J= 12,4 ; 4,0 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,64 (1H, dd, J= 14,6 ; 4,0 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,48 (1H, c, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,45 (1H, c, J= 7,0 ; 3,3 Hz, 20-CH) ; 2,27 (1H, dd, J= 14,6 ; 8,4 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,16 (1H, c, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 1,26 (3H, d, J= 7,0 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,88 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,59 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 182,2 (C-22) ; 150,0 (C-10) ; 142,8 (C-8) ; 136,7 (C-5) ; 119,9 (C-6) ; 116,5 (C-7) ; 107,6 (C-19) ; 69,4 (C-3) ; 56,1 (C-14) ; 52,9 (C-17) ; 45,8 (C-13) ; 42,8 (C-20) ; 40,4 (C-12) ; 37,5 (C-1) ; 35,2 (C-4) ; 31,2 (C-2) ; 28,9 (C-9) ; 26,7 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,4 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 18,2 (C-30) ; 17,2 (C-21) ; 12,3 (C-18) ; -4,7 (C-29)

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 10 mn (MeOH/AcOH 100:0,5%)

**20-COOH triène 19 :****acide 3β-[(t-butyl diméthylsilyl)oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-22-oïque**

L'acide du *trans*-triène **14** (104 mg ; 0,23 mmol ; 1 éq.) est dissous dans un mélange d'anthracène (0,017 g ; 0,094 mmol ; 0,4 éq.), de triéthylamine (65 μL ; 0,47 mmol ; 2 éq.) dans le toluène (4,7 mL ; c=0,05 M) et le méthanol (468 μL ; c=0,5 M) dans un tube Corex<sup>®</sup>, puis dégazé à l'argon 5 mn. La lampe à vapeur de mercure refroidie par la circulation d'un fluide réfrigérant dans sa double enveloppe est allumée environ 20 mn avant l'expérimentation. Lorsque la luminosité est stabilisée, le tube Corex<sup>®</sup> est placé à 5 cm de l'axe de la lampe pendant 2,5 h dans un bain à 5-7°C. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur silice, l'anthracène est élué par du toluène puis par de l'éther de pétrole. Le produit est décroché par une élution au MTBE contenant 1% d'acide acétique. La phase organique est lavée à la saumure acidifiée par une solution de HCl 1 M puis à la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous vide à 30°C pour donner une meringue blanche de l'acide du triène **19** (95 mg ; Rdt : 91%) mais contenant l'*iso*-triène et des traces de toluène et d'anthracène.



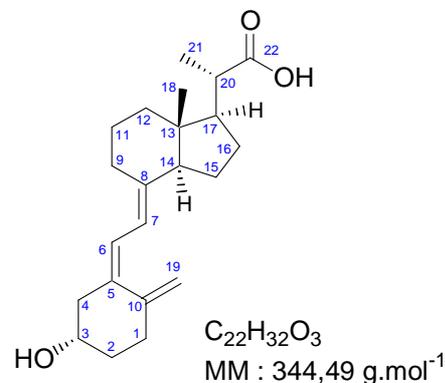
CCM (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 80/20/0,5) : Rf = 0,57

CLHP(C<sub>18</sub>) : Tr= 9,5 mn (MeOH/AcOH 100:0,5%)

20-COOH vitamine D 20 :

acide 3β-hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-22-oïque

L'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle **19** (0,193 g ; 0,42 mmol ; 1 éq.) est dissous dans le THF non-stabilisé (4,2 mL ; c=0,1 M) dans un tube en plastique, la solution 1 M de TBAF dans le THF (3 éq.) est alors ajoutée à 0°C sous agitation. Après 3 h de réaction à 0°C sous argon puis à température ambiante, l'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle est déprotégé. Le milieu réactionnel est dilué dans le MTBE et de la saumure acidifiée par une solution de HCl 1 M. La phase organique est lavée deux fois à la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée sur silice et évaporée sous vide à 30°C pour donner une meringue blanche d'alcool **20** qui par la suite est purifié par flash chromatographie (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 70:30:0,5) (0,136 g ; Rdt : 94% ; pur à 84%) puis les isomères du triène sont séparés par HPLC préparative sur une colonne C18 éluée par (MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5%)



CCM (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 70/30/0,5) : Rf = 0,31

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 6,22 (1H, d, J= 11,0 Hz, 6-CH) ; 6,03 (1H, d, J= 11,0 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,81 (1H, d, J= 2,6 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,95 (1H, m, J= 7,7 ; 3,7 Hz, 3α-CHOH) ; 2,84 (1H, dd, J= 11,7 ; 3,0 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,57 (1H, dd, J= 13,1 ; 3,7 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,42 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, c, J= 7,0 Hz, 20-CH) ; 2,29 (1H, dd, J= 13,1 ; 7,7 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 1,25 (3H, d, J= 7,0 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,57 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 182,3 (C-22) ; 145,0 (C-10) ; 141,3 (C-8) ; 135,6 (C-5) ; 122,2 (C-6) ; 117,9 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,3 (C-3) ; 55,9 (C-14) ; 52,9 (C-17) ; 45,9 (C-4) ; 45,8 (C-13) ; 42,8 (C-20) ; 40,4 (C-12) ; 35,1 (C-2) ; 32,0 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 26,7 (C-16) ; 23,4 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 17,2 (C-21) ; 12,2 (C-18)

MS (ESI<sup>+</sup>) : 345 [MH]<sup>+</sup>

HRMS (CI) : Calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub><sup>1+</sup> ..... 345,24297  
mesurée ..... 345,24326

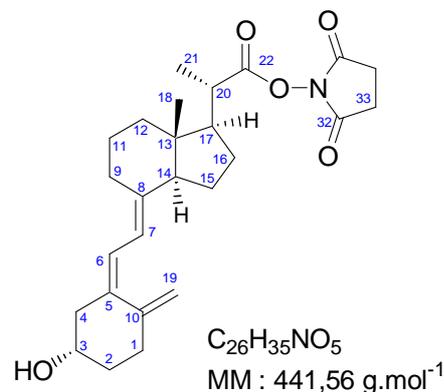
CLHP(C<sub>18</sub>) : Tr= 9 mn (MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5%)

UV : ε<sub>264,0 nm</sub> = 15150 ; ε<sub>278,0 nm</sub> = 11910

**20-CO-NHS vitamine D 21 :**

*Ester de N-hydroxysuccinimide de l'acide 3 $\beta$ -hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-22-oïque*

La 20-COOH vitamine D **20** (0,135 g ; 0,39 mmol ; 1 éq.) et le N-hydroxysuccinimide (0,054 g ; 0,47 mmol ; 1,2 éq.) sont séchés sous vide puis dissous dans le dichlorométhane anhydre à température ambiante. Le DCC en solution 1 M dans le dichlorométhane (0,470 mL ; 0,47 mmol ; 1,2 éq.) est ajouté à 0°C sous agitation. Après 2,75 heures de réaction à 0°C, le dichlorométhane est évaporé sous vide à 30°C, le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle et filtré sur silice. Le filtrat, évaporé sous azote, est déposé sur une colonne de silice et élué par un gradient (éther de pétrole-AcOEt 70:30 -> 50:50). Les fractions contenant l'ester activé sont regroupées et évaporées sous vide à 30°C pour donner la 20-CO-NHS vitamine D **21** (0,172 g ; Rdt : 99%) sous forme d'une meringue blanche.



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 70/30) : R<sub>f</sub> = 0,15

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 6,22 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 6,05 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,81 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,95 (1H, l, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 2,83 (2H, d, J= 4,7 Hz, 33-CH) ; 2,82 (1H, c, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,73 (1H, c, 20-CH) ; 2,57 (1H, d, J= 13,2 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, m, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 13,2 ; 7,9 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,18 (1H, m, 1 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,39 (3H, d, J= 6,9 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,61 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

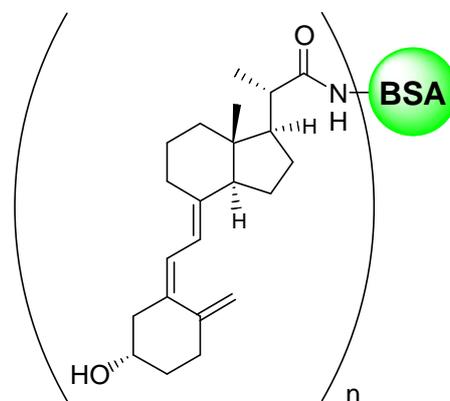
**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 145,0 (C-10) ; 141,0 (C-8) ; 135,8 (C-5) ; 122,2 (C-6) ; 118,1 (C-7) ; 112,6 (C-19) ; 69,2 (C-3) ; 55,8 (C-14) ; 52,8 (C-17) ; 46,0 (C-13) ; 45,9 (C-4) ; 40,6 (C-20) ; 40,3 (C-12) ; 35,2 (C-2) ; 31,9 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 26,7 (C-16) ; 25,6 (C-33) ; 23,4 (C-11) ; 22,4 (C-15) ; 17,4 (C-21) ; 12,2 (C-18)

**MS** (CI) : 498 [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> ; 442 [MH]<sup>+</sup> ; 424 [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>5</sub><sup>1+</sup> .....442,2593  
mesurée .....442,2591

**1<sup>er</sup> Immunogène : conjugué 20-CO-BSA vitamine D - BSA 22 :**

La BSA déminéralisée (300 mg ; 4,48  $\mu$ mol ; 1 éq.) est dissoute sous agitation au Vortex dans une solution aqueuse 0,1 M de bicarbonate de sodium (7,51 mL ; 40 mg/mL) puis du THF distillé (3,76 mL) est ajouté goutte à goutte sous agitation au Vortex, à une vitesse assez lente pour maintenir la solution limpide. La 20-CO-NHS vitamine D **21** (99 mg ; 0,24 mmol ; 50 éq.) est dissoute dans du THF (3,76 mL) et additionnée lentement (15 mn) sous agitation au Vortex sur la solution de BSA de manière à ce que le milieu réactionnel reste limpide en fin d'addition. La réaction est laissée 45 heures, sous argon, à température ambiante sous agitation magnétique. Le milieu réactionnel limpide est placé dans des sacs de dialyse (SpectraPor ; MWCO 6000-8000 ; 1,7 mL/cm ;



préalablement bouillis et lavés à l'eau) et le tube est rincé par un mélange de bicarbonate de sodium 0,1 M aqueux et de THF distillé 50/50, puis dialysé à 4°C deux fois contre 5 L (4 heures) et une fois contre 1 L (une nuit) de solution de bicarbonate de sodium 0,1 M dégazée à l'azote. Un colloïde blanc

apparaît à la première dialyse probablement à cause de la trop forte concentration de l'immunogène dans le sac de dialyse. La totalité du contenu des sacs est déposée sur une colonne d'exclusion stérique de Sépharose® CL-4B (Pharmacia-Biotech) et de billes de verre (h= 80 cm ; Ø= 3,5 cm) puis éluée par une solution aqueuse 0,1 M de bicarbonate de sodium. Le chromatogramme est enregistré à  $\lambda=280$  nm (LC spectrophotometer, range 0,64 ; enregistreur Kipp et Zonen BD 41, sensibilité 10 mV, défilement papier 0,2 mm/mn) et les fractions collectées toutes les 16 mn (collecteur de fractions ISCO Retriever II).

La fraction A (1<sup>er</sup> pic) : tubes 8 à 15, correspond à l'immunogène dénaturé, colloïde blanc.

La fraction B (2<sup>ème</sup> pic) : tubes 16 à 27, est l'immunogène limpide non-dénaturé.

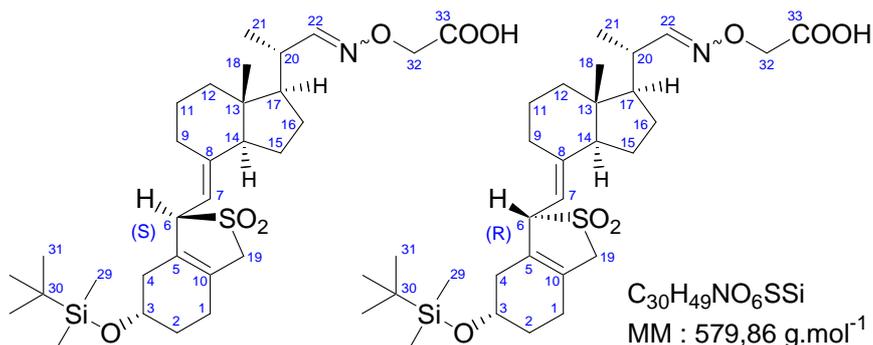
La fraction C (épaulement du 2<sup>ème</sup> pic) : tubes 28 à 32, probablement l'haptène.

Les fractions A et B sont réparties dans des sacs de dialyses distincts (SpectraPor ; MWCO 6000-8000 ; 1,7 mL/cm, préalablement bouillis et lavés à l'eau) puis dialysées à 4°C quatre fois contre 5 L (3x4 heures et une nuit) d'eau dégazée à l'azote. Les sacs de dialyse sont vidés et rincés, le volume de chaque fraction est mesuré et un prélèvement effectué (A : 157 mL ; B : 256 mL). Chaque fraction est répartie dans des erlens, congelée et lyophilisée pour donner le premier immunogène : 20-CO-BSA vitamine D **22** (A : 50,6 mg ; B : 289,5 mg).

### 22-CMO adduits-SO<sub>2</sub> **23a** et **23b** :

Adduits-SO<sub>2</sub> 6(S) et 6(R) du 22-O-(carboxyméthyl)oximino-3β-[(t-butyl diméthylsilyl)oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5,7(E),10(19)-triène

L'aldéhyde des adduits-SO<sub>2</sub> **3a** et **3b** (50 mg ; 0,099 mmol ; 1 éq.) est dissous dans le dichlorométhane anhydre (1 mL ; c=0,1 M), l'hémichlorhydrate de carboxyméthoxylamine (0,012 g ; 0,054 mmol ; 0,55 éq.) est additionné sous forme solide, suivie de pyridine sur tamis moléculaire (100 µL) à 0°C sous agitation. Après 1,5 h de réaction,



l'aldéhyde a disparu en CCM (éther de pétrole-AcOEt 80:20) et laisse place à un produit assez polaire de Rf=0,5 (CHCl<sub>3</sub>-acétone-AcOH 70:20:0,5). Le brut réactionnel est évaporé puis repris par du MTBE, de l'eau et quelques gouttes d'une solution de NaOH 1 M jusqu'à pH basique. La phase aqueuse ainsi que l'émulsion sont soutirées, additionnées de MTBE et acidifiées par une solution de HCl 1 M. La phase aqueuse est extraite à nouveau trois fois par du MTBE. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporées par balayage d'azote jusqu'à obtenir le 22-CMO des adduits-SO<sub>2</sub> **23a** et **23b** (35 mg ; Rdt : 61%) sous forme d'un solide blanc quasi-pur.

CCM (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 50/50/0,5) isomère 6(S) : Rf = 0,36

CCM (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 50/50/0,5) isomère 6(R) : Rf = 0,31

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(S) **23b** :  $\delta$  = 7,37 (1H, d, J= Hz, 22-CH) ; 4,70 (1H, d, J= 9,5 Hz, 7-CH) ; 4,60 (3H, s, 32-OCH<sub>2</sub>) ; 4,51 (1H, d, J= 9,5 Hz, 6-CH) ; 4,01 (1H, c, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 3,66 (2H, c, 19-CH<sub>2</sub>) ; 2,62 (1H, m, J= 8,8 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, m, J= 8,4 ; 7,0 Hz, 20-CH) ; 1,14 (3H, d, J= 7,0 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,88 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,69 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,06 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

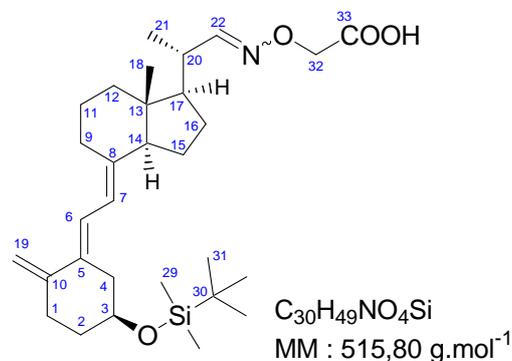
**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) isomère 6(S) **23b** :  $\delta$  = 174,5 (C-33) ; 157,6 (C-22) ; 150,0 (C-8) ; 130,7 (C-5) ; 126,5 (C-10) ; 110,7 (C-7) ; 69,7 (C-32) ; 67,6 (C-6) ; 66,6 (C-3) ; 58,1 (C-19) ; 56,0 (C-14) ; 54,1 (C-17) ; 46,4 (C-13) ; 40,1 (C-12) ; 37,4 (C-20) ; 34,3 (C-4) ; 30,7 (C-2) ; 29,8 (C-9) ; 27,0 (C-

16) ; 25,8 (C-31) ; 24,4 (C-1) ; 23,8 (C-11) ; 22,2 (C-15) ; 18,1 (C-30) ; 18,0 (C-21) ; 12,1 (C-18) ; -4,7 (C-29)

### 22-CMO *trans*-triène **24** :

#### 22-*O*-(carboxyméthyl)oxyimino-3 $\beta$ -[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5(*Z*),7(*E*),10(19)-triène

A une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (0,507 g ; 6,04 mmol ; 7 éq.), le 22-CMO des adduits-SO<sub>2</sub> **23a** et **23b** (0,500 g ; 0,86 mmol ; 1 éq.) dissous dans l'éthanol à 96% est ajouté à température ambiante sous agitation. Lorsque le dégagement de CO<sub>2</sub> cesse, la solution est concentrée sous vide à 30°C puis reprise dans l'éthanol 96% (86 mL ; 0,01 M) puis portée à reflux 45 mn sous azote. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous vide à 30°C à l'évaporateur rotatif puis repris dans l'éthanol absolu (particules brisées aux ultra-sons) puis filtré sur Célite. Le filtrat est évaporé sous vide à 30°C pour donner une meringue jaunâtre du sel de sodium du 22-CMO du *trans*-triène **24** (0,436 g ; Rdt : 94%) quasiment pur en CLHP qui sera utilisé en l'état pour la suite de la synthèse.



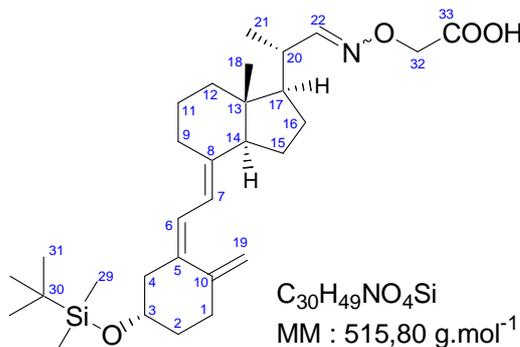
**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 70/30/0,5) : Rf = 0,33

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 9,5 mn (MeOH/AcOH 100:0,5%)

### 22-CMO triène **26** :

#### 22-*O*-(carboxyméthyl)oxyimino-3 $\beta$ -[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5(*E*),7(*E*),10(19)-triène

Le sel de sodium du 22-CMO du *trans*-triène **24** (0,400 g ; 0,74 mmol ; 1 éq.) est dissous dans le méthanol (7,4 mL ; 0,1 M) puis ajouté à un mélange d'anthracène (0,053 g ; 0,30 mmol ; 0,4 éq.) et de triéthylamine (73  $\mu$ L ; 0,52 mmol ; 0,7 éq.) dans le toluène (14,8 mL ; c=0,05 M). Le milieu réactionnel est placé dans un tube Corex<sup>®</sup>, puis dégazé à l'argon 10 mn. La lampe à vapeur de mercure refroidie par la circulation d'un fluide réfrigérant dans sa double enveloppe est allumée environ 20 mn avant l'expérimentation. Lorsque la luminosité est stabilisée, le tube Corex<sup>®</sup> est placé à 5 cm de l'axe de la lampe pendant 3 heures dans un bain à 8°C dont la température remonte à 24°C au cours de l'irradiation. Le milieu réactionnel est ensuite dilué dans le MTBE et de la saumure acidifiée par une solution de HCl 1 M. La phase organique est lavée une fois à la saumure acidifiée par une solution de HCl 1 M puis trois fois à la saumure, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée sur silice et enfin évaporée sous vide à 30°C pour donner une meringue blanche du 22-CMO du triène **24** contenant des traces de d'anthracène qui sera utilisé en l'état pour la suite de la synthèse.



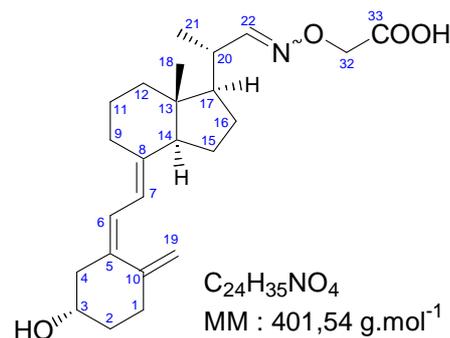
**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 70/30/0,5) : Rf = 0,29

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 9 mn (MeOH/AcOH 100:0,5%)

**22-CMO vitamine D 27 :**

22-O-(carboxyméthyl)oxyimino- 3β-hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

L'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle **26** est déprotégé par le TBAF 1 M en solution dans le THF en suivant le même protocole que pour la 20-COOH vitamine D **20**. 0,124 g (0,24 mmol) de l'éther fournissent après chromatographie (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 70:30:0,5) 46 mg de l'alcool **27** (48%, meringue blanche) qui est purifié par CLHP préparative sur colonne C18.



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 50/50/0,5) : R<sub>f</sub> = 0,24

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7,36 (1H, d, J= 8,4 Hz, 22E-CH) ; 6,56 (1H, d, J= 8,7 Hz, 22Z-CH) ; 6,22 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 6,03 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,04 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,80 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 4,57 (2H, s, 32-CH<sub>2</sub>) ; 3,96 (1H, m, J= 7,3 ; 3,7 Hz, 3α-CHOH) ; 2,84 (1H, m, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,57 (1H, dd, J= 13,2 ; 3,7 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,39 (1H, c, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 13,2 ; 7,3 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (1H, c, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 1,13 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,57 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 157,5 (C-22) ; 145,0 (C-10) ; 141,3 (C-8) ; 135,5 (C-5) ; 122,3 (C-6) ; 117,9 (C-7) ; 112,6 (C-19) ; 69,3 (C-3) ; 56,1 (C-14) ; 54,1 (C-17) ; 46,0 (C-13) ; 45,8 (C-4) ; 40,2 (C-12) ; 37,3 (C-20) ; 35,1 (C-2) ; 31,9 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 26,9 (C-16) ; 23,4 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 18,1 (C-21) ; 12,3 (C-18)

**MS** (CI) : 825 [2M+Na]<sup>+</sup> ; 424 [M+Na]<sup>+</sup> ; 402 [MH]<sup>+</sup>

**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>4</sub><sup>1+</sup> ..... 402,26443  
mesurée ..... 402,26426

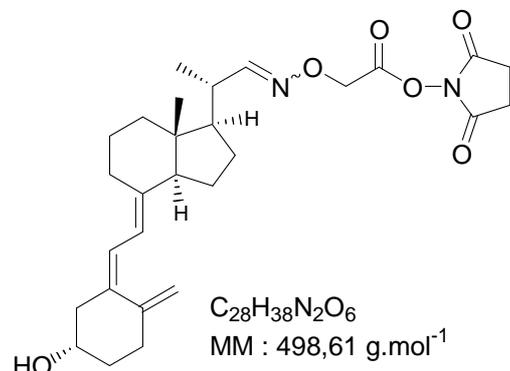
**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 11 mn (MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰) 22(E)-CMO vitamine D

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 12 mn (MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5‰) 22(Z)-CMO vitamine D

**22-CMO-NHS vitamine D 28 :**

Ester de N-hydroxysuccinimide du 22-O-(carboxyméthyl)oxyimino- 3β-hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

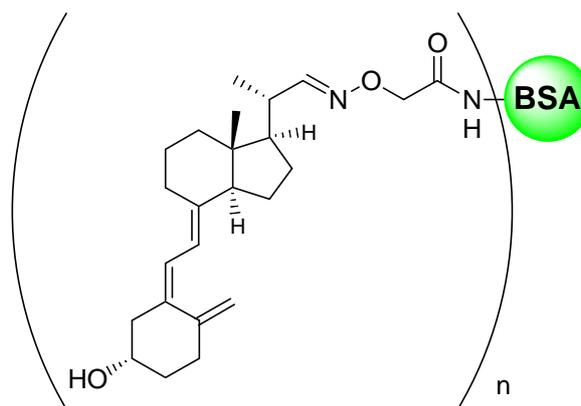
La 22-CMO vitamine D **27** (48 mg ; 0,12 mmol ; 1 éq.) et le N-hydroxysuccinimide (0,017 g ; 0,14 mmol ; 1,2 éq.) sont séchés sous vide puis dissous dans le dichlorométhane anhydre à température ambiante. Le DCC en solution 1 M dans le dichlorométhane (0,143 mL ; 0,14 mmol ; 1,2 éq.) est ajouté à 0°C sous agitation. Après 1 heure de réaction à 0°C, le dichlorométhane est évaporé sous azote, le résidu est chromatographié sur une colonne de silice et élué par un mélange éther de pétrole-AcOEt 50:50. Les fractions contenant l'ester activé sont regroupées et évaporées sous vide à 30°C pour donner la 22-CMO-NHS vitamine D **28** (44 mg ; Rdt : 73%) sous forme d'une meringue blanche, contaminée en CCM (éther de pétrole-AcOEt 50:50) par un produit polaire.



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 70/30) : R<sub>f</sub> = 0,38

2<sup>ème</sup> Immunogène : conjugué 22-CMO-BSA vitamine D - BSA **29** :

La BSA déminéralisée (296 mg ; 4,41  $\mu$ mol ; 1  $\text{eq.}$ ) est dissoute sous agitation au Vortex dans une solution aqueuse 0,1 M de bicarbonate de sodium (7,39 mL ; 40 mg/mL) puis du THF distillé (3,70 mL) est ajouté en goutte à goutte sous agitation au Vortex, à une vitesse assez lente pour maintenir la solution limpide. La 22-CMO-NHS vitamine D **28** (110 mg ; 0,22 mmol ; 50  $\text{eq.}$ ) est dissoute dans du THF (3,70 mL) et additionnée lentement sous agitation au Vortex sur la solution de BSA de manière à ce que le milieu réactionnel reste limpide en fin d'addition. La réaction est laissée 38 heures, sous argon, à température



ambiante sous agitation magnétique. Le milieu réactionnel limpide est placé dans des sacs de dialyse et le tube est rincé par 60 mL d'un mélange de bicarbonate de sodium 0,1 M aqueux et de THF distillé 50/50, puis dialysé à 4°C contre 5 L (4 heures), 2 L (4 heures) et 5 L (une nuit), de solution de bicarbonate de sodium 0,1 M dégazée à l'azote. La solution reste limpide. Le contenu des sacs est mélangé et divisé en deux (la 2<sup>ème</sup> partie est congelée à -18°C pour être traitée quatre jours après) pour être déposé en deux fois sur une colonne d'exclusion stérique de Sépharose® CL-4B et de billes de verre (h= 80 cm ;  $\varnothing$ = 3,5 cm) puis élué par une solution aqueuse 0,1 M de bicarbonate de sodium. Le chromatogramme est enregistré à  $\lambda$ =280 nm et les fractions collectées toutes les 12 mn.

Il n'y a pas de fraction dénaturée.

La fraction A : tubes 4 à 16 et 5 à 19, est l'immunogène limpide non-dénaturé.

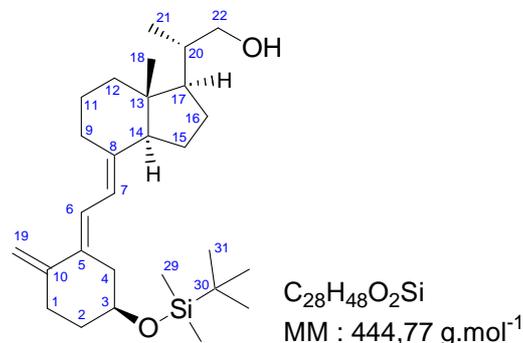
La fraction B (épaulement du pic) : tubes 17 à 22 et 20 à 24 probablement l'haptène.

Les fractions A sont réparties dans des sacs de dialyses puis dialysées à 4°C trois fois contre 5 L (2x4 heures et une nuit) pour la première partie de la purification et quatre fois contre 5 L (2x4 heures et deux nuits) pour la deuxième partie de la purification, d'eau dégazée à l'azote. Les sacs de dialyse sont vidés et rincés, le volume de chaque fraction est mesuré et un prélèvement effectué (A1 : 240 mL ; A2 : 325 mL). Chaque fraction est répartie dans des erlens, congelée et lyophilisée pour donner le deuxième immunogène : 22-CMO-BSA vitamine D **29** (A1 : 175,1 mg ; A2 : 178,9 mg).

*trans*-Trièno $\text{l}$  **30** (22-OH triène):

3 $\beta$ -[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5(Z),7(E),10(19)-trièn-22-ol

L'alcool des adduits-SO<sub>2</sub> **4a** et **4b** (2 g ; 3,9 mmol ; 1  $\text{eq.}$ ) est dissous dans l'éthanol à 96% (200 mL ; 0,02 M). Sous agitation magnétique, une solution de bicarbonate de sodium (2,311 g ; 27,5 mmol ; 7  $\text{eq.}$ ) dans l'eau (40 mL ; 0,1 M) est ajoutée à température ambiante. La suspension est agitée 10 mn, placée 1 mn aux ultra-sons et chauffée 1 h à reflux. Après refroidissement, le milieu réactionnel est tiré à sec puis repris dans l'éthanol 96% pour être filtré sur célite. Le filtrat est évaporé sous vide à 30°C pour donner un solide blanc, mélange de *trans*-trièno $\text{l}$  **30**, pur en CLHP et de traces de bicarbonate de sodium qui sera utilisé en l'état pour la suite de la synthèse.



CCM (Ether de pétrole/AcOEt 80/20) : R<sub>f</sub> = 0,48

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 6,48 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 5,86 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 4,93 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,65 (1H, s, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,85 (1H, m, J= 4,0 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 3,66 (1H, dd, J=

10,6 ; 3,3 Hz, 20-CH<sub>2</sub>OH) ; 3,40 (1H, dd, J= 10,6 ; 7,0 Hz, 20-CH<sub>2</sub>OH) ; 2,87 (1H, dd, J= 11,7 ; 3,6 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,66 (1H, dd, J= 13,9 ; 4,0 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,45 (1H, dt, J= 13,9 Hz, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,25 (1H, dd, J= 13,9 ; 8,8 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,15 (1H, td, J= 13,9 Hz, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 1,07 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,89 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,58 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 150,0 (C-10) ; 143,5 (C-8) ; 136,4 (C-5) ; 120,0 (C-6) ; 116,2 (C-7) ; 107,6 (C-19) ; 69,5 (C-3) ; 68,0 (C-22) ; 56,2 (C-14) ; 52,9 (C-17) ; 45,9 (C-13) ; 40,4 (C-12) ; 39,1 (C-20) ; 37,6 (C-1) ; 35,2 (C-4) ; 31,3 (C-2) ; 29,0 (C-9) ; 27,2 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,5 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 18,2 (C-30) ; 16,9 (C-21) ; 12,1 (C-18) ; -4,7 (C-29)

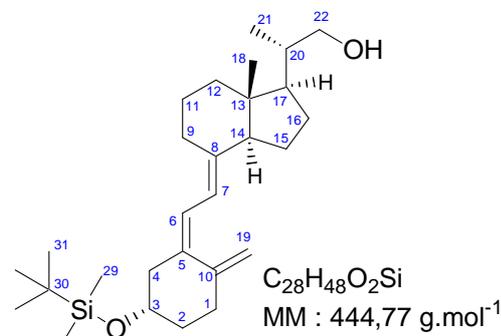
**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 11,5 mn (MeOH 100%)

**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 80/20) : R<sub>f</sub> = 0,48

*Trièno*l **31** :

*3β-[(t-butyl)diméthylsilyl]oxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-22-ol*

Le *trans*-triènol **30** (50 mg ; 0,112 mmol ; 1 éq.) et l'antracène (8 mg ; 0,045 mmol ; 0,4 éq.) sont dissous dans le toluène (2,2 mL ; 0,05 M) dans un tube Corex<sup>®</sup> transparent aux UV et une goutte de triéthylamine est rajoutée. La lampe à vapeur de mercure refroidie par la circulation d'un fluide réfrigérant (10°C) dans sa double enveloppe est allumée quelques minutes avant l'expérimentation. Lorsque la luminosité est stabilisée, le tube Corex<sup>®</sup> est placé à 10 cm de l'axe de la lampe pendant 1 h. Seule une légère dégradation est observée en CCM (éter de pétrole-AcOEt 8:2). Le milieu réactionnel est filtré sur colonne silice 35-70 μm, lavée au toluène afin d'éliminer l'antracène puis éluee par un mélange éther de pétrole-AcOEt 8:2 pour récupérer 44 mg d'un produit dont le spectre RMN <sup>1</sup>H montre des similitudes avec celui de la vitamine D<sub>2</sub> et de grandes différences avec le produit de départ.



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 80/20) : R<sub>f</sub> = 0,45

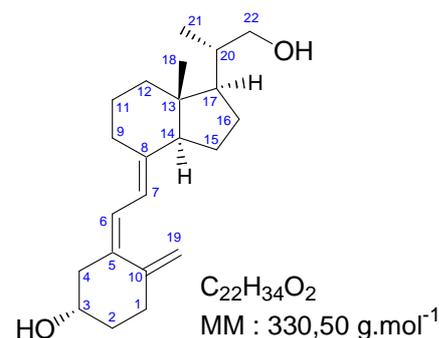
**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 6,16 (1H, d, J= 11,4 Hz, 6-CH) ; 6,02 (1H, d, J= 11,4 Hz, 7-CH) ; 5,01 (1H, s, J= Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,77 (1H, s, J= Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,82 (1H, m, J= 9,1 ; 4,0 Hz, 3α-CHOH) ; 3,65 (1H, d, J= 8,0 Hz, 20-CH<sub>2</sub>OH) ; 3,38 (1H, t, J= 8,0 Hz, 20-CH<sub>2</sub>OH) ; 2,84 (1H, dd, J= 12,6 ; 4,1 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,44 (1H, dd, J= 12,9 ; 4,0 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,37 (1H, dt, J= 13,5 ; 4,7Hz, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,24 (1H, dd, J= 12,9 ; 9,1 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,09 (1H, dt, J= 13,5 ; 4,4 Hz, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 1,99 (1H, c, 12β-CH<sub>2</sub>) ; 1,99 (1H, c, 14-CH) ; 1,91 (1H, c, 2α-CH<sub>2</sub>) ; 1,88 (1H, c, 16α-CH<sub>2</sub>) ; 1,69 (1H, c, 9α-CH<sub>2</sub>) ; 1,56 (1H, c, 2β-CH<sub>2</sub>) ; 1,55 (1H, c, 20-CH) ; 1,54 (1H, c, 15α-CH<sub>2</sub>) ; 1,54 (1H, c, 15β-CH<sub>2</sub>) ; 1,53 (1H, c, 11α-CH<sub>2</sub>) ; 1,53 (1H, c, 11β-CH<sub>2</sub>) ; 1,38 (1H, c, 17-CH) ; 1,33 (1H, c, 12α-CH<sub>2</sub>) ; 1,28 (1H, c, 16β-CH<sub>2</sub>) ; 1,14 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,89 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,57 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 145,4 (C-10) ; 141,1 (C-8) ; 136,5 (C-5) ; 121,3 (C-6) ; 118,0 (C-7) ; 112,1 (C-19) ; 70,6 (C-3) ; 68,0 (C-22) ; 56,0 (C-14) ; 52,8 (C-17) ; 46,9 (C-4) ; 45,8 (C-13) ; 40,4 (C-12) ; 39,1 (C-20) ; 36,4 (C-2) ; 32,8 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 27,2 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,4 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 18,2 (C-30) ; 16,9 (C-21) ; 12,2 (C-18) ; -4,6 (C-29)

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 10,5 mn (MeOH 100%)

**22-OH vitamine D :****3 $\beta$ -hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-22-ol**

L'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle **31** est déprotégé par le TBAF 1 M en solution dans le THF en suivant le même protocole que pour la 20-COOH vitamine D **20** mais sans extraction acide. 0,210 g (0,47 mmol) de l'éther fournissent après chromatographie (éther de pétrole-AcOEt 70:30) 50 mg de la 22-OH vitamine D (32%, meringue blanche).



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 50/50) : R<sub>f</sub> = 0,38

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 6,24 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 6,04 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, t, J= 2,6 ; 1,1 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,82 (1H, d, J= 2,6 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,95 (1H, m, J= 7,6 ; 3,7 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 3,65 (1H, dd, J= 10,6 ; 3,2 Hz, 20-CH<sub>2</sub>OH) ; 3,38 (1H, dd, J= 10,6 ; 6,6 Hz, 20-CH<sub>2</sub>OH) ; 2,83 (1H, dd, J= 11,9 ; 3,8 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,58 (1H, dd, J= 13,2 ; 3,7 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, m, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 13,2 ; 7,6 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,18 (1H, m, 1 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,06 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,57 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 145,1 (C-10) ; 141,9 (C-8) ; 135,3 (C-5) ; 122,3 (C-6) ; 117,6 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,2 (C-3) ; 67,9 (C-22) ; 56,0 (C-14) ; 52,8 (C-17) ; 45,9 (C-4) ; 45,9 (C-13) ; 40,4 (C-12) ; 39,1 (C-20) ; 35,2 (C-2) ; 31,9 (C-1) ; 29,0 (C-9) ; 27,2 (C-16) ; 23,5 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 16,9 (C-21) ; 12,1 (C-18)

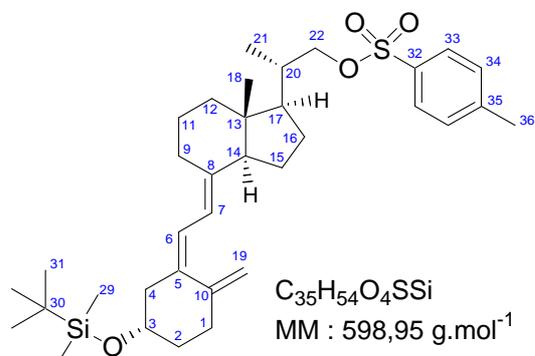
**MS** (ESI+) : 331 [MH]<sup>+</sup>

**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>35</sub>O<sub>2</sub><sup>1+</sup> .....331,2637  
mesurée .....331,2639

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 5,75 mn (MeOH/eau 90:10)

**22-OpTs triène 32 :****3 $\beta$ -[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-22-*p*-tolylsulfonate-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène**

Le triénol **31** (1,444 g ; 2,25 mmol ; 1 éq.) est dissous dans la pyridine conditionnée sur tamis moléculaire (6,5 mL ; 0,5 M). Le chlorure de tosyle (0,743 g ; 3,90 mmol ; 1,2 éq.) est ajouté sous agitation à 0°C. Après 5 h de réaction à 0°C, le milieu réactionnel est placé 1,5 h à -18°C puis l'excès de chlorure de tosyle est hydrolysé sous agitation pendant 30 mn par l'ajout d'une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium puis d'une petite quantité de MTBE. La phase organique est diluée par l'ajout de MTBE, puis séparée, extraite à nouveau par une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium puis deux fois par une solution aqueuse de chlorure de sodium, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée sur silice et évaporée sous vide à 30°C. Le tosylate **32** ainsi obtenu n'a pas l'odeur caractéristique du chlorure de tosyle (1,815 g ; Rdt : 93%). Afin de s'assurer de sa pureté, le produit est purifié sur colonne de silice (éther



de pétrole-AcOEt 100:2 -> 95:5) puis évaporé sous vide à 30°C pour donner un solide blanc collant de 22-OpTs triène **32** (1,206 g ; Rdt : 62%).

**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 70/30) : Rf = 0,51

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7,79 (2H, d, J= 8,0 Hz, 33-CH) ; 7,34 (2H, d, J= 8,0 Hz, 34-CH) ; 6,14 (1H, d, J= 11,0 Hz, 6-CH) ; 5,99 (1H, d, J= 11,0 Hz, 7-CH) ; 5,00 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,75 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,98 (1H, dd, J= 9,1 ; 2,9 Hz, 22-CH<sub>2</sub>OTs) ; 3,80 (1H, c, J= 9,1 ; 6,6 Hz, 22-CH<sub>2</sub>OTs) ; 3,80 (1H, m, 3α-CHOH) ; 2,82 (1H, dd, J= 11,7 ; 3,3 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,45 (3H, s, 36-CH<sub>3</sub>) ; 2,41 (1H, c, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,34 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,24 (1H, dd, J= 12,2 ; 9,0 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,08 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 0,99 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,88 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,51 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,06 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 145,4 (C-10) ; 144,6 (C-35) ; 140,7 (C-8) ; 136,7 (C-5) ; 133,1 (C-32) ; 129,8 (C-34) ; 127,9 (C-33) ; 121,2 (C-6) ; 118,1 (C-7) ; 112,1 (C-19) ; 75,6 (C-22) ; 70,5 (C-3) ; 55,9 (C-14) ; 52,1 (C-17) ; 46,9 (C-4) ; 45,7 (C-13) ; 40,2 (C-12) ; 36,5 (C-20) ; 36,4 (C-2) ; 32,7 (C-1) ; 28,8 (C-9) ; 26,9 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,3 (C-11) ; 22,2 (C-15) ; 21,7 (C-36) ; 18,2 (C-30) ; 17,0 (C-21) ; 12,0 (C-18) ; -4,6 (C-29)

**MS** (ESI+) : 599 [MH]<sup>+</sup>

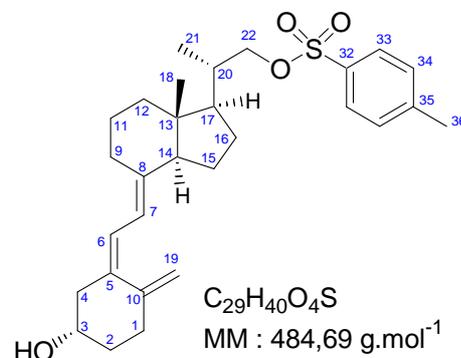
**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>35</sub>H<sub>55</sub>O<sub>4</sub>SSi<sup>1+</sup> ..... 599,35903  
mesurée ..... 599,35873

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 13,5 mn (MeOH 100%)

22-OpTs vitamine D **53** :

3β-hydroxy-22-p-tolylsulfonate-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

Le 22-OpTs du triène **32** (39 mg ; 65 μmol ; 1 éq.) est dissous dans le THF non-stabilisé (65 μL ; 1 M) dans un tube en plastique ; la solution 1 M de TBAF dans le THF (65 μL ; 65 μmol ; 1 éq.) est alors ajoutée à 0°C sous agitation. Après 1,5 heures de réaction à 0°C sous azote, la réaction est peu avancée ; la solution de TBAF dans le THF (130 μL ; 130 μmol ; 2 éq.) est rajoutée pour une nuit à -18°C. Le milieu réactionnel est dilué dans le MTBE et la saumure. La phase organique est lavée deux fois à la saumure et deux fois à l'eau, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée sur silice et évaporée sous vide à 30°C (30 mg). Le produit brut est purifié sur colonne de silice et élué par (éther de pétrole-AcOEt 80:20) pour donner la 22-OpTs vitamine D **53** (15 mg ; Rdt : 47%).



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 70/30) : Rf = 0,24

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7,79 (2H, d, J= 8,4 Hz, 33-CH) ; 7,35 (2H, d, J= 8,4 Hz, 34-CH) ; 6,22 (1H, d, J= 11,0 Hz, 6-CH) ; 6,01 (1H, d, J= 11,0 Hz, 7-CH) ; 5,04 (1H, t, J= 2,6 ; 1,2 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,80 (1H, d, J= 2,6 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,98 (1H, dd, J= 9,1 ; 3,2 Hz, 22-CH<sub>2</sub>) ; 3,96 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,80 (1H, dd, J= 9,1 ; 6,6 Hz, 22-CH<sub>2</sub>) ; 2,82 (1H, dd, J= 11,7 ; 4,0 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,57 (1H, dd, J= 13,5 ; 4,0 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,45 (3H, s, 36-CH<sub>3</sub>) ; 2,37 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,28 (1H, dd, J= 13,5 ; 7,3 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 0,99 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,51 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 145,1 (C-10) ; 144,6 (C-35) ; 141,5 (C-8) ; 135,5 (C-5) ; 133,1 (C-32) ; 129,8 (C-34) ; 127,9 (C-33) ; 122,2 (C-6) ; 117,8 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 75,6 (C-22) ; 69,2 (C-3) ;

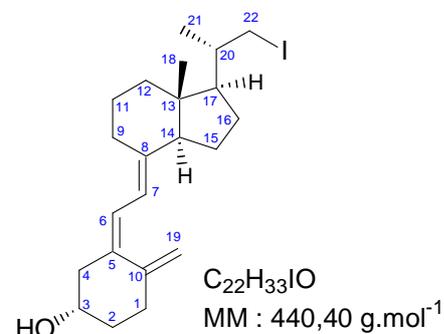
55,9 (C-14) ; 52,1 (C-17) ; 45,9 (C-4) ; 45,8 (C-13) ; 40,1 (C-12) ; 36,5 (C-20) ; 35,2 (C-2) ; 31,9 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 26,9 (C-16) ; 23,4 (C-11) ; 22,2 (C-15) ; 21,7 (C-36) ; 17,0 (C-21) ; 12,0 (C-18)

CLHP(C<sub>18</sub>) : Tr= 9,5 mn (MeOH/eau 90:10)

### 22-Iodo vitamine D **54** :

#### 3β-hydroxy-22-iodo-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

La 22-OpTs vitamine D **53** (10 mg ; 21 μmol ; 1 éq.) et l'iodure de sodium (46 mg ; 0,31 mmol ; 15 éq.) sont dissous dans l'acétone (0,51 mL ; 0,04 M) sous agitation magnétique, à température ambiante puis placés à 50°C 2 heures. Le milieu réactionnel est évaporé sous azote, repris dans (éther de pétrole-AcOEt 80:20), filtré sur silice et évaporé. Le produit est purifié sur colonne de silice et élué par (éther de pétrole-AcOEt 90:10) pour donner la 22-iodo vitamine D **54** (5 mg ; Rdt : 56%).



CCM (Ether de pétrole/AcOEt 90/10) : Rf = 0,39

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 6,43 (1H, d, J= 11,4 Hz, 6-CH) ; 6,04 (1H, d, J= 11,4 Hz, 7-CH) ; 5,06 (1H, t, J= 2,2 ; 1,0 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,82 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,96 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,34 (1H, dd, J= 9,5 ; 2,5 Hz, 22-CH<sub>2</sub>I) ; 3,19 (1H, dd, J= 9,5 ; 5,7 Hz, 22-CH<sub>2</sub>I) ; 2,83 (1H, dd, J= 11,7 ; 3,5 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,57 (1H, dd, J= 13,2 ; 3,7 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 13,2 ; 7,9 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,18 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 1,04 (3H, d, J= 6,3 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,59 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 145,1 (C-10) ; 141,6 (C-8) ; 135,4 (C-5) ; 122,3 (C-6) ; 117,8 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,2 (C-3) ; 56,0 (C-14) ; 55,8 (C-17) ; 45,9 (C-4) ; 45,8 (C-13) ; 40,2 (C-12) ; 37,3 (C-20) ; 35,2 (C-2) ; 31,9 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 27,0 (C-16) ; 23,4 (C-11) ; 22,1 (C-15) ; 21,0 (C-22) ; 20,9 (C-21) ; 12,8 (C-18)

MS (ESI+) : 441 [MH]<sup>+</sup>

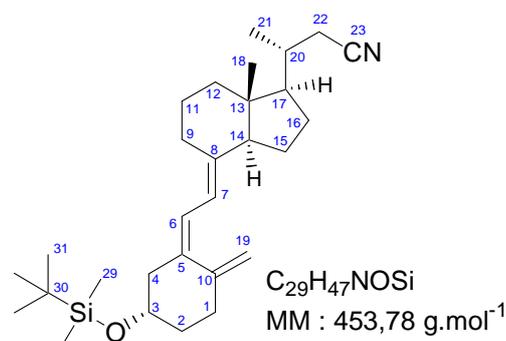
**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>IO<sup>1+</sup> .....441,16544  
mesurée .....441,16514

CLHP(C<sub>18</sub>) : Tr= 15 mn (MeOH/eau 95:5)

### 22-Cyano triène **33** :

#### 3β-[(t-butyl-diméthylsilyl)oxy]-22-cyano-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

Le tosylate **32** (1,473 g ; 2,5 mmol ; 1 éq.) est dissous dans du DMSO séché sur tamis moléculaire (12,2 mL ; 0,2 M) puis le cyanure de potassium (1,121 g ; 17,2 mmol ; 7 éq.) est ajouté à température ambiante sous agitation. Le milieu réactionnel est chauffé à 60°C 10 mn, placé aux ultra-sons 20 mn et à nouveau chauffé à 60°C 1 h. La réaction est contrôlée par CCM (éther de pétrole-AcOEt 95:5), le 22-cyano triène migre juste au dessus du tosylate. Le milieu réactionnel est alors additionné de MTBE et d'eau. La phase aqueuse est séparée et extraite quatre fois par du MTBE. Les phases organiques sont regroupées et lavées quatre



fois à la saumure, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées sur silice et évaporées sous vide à  $30^\circ\text{C}$  pour donner le 22-cyano triène **33** (1,141 g ; Rdt : 100%).

**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 95/5) :  $R_f = 0,39$

**RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 6,15$  (1H, d,  $J = 11,3$  Hz, 6-CH) ;  $6,01$  (1H, d,  $J = 11,3$  Hz, 7-CH) ;  $5,01$  (1H, s, 19E- $\text{CH}_2$ ) ;  $4,77$  (1H, t,  $J = 1,3$  Hz, 19Z- $\text{CH}_2$ ) ;  $3,82$  (1H, m,  $J = 9,1$  ;  $4,3$  Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ;  $2,84$  (1H, dd,  $J = 12,0$  ;  $3,5$  Hz, 9 $\beta$ - $\text{CH}_2$ ) ;  $1,18$  (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, 21- $\text{CH}_3$ ) ;  $0,89$  (3x3H, s, 31-C $\text{CH}_3$ ) ;  $0,57$  (3H, s, 18- $\text{CH}_3$ ) ;  $0,07$  (2x3H, d, 29-Si $\text{CH}_3$ )

**RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 145,4$  (C-10) ;  $140,5$  (C-8) ;  $136,9$  (C-5) ;  $121,2$  (C-6) ;  $119,0$  (C-23) ;  $118,2$  (C-7) ;  $112,2$  (C-19) ;  $70,5$  (C-3) ;  $56,0$  (C-14) ;  $55,1$  (C-17) ;  $46,9$  (C-4) ;  $45,7$  (C-13) ;  $40,2$  (C-12) ;  $36,4$  (C-2) ;  $33,9$  (C-20) ;  $32,7$  (C-1) ;  $28,7$  (C-9) ;  $27,6$  (C-16) ;  $25,9$  (C-31) ;  $24,8$  (C-22) ;  $23,3$  (C-11) ;  $22,1$  (C-15) ;  $19,5$  (C-21) ;  $18,2$  (C-30) ;  $12,2$  (C-18) ;  $-4,6$  (C-29)

**MS** (CI) :  $510$  [ $\text{M}+\text{C}_4\text{H}_9$ ] $^+$  ;  $454$  [ $\text{MH}$ ] $^+$  ;  $322$  [ $\text{MH-TBDMSOH}$ ] $^+$

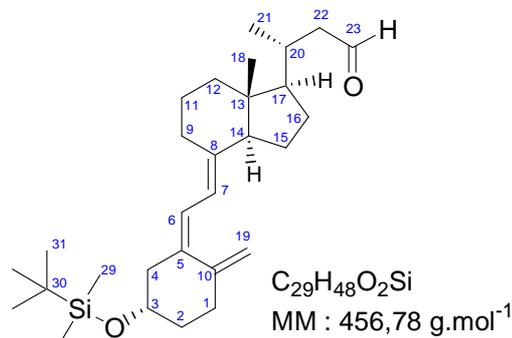
**HRMS** (CI) : Calculée pour  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{NOSi}^+$  .....  $454,3505$   
mesurée .....  $454,3502$

**CLHP**( $\text{C}_{18}$ ) : Tr= 10,5 mn (MeOH 100%)

22-CHO triène **34** :

*3 $\beta$ -[(t-butyl)diméthylsilyloxy]-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-23-al*

Le 22-cyano triène **33** (42 mg ; 0,093 mmol ; 1 éq.) est dissous dans le dichlorométhane anhydre (0,926 mL ; 0,1 M) puis à  $-80^\circ\text{C}$ , sous agitation magnétique, la solution de DIBALH 1 M dans le toluène (102  $\mu\text{L}$  ; 0,102 mmol ; 1,1 éq.) est ajoutée. Après 2 h de réaction une CCM (éther de pétrole-AcOEt 95:5) indique la fin de la réaction, le 22-CHO triène migre juste au dessus du nitrile. Le milieu réactionnel est dilué dans un mélange de MTBE et de saumure acidifiée par HCl 1 M. La phase aqueuse est séparée et extraite deux fois par du MTBE. Les phases organiques sont regroupées, lavées deux fois à l'eau, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées sur silice et évaporées sous balayage d'azote pour donner le 22-CHO triène **34** (26 mg ; Rdt : 62%).



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 95/5) :  $R_f = 0,47$

**RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 9,75$  (1H, dd,  $J = 3,4$  ;  $1,2$  Hz, 22-CHO) ;  $6,16$  (1H, d,  $J = 11,3$  Hz, 6-CH) ;  $6,01$  (1H, d,  $J = 11,3$  Hz, 7-CH) ;  $5,01$  (1H, s, 19E- $\text{CH}_2$ ) ;  $4,77$  (1H, d,  $J = 2,6$  Hz, 19Z- $\text{CH}_2$ ) ;  $3,82$  (1H, m,  $J = 9,1$  ;  $4,0$  Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ;  $2,83$  (1H, dd,  $J = 11,0$  ;  $3,7$  Hz, 9 $\beta$ - $\text{CH}_2$ ) ;  $2,37$  (1H, m, 1 $\beta$ - $\text{CH}_2$ ) ;  $1,03$  (3H, d,  $J = 6,6$  Hz, 21- $\text{CH}_3$ ) ;  $0,89$  (3x3H, s, 31-C $\text{CH}_3$ ) ;  $0,60$  (3H, s, 18- $\text{CH}_3$ ) ;  $0,07$  (2x3H, d, 29-Si $\text{CH}_3$ )

**RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 203,5$  (C-23) ;  $145,4$  (C-10) ;  $140,8$  (C-8) ;  $136,7$  (C-5) ;  $121,3$  (C-6) ;  $118,1$  (C-7) ;  $112,2$  (C-19) ;  $70,6$  (C-3) ;  $56,2$  (C-14) ;  $56,2$  (C-17) ;  $50,8$  (C-22) ;  $46,9$  (C-4) ;  $45,8$  (C-13) ;  $40,4$  (C-12) ;  $36,4$  (C-2) ;  $32,8$  (C-1) ;  $31,9$  (C-20) ;  $28,8$  (C-9) ;  $27,9$  (C-16) ;  $25,9$  (C-31) ;  $23,4$  (C-11) ;  $22,2$  (C-15) ;  $20,1$  (C-21) ;  $18,2$  (C-30) ;  $12,1$  (C-18) ;  $-4,6$  (C-29)

**MS** (CI) :  $513$  [ $\text{M}+\text{C}_4\text{H}_9$ ] $^+$  ;  $457$  [ $\text{MH}$ ] $^+$  ;  $325$  [ $\text{MH-TBDMSOH}$ ] $^+$

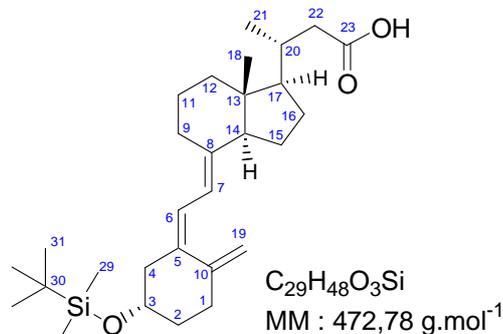
**HRMS (CI) :** Calculée pour  $C_{29}H_{49}O_2Si^{1+}$  .....457,3502  
mesurée .....457,3507

**CLHP**( $C_{18}$ ) : Tr= 12 mn (MeOH 100%)

**22-COOH triène 35 :**

*acide 3 $\beta$ -[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-23-oïque*

Le 22-CHO triène **34** (20 mg ; 0,044 mmol ; 1 éq.) est dissous dans le *tert*-butanol (220  $\mu$ L ; c=0,2 M) puis le 2-méthyl-2-butène 90% technique (41  $\mu$ L ; 0,44 mmol ; 10 éq.) est ajouté à température ambiante suivi d'une solution aqueuse 0,5 M de dihydrogénophosphate de sodium (220  $\mu$ L ; c=0,2 M) dans laquelle a été dissous le chlorite de sodium (10 mg ; 0,088 mmol ; 2 éq.). Le milieu biphasique est agité vigoureusement 15 mn à 0°C. Du MTBE et de la saumure sont alors ajoutés, la phase aqueuse séparée est extraite deux fois par du MTBE. Les phases organiques regroupées sont extraites deux fois à l'eau, séchées sur  $MgSO_4$ , filtrées et évaporées sous balayage d'azote à 35°C pour donner le 22-COOH triène **35** (21 mg ; Rdt : 100%) sous forme d'une meringue blanche quasi-pure en CLHP.



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 80/20/0,5) : Rf = 0,38

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  = 6,16 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 6,01 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,01 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,77 (1H, d, J= 1,5 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,82 (1H, m, J= 9,1 ; 4,0 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 2,84 (1H, dd, J= 12,1 ; 3,0 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,49 (1H, dd, J= 4,0 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,49 (1H, dd, J= 16,6 ; 2,9 Hz, 22-CH<sub>2</sub>) ; 2,35 (1H, dt, J= 13,9 ; 4,7 Hz, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,24 (1H, dd, J= 12,8 ; 9,5 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,04 (3H, d, J= 6,2 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,89 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,59 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  = 179,2 (C-23) ; 145,4 (C-10) ; 141,0 (C-8) ; 136,6 (C-5) ; 121,3 (C-6) ; 118,1 (C-7) ; 112,2 (C-19) ; 70,6 (C-3) ; 56,3 (C-14) ; 56,1 (C-17) ; 46,9 (C-4) ; 45,8 (C-13) ; 41,2 (C-22) ; 40,4 (C-12) ; 36,4 (C-2) ; 34,0 (C-20) ; 32,8 (C-1) ; 28,8 (C-9) ; 27,7 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,4 (C-11) ; 22,2 (C-15) ; 19,7 (C-21) ; 18,2 (C-30) ; 12,1 (C-18) ; -4,6 (C-29)

**MS (CI) :** 529 [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> ; 473 [MH]<sup>+</sup> ; 341 [MH-TBDMSOH]<sup>+</sup>

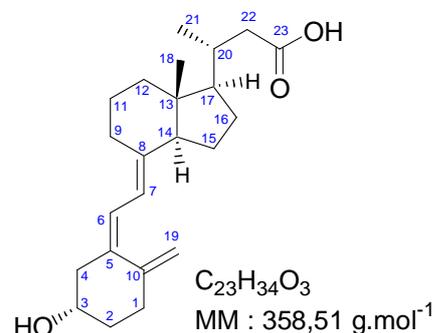
**HRMS (CI) :** Calculée pour  $C_{29}H_{49}O_3Si^{1+}$  .....473,3451  
mesurée .....473,3451

**CLHP**( $C_{18}$ ) : Tr= 11 mn (MeOH/AcOH 100:0,5%)

**22-COOH vitamine D 36 :**

*acide 3 $\beta$ -hydroxy-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-23-oïque*

L'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle **35** est déprotégé par le TBAF 1 M en solution dans le THF en suivant le même protocole que pour la 20-COOH vitamine D **20**. 0,349 g (0,74 mmol) de l'éther fournissent après chromatographie (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 70:30:0,5 -> 50:50:0,5) 182 mg de l'alcool **36** (69%, meringue blanche) qui est purifié par CLHP préparative sur colonne C18.



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 50/50/0,5) : Rf = 0,45

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 6,23 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 6,03 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, d, J= 1,1 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,82 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,95 (1H, m, J= 7,3 ; 3,7 Hz, 3α-CHOH) ; 2,83 (1H, dd, J= 12,1 ; 3,6 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,58 (1H, dd, J= 13,2 ; 3,7 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,42 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 13,2 ; 7,3 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,18 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 1,04 (3H, d, J= 5,1 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,58 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 184,2 (C-32) ; 145,1 (C-10) ; 141,7 (C-8) ; 135,4 (C-5) ; 122,3 (C-6) ; 117,8 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,3 (C-3) ; 56,3 (C-14) ; 56,2 (C-17) ; 45,9 (C-4) ; 45,9 (C-13) ; 40,4 (C-12) ; 35,2 (C-2) ; 34,0 (C-20) ; 31,9 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 27,7 (C-16) ; 23,5 (C-11) ; 22,2 (C-15) ; 19,7 (C-21) ; 12,0 (C-18)

**MS** (CI) : 415 [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> ; 359 [MH]<sup>+</sup> ; 341 [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

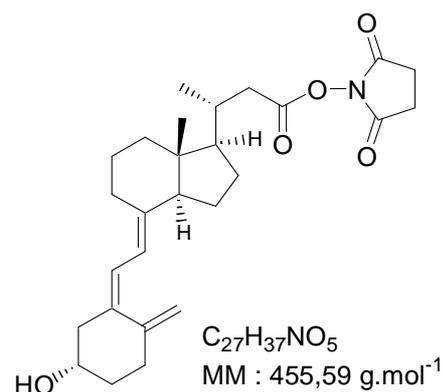
**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>O<sub>3</sub><sup>1+</sup> ..... 359,2586  
mesurée ..... 359,2594

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 10 mn (MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5%)

### 22-CO-NHS vitamine D **42** :

*Ester de N-hydroxysuccinimide de l'acide 3β-hydroxy-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-23-oïque*

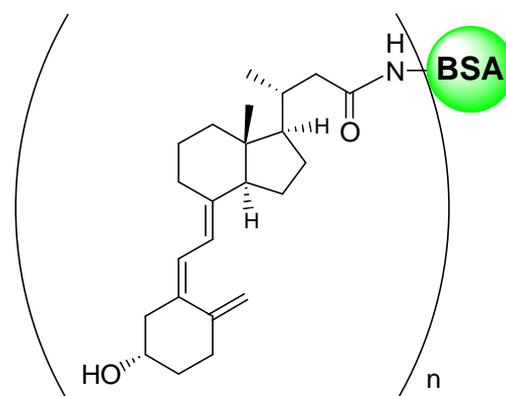
L'ester activé **42** est préparé de la même manière que l'ester activé **21** par couplage de l'acide carboxylique **36** (91 mg ; 0,25 mmol ; 1 éq.) au N-hydroxysuccinimide (35 mg ; 0,31 mmol ; 1,2 éq.) en présence de DCC. Il est purifié sur colonne de silice et élué par (éther de pétrole-AcOEt 50:50) pour donner 98 mg de 22-CO-NHS vitamine D **42** (Rdt : 84%).



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 70/30) : Rf = 0,38

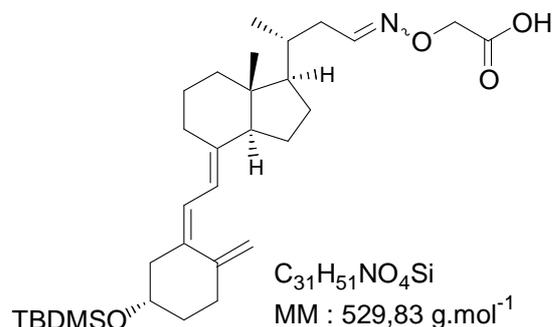
### 3<sup>ème</sup> Immunogène : conjugué 22-CO-BSA vitamine D - BSA **43** :

Le 3<sup>ème</sup> immunogène est préparé de la même manière que le 1<sup>er</sup> (20-CO-BSA vitamine D **22**) par couplage de l'ester activé **42** (98 mg ; 0,22 mmol ; 50 éq.) sur la BSA (288 mg ; 4,30 μmol ; 1 éq.). Après la première série de dialyse pour éliminer le THF entre autre, l'immunogène est purifié de la même manière puis dialysé contre de l'eau et lyophilisé. L'immunogène est entièrement soluble dans l'eau, il n'y a pas de fraction dénaturée.



**23-CMO triène 37 :****23-O-(carboxyméthyl)oxyimino-3β-[(t-butyl diméthylsilyl)oxy]-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène**

Le 22-CHO triène **34** (0,482 g ; 1,06 mmol ; 1 éq.) et l'hémi-chlorhydrate de carboxyméthoxylamine (0,138 g ; 0,63 mmol ; 1,2 éq.) sont séchés sous vide avant d'être dissous dans le dichlorométhane anhydre sous azote. Sous agitation et à 0°C, la pyridine conditionnée sur tamis moléculaire (1,7 mL ; 21,1 mmol ; 20 éq.) est ajoutée. La réaction est laissée 1,5 h à 0°C, puis 30 mn à température ambiante. Une CCM montre la disparition de l'aldéhyde (éther de pétrole-AcOEt 95:5) et l'apparition de l'acide (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 70:30:0,5). Le milieu réactionnel est évaporé à sec (azéotrope pyridine-heptane). Les sous-produits apolaires sont éliminés par lavage avec un mélange (éther de pétrole-AcOEt 90:10) sur silice pour retenir le produit, puis le produit est élué par un mélange (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 70:30:0,5). Le filtrat est évaporé sous vide à 30°C et les traces d'acide acétique éliminées par son azéotrope avec l'hexane. Le produit obtenu est purifié par chromatoflash (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 70:30:0,5) pour donner le 23-CMO triène **37** sous forme d'un solide blanc (0,504 g ; Rdt : 90%).



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 70/30/0,5) : Rf = 0,16

**MS** (ESI<sup>+</sup>) : 568 [M+K]<sup>+</sup> ; 552 [M+Na]<sup>+</sup> ; 530 [MH]<sup>+</sup> ; 398 [MH-TBDMSOH]<sup>+</sup>

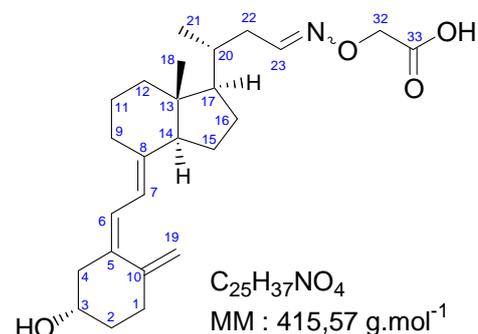
**HRMS** (LSIMS<sup>+</sup>, thioglycérol+AcONa) : Calculée pour  $C_{31}H_{50}NNa_2O_4Si^{1+}$  .....574,3304  
mesurée .....574,3306

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 10,5 mn (MeOH/AcOH 100:0,5%) 23(E)-CMO triène

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 11 mn (MeOH/AcOH 100:0,5%) 23(Z)-CMO triène

**23-CMO vitamine D 38 :****23-O-(carboxyméthyl)oxyimino-3β-hydroxy-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène**

Le 23-CMO triène **37** est dissous dans le THF non-stabilisé. Sous azote et sous agitation, le TBAF 1 M dans le THF (2,4 mL ; 2,4 mmol ; 3 éq.) est ajouté à 0°C. La réaction est laissée une nuit à température ambiante et 1 heure à 50°C avant d'être partiellement évaporée par balayage d'azote. Le milieu réactionnel est alors dilué dans un mélange de MTBE et de saumure dont la phase organique est séparée pour être lavée deux fois à la saumure (les phases aqueuses sont contre-extraites par du MTBE). Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées sur silice et évaporées sous vide à 30°C. Le brut est purifié sur colonne de silice et élué par un gradient (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 70:30:0,5 -> 50:50:0,5) pour donner un solide blanc de 23-CMO vitamine D **38** quasi-pur (0,279 g ; Rdt : 84%).



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 50/50/0,5) : Rf = 0,18

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7,523 et 6,7806 (1H, dd, J= 7,6 ; 5,7 Hz, 23-CH) ; 6,23 (1H, d, J= 11,1 Hz, 6-CH) ; 6,03 (1H, d, J= 11,1 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, t, J= 1,1 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,81 (1H, d, J=

2,3 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 4,6014 et 4,6321 (2H, s, 32-OCH<sub>2</sub>) ; 3,96 (1H, m, J= 7,5 ; 3,6 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 2,83 (1H, dd, J= 12,1 ; 3,3 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,58 (1H, dd, J= 13,4 ; 3,6 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,37 (1H, m, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 13,4 ; 7,5 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (1H, m, 1 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,00 (3H, d, J= 6,4 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,56 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 152,7 (C-23) ; 145,0 (C-10) ; 141,8 (C-8) ; 135,3 (C-5) ; 122,4 (C-6) ; 117,7 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,3 (C-3) ; 56,2 (C-14) ; 56,2 (C-17) ; 45,9 (C-13) ; 45,9 (C-4) ; 40,3 (C-12) ; 35,7 (C-22) ; 35,1 (C-2) ; 34,8 (C-20) ; 31,9 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 27,6 (C-16) ; 23,5 (C-11) ; 22,2 (C-15) ; 19,1 (C-21) ; 12,0 (C-18)

**MS** (ESI<sup>+</sup>) : 853 [2M+Na]<sup>+</sup> ; 438 [M+Na]<sup>+</sup> ; 416 [MH]<sup>+</sup> ; 398 [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

**HRMS** (LSIMS<sup>+</sup>, thioglycérol) : Calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>4</sub><sup>1+</sup> ..... 416,2801  
mesurée ..... 416,2802

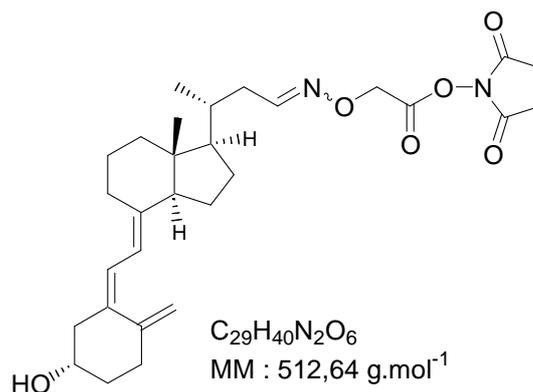
**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 15,5 mn (MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5%) 23(*E*)-CMO vitamine D

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 16,5 mn (MeOH/eau/AcOH 80:20:0,5%) 23(*Z*)-CMO vitamine D

#### 23-CMO-NHS vitamine D **44** :

*Ester de N-hydroxysuccinimide du 23-O-(carboxyméthyl)oxymino-3 $\beta$ -hydroxy-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène*

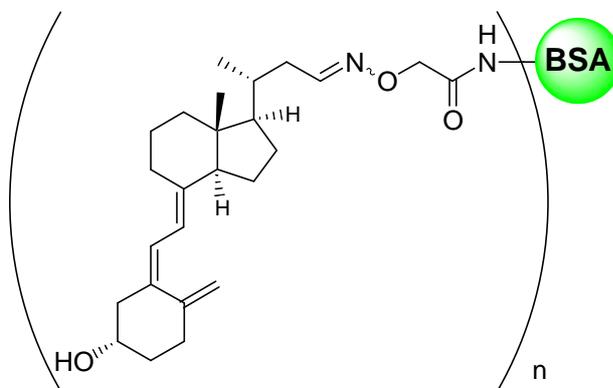
L'ester activé **44** est préparé de la même manière que l'ester activé **21** par couplage de l'acide carboxylique **38** (80 mg ; 0,22 mmol ; 1 éq.) au N-hydroxysuccinimide (31 mg ; 0,27 mmol ; 1,2 éq.) en présence de DCC. Il est purifié sur colonne de silice et élué par (éther de pétrole-AcOEt 50:50) pour donner la 23-CMO-NHS vitamine D **44** (96 mg ; Rdt : 84%).



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 50/50) : R<sub>f</sub> = 0,36

#### 4<sup>ème</sup> Immunogène : conjugué 23-CMO-BSA vitamine D - BSA **45** :

Le 4<sup>ème</sup> immunogène est préparé de la même manière que le 1<sup>er</sup> (20-CO-BSA vitamine D **22**) par couplage de l'ester activé **44** (60 mg ; 0,12 mmol ; 50 éq.) sur la BSA (157 mg ; 2,34  $\mu$ mol ; 1 éq.). Après la première série de dialyse pour éliminer le THF entre autre, l'immunogène est purifié de la même manière puis dialysé contre de l'eau et lyophilisé. L'immunogène est entièrement soluble dans l'eau, il n'y a pas de fraction dénaturée (191,4 mg).

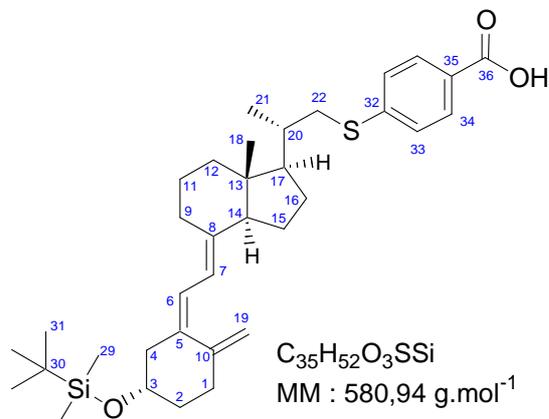


**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 50/50) : R<sub>f</sub> = 0,36

22-(S-Bz-COOH) triène **39** :

acide 3 $\beta$ -[(t-butyl diméthylsilyl)oxy]-22-(4-mercaptobenzoïque)-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

Dans un ballon de 50 mL, l'acide 4-mercaptobenzoïque (206 mg ; 1,3 mmol ; 2 éq.) et le bicarbonate de sodium (224 mg ; 2,7 mmol ; 4 éq.) sont séchés sous vide puis le DMSO anhydre sur tamis moléculaire (6,7 mL ; 0,1 M) est ajouté. L'ensemble placé 5 mn aux ultra-sons. Le 22-OpTs triène **32** solide (400 mg ; 0,67 mmol ; 1 éq.) est ensuite rapidement introduit. La suspension est alors agitée 4 h à température ambiante, puis 20 h à 50°C sous azote. Le milieu réactionnel est alors additionné de MTBE, de saumure et d'une solution aqueuse d'HCl 1 M jusqu'à pH acide. La phase organique est séparée et la phase aqueuse extraite à nouveau au MTBE. Les phases organiques regroupées sont lavées 3 fois à la saumure, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées sur silice et évaporées sous vide. Ce produit est chromatographié sur colonne de silice, éluée par un gradient (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 90:10:0,5 -> 80:20:0,5) pour donner le 22-(S-Bz-COOH) triène **39** (136 mg ; Rdt : 35%) sous forme d'un solide blanc.



CCM (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 80/20/0,5) : R<sub>f</sub> = 0,26

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7,97 (2H, d, J = 8,4 Hz, 34-CH) ; 7,31 (2H, d, J = 8,4 Hz, 33-CH) ; 6,16 (1H, d, J = 11,0 Hz, 6-CH) ; 6,03 (1H, d, J = 11,0 Hz, 7-CH) ; 5,01 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,77 (1H, d, J = 1,5 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,82 (1H, m, J = 9,1 ; 4,0 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 3,21 (1H, dd, J = 12,0 ; 2,6 Hz, 22-CH<sub>2</sub>S) ; 2,84 (1H, dd, J = 12,0 ; 3,3 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,72 (1H, dd, J = 12,0 ; 8,8 Hz, 22-CH<sub>2</sub>S) ; 2,45 (1H, dd, J = 12,8 ; 4,0 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,35 (1H, m, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,25 (1H, dd, J = 12,8 ; 9,1 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,14 (3H, d, J = 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,89 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,57 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 171,8 (C-36) ; 146,4 (C-32) ; 145,4 (C-10) ; 140,8 (C-8) ; 136,7 (C-5) ; 130,4 (C-34) ; 126,3 (C-33) ; 125,5 (C-35) ; 121,3 (C-6) ; 118,1 (C-7) ; 112,2 (C-19) ; 70,6 (C-3) ; 56,1 (C-14) ; 55,8 (C-17) ; 46,9 (C-4) ; 46,0 (C-13) ; 40,4 (C-12) ; 39,4 (C-22) ; 36,5 (C-20) ; 36,4 (C-2) ; 32,7 (C-1) ; 28,8 (C-9) ; 27,6 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,4 (C-11) ; 22,2 (C-15) ; 19,1 (C-21) ; 18,2 (C-30) ; 12,1 (C-18) ; -4,6 (C-29)

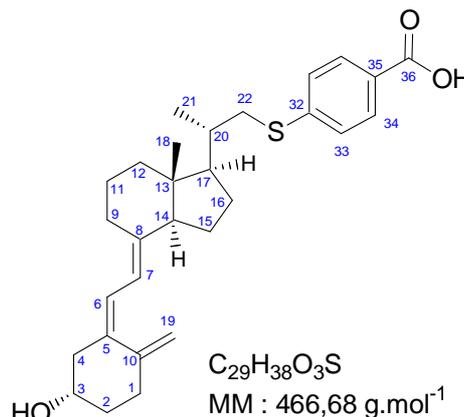
**MS** (LSIMS, thioglycérol+AcONa) : 625 [M+2Na]<sup>+</sup>

**HRMS** (LSIMS+, thioglycérol+AcONa) : Calculée pour C<sub>35</sub>H<sub>51</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub>SSi<sup>1+</sup> .....625,3124  
mesurée .....625,3128

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 22 mn (MeOH/AcOH 100:0,5%)

22-(*S*-Bz-COOH) vitamine D **40** :acide 3 $\beta$ -hydroxy-22-(4-mercaptobenzoïque)-24-nor-9,10-secochola-5(*E*),7(*E*),10(19)-triène

L'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle **39** est déprotégé par le TBAF 1 M en solution dans le THF en suivant le même protocole que pour la 20-COOH vitamine D **20**. 20 mg (34  $\mu$ mol) de l'éther fournissent après chromatographie (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 70:30:0,5  $\rightarrow$  50:50:0,5) 14 mg de l'alcool **40** (88%, meringue blanche) qui est purifié par CLHP préparative sur colonne C18.



CCM (Ether de pétrole/AcOEt/AcOH 50/50/0,5) : Rf = 0,47

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  = 7,97 (2H, d, J= 8,5 Hz, 34-CH) ; 7,31 (2H, d, J= 8,5 Hz, 33-CH) ; 6,23 (1H, d, J= 11,0 Hz, 6-CH) ; 6,05 (1H, d, J= 11,0 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, t, J= 1,1 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,82 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,96 (1H, m, J= 7,6 ; 3,8 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 3,22 (1H, dd, J=12,0 ; 2,8 Hz, 22-CH<sub>2</sub>S) ; 2,83 (1H, dd, J= 12,0 ; 4,1 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,73 (1H, dd, J= 12,0 ; 8,8 Hz, 22-CH<sub>2</sub>S) ; 2,58 (1H, dd, J= 12,9 ; 3,8 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, c, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 12,9 ; 7,6 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,18 (1H, c, 1 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,03 (1H, c, 14-CH) ; 2,01 (1H, c, 12 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,92 (1H, c, 2 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,92 (1H, c, 16 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,80 (1H, c, 20-CH) ; 1,70 (1H, c, 9 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,70 (1H, c, 11 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,68 (1H, c, 2 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,56 (1H, c, 11 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,54 (1H, c, 15 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,54 (1H, c, 15 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,50 (1H, c, 17-CH) ; 1,37 (1H, c, 12 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,35 (1H, c, 16 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,14 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,56 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  = 145,2 (C-10) ; 141,6 (C-8) ; 135,9 (C-5) ; 130,2 (C-34) ; 126,7 (C-33) ; 122,0 (C-6) ; 118,0 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,4 (C-3) ; 56,2 (C-14) ; 56,0 (C-17) ; 46,2 (C-13) ; 45,9 (C-4) ; 40,4 (C-12) ; 39,8 (C-22) ; 36,6 (C-20) ; 35,3 (C-2) ; 32,4 (C-1) ; 29,0 (C-9) ; 27,7 (C-16) ; 23,5 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 19,1 (C-21) ; 12,1 (C-18)

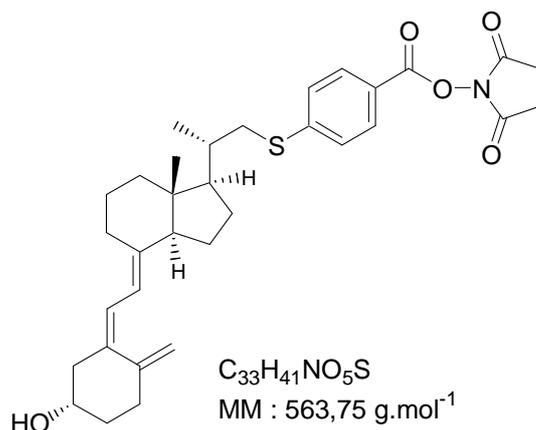
MS (CI) : 467 [MH]<sup>+</sup> ; 449 [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>O<sub>3</sub>S<sup>1+</sup> ..... 467,2620  
mesurée ..... 467,2621

CLHP(C<sub>18</sub>) : Tr= 10,5 mn (MeOH/eau/AcOH 90:10:0,5%)22-(*S*-Bz-CO-NHS) vitamine D **46** :Ester de *N*-hydroxysuccinimide de l'acide 3 $\beta$ -hydroxy-22-(4-mercaptobenzoïque)-24-nor-9,10-secochola-5(*E*),7(*E*),10(19)-triène

L'ester activé **46** est préparé de la même manière que l'ester activé **21** par couplage de l'acide carboxylique **40** (39 mg ; 84  $\mu$ mol ; 1 éq.) au *N*-hydroxysuccinimide (12 mg ; 100  $\mu$ mol ; 1,2 éq.) en présence de DCC. Il est purifié sur colonne de silice et élué par (éther de pétrole-AcOEt 50:50) pour donner 47 mg de 22-(*S*-Bz-CO-NHS) vitamine D **46** (Rdt : 100%).

CCM (Ether de pétrole/AcOEt 50/50) : Rf = 0,29

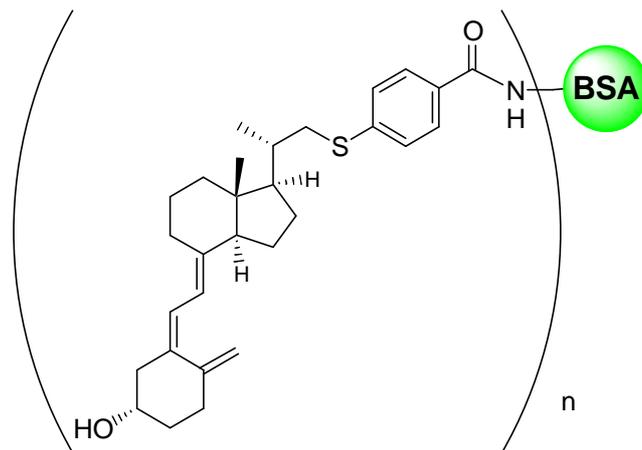


*5<sup>ème</sup> immunogène : conjugué 22-(S-Bz-CO-BSA) vitamine D - BSA 47 :*

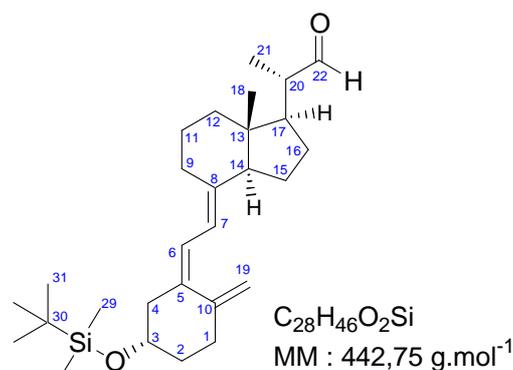
Le 5<sup>ème</sup> immunogène est préparé de la même manière que le 1<sup>er</sup> (20-CO-BSA vitamine D **22**) par couplage de l'ester activé **46** (47 mg ; 0,083 mmol ; 50 éq.) sur la BSA (112 mg ; 1,67  $\mu$ mol ; 1 éq.). Après la première série de dialyse pour éliminer le THF entre autre, l'immunogène est purifié de la même manière puis dialysé contre de l'eau et lyophilisé.

Fraction dénaturée : 67,7 mg

Immunogène soluble : 58 mg

*Triènol **48** (20-CHO triène) :**3 $\beta$ -[(t-butyl)diméthylsilyl]oxy]-23,24-dinor-9,10-secochola-5,7(E),10(19)-trièn-22-al*

L'acide iodoxybenzoïque<sup>119</sup> (0,126 g ; 0,45 mmol ; 2 éq.) est dissous dans le DMSO (2,2 mL ; c=0,1 M). Après dissolution totale, l'alcool **31** (0,100 mg ; 0,23 mmol ; 1 éq.) est ajouté à température ambiante. La réaction est terminée au bout de 1 h et le brut réactionnel est extrait 3 fois par l'éther de pétrole. Les phases d'éther de pétrole sont regroupées, extraites 2 fois par un mélange de saumure et d'une solution saturée de bicarbonate de sodium et 2 fois à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée sous vide pour donner l'aldéhyde **48** (0,089 g, Rdt : 89%). La purification par flash chromatographie sur silice (éther de pétrole-AcOEt 100:2 -> 95:5) donne 68 mg (Rdt : 68%) de l'aldéhyde **48** sous forme d'une meringue blanche.



CCM (Ether de pétrole/AcOEt 100/2) : Rf = 0,18

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 6,15 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 6,03 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,01 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,77 (1H, s, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,82 (1H, m, J= 9,1 ; 4,3 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 2,85 (1H, dd, J= 11,7 ; 3,6 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,45 (1H, dd, J= 12,4 ; 4,3 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,37 (1H, m, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,24 (1H, dd, J= 12,4 ; 9,1 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,14 (3H, d, J= 7,0 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,89 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,60 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 205,0 (C-22) ; 145,4 (C-10) ; 140,3 (C-8) ; 137,0 (C-5) ; 121,2 (C-6) ; 118,3 (C-7) ; 112,2 (C-19) ; 70,6 (C-3) ; 55,6 (C-14) ; 51,4 (C-17) ; 49,8 (C-20) ; 46,9 (C-4) ; 46,2 (C-13) ; 40,3 (C-12) ; 36,4 (C-2) ; 32,7 (C-1) ; 28,8 (C-9) ; 26,5 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,3 (C-11) ; 22,6 (C-15) ; 18,2 (C-30) ; 13,6 (C-21) ; 12,5 (C-18) ; -4,6 (C-29)

**MS** (CI) : 499 [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> ; 443 [MH]<sup>+</sup> ; 311 [MH-TBDMSOH]<sup>+</sup>

**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>O<sub>2</sub>Si<sup>+</sup> .....443,3345  
mesurée .....443,3347

<sup>119</sup> Gracieusement fourni par S. LAURENT (LCO I) et préparé selon le protocole : Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538.

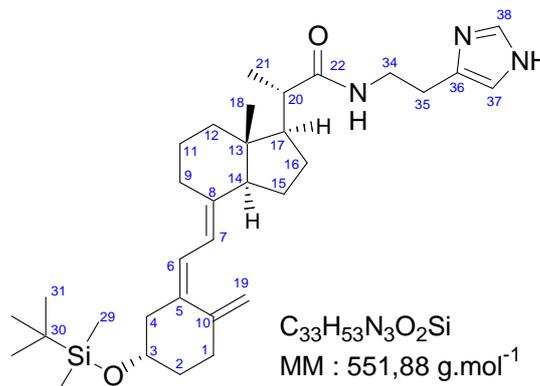
**20-CO-histamine triène 57:**

*3β-[(t-butyl diméthylsilyl)oxy]-22-N-histamine-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène-22-amide*

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7,57 (1H, s, 38-CH) ; 6,81 (1H, s, 37-CH) ; 6,15 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 5,99 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,00 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,76 (1H, s, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,82 (1H, m, J= 9,1 ; 4,0 Hz, 3α-CHOH) ; 3,52 (2H, c, 34-CH<sub>2</sub>) ; 2,83 (1H, c, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,81 (2H, t, J= 6,6 Hz, 35-CH<sub>2</sub>) ; 2,45 (1H, dd, J= 12,4 ; 4,0 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,24 (1H, dd, J= 12,4 ; 9,1 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 1,16 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,88 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,54 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

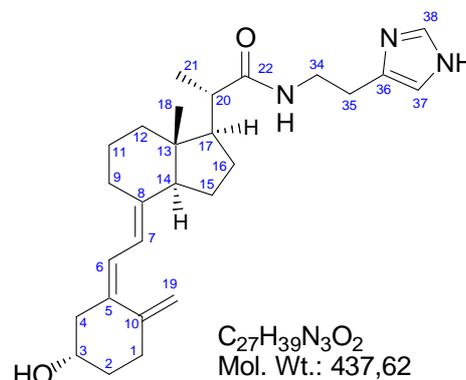
**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 177,0 (C-22) ; 145,3 (C-10) ; 140,8 (C-8) ; 136,6 (C-5) ; 121,3 (C-6) ; 118,1 (C-7) ; 112,2 (C-19) ; 70,6 (C-3) ; 55,8 (C-14) ; 53,2 (C-17) ; 45,9 (C-4) ; 45,6 (C-13) ; 45,2 (C-20) ; 40,4 (C-12) ; 36,4 (C-2) ; 32,8 (C-1) ; 28,9 (C-35) ; 28,8 (C-9) ; 27,0 (C-34) ; 26,8 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,3 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 18,2 (C-30) ; 17,8 (C-21) ; 12,3 (C-18) ; -4,6 (C-29)

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 6,5 mn (MeOH 100%)

**20-CO-histamine vitamine D 58 :**

*3β-hydroxy-22-N-histamine-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène-22-amide*

La 20-CO-NHS vitamine D **21** (30 mg ; 68 μmol ; 1 éq.) et l'histamine (15 mg ; 0,136 mmol ; 2 éq.) sont dissoutes dans le THF non-stabilisé (1,36 mL ; 0,05 M) et une solution aqueuse 0,1 M de bicarbonate de sodium (1,36 mL ; 0,05 M). Après une nuit à 4°C, l'ester activé est encore visible en CCM (éther de pétrole-AcOEt 50:50), l'histamine (38 mg ; 0,34 mmol ; 5 éq.) est ajoutée. Après 40 heures, la réaction est finie, le milieu réactionnel évaporé sous vide à 30°C, le résidu déposé sur colonne de silice est élué par (chloroforme-méthanol-ammoniaque 28% 90:10:1) pour donner la 20-CO-histamine vitamine D **58** (24 mg ; 80%).



**CCM** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> aq. 80/20/1) : R<sub>f</sub> = 0,60

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7,58 (1H, s, 38-CH) ; 6,82 (1H, s, 37-CH) ; 6,22 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 6,01 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,04 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 4,80 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 3,94 (1H, m, J= 7,9 ; 3,8 Hz, 3α-CHOH) ; 3,53 (2H, m, J= 6,3 Hz, 34-CH<sub>2</sub>) ; 2,83 (1H, c, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,81 (2H, t, J= 6,3 Hz, 37-CH<sub>2</sub>) ; 2,70 (1H, q, J= 7,1 Hz, 20-CH) ; 2,57 (1H, dd, J= 13,0 ; 3,4 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 13,0 ; 7,8 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 2,08 (1H, dd, J= 10,1 ; 6,6 Hz) ; 2,03 (1H, dd, J= 10,1 Hz) ; 1,15 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,54 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 145,1 (C-10) ; 141,5 (C-8) ; 135,5 (C-5) ; 122,3 (C-6) ; 117,8 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,2 (C-3) ; 55,9 (C-14) ; 53,3 (C-17) ; 46,0 (C-4) ; 45,7 (C-13) ; 45,2 (C-20) ; 40,3 (C-12) ; 35,2 (C-2) ; 32,0 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 26,8 (C-16) ; 23,4 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 17,8 (C-21) ; 12,2 (C-18)

**MS** (CI) : 494 [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> ; 438 [MH]<sup>+</sup>

**HRMS (CI) :** Calculée pour  $C_{27}H_{39}N_3O_2^{1+}$  .....438,3121  
mesurée .....438,3121

**CLHP**( $C_{18}$ ) : Tr= 10,7 mn (MeOH/eau/ $Et_3N$  70:30:0,1‰)

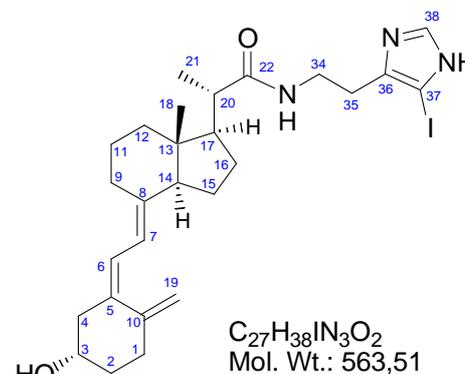
20-CO-(5-iodohistamine) vitamine D **59** :

3 $\beta$ -hydroxy-22-N-(5-iodohistamine)-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-22-amide

Les dérivés histaminés sont aliquotés dans le méthanol sur le fond des tubes puis séchés sous azote et sous vide. Les solutions doivent être ajoutées sur le fond du tube à la micropipette, tout en mélangeant au vortex.

Les produits sont stables à  $-18^\circ C$  et ne semblent pas se dégrader en solution diluée dans le méthanol.

A un tube contenant la 20-CO-histamine vitamine D **58** (ref SPL 188PP1) (**10**  $\mu g$  ; 23 nmol ; 1 éq.) sont ajoutés (23  $\mu L$  ; 1 mM) de méthanol puis (11,5  $\mu L$  ; 11 nmol ; 0,5 éq.) d'une solution d'iodure de sodium aqueux à 1 mM sous agitation au Vortex, à température ambiante. La solution de chloramine T (10,5  $\mu L$  ; 46 nmol ; 2 éq.) à 1 mg/mL dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 est ajoutée sous agitation vigoureuse au Vortex. Après deux minutes, la réaction est stoppée par l'ajout sur le fond du tube d'une solution de métabisulfite de sodium (9  $\mu L$  ; 229 nmol ; 10 éq.) à 5 mg/mL dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Le milieu réactionnel est prélevé et injecté en CLHP.



A un tube contenant la 20-CO-histamine vitamine D **58** (ref SPL 205A) (**0,5**  $\mu g$  ; 1,1 nmol ; 1 éq.) sont ajoutés 23  $\mu L$  (0,05 mM) de méthanol puis 11,5  $\mu L$  (0,57 nmol ; 0,5 éq.) d'une solution d'iodure de sodium à 50  $\mu M$  dans la soude aqueuse à pH 7-11 sous agitation au Vortex et à température ambiante. La solution de chloramine T (10,5  $\mu L$  ; 45,7 nmol ; 40 éq.) à 1 mg/mL dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 est ajoutée sous agitation vigoureuse au Vortex. Après deux minutes, la réaction est stoppée par l'ajout sur le fond du tube d'une solution de métabisulfite de sodium (9  $\mu L$  ; 229 nmol ; 200 éq.) à 5 mg/mL dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Le milieu réactionnel est prélevé et injecté en CLHP.

**RMN- $^1H$**  (300 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  = 7,54 (1H, s, 38-CH) ; 6,21 (1H, d, J= 11,6 Hz, 6-CH) ; 6,01 (1H, d, J= 11,6 Hz, 7-CH) ; 5,03 (1H, s, 19E- $CH_2$ ) ; 4,79 (1H, d, J= 1,9 Hz, 19Z- $CH_2$ ) ; 2,84 (1H, d, J= 13,2 Hz, 9 $\beta$ - $CH_2$ ) ; 2,76 (2H, m, 35- $CH_2$ ) ; 2,61 (1H, dd, J= 13,1 ; 4,1 Hz, 4 $\alpha$ - $CH_2$ ) ; 2,39 (1H, dt, J= 13,9 ; 5,0 Hz, 1 $\beta$ - $CH_2$ ) ; 2,25 (1H, dd, J= 12,2 ; 8,8 Hz, 4 $\beta$ - $CH_2$ ) ; 2,14 (1H, m, 1 $\alpha$ - $CH_2$ ) ; 1,15 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21- $CH_3$ ) ; 0,55 (3H, s, 18- $CH_3$ )

**RMN- $^{13}C$**  (75 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  = 145,2 (C-10) ; 141,3 (C-8) ; 136,1 (C-5) ; 121,9 (C-6) ; 118,1 (C-7) ; 112,6 (C-19) ; 69,4 (C-3) ; 56,0 (C-14) ; 53,2 (C-17) ; 46,0 (C-4) ; 45,8 (C-13) ; 44,8 (C-20) ; 40,5 (C-12) ; 38,4 (C-34) ; 35,4 (C-2) ; 32,5 (C-1) ; 29,8 (C-35) ; 29,0 (C-9) ; 26,8 (C-16) ; 23,5 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 17,6 (C-21) ; 12,2 (C-18)

**MS** (ESI+) : 564 [MH] $^+$

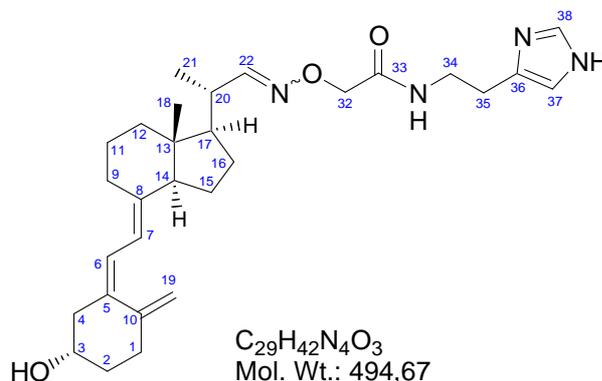
**HRMS (CI) :** Calculée pour  $C_{27}H_{39}IN_3O_2^{1+}$  .....564,2087  
mesurée .....564,2089

**CLHP**( $C_{18}$ ) : Tr= 14,5 mn (MeOH/eau/ $Et_3N$  70:30:0,1‰)

**22-CMO-histamine vitamine D 64 :**

22-O-[(N-histamine)-carbamoylméthyl]oxyimino-3 $\beta$ -hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

Le dérivé à ioder 22-CMO-histamine vitamine D **64** est préparé de la même manière que le dérivé à ioder 20-CO-histamine vitamine D **58**) par couplage de l'ester activé **28** (44 mg ; 88  $\mu$ mol ; 1 éq.) à l'histamine (49 mg ; 441  $\mu$ mol ; 5 éq.). Il est purifié sur colonne de silice et élué par (chloroforme-méthanol-ammoniaque 28% 90:10:1) puis par CLHP préparative pour donner 27 mg de 22-CMO-histamine vitamine D **64** (61%) Un aliquot est purifié par CLHP analytique préparative afin de garantir sa pureté lors des marquages à l'iode (125).



**CCM** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> aq. 80/20/1) : R<sub>f</sub> = 0,51

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7,54 (1H, s, 38-CH) ; 7,35 (1H, d, J= 8,1 Hz, 22E-CH) ; 6,82 (1H, s, 37-CH) ; 6,54 (1H, d, J= 8,4 Hz, 22Z-CH) ; 6,22 (1H, d, J= 11,0 Hz, 6-CH) ; 6,02 (1H, d, J= 11,0 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,80 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 4,46 (2H, s, 32-CH<sub>2</sub>) ; 3,97 (1H, m, J= 7,3 ; 3,7 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 3,59 (2H, m, J= 6,4 Hz, 34-CH<sub>2</sub>) ; 2,83 (1H, c, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,83 (2H, t, J= 6,4 Hz, 35-CH<sub>2</sub>) ; 2,58 (1H, dd, J= 13,2 ; 3,3 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,38 (1H, m, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,30 (1H, dd, J= 13,2 ; 7,3 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,18 (1H, m, 1 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,11 (3H, d, J= 7,0 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,56 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 170,2 (C-33) ; 157,8 (C-22) ; 145,1 (C-10) ; 141,1 (C-8) ; 135,8 (C-5) ; 134,8 (C-38) ; 122,1 (C-6) ; 118,0 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 72,5 (C-32) ; 69,1 (C-3) ; 56,1 (C-14) ; 54,1 (C-17) ; 45,9 (C-13) ; 45,8 (C-4) ; 40,2 (C-12) ; 38,8 (C-34) ; 37,4 (C-20) ; 35,1 (C-2) ; 31,9 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 26,9 (C-16) ; 23,4 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 18,0 (C-21) ; 12,3 (C-18)

**MS** (ESI<sup>+</sup>) : 495 [MH]<sup>+</sup> ; 989 [2M+H]<sup>+</sup> ; 1011 [2M+Na]<sup>+</sup>

**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>1+</sup> ..... 495,3335  
mesurée ..... 495,3337

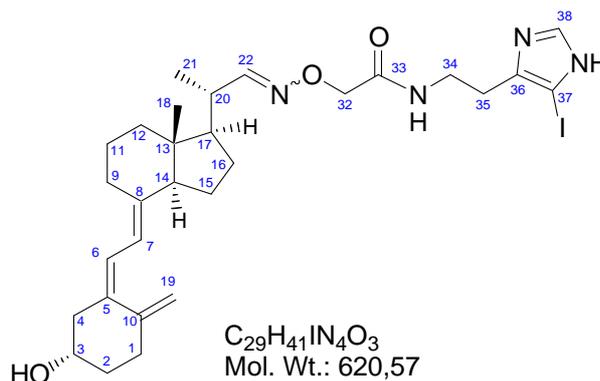
**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 12,5 mn (MeOH/eau/Et<sub>3</sub>N 75:25:0,1%)

**UV** :  $\epsilon_{265,5 \text{ nm}}$  = 16170 ;  $\epsilon_{266,5 \text{ nm}}$  = 16812

**22-CMO-(5-iodohistamine) vitamine D 65 :**

22-O-[(5-iodohistamine)-carbamoylméthyl]oxyimino-3 $\beta$ -hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

A un tube contenant la 22-CMO-histamine vitamine D **64** (ref SPL 208PP1) (**10  $\mu$ g** ; 20 nmol ; 1 éq.) sont ajoutés (40  $\mu$ L ; 0,5 mM) de méthanol puis (10  $\mu$ L ; 10 nmol ; 0,5 éq.) d'une solution d'iodure de sodium aqueux à 1 mM sous agitation au Vortex et à température ambiante. La solution de chloramine T (9,5  $\mu$ L ; 40 nmol ; 2 éq.) à 1 mg/mL dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 est ajoutée sous agitation vigoureuse au Vortex. Après deux minutes, la réaction est stoppée par l'ajout sur le fond du tube



d'une solution de métabisulfite de sodium (8  $\mu$ L ; 202 nmol ; 10  $\text{éq.}$ ) à 5 mg/mL dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Le milieu réactionnel est prélevé et injecté en CLHP.

**RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 7,53 (1H, s, J= Hz, 38-CH) ; 7,36 (1H, d, J= 8,2 Hz, 22-CH) ; 6,21 (1H, d, J= 10,9 Hz, 6-CH) ; 6,03 (1H, d, J= 10,9 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, s, 19E- $\text{CH}_2$ ) ; 4,81 (1H, d, J= 2,2 Hz, 19Z- $\text{CH}_2$ ) ; 4,46 (2H, s, 32- $\text{CH}_2$ ) ; 3,97 (1H, l, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 3,57 (2H, d, J= Hz, 34- $\text{CH}_2$ ) ; 2,85 (2H, s, 35- $\text{CH}_2$ ) ; 2,58 (1H, dd, J= 13,2 ; 2,8 Hz, 4 $\alpha$ - $\text{CH}_2$ ) ; 2,39 (1H, m, 1 $\beta$ - $\text{CH}_2$ ) ; 2,30 (1H, dd, J= 13,2 ; 7,6 Hz, 4 $\beta$ - $\text{CH}_2$ ) ; 2,18 (1H, m, 1 $\alpha$ - $\text{CH}_2$ ) ; 1,13 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21- $\text{CH}_3$ ) ; 0,58 (3H, s, 18- $\text{CH}_3$ )

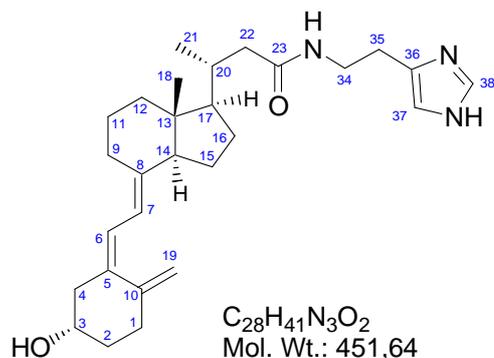
**RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 145,1 (C-10) ; 141,0 (C-8) ; 135,9 (C-5) ; 122,1 (C-6) ; 118,1 (C-7) ; 112,6 (C-19) ; 72,3 (C-32) ; 69,2 (C-3) ; 46,0 (C-13) ; 45,9 (C-4) ; 40,2 (C-12) ; 37,3 (C-20) ; 35,2 (C-2) ; 31,9 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 27,0 (C-16) ; 23,4 (C-11) ; 22,4 (C-15) ; 18,1 (C-21) ; 12,4 (C-18)

**CLHP(C $_{18}$ )** : Tr= 15 mn (MeOH/eau/ $\text{Et}_3\text{N}$  75:25:0,1%)

22-CO-histamine vitamine D **66** :

3 $\beta$ -hydroxy-23-N-histamine-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-trièn-23-amide

Le dérivé à ioder 22-CO-histamine vitamine D **66** est préparé de la même manière que le dérivé à ioder 20-CO-histamine vitamine D **58** par couplage de l'ester activé **42** (18 mg ; 40  $\mu$ mol ; 1  $\text{éq.}$ ) à l'histamine (22 mg ; 198  $\mu$ mol ; 5  $\text{éq.}$ ). De la saumure est ajoutée et la phase aqueuse est extraite 3 fois au dichlorométhane. Les phases organiques regroupées sont séchées sur  $\text{MgSO}_4$  puis purifiées sur colonne de silice éluee par (chloroforme-méthanol-ammoniaque 28% 90:10:1). 6 mg de 22-CO-histamine vitamine D **66** (Rdt : 33%) sont collectés. Un aliquot est purifié par CLHP analytique préparative afin de garantir sa pureté lors des marquages à l'iode (125).



**CCM** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$  aq. 80/20/1) : Rf = 0,61

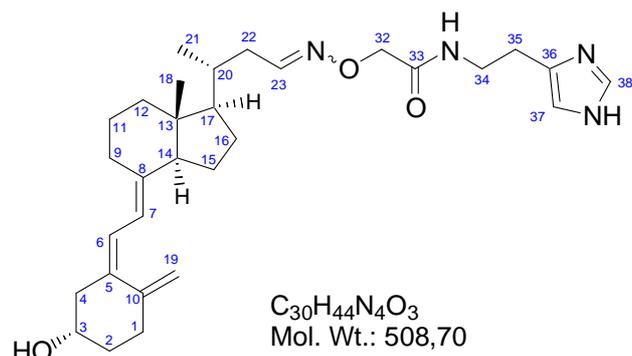
**CLHP(C $_{18}$ )** : Tr= 16 mn (MeOH/eau/ $\text{Et}_3\text{N}$  70:30:0,1%)

**CLHP(C $_{18}$ )** : Tr= 8,5 mn (MeOH/eau/ $\text{Et}_3\text{N}$  75:25:0,1%)

23-CMO-histamine vitamine D **68** :

23-O-[(N-histamine)-carbamoylméthyl]oxyimino-3 $\beta$ -hydroxy-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

La 23-CMO-NHS vitamine D **44** (20 mg ; 39  $\mu$ mol ; 1  $\text{éq.}$ ) et l'histamine (22 mg ; 0,195 mmol ; 5  $\text{éq.}$ ) sont dissous dans le THF non-stabilisé (0,39 mL ; 0,1 M) et une solution aqueuse 0,1 M de bicarbonate de sodium (0,39 mL ; 0,1 M). Après 24 h à température ambiante, l'ester activé a disparu en CCM (éther de pétrole-AcOEt 50:50). Le milieu réactionnel évaporé par balayage d'azote à 35°C, le résidu aqueux additionné d'une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium est extraite 3 fois au dichlorométhane. Les phases organiques sous



regroupées, extraites 2 fois à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous azote à Ta pour donner la 23-CMO-histamine vitamine D **68** (20 mg ; 100% de rendement) sous forme d'une meringue blanche puis un aliquot est purifié par CLHP analytique préparative afin de garantir sa pureté lors des marquages à l'iode (125).

**CCM** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> aq. 80/20/0,5) : Rf = 0,80

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7,54 (1H, s, 38-CH) ; 7,5221 et 6,7569 (1H, dd, J= 6,3 ; 4,7 Hz, 23-CH) ; 6,81 (1H, s, 37-CH) ; 6,22 (1H, d, J= 11,0 Hz, 6-CH) ; 6,04 (1H, d, J= 11,0 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, d, J= 1,5 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,82 (1H, d, J= 1,5 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 4,4838 et 4,5298 (2H, s, 32-OCH<sub>2</sub>) ; 3,97 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,59 (2H, m, J= 6,0 Hz, 34-CH<sub>2</sub>) ; 2,83 (1H, c, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,83 (2H, t, J= 6,6 Hz, 35-CH<sub>2</sub>) ; 2,58 (1H, dd, J= 12,9 ; 2,2 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,41 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,30 (1H, dd, J= 13,5 ; 7,8 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,18 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 0,97 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,55 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 170,1 (C-33) ; 152,9 (C-23) ; 145,1 (C-10) ; 141,5 (C-8) ; 141,5 (C-36) ; 135,6 (C-5) ; 134,7 (C-38) ; 122,2 (C-6) ; 117,8 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 72,5 (C-32) ; 69,1 (C-3) ; 56,3 (C-14) ; 56,1 (C-17) ; 45,9 (C-4) ; 45,8 (C-13) ; 40,4 (C-12) ; 38,8 (C-34) ; 35,7 (C-22) ; 35,2 (C-2) ; 34,8 (C-20) ; 31,9 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 27,6 (C-16) ; 23,4 (C-11) ; 22,2 (C-15) ; 19,2 (C-21) ; 12,0 (C-18)

**MS** (ESI+) : 509 [MH]<sup>+</sup> ; 491 [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

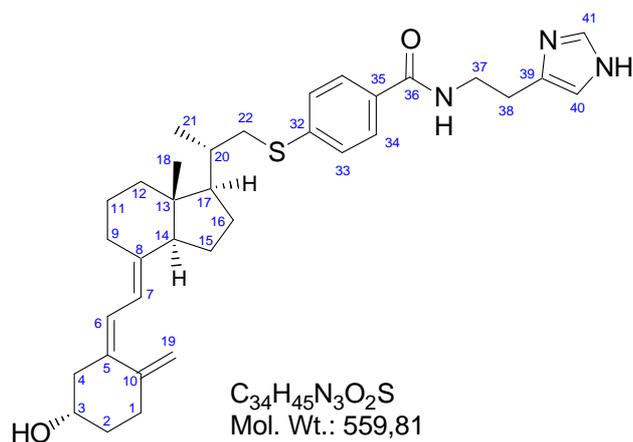
**HRMS** (LSIMS+, thioglycérol) : Calculée pour C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>1+</sup> ..... 509,3492  
mesurée ..... 509,3495

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 15,3 mn (MeOH/eau/Et<sub>3</sub>N 75:25:0,1%)

22-(S-Bz-CO-histamine) vitamine D **70** :

acide 3β-hydroxy-22-[(N-histamine)-4-mercaptobenzamide]-24-nor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

Le dérivé à ioder 22-(S-Bz-CO-histamine) vitamine D **70** est préparé de la même manière que le dérivé à ioder 23-CMO-histamine vitamine D **68** par couplage de l'ester activé **46** (9 mg ; 15 μmol ; 1 éq.) à l'histamine (8 mg ; 75 μmol ; 5 éq.). Un aliquot est purifié par CLHP analytique préparative afin de garantir sa pureté lors des marquages à l'iode (125).



**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7,70 (2H, d, J= 7,6 Hz, 34-CH) ; 7,61 (1H, s, 41-CH) ; 7,30 (2H, d, J= 7,6 Hz, 33-CH) ; 6,85 (1H, s, 40-CH) ; 6,23 (1H, d, J= 11,4 Hz, 6-CH) ; 6,04 (1H, d, J= 11,4 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,82 (1H, s, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,95 (1H, m, 3α-CHOH) ; 3,72 (2H, m, J= 6,0 Hz, 37-CH<sub>2</sub>) ; 3,18 (1H, d, J= 12,3 Hz, 22-CH<sub>2</sub>S) ; 2,91 (2H, t, J= 6,0 Hz, 38-CH<sub>2</sub>) ; 2,83 (1H, d, J= 13,2 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,69 (1H, dd, J= 12,3 Hz, 22-CH<sub>2</sub>S) ; 2,57 (1H, d, J= 12,6 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 12,6 ; 7,8 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 1,13 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,55 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 167,1 (C-36) ; 145,1 (C-10) ; 142,7 (C-32) ; 141,6 (C-8) ; 135,5 (C-5) ; 131,1 (C-35) ; 127,4 (C-33) ; 127,3 (C-34) ; 122,3 (C-6) ; 117,8 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,2 (C-3) ; 56,2 (C-14) ; 55,9 (C-17) ; 46,1 (C-13) ; 45,9 (C-4) ; 36,6 (C-20) ; 35,2 (C-2) ; 34,7 (C-41) ; 31,9 (C-1) ; 29,0 (C-9) ; 27,6 (C-16) ; 23,5 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 19,1 (C-21) ; 12,1 (C-18)

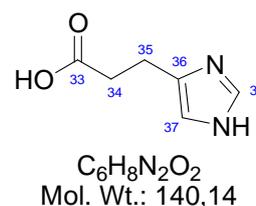
**MS** (LSIMS+, thioglycérol) : 560 [MH]<sup>+</sup>

**HRMS** (LSIMS+, thioglycérol) : Calculée pour C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>1+</sup> .....560,3311  
mesurée .....560,3304

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 7,5 mn (MeOH/eau/Et<sub>3</sub>N 90:10:0,1‰)

*Acide 3-(1H-imidazol-4-yl)-propionique 73 :*

Dans un tricol de 250 mL, l'acide urocannique **72** (5,48 g ; 39,7 mmol) est mis en suspension dans l'eau (80 mL ; 0,5M) au moyen des ultra-sons et en chauffant à 80°C sous azote. A cette suspension refroidie à température ambiante, est ajouté le catalyseur à base de palladium 10% sur charbon actif (0,548 g ; 10% wt). Le milieu réactionnel est balayé par un léger flux d'hydrogène puis laissé sous atmosphère d'hydrogène au moyen d'un ballon de baudruche sous agitation magnétique à 40°C pendant 3 h. La fin de la réaction est marquée par la disparition du spot CCM UV (chloroforme-méthanol 50/50 Rf : 0,5). Le ballon est alors refroidi à température ambiante et balayé par un flux d'azote. Le milieu réactionnel est filtré sur célite et le filtrat est concentré sous vide à 60°C à l'évaporateur rotatif avant d'être lyophilisé pour donner l'acide 3-(1H-imidazol-4-yl)-propionique **73** sous forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif.

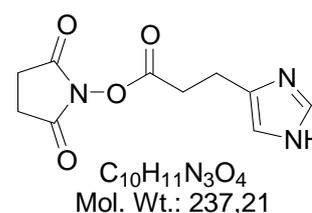


**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 8,55 (1H, d, J= 1,5 Hz, 38-CH) ; 7,21 (1H, s, 37-CH) ; 2,97 (1H, t, J= 7,2 Hz, 34-CH<sub>2</sub>) ; 2,58 (1H, t, J= 7,2 Hz, 35-CH<sub>2</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 183,6 (C-33) ; 136,3 (C-36) ; 135,6 (C-38) ; 118,0 (C-37) ; 38,7 (C-34) ; 23,8 (C-35)

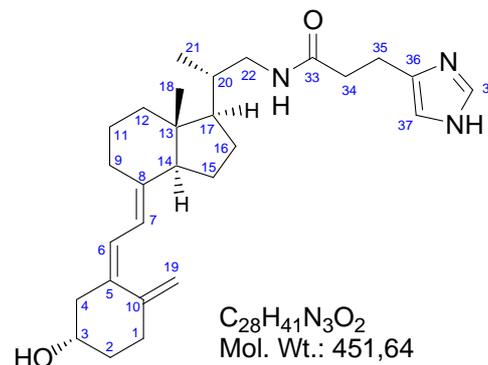
*N-hydroxysuccinimide 3-(1H-imidazol-4-yl)-propionate 74 :*

L'acide 3-(1H-imidazol-4-yl)-propionique **73** (20 mg ; 0,14 mmol ; 1 éq.) est placé en suspension dans le THF (1,4 mL ; c=0,1 M), puis le carbonate de N,N'-disuccinimide technique (55 mg ; 0,21 mmol ; 1,5 éq.) est ajouté à température ambiante sous agitation. Après 1 jour à Ta, le milieu réactionnel est stocké à 4°C. Un aliquot est évaporé par balayage d'azote. De l'eau est ajoutée et la phase aqueuse extraite 3 fois par du dichlorométhane. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporé pour donner le N-hydroxysuccinimide 3-(1H-imidazol-4-yl)-propionate **74**.



**22-NH-[3-(1H-Imidazol-4-yl)-propionate] vitamine D 75 :****3 $\beta$ -hydroxy-22-amino-N-[3-(1H-imidazol-4-yl)-propionamide]-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène**

Sur le même principe que pour l'obtention du dérivé à ioder 23-CMO-NHS vitamine D **44**, la 22-amino vitamine D **84** (3,6 mg ; 11  $\mu$ mol ; 1 éq.) est couplée à un excès d'ester de N-hydroxysuccinimide de l'acide 3-(1H-imidazol-4-yl)-propionique. La réaction est laissée 2 jours à 4°C et le milieu réactionnel est évaporé sous balayage d'azote. La totalité est dissoute dans le méthanol et purifié sur colonne CLHP analytique avec un gradient (MeOH/eau/Et<sub>3</sub>N 60:40:0,1%<sub>o</sub> -> 90:10:0,1%<sub>o</sub> en 40 mn) afin de garantir sa pureté lors des marquages à l'iode (125).



**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7,53 (1H, s, 38-CH) ; 6,80 (1H, s, 37-CH) ; 6,23 (1H, d, J= 11,4 Hz, 6-CH) ; 6,04 (1H, d, J= 11,4 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,82 (1H, s, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,96 (1H, m, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 3,73 (2H, m, J= 6,9 Hz, 34-CH<sub>2</sub>) ; 3,34 (1H, m, 22-CH<sub>2</sub>NH) ; 2,98 (1H, m, 22-CH<sub>2</sub>NH) ; 2,92 (2H, t, J= 6,6 Hz, 35-CH<sub>2</sub>) ; 2,83 (1H, d, J= 12,6 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,57 (1H, c, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,39 (1H, m, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 13,6 ; 7,6 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,18 (1H, m, 2 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 0,92 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,55 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 173,5 (C-33) ; 145,5 (C-10) ; 142,0 (C-8) ; 135,9 (C-5) ; 122,7 (C-6) ; 118,2 (C-7) ; 112,9 (C-19) ; 69,6 (C-3) ; 58,9 (C-22) ; 56,5 (C-14) ; 54,6 (C-17) ; 46,3 (C-13) ; 45,4 (C-4) ; 40,8 (C-12) ; 37,2 (C-20) ; 35,6 (C-2) ; 32,3 (C-1) ; 29,3 (C-9) ; 27,8 (C-16) ; 23,9 (C-11) ; 22,7 (C-15) ; 17,9 (C-21) ; 12,5 (C-18)

**MS** (LSIMS+, thioglycérol) : 452 [MH]<sup>+</sup>

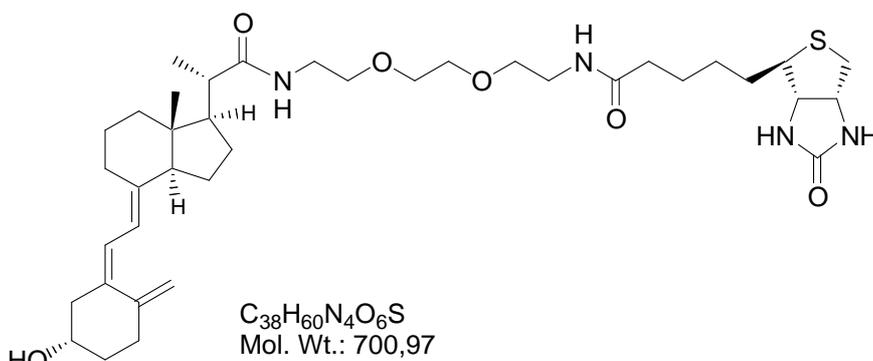
**HRMS** (LSIMS+, thioglycérol) : Calculée pour C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>1+</sup> ..... 452,3277  
mesurée ..... 452,3283

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 9 mn (MeOH/eau/Et<sub>3</sub>N 80:20:0,1%<sub>o</sub>)

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 11,3 mn (MeOH/eau/Et<sub>3</sub>N 75:25:0,1%<sub>o</sub>)

**20-CO-NH-PEO-biotine vitamine D 77 :****{N-biotinyl-[N-2,2'-(éthylènedioxy)bis(éthylamine)]}-3 $\beta$ -hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène-22-amide**

L'ester activé 20-CO-NHS vitamine D **21** (5,0 mg ; 11,3  $\mu$ mol ; 1 éq.) et la biotin-PEO-amine (Pierce-Perbio ref. 21346) (4,2 mg ; 11,3  $\mu$ mol ; 1 éq.) sont dissous dans le THF distillé (113  $\mu$ L ; 0,1 M) et une solution aqueuse de bicarbonate de sodium 0,1 M (113  $\mu$ L ; 0,1 M) et laissé sous azote 22 h à température ambiante puis 5 h supplémentaires à 40°C. Le milieu réactionnel est alors séché sous balayage d'azote à 35°C, repris



dans 100  $\mu\text{L}$  de méthanol (volume de la boucle d'injection) et injecté en CLHP sur une colonne analytique (Hypersil 56105-060 ; 250x4.6 mm 5 $\mu\text{m}$  Kromasil C18), éluée par un gradient de méthanol dans l'eau de 50% à 100% en 60 mn avec un débit de 1 mL/mn. Les fractions absorbant les UV à 264 nm sont collectées et évaporées sous azote à 35°C (SPL 292). Chacune des fractions est par la suite testée face à un anticorps anti-vitamine D pour vérifier la présence de vitamine D et révélé par la streptavidine – HRP pour vérifier la présence de la biotine. Seul les fractions 6 et 7 sont positives à ce test.

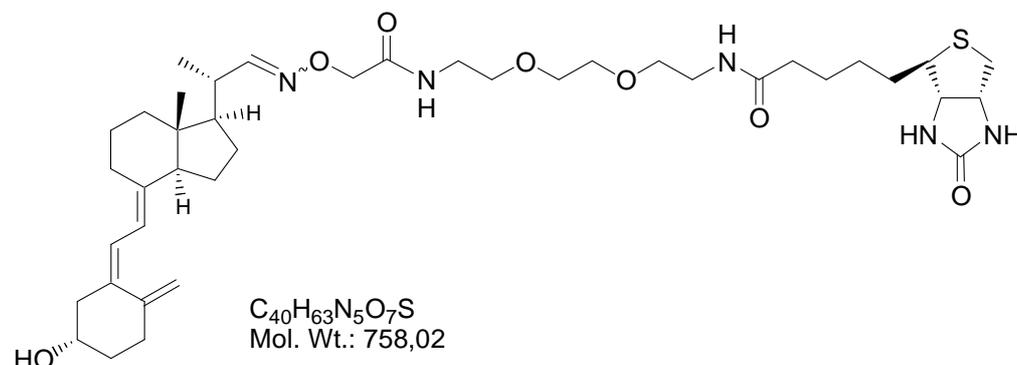
**MS** (ESI+) : 723 [M+Na]<sup>+</sup> ; 701 [MH]<sup>+</sup> ;

**HRMS** (LSIMS, glycérol) : Calculée pour C<sub>38</sub>H<sub>61</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sup>1+</sup> .....701,4312  
mesurée .....701,4334

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 11,2 mn (MeOH/eau 70:30)

**22-CMO-NH-PEO-biotine vitamine D 78 :**

*{N-biotinyl-[N-2,2'-(éthylènedioxy)bis(éthylamine)]}-22-O-(carbamoylméthyl)oxyimino- 3 $\beta$ -hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène*



L'ester activé 22-CMO-NHS vitamine D **28** (5,0 mg ; 10  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) et la biotin-PEO-amine (Pierce-Perbio ref. 21346) (3,8 mg ; 10  $\mu\text{mol}$  ; 1 éq.) sont dissous dans le THF distillé (100  $\mu\text{L}$  ; 0,1 M) et une solution aqueuse de bicarbonate de sodium 0,1 M (100  $\mu\text{L}$  ; 0,1 M) et laissé sous azote 22 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors séché sous balayage d'azote à 40°C, repris dans 100  $\mu\text{L}$  de méthanol (volume de la boucle d'injection) et injecté en CLHP sur une colonne analytique (Hypersil 56105-060 ; 250x4.6 mm 5 $\mu\text{m}$  Kromasil C18), éluée par un gradient de méthanol dans l'eau de 50% à 100% en 60 mn avec un débit de 1 mL/mn. Les fractions absorbant les UV à 264 nm sont collectées et évaporées sous azote à 35°C (SPL 293). Chacune des fractions est par la suite testée face à un anticorps anti-vitamine D pour vérifier la présence de vitamine D et révélé par la streptavidine – HRP pour vérifier la présence de la biotine. Seul les fractions 12, 17 et 18 sont positives à ce test.

**MS** (ESI+) : 780 [M+Na]<sup>+</sup> ; 758 [MH]<sup>+</sup>

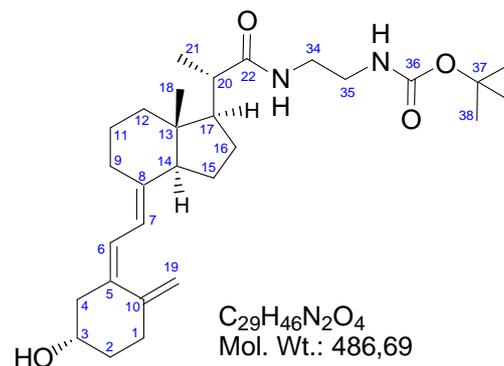
**HRMS** (LSIMS, glycérol) : Calculée pour C<sub>40</sub>H<sub>64</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S<sup>1+</sup> .....758,4526  
mesurée .....758,4508

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 26 mn (MeOH/eau/ 70:30)

**20-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBOC vitamine D 79 :**

*N*-(*N*-BOC-éthylènediamine)-3β-hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(*E*),7(*E*),10(19)-trièn-22-amide

La 20-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBOC vitamine D **79** est préparée de la même manière que la 20-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> vitamine D **80** par couplage de l'ester activé **21** (50 mg ; 0,11 mmol ; 1 éq.) à la BOC-éthylènediamine (60 μL ; 0,23 mmol ; 2 éq.) dans le THF en présence de triéthylamine (19 μL ; 0,14 mmol ; 1,2 éq.). Les extractions sont faites par du MTBE. Après purification, 11 mg de 20-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBOC vitamine D **79** (Rdt : 20%) sont obtenus.



**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 6,22 (1H, d, J= 11,0 Hz, 6-CH) ; 6,02 (1H, d, J= 11,0 Hz, 7-CH) ; 5,04 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,81 (1H, s, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,94 (1H, m, J= 7,6 ; 3,5 Hz, 3α-CHOH) ; 3,34 (2H, m, 34-CH<sub>2</sub>) ; 3,28 (2H, t, J= 5,0 Hz, 35-CH<sub>2</sub>) ; 2,83 (1H, dd, J= 12,6 ; 3,8 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,57 (1H, dd, J= 12,9 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 12,9 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 2,10 (1H, m) ; 2,04 (1H, t, J= 9,5 Hz) ; 1,44 (9H, s, 38-CCH<sub>3</sub>) ; 1,18 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,55 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 171,8 (C-22) ; 145,1 (C-10) ; 141,5 (C-8) ; 135,5 (C-5) ; 122,3 (C-6) ; 117,8 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,2 (C-3) ; 55,9 (C-14) ; 53,2 (C-17) ; 45,9 (C-4) ; 45,1 (C-13) ; 45,1 (C-20) ; 40,3 (C-12) ; 35,2 (C-2) ; 32,0 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 28,4 (C-38) ; 26,9 (C-16) ; 23,4 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 17,9 (C-21) ; 12,2 (C-18)

**MS** (ESI+) : 995 [2M+Na]<sup>+</sup> ; 509 [M+Na]<sup>+</sup> ; 487 [MH]<sup>+</sup> ; 431 [MH-isopropène]<sup>+</sup>

**MS** (LSIMS, thioglycérol) : 509 [M+Na]<sup>+</sup> ; 487 [MH]<sup>+</sup> ; 431 [MH-isopropène]<sup>+</sup> ; 387 [MH-isopropène-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>

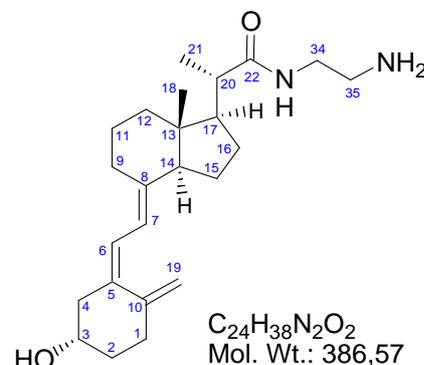
**HRMS** (LSIMS, thioglycérol) : Calculée pour C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>1+</sup> ..... 487,3536  
mesurée ..... 487,3537

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 10,3 mn (MeOH/eau 80:20)

**20-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> vitamine D 80 :**

*N*-(éthylènediamine)-3β-hydroxy-23,24-dinor-9,10-secochola-5(*E*),7(*E*),10(19)-trièn-22-amide

La 20-CO-NHS vitamine D **21** (50 mg ; 0,11 mmol ; 1 éq.) est dissoute dans le THF (1,1 mL ; c=0,1 M) A Ta, sous agitation, un excès de diéthylamine (76 μL ; 0,68 mmol ; 6 éq.) est ajouté rapidement. Un précipité de NHS apparaît rapidement et la réaction est arrêtée à 30 mn. Le milieu réactionnel est évaporé sous balayage d'azote. De la saumure est ajoutée et le milieu extrait 3 fois par du dichlorométhane. Les phases organiques regroupées sous séchées sur MgSO<sub>4</sub> puis le produit est chromatographié sur colonne de silice et élué par un gradient (chloroforme/méthanol/ammoniaque 28% 90:10:1 -> 80:20:1) pour obtenir 23 mg de 20-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> vitamine D **80** (Rdt : 52%).



**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 6,22 (1H, d, J= Hz, 6-CH) ; 6,02 (1H, d, J= Hz, 7-CH) ; 5,04 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,80 (1H, s, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,90 (1H, m, J= 7,9 ; 4,0, 3α-CH) ; 3,69 (2H, m, J= 6,9 ; 1,6 Hz, 34-CH) ; 2,38 (1H, m, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,27 (1H, dd, J= 12,6 ; 8,2 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (1H, m, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 2,05 (1H, t, J= 7,9 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 1,43 (1H, td, J= 12,6 ; 3,5 Hz) ; 1,18 (3H, d, J= 6,9 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,56 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 145,1 (C-10) ; 135,7 (C-5) ; 122,1 (C-6) ; 117,9 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,3 (C-3) ; 55,9 (C-14) ; 53,1 (C-17) ; 45,9 (C-4) ; 45,7 (C-13) ; 44,7 (C-20) ; 40,4 (C-12) ; 35,2 (C-2) ; 32,2 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 26,8 (C-16) ; 23,5 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 17,6 (C-21) ; 12,2 (C-18)

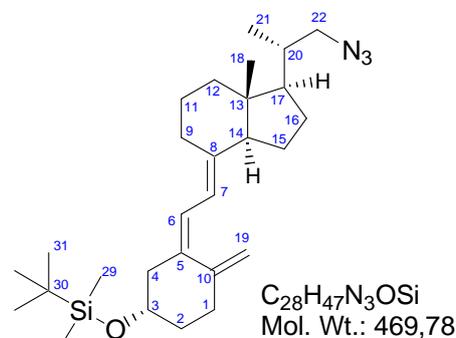
**MS** (CI) : 443 [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> ; 387 [MH]<sup>+</sup> ; 369 [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>1+</sup> .....387,3012  
mesurée .....387,3014

22-azido triène **81** :

3β-[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-22-azido-23,24-dinor-9,10-secochola-5(*E*),7(*E*),10(19)-triène

L'azoture de sodium (76 mg ; 1,2 mmol ; 7 éq.) est mis en suspension dans DMF anhydre sur tamis moléculaire (1,7 mL ; 0,1 M), et chauffé à 70°C 15 mn. Le 22-OpTs triène **32** (100 mg ; 0,17 mmol ; 1 éq.) est ajouté sous forme solide à température ambiante, puis l'ensemble est porté à 50°C pendant 2 h. Le milieu réactionnel est alors additionné d'éther de pétrole et de saumure. La phase organique est séparée et à nouveau lavée 2 fois à la saumure. Les phases aqueuses sont systématiquement contre-extraites par de l'éther de pétrole. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées sur silice, éluées par (éther de pétrole-AcOEt-AcOH 95:5) et évaporées sous vide pour donner une pâte incolore, très visqueuse de 22-azido triène **81** (64 mg ; Rdt : 82%).



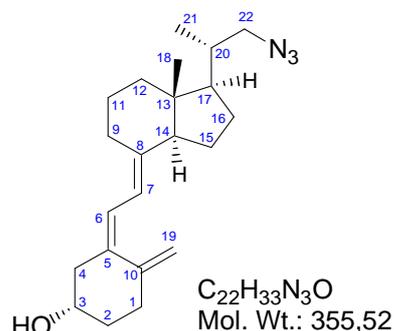
**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 100/2) : R<sub>f</sub> = 0,46

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 6,16 (1H, d, J= 11,0 Hz, 6-CH) ; 6,02 (1H, d, J= 11,0 Hz, 7-CH) ; 5,01 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,77 (1H, t, J= 1,3 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,82 (1H, m, J= 9,2 ; 4,0 Hz, 3α-CHOH) ; 3,38 (1H, dd, J= 11,7 ; 3,3 Hz, 22-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>) ; 3,06 (1H, dd, J= 11,7 ; 7,6 Hz, 22-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>) ; 2,84 (1H, dd, J=12,2 ; 4,0 Hz, 9β-CH<sub>2</sub>) ; 2,45 (1H, dd, J= 12,9 ; 4,0 Hz, 4α-CH<sub>2</sub>) ; 2,36 (1H, dt, J= 13,5 ; 4,7 Hz, 1β-CH<sub>2</sub>) ; 2,24 (1H, dd, J= 12,9 ; 9,2 Hz, 4β-CH<sub>2</sub>) ; 2,09 (1H, tdt, J= 13,5 ; 4,4 ; 1,6 Hz, 1α-CH<sub>2</sub>) ; 1,06 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,89 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,56 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 145,4 (C-10) ; 140,8 (C-8) ; 136,7 (C-5) ; 121,3 (C-6) ; 118,1 (C-7) ; 112,2 (C-19) ; 70,6 (C-3) ; 58,0 (C-22) ; 56,0 (C-14) ; 53,6 (C-17) ; 46,9 (C-4) ; 45,8 (C-13) ; 40,4 (C-12) ; 37,3 (C-20) ; 36,4 (C-2) ; 32,8 (C-1) ; 28,8 (C-9) ; 27,4 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,4 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 18,2 (C-30) ; 17,9 (C-21) ; 12,1 (C-18) ; -4,6 (C-29)

**22-azido vitamine D 82 :****3 $\beta$ -hydroxy-22-azido-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène**

L'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle **81** est déprotégé par le TBAF 1 M en solution dans le THF en suivant le même protocole que pour la 20-COOH vitamine D **20** mais sans extraction acide. 64 mg (0,14 mmol) de l'éther fournissent après chromatographie (éther de pétrole-AcOEt 90:10 -> 80:20) 32 mg de l'alcool **82** (67%, meringue blanche).



**CCM** (Ether de pétrole/AcOEt 80/20) : Rf = 0,32

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 6,43 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 6,04 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, t, J= 1,1 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,81 (1H, d, J= 2,3 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,95 (1H, m, J= 7,5 ; 3,8 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 3,38 (1H, dd, J= 12,0 ; 3,4 Hz, 22-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>) ; 3,07 (1H, dd, J= 12,0 ; 7,5 Hz, 22-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>) ; 2,83 (1H, dd, J= 11,8 ; 3,9 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,58 (1H, dd, J= 13,0 ; 3,8 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,40 (1H, m, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,29 (1H, dd, J= 13,0 ; 7,5 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (1H, m, 1 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,06 (3H, d, J= 6,8 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,56 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 145,1 (C-10) ; 141,6 (C-8) ; 135,5 (C-5) ; 122,3 (C-6) ; 117,8 (C-7) ; 112,5 (C-19) ; 69,2 (C-3) ; 58,0 (C-22) ; 56,1 (C-14) ; 53,6 (C-17) ; 45,9 (C-4) ; 45,9 (C-13) ; 40,3 (C-12) ; 37,3 (C-20) ; 35,2 (C-2) ; 31,9 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 27,4 (C-16) ; 23,5 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 17,9 (C-21) ; 12,1 (C-18)

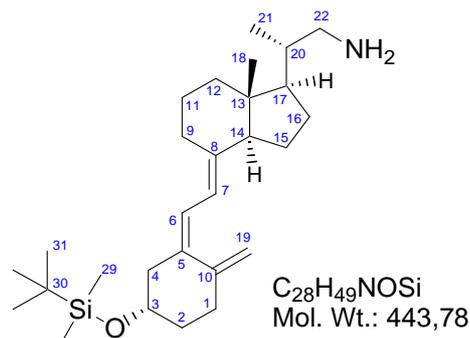
**MS** (CI) : 412 [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> ; 356 [MH]<sup>+</sup> ; 338 [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ; 328 [MH-N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> ; 310 [MH-H<sub>2</sub>O-N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>

**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sup>1+</sup> ..... 356,2702  
mesurée ..... 356,2706

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 19 mn (MeOH/eau 90:10)

**22-amino triène 83 :****3 $\beta$ -[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-22-amino-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène**

Le 22-azido triène **81** (28 mg ; 0,06 mmol ; 1 éq.) est dissous dans le THF séché sur hydrure de lithium aluminium (1,2 mL ; 0,05 M). L'hydrure de lithium aluminium (11 mg ; 0,3 mmol ; 5 éq.) est ajouté à température ambiante et le milieu réactionnel agité 30 mn sous azote. Le THF est partiellement évaporé sous azote et du MTBE humide est ajouté, suivi de saumure. La phase organique est séparée et lavée à la saumure puis par de l'eau. Les phases aqueuses sont réextraites par du MTBE, regroupées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporées sous vide pour donner le 22-amino triène **83** (21 mg : Rdt : 81%) sous forme d'une meringue blanche.



**CCM** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> aq. 90/10/1) : Rf = 0,38

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 6,16 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 6,02 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,01 (1H, s, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,78 (1H, d, J= 1,1 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,82 (1H, m, J= 9,1 ; 4,0 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 3,74 (2H, m, 22-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) ; 2,83 (1H, dd, J= 11,5 ; 3,2 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,75 (1H, dd, J= 12,8 Hz, 22-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) ; 2,37 (1H, m, J= 13,5 ; 4,8 Hz, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,24 (1H, dd, J= 12,8 ; 9,1 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,09 (1H,

m, 1 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 1,00 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,89 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,56 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 150,9 (C-10) ; 145,4 (C-8) ; 136,5 (C-5) ; 121,3 (C-6) ; 117,9 (C-7) ; 112,1 (C-19) ; 70,6 (C-3) ; 68,0 (C-22) ; 56,2 (C-14) ; 53,9 (C-17) ; 47,6 (C-4) ; 45,8 (C-13) ; 40,5 (C-12) ; 39,4 (C-20) ; 36,4 (C-2) ; 32,8 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 27,4 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,5 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 18,2 (C-30) ; 17,1 (C-21) ; 12,2 (C-18) ; -4,6 (C-29)

**MS** (CI) : 500 [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> ; 444 [MH]<sup>+</sup> ; 312 [MH-TBDMSOH]<sup>+</sup>

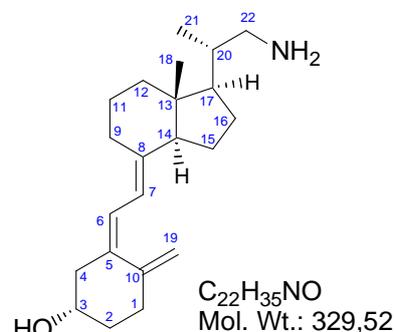
**HRMS** (CI) : Calculée pour C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>NOSi<sup>1+</sup> .....444,3662  
mesurée .....444,3665

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 32,8 mn (MeOH/Et<sub>3</sub>N 100:0,1%)

### 22-amino vitamine D **84** :

#### 3 $\beta$ -hydroxy-22-amino-23,24-dinor-9,10-secochola-5(E),7(E),10(19)-triène

L'éther de *tert*-butyldiméthylsilyle **83** (0,158 g ; 0,36 mmol ; 1 éq.) est déprotégé par l'acide fluorhydrique 48% aqueux (0,5 mL ; 14 mmol ; 40 éq.) en solution dans le THF (7,1 mL ; c=0,05 M) en tube en plastique une nuit à -18°C. Le THF est évaporé par balayage d'azote à 35°C. Le milieu réactionnel est repris dans du MTBE et de l'eau acidifiée par de l'HCl 1 M. La phase aqueuse est séparée et extraite par du MTBE puis du bicarbonate de sodium est ajouté jusqu'à pH basique. La phase aqueuse est extraite 3 fois par du dichlorométhane et les phases organiques regroupées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée pour donner l'amine **84** (82 mg ; Rdt : 80%). La purification par flash chromatographie (chloroforme/méthanol/ammoniaque 28% 95:5:1) fourni plusieurs fractions de l'amine **84** pur en RMN.



**CCM** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> aq. 90/10/1) : Rf = 0,24

**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 6,23 (1H, d, J= 11,3 Hz, 6-CH) ; 6,04 (1H, d, J= 11,3 Hz, 7-CH) ; 5,05 (1H, t, J= 1,1 Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,82 (1H, d, J= 2,3 Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,93 (1H, m, J= 7,9 ; 3,8 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 2,83 (1H, dd, J= 11,9 ; 3,5 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,75 (1H, dd, J= 12,6 ; 2,0 Hz, 22-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) ; 2,57 (1H, dd, J= 13,2 ; 3,8 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,43 (1H, m, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,38 (1H, m, 22-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) ; 2,28 (1H, dd, J= 13,2 ; 7,9 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (1H, m, 1 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 0,99 (3H, d, J= 6,0 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,56 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)

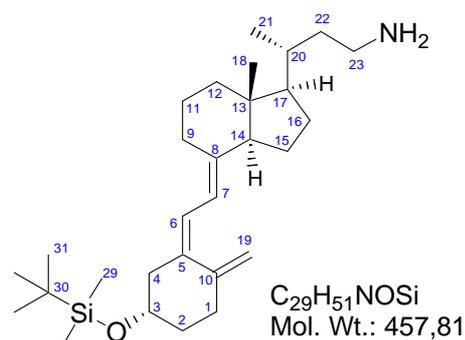
**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 145,2 (C-10) ; 141,9 (C-8) ; 135,4 (C-5) ; 122,3 (C-6) ; 117,7 (C-7) ; 112,4 (C-19) ; 69,2 (C-3) ; 56,2 (C-14) ; 53,9 (C-17) ; 47,5 (C-22) ; 46,0 (C-4) ; 45,9 (C-13) ; 40,5 (C-12) ; 35,3 (C-2) ; 32,0 (C-1) ; 29,0 (C-9) ; 27,3 (C-16) ; 23,5 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 17,1 (C-21) ; 12,1 (C-18)

**MS** (CI) : 386 [M+C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> ; 330 [MH]<sup>+</sup> ; 312 [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>

**HRMS** (LSIMS, thioglycérol) : Calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>NO<sup>1+</sup> .....330,2797  
mesurée .....330,2799

**23-amino triène 86 :****3 $\beta$ -[(*t*-butyldiméthylsilyl)oxy]-23-amino-24-nor-9,10-secochola-5(*E*),7(*E*),10(19)-triène**

Le 22-cyano triène **33** (24 mg ; 0,05 mmol ; 1 éq.) est dissous dans le THF séché sur hydrure de lithium aluminium (1,0 mL ; 0,05 M). L'hydrure de lithium aluminium (20 mg ; 0,5 mmol ; 10 éq.) est ajouté à température ambiante et le milieu réactionnel agité 1 h sous azote. Le THF est partiellement évaporé sous azote et du MTBE humide est ajouté, suivi de saumure. La phase organique est séparée et lavée à la saumure puis par de l'eau. Les phases aqueuses sont réextraites par du MTBE, regroupées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporées sous vide. Le produit brut est purifié par flash chromatographie sur silice (chloroforme/méthanol/ammoniaque 28% 90:10:1) pour donner le 23-amino triène **86** (12 mg ; Rdt : 50%) sous forme d'une meringue blanche.



**CCM** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> aq. 90/10/1) : R<sub>f</sub> = 0,21

**RMN-<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 6,16 (1H, d, J= 11,4 Hz, 6-CH) ; 6,01 (1H, d, J= 11,4 Hz, 7-CH) ; 5,01 (1H, s, J= Hz, 19E-CH<sub>2</sub>) ; 4,78 (1H, s, J= Hz, 19Z-CH<sub>2</sub>) ; 3,82 (1H, m, J= 9,7 ; 4,0 Hz, 3 $\alpha$ -CHOH) ; 2,83 (1H, d, J= 12,6 Hz, 9 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,77 (1H, m, 23-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) ; 2,64 (1H, m, 23-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) ; 2,45 (1H, dd, J= 12,9 ; 4,0 Hz, 4 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,37 (1H, dt, J= 13,6 ; 4,7 Hz, 1 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,24 (1H, dd, J= 12,9 ; 9,7 Hz, 4 $\beta$ -CH<sub>2</sub>) ; 2,09 (1H, c, J= 13,6 Hz, 1 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ; 0,94 (3H, d, J= 6,6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>) ; 0,89 (3x3H, s, 31-CCH<sub>3</sub>) ; 0,55 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) ; 0,07 (2x3H, d, 29-SiCH<sub>3</sub>)

**RMN-<sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 145,4 (C-10) ; 141,4 (C-8) ; 136,4 (C-5) ; 121,4 (C-6) ; 117,9 (C-7) ; 112,1 (C-19) ; 70,6 (C-3) ; 56,7 (C-14) ; 56,3 (C-17) ; 46,9 (C-4) ; 45,8 (C-13) ; 36,4 (C-2) ; 34,2 (C-20) ; 32,8 (C-1) ; 28,9 (C-9) ; 27,8 (C-16) ; 25,9 (C-31) ; 23,5 (C-11) ; 22,3 (C-15) ; 19,0 (C-21) ; 18,2 (C-30) ; 12,1 (C-18) ; -4,6 (C-29)

**CLHP**(C<sub>18</sub>) : Tr= 13,0 mn (MeOH/Et<sub>3</sub>N 100:0,1%)

**Conditions générales de marquage à l'iode(125)**

Sous une hotte aspirante munie de vitres chargées en plomb et dans des conditions optimum de radioprotection, le dérivé à ioder est dissous dans une quantité suffisante de méthanol pour assurer sa solubilité (20  $\mu$ L). La solution de Na<sup>125</sup>I (0,8 mCi ; 8  $\mu$ L) est ajoutée à température ambiante, suivie de la solution oxydante de chloramine T à 1 mg/mL en tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7,4 (10  $\mu$ L). La réaction de substitution électrophile aromatique est très rapide et permet de limiter les phénomènes de radiolyse. Elle est stoppée après environ 2 mn par une solution réductrice de métabisulfite de sodium à 5 mg/mL en tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7,4 (20  $\mu$ L). Le milieu réactionnel est par la suite dilué dans un mélange d'acétonitrile à 30% dans une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique 0,5% (0,5 mL) pour être purifié par CLHP gradient sur une colonne analytique phase inverse (C18). L'éluat est collecté automatiquement toutes les minutes. Le pic d'iode libre (<sup>125</sup>I) sort rapidement après le volume mort de la colonne, suivi du produit d'iodation à un temps de rétention variable en fonction de sa polarité. Le pic de radioactivité correspondant au produit de diiodation est absent des marquages.

**Purification d'anticorps sur colonne de Protéine A**

Réactifs :

- Tampon borate 20 mM - NaCl 0,15 M pH 8,5 (élution)
- Tampon acide acétique 0,58% - NaCl 0,15 M pH 3,0 (décrochage)

- Tampon borate 1 M pH 8,0 (neutralisation)
- Tampon borate 20 mM - NaCl 0,15 M NaN<sub>3</sub> 10 mM pH 8,5 (conservation colonne)
- Colonne Sépharose - protéine A (h= 25 cm ; Ø= 2 cm) équilibrée en tampon borate 20 mM-NaCl 0,15 M pH 8,5

Purification sur protéine A :

Accrochage :

- 1 mL de liquide d'ascite dilué au demi par 1 mL de tp borate 20 mM
- Filtration sur Millipore® 0,22 µm et dépôt sur la colonne éluée par tp borate 20 mM à faible débit
- Tête de colonne lavé 4 fois par 500 µL de tp borate 20 mM à faible débit
- Incubation une nuit à +4°C

Décrochage :

- Elution par tp borate 20 mM à faible débit jusqu'à absorption nulle à 280 nm
- Elution par tp acide acétique 0,58% à débit moyen
- Eluat collecté en tubes polypropylène additionnés de 0,3 mL de tp borate 1 M
- Mesure de la DO des tubes à 280 nm
- Colonne reconditionné en tp borate 20mM - NaN<sub>3</sub>

Dialyse :

- Les tubes contenant les Ac sont regroupés
- Dialysé contre 1 L de tp borate 20 mM 1 nuit à +4°C
- Sac de dialyse vidé (volume recueilli de 7 mL)
- Mesure de la DO à 280 nm : 0,0913 soit 0,0652 mg/mL
- Concentration de la solution jusqu'à 0,5 mL
- DO<sub>280 nm</sub> = 0,62 soit 0,442 mg/mL et une quantité totale d'anticorps de 0,221 mg

## Table des illustrations

Figure 1 : Numérotation des carbones sur le squelette du 7-déhydrocholestérol, de la vitamine D <sub>2</sub> et de la vitamine D <sub>3</sub> .....	17
Figure 2 : Métabolites et forme hormonale des vitamines D <sub>2</sub> et D <sub>3</sub> .....	18
Figure 3 : Schéma d'obtention d'anticorps anti-vitamine D .....	19
Figure 4 : Photoclivage du cycle B des provitamines D aboutissant aux vitamines D <sub>2</sub> et D <sub>3</sub> .....	23
Figure 5 : Production de vitamine D <sub>3</sub> dans la peau par irradiation UV du 7-dehydrocholestérol .....	24
Figure 6 : Sources de vitamine D .....	25
Figure 7 : Sites d'activation de la vitamine D .....	27
Figure 8 : Inactivation de la vitamine D et catabolites .....	27
Figure 9 : Métabolisme et fonction homéostatique de la vitamine D dans le système endocrinien .....	28
Figure 10 : Séquence d'acides aminés et structure secondaire présumée de la DBP humaine.....	31
Figure 11 : Vue stéréo du site de liaison de la vitamine D sur une partie du domaine I de la DBP .....	32
Figure 12 : Schéma réactionnel d'une compétition et d'un sandwich .....	37
Figure 13 : Préparation du diol de Lythgoe-Inhoffen par ozonolyse de la vitamine D <sub>2</sub> .....	48
Figure 14 : Couplage de Wittig-Horner.....	49
Figure 15 : Couplage par catalyse au palladium.....	49
Figure 16 : Protection sous forme de 6(R)-hydroxy-3,5-cyclovitamine D <sub>2</sub> et déprotection .....	51
Figure 17 : Vitamine D et ses métabolites.....	54
Figure 18 : Métabolites de la chaîne latérale de la vitamine D dans la zone de couplage de la BSA.....	54
Figure 19 : vitamine D <sub>2</sub> (ergocalciférol).....	60
Figure 20 : Protection de la vitamine D <sub>2</sub> .....	60
Figure 21 : Ozonolyse classique.....	61
Figure 22 : Double liaisons de la vitamine D <sub>2</sub> protégée sensibles à l'ozonolyse.....	62
Figure 23 : Structure du Reactive Blue 2 (Procion Blue HB) .....	62
Figure 24 : Méthodes d'ozonolyse et produits obtenus .....	63
Figure 25 : Ozonolyse en présence de soude méthanolique .....	64
Figure 26 : Tosylation de l'alcool 6 .....	64

Figure 27 : Déprotection du triène et photo-isomérisation .....	65
Figure 28 : Déprotection de l'alcool .....	66
Figure 29 : Voie d'accès à l'ester méthylique <b>12</b> du 1 <sup>er</sup> haptène par ouverture du cycle B .....	67
Figure 30 : Oxydation de l'alcool <b>4</b> en acide <b>13</b> .....	67
Figure 31 : Oxydation de l'aldéhyde <b>3</b> en acide <b>13</b> .....	68
Figure 32 : Oxydation de l'aldéhyde <b>3</b> par le chlorite de sodium .....	69
Figure 33 : Déprotection du triène du 20-COOH adduits-SO <sub>2</sub> <b>13a</b> et <b>13b</b> .....	69
Figure 34 : Régio-isomères du triène .....	70
Figure 35 : Maximum d'absorption de chaque configuration du triène .....	71
Figure 36 : Déprotection du triène .....	72
Figure 37 : Photo-isomérisation du 20-COOH <i>trans</i> -triène <b>14</b> .....	72
Figure 38 : Déprotection de l'alcool du 20-COOH triène <b>19</b> .....	73
Figure 39 : Voies d'activation de l'acide .....	74
Figure 40 : Ester activé <b>21</b> de la 20-COOH vitamine D <b>20</b> .....	74
Figure 41 : Couplage de la 20-CO-NHS vitamine D <b>21</b> à la BSA .....	75
Figure 42 : Préparation du dérivé CMO <b>23</b> de l'aldéhyde <b>3</b> .....	77
Figure 43 : Déprotection et photoisomérisation du triène du 22-CMO <b>23</b> .....	77
Figure 44 : Activation de l'acide de la 22-CMO vitamine D <b>27</b> .....	78
Figure 45 : Couplage de la 22-CMO-NHS vitamine D <b>28</b> à la BSA .....	78
Figure 46 : Ensemble des étapes communes aux trois nouveaux haptènes .....	80
Figure 47 : Ozonolyse et réduction enchaînées .....	80
Figure 48 : Déprotection et photoisomérisation du triène de l'alcool des adduits-SO <sub>2</sub> <b>4</b> .....	81
Figure 49 : Préparation du tosylate <b>32</b> .....	82
Figure 50 : Trois haptènes à partir d'un intermédiaire commun, le tosylate <b>32</b> .....	82
Figure 51 : Voies d'accès envisagées pour le 22-COOH triène <b>35</b> .....	83
Figure 52 : Voie d'accès retenue à la 22-COOH vitamine D <b>35</b> .....	84
Figure 53 : S <sub>N</sub> 2 du cyanure sur le tosylate <b>32</b> .....	85
Figure 54 : Réduction du nitrile <b>33</b> en aldéhyde <b>34</b> par le DIBALH .....	85
Figure 55 : Oxydation de l'aldéhyde <b>34</b> au chlorite de sodium .....	86
Figure 56 : Déprotection de l'alcool <b>35</b> et activation de l'acide <b>36</b> .....	86
Figure 57 : Couplage de la 22-CO-NHS vitamine D <b>42</b> à la BSA .....	87
Figure 58 : Voie d'accès à la 23-CMO vitamine D <b>38</b> .....	87
Figure 59 : Couplage de la 23-CMO-NHS vitamine D <b>44</b> à la BSA .....	88
Figure 60 : S <sub>N</sub> 2 par l'acide 4-mercaptobenzoïque .....	89
Figure 61 : Couplage de la 22-S-Bz-CO-NHS vitamine D <b>46</b> à la BSA .....	90
Figure 62 : Ensemble des étapes communes .....	93
Figure 63 : Un unique intermédiaire commun, le triénol <b>31</b> .....	93
Figure 64 : Oxydation du triénol <b>11</b> par l'IBX dans le DMSO .....	94
Figure 65 : Traceurs connus de la vitamine D .....	95
Figure 66 : Synthèse de la 22-iodo vitamine D <b>54</b> .....	96
Figure 67 : Synthèse du dérivé histaminé <b>58</b> à partir des adduits-SO <sub>2</sub> .....	97
Figure 68 : Synthèse des dérivés histaminés <b>58</b> et <b>59</b> à partir de l'ester activé <b>21</b> .....	97
Figure 69 : Marquage à froid de la 20-CO-histamine vitamine D <b>25</b> .....	98
Figure 70 : Chromatogramme à 264 nm du marquage sur 10 µg avec 0,5 éq. de NaI froid 1 mn (injection de 20 µL) .....	99
Figure 71 : Chromatogramme à 264 nm du marquage de 0,5 µg de 20-CO-histamine vitamine D <b>58</b> (injection de 100 µL) .....	99
Figure 72 : Iodation de l'histamine .....	101
Figure 73 : Synthèse des dérivés histaminés <b>64</b> et <b>65</b> à partir de l'ester activé <b>28</b> .....	101
Figure 74 : Marquage à froid de la 22-CMO-histamine vitamine D <b>64</b> .....	102
Figure 75 : Chromatogramme à 264 nm du marquage de 10 µg de 22-CMO-histamine vitamine D <b>64</b> (injection de 20 µL) .....	102
Figure 76 : Préparation du dérivé à ioder 22-CO-histamine vitamine D <b>66</b> .....	103
Figure 77 : Préparation du dérivé à ioder 23-CMO-histamine vitamine D <b>68</b> .....	104
Figure 78 : Préparation du dérivé à ioder 22-(S-Bz-CO-histamine) vitamine D <b>70</b> .....	104
Figure 79 : Hydrogénation de l'acide urocanique <b>72</b> .....	105
Figure 80 : Dérivé à iodé 22-NH-[3-(1H-imidazol-4-yl)-propionate] vitamine D <b>75</b> .....	105
Figure 81 : Couplage du dérivé de la biotine sur les esters activés des deux 1 <sup>er</sup> haptènes .....	107
Figure 82 : Recherche des dérivés biotine - vitamine D .....	107
Figure 83 : Couplage des dérivés d'éthylènediamine .....	109
Figure 84 : 22 et 23-amino vitamines D via la réduction des produits de SN du tosylate <b>32</b> .....	111
Figure 85 : Amino-réduction de l'aldéhyde des adduit-SO <sub>2</sub> <b>3a</b> et <b>3b</b> .....	111
Figure 86 : Région des protons éthyléniques sur les spectres RMN <sup>1</sup> H des dérivés adduits-SO <sub>2</sub> , <i>trans</i> -triène, triène et vitamine D .....	112

Figure 88 : Méthode de criblage de la fusion en RIA.....	123
Figure 89 : Méthode de criblage de la fusion en EIA.....	125
Figure 90 : Etapes nécessaires pour la détection des anticorps anti-vitamine D .....	128
Figure 91 : Effet crochet dû à l'excès de dérivé vitamine D biotinylé .....	129
Figure 93 : Protocole de fusion .....	155

---

## **ANNEXES**

---



# Annexes

## Annexe A : Tableaux de déplacements RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C

### Spectres des dérivés des adduits-SO<sub>2</sub>

Déplacements <sup>1</sup> H pour les Adduits-SO <sub>2</sub>										
Position	Adduit-SO <sub>2</sub> 6(S)	Adduit-SO <sub>2</sub> 6(R)	20-CHO 6(S)	20-CHO 6(R)	22-OH 6(S)	20-COOMe 6(S)	20-COOH 6(S)	22-CMO 6(S)	Moy.	Ecart
	2a	2b	3a	3b	4a	5a	13a	23a		
3 α	4,02 c	3,97 c	4,02 c	3,96 c	4,01 c	4,03 c	4,01 c	4,01 c	4,00	0,02
6	4,52 d	4,63 d	4,52 d	4,62 d	4,52 d	4,53 d	4,52 d	4,51 d	4,55	0,05
7	4,69 d	4,77 d	4,72 d	4,81 d	4,70 d	4,71 d	4,70 d	4,70 d	4,72	0,04
9 β	2,61 c	2,58	2,63 c	2,61 dd	2,61 c	2,64 c	2,62	2,62 c	2,62	0,02
18	0,66 s	0,57 s	0,71 s	0,62 s	0,68 s	0,69 s	0,69 s	0,69 s	0,66	0,05
19	3,65 c	3,66 c	3,66 c	3,66 c	3,66 c	3,67 c	3,66 c	3,66 c	3,66	0,01
20	2,05		2,40 m	2,37 c	1,57	2,47	2,44	2,40 c	2,24	0,33
21	1,02 d	0,92 d	1,14 d	1,15 d	1,06 d	1,22 d	1,26 d	1,14 d	1,12	0,11
22 α	5,19	5,20	9,60 d	9,58 d	3,64			7,37 d		
22 β					3,40 dd					
23	5,20 c	5,20 m							5,20	0,00
28	0,92 d	1,03 d							0,97	0,08
29	0,05 d	0,06 d	0,06 d	0,05	0,07 d	0,07 d	0,05 d	0,05 d	0,06	0,01
31	0,88 s	0,88 s	0,88 s	0,88 s	0,87 s	0,89 s	0,87 s	0,88 s	0,88	0,01

Tableau 13 : Comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H des dérivés « adduits-SO<sub>2</sub> »

Déplacements <sup>13</sup> C pour les Adduits-SO <sub>2</sub>										
Position	Adduit-SO <sub>2</sub> 6(S)	Adduit-SO <sub>2</sub> 6(R)	20-CHO 6(S)	20-CHO 6(R)	22-OH 6(S)	20-COOMe 6(S)	20-COOH 6(S)	22-CMO 6(S)	Moy.	Ecart
	2a	2b	3a	3b	4a	5a	13a	23a		
(C-1)	24,3	24,7	24,3	24,7	24,3	24,7	24,3	24,4	24,5	0,2
(C-2)	30,7	31,0	30,7	31,0	30,7	31,1	30,7	30,7	30,9	0,2
(C-3)	66,6	66,9	66,5	66,8	66,6	66,9	66,5	66,6	66,7	0,2
(C-4)	34,3	34,1	34,3	34,1	34,3	34,7	34,3	34,3	34,3	0,2
(C-5)	130,8	130,5	130,6	130,3	130,7	131,1	130,7	130,7	130,7	0,2
(C-6)	67,7	66,9	67,6	66,8	67,6	68,0	67,6	67,6	67,5	0,4
(C-7)	110,2	109,6	110,9	110,4	110,4	111,1	110,8	110,7	110,5	0,5
(C-8)	150,6	150,0	149,8	149,1	150,4	150,4	150,0	150,0	150,1	0,5
(C-9)	29,9	29,4	29,8	29,3	29,8	30,2	29,8	29,8	29,8	0,3
(C-10)	126,4	126,7	126,6	126,9	126,4	126,9	126,5	126,5	126,6	0,2
(C-11)	24,0	23,6	23,8	23,4	23,9	24,2	23,8	23,8	23,8	0,3
(C-12)	40,3	40,0	40,0	39,8	40,2	40,5	40,2	40,1	40,1	0,2
(C-13)	46,1	45,5	46,6	45,9	46,2	46,5	46,2	46,4	46,2	0,4
(C-14)	56,5	56,3	55,5	55,3	56,0	56,2	55,8	56,0	56,0	0,4
(C-15)	22,1	22,1	22,5	22,5	22,1	22,5	22,2	22,1	22,3	0,2
(C-16)	27,7	27,6	26,5	26,4	27,1	26,9	26,7	27,0	27,0	0,5
(C-17)	56,4	56,2	51,4	51,2	52,8	53,7	52,8	54,1	53,6	1,9
(C-18)	12,0	12,3	12,2	12,5	11,9	12,3	11,9	12,1	12,2	0,2
(C-19)	58,1	58,2	58,1	58,2	58,1	58,5	58,1	58,1	58,2	0,1
(C-20)	40,3	40,3	49,7	49,6	38,9	43,1	42,8	37,4	42,8	4,7
(C-21)	21,1	21,2	13,5	13,6	16,9	17,7	17,2	18,0	17,4	2,9
(C-22)	132,1	132,2	204,9	204,6	67,9	177,7	182,6	157,6		
(C-23)	135,6	135,4							135,5	0,1
(C-24)	42,9	42,9							42,9	0,0
(C-25)	33,1	33,1							33,1	0,0
(C-26)	19,7	19,7							19,7	0,0
(C-27)	20,0	20,0							20,0	0,0
(C-28)	17,7	17,7							17,7	0,0
(C-29)	-4,7	-4,7	-4,7	-4,7	-4,7	-4,3	-4,7	-4,7	-4,7	0,1
(C-30)	18,1	18,2	18,1	18,2	18,1	18,5	18,1	18,1	18,2	0,1
(C-31)	25,8	25,8	25,8	25,8	25,8	26,2	25,8	25,8	25,9	0,1
(C-32)						51,8		69,7	60,7	12,7
(C-33)								174,5		

Tableau 14 : Comparaison des spectres RMN <sup>13</sup>C des dérivés « adduits-SO<sub>2</sub> »

## Spectres des dérivés du « triène »

Déplacements <sup>1</sup> H pour les Triènes															Moy.	Ecart
Position	20-COOH trans- 14	trans- Trièno1 30	Trièno1 31	22-OpTs 32	22- Cyano 33	22-CHO 34	22- COOH 35	22-S-Bz- COOH 37	Trièno1 48	20-CO- hist. 57	22- Azido 81	22- Amino 83	23- Amino 86			
1 α	2,16 c	2,15 m	2,09 dt	2,08 c							2,09 td		2,09 c	2,10	0,03	
1 β	2,48 c	2,45 m	2,37 td	2,34 c			2,35	2,35	2,37 c		2,36 td	2,37 c	2,37 td	2,37	0,03	
3 α	3,86 m	3,85 m	3,82 m	3,80 m	3,82 m	3,82 m	3,82 m	3,82 m	3,82 m	3,81 m	3,82 m	3,82 m	3,82 m	3,82	0,01	
4 α	2,64 dd	2,66 dd	2,44 dd	2,41			2,49 dd	2,45 dd	2,45 dd	2,45 dd	2,45 dd		2,45 dd	2,47	0,07	
4 β	2,27 dd	2,25 dd	2,24 dd	2,23 dd			2,24 c	2,24 dd	2,24 dd	2,24	2,24 dd	2,24	2,24	2,24	0,01	
6	6,47 d	6,48 d	6,16 d	6,14 d	6,15 d	6,16 d	6,16 d	6,16 d	6,15 d	6,15 d	6,16 d	6,16 d	6,16 d	6,18	0,09	
7	5,86 d	5,86 d	6,02 d	5,99 d	6,01 d	6,01 d	6,01 d	6,03 d	6,03 d	5,99 d	6,02 d	6,01 d	6,01 d	6,00	0,04	
9 β	2,88 dd	2,87 dd	2,84 dd	2,82 dd	2,84 dd	2,83 dd	2,84 dd	2,84 dd	2,85 dd	2,83 c	2,84 dd	2,83 dd	2,83 d	2,84	0,01	
18	0,59 s	0,58 s	0,57 s	0,51 s	0,57 s	0,60 s	0,59 s	0,57 s	0,60 s	0,54 s	0,56 s	0,56 s	0,55	0,57	0,02	
19 E	4,93 s	4,93 s	5,00 s	5,00 s	5,00 s	5,01 s	5,01 s	5,01 s	5,01 s	5,00 s	5,01 s	5,00 s	5,00 s	5,00	0,02	
19 Z	4,65 s	4,65 s	4,77 s	4,75 d	4,77 s	4,77 s	4,77 s	4,77 d	4,77 s	4,76 s	4,77 s	4,78 s	4,78 s	4,76	0,04	
21	1,26 d	1,07 d	1,13 d	0,99 d	1,17 d	1,03 d	1,04 d	1,14 d	1,13 d	1,16 d	1,06 d	1,00 d	0,94 d	1,07	0,08	
22 α		3,66 dd	3,65 d	3,98 dd			2,42	3,21 dd	-	-	3,38 dd	3,74 c	2,77 (2)	3,35	0,53	
22 β	-	3,40 dd	3,38 t	3,80							3,06 dd	2,75 dd		3,13	0,42	
29	0,07 d	0,07 d	0,07 d	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07 d	0,07 d	0,07	0,07	0,07 d	0,07	0,00	
31	0,88 s	0,89 s	0,89 s	0,88 s	0,89 s	0,89 s	0,89 s	0,89 s	0,89 s	0,88 s	0,89 s	0,89 s	0,89 s	0,88	0,00	

Tableau 15 : Comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H des dérivés « triène »

Déplacements <sup>13</sup> C pour les Triènes															Moy.	Ecart
Position	20-COOH trans- 14	trans- Trièno1 30	Trièno1 31	22-OpTs 32	22- cyano 33	22-CHO 34	22- COOH 35	22-S-Bz- COOH 37	Trièno1 48	20-CO- hist. 57	22- azido 81	22- amino 83	23- amino 86			
(C-1)	37,5	37,6	32,8	32,7	32,7	32,8	32,8	32,7	32,7	32,8	32,8	32,8	32,8	33,2	1,4	
(C-2)	31,2	31,2	36,4	36,3	36,3	36,4	36,4	36,4	36,4	36,4	36,4	36,4	36,4	35,9	1,5	
(C-3)	69,4	69,5	70,6	70,5	70,5	70,6	70,6	70,6	70,6	70,6	70,6	70,6	70,6	70,5	0,3	
(C-4)	35,2	35,2	46,9	46,9	46,9	46,9	46,9	46,9	46,9	45,9	46,9	47,6	46,9	45,8	3,5	
(C-5)	136,7	136,4	136,5	136,7	136,9	136,7	136,6	136,7	137,0	136,6	136,7	136,5	136,4	136,7	0,2	
(C-6)	119,9	120,0	121,3	121,2	121,2	121,2	121,3	121,2	121,1	121,2	121,3	121,3	121,4	121,1	0,4	
(C-7)	116,5	116,2	118,0	118,1	118,2	118,1	118,1	118,1	118,3	118,1	118,1	117,9	117,9	117,9	0,6	
(C-8)	142,8	143,5	141,1	140,7	140,5	140,8	141,0	140,8	140,3	140,8	140,8	145,4	141,4	141,4	1,6	
(C-9)	28,9	29,0	28,9	28,8	28,7	28,8	28,8	28,8	28,8	28,8	28,8	28,9	28,9	28,8	0,1	
(C-10)	150,0	150,0	145,4	145,4	145,4	145,4	145,4	145,4	145,4	145,3	145,4	150,9	145,4	146,3	2,1	
(C-11)	23,4	23,5	23,4	23,3	23,3	23,4	23,4	23,4	23,3	23,3	23,4	23,5	23,5	23,4	0,1	
(C-12)	40,4	40,4	40,4	40,2	40,2	40,4	40,4	40,4	40,3	40,3	40,4	40,5	?	40,3	0,1	
(C-13)	45,8	45,9	45,8	45,7	45,7	45,8	45,8	46,0	46,2	45,6	45,8	45,8	45,8	45,8	0,2	
(C-14)	56,0	56,2	56,0	55,9	56,0	56,2	56,3	56,1	55,6	55,8	56,0	56,2	56,7	56,0	0,2	
(C-15)	22,3	22,3	22,3	22,2	22,1	22,2	22,2	22,2	22,6	22,3	22,3	22,3	22,2	22,3	0,1	
(C-16)	26,7	27,2	27,2	26,9	27,6	27,9	27,7	27,6	26,5	26,8	27,4	27,3	27,8	27,3	0,4	
(C-17)	52,9	52,9	52,8	52,1	55,1	56,2	56,1	55,8	51,4	53,2	53,6	53,9	56,3	53,9	1,7	
(C-18)	12,3	12,1	12,1	12,0	12,2	12,1	12,1	12,1	12,5	12,3	12,1	12,2	12,1	12,2	0,1	
(C-19)	107,6	107,6	112,1	112,1	112,2	112,2	112,2	112,2	112,2	112,2	112,1	112,1	112,1	111,7	1,4	
(C-20)	42,8	39,1	39,1	36,5	33,9	31,9	33,9	36,5	49,8	45,2	37,3	39,4	34,2	38,4	5,2	
(C-21)	17,2	16,9	16,9	17,0	19,4	20,1	19,6	19,1	13,6	17,8	17,9	17,1	19,0	17,8	1,8	
(C-22)	182,2	68,0	68,0	75,6	24,8	50,8	41,2	39,4	205,0	177,0	58,0	68,0	?			
(C-29)	-4,7	-4,7	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	0,0	
(C-30)	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	0,0	
(C-31)	25,9	25,9	25,9	25,9	25,9	25,9	25,9	25,9	25,9	25,9	25,9	25,9	25,9	25,9	0,0	

Tableau 16 : Comparaison des spectres RMN <sup>13</sup>C des dérivés « triène »

## Spectres des dérivés de la vitamine D

Déplacements <sup>1</sup> H pour les Vitamines D										
Position	Vit. D <sub>2</sub>	20-COOH	22-CMO	22-COOH	23-CMO	22-S-Bz-COOH	20-CO-hist.	22-CMO-hist.	23-CMO-hist.	22-(S-Bz-CO-hist.)
	1	20	27	36	38	40	58	64	68	70
1 α	2,18	2,17 c	2,17 c	2,18	2,17 m	2,18 c	2,17 c	2,18 c	2,18 m	2,17 c
1 β	2,42	2,42 c	2,39 c	2,42	2,37 m	2,40 c	2,40 c	2,38 c	2,41 m	2,40 c
3 α	3,95 m	3,95 m	3,96 m	3,95 m	3,96 m	3,96 m	3,94 m	3,97 m	3,97 m	3,95 m
4 α	2,58	2,57 dd	2,57 dd	2,58 dd	2,58 dd	2,58 dd	2,57 dd	2,58 dd	2,58 dd	2,57 d
4 β	2,30	2,29 dd	2,28 dd	2,30 dd	2,30 dd	2,29 dd				
6	6,23 d	6,22 d	6,22 d	6,23 d	6,23 d	6,23 d	6,22 d	6,22 d	6,22 d	6,23 d
7	6,04 d	6,03 d	6,03 d	6,03 d	6,03 d	6,05 d	6,01 d	6,02 d	6,04 d	6,04 d
9 β	2,83	2,84 dd	2,84 c	2,83 dd	2,83 dd	2,83 dd	2,83 c	2,83	2,83 dd	2,83 d
18	0,56 s	0,57 s	0,57 s	0,58 s	0,56 s	0,56 s	0,54 s	0,56 s	0,55 s	0,55 s
19 E	4,82 t	5,05 s	5,04 s	5,05 d	5,05 d	5,05 d	4,80 d	5,05 d	5,05 d	5,05 s
19 Z	5,05 d	4,81 d	4,80 d	4,82 d	4,81 d	4,82 d	5,04 s	4,80 d	4,82 d	4,81 s
21	0,92 d	1,25 d	1,13 d	1,04 d	1,00 m	1,14 d	1,15 d	1,11 d	0,97 m	1,13 d
22 α	5,20	–	7,36 d	–	–	3,21 dd	–	7,35 d	–	3,18 d
22 β	–	–	6,56 d	–	–	2,73 dd	–	6,54 d	–	2,68 dd

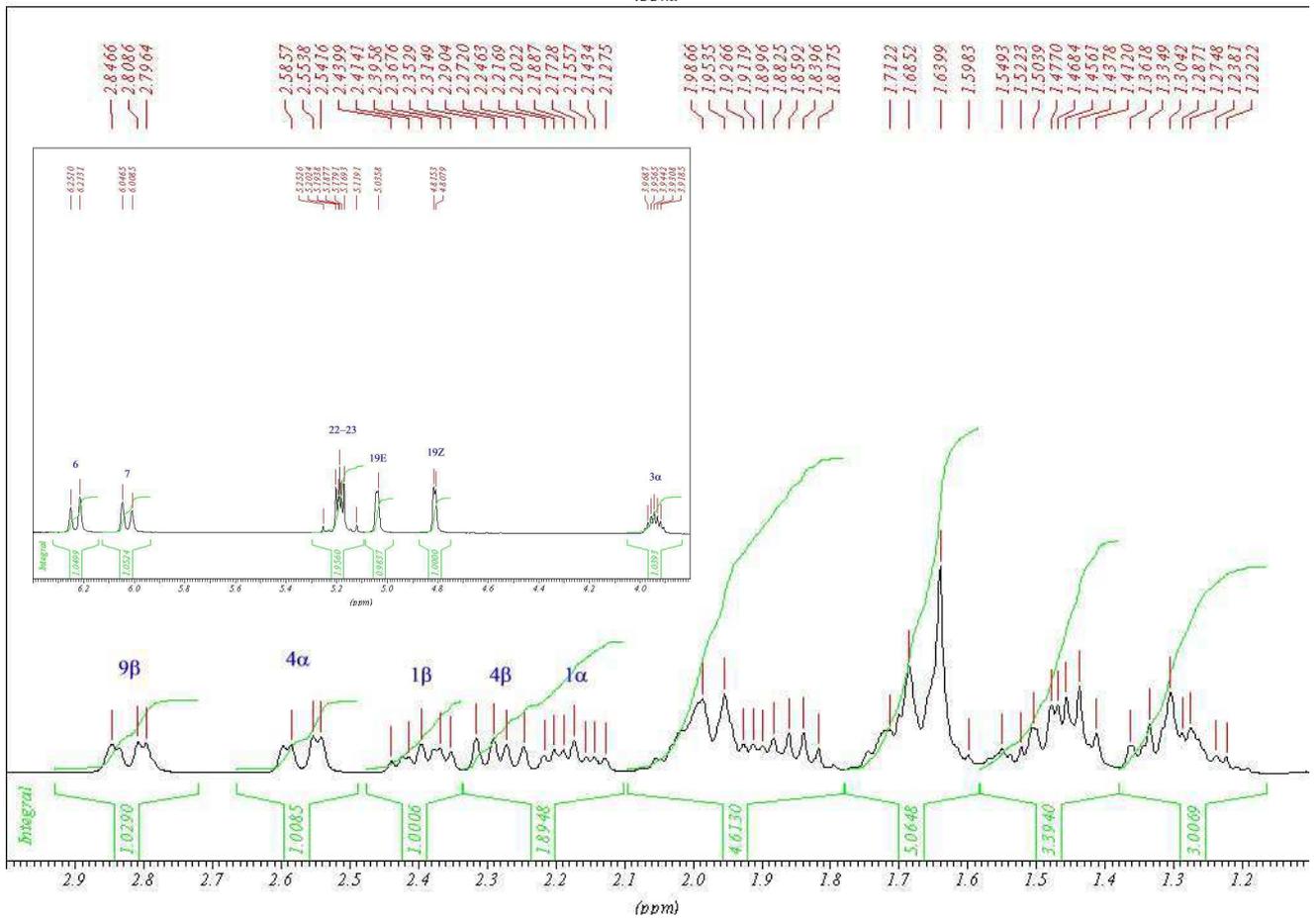
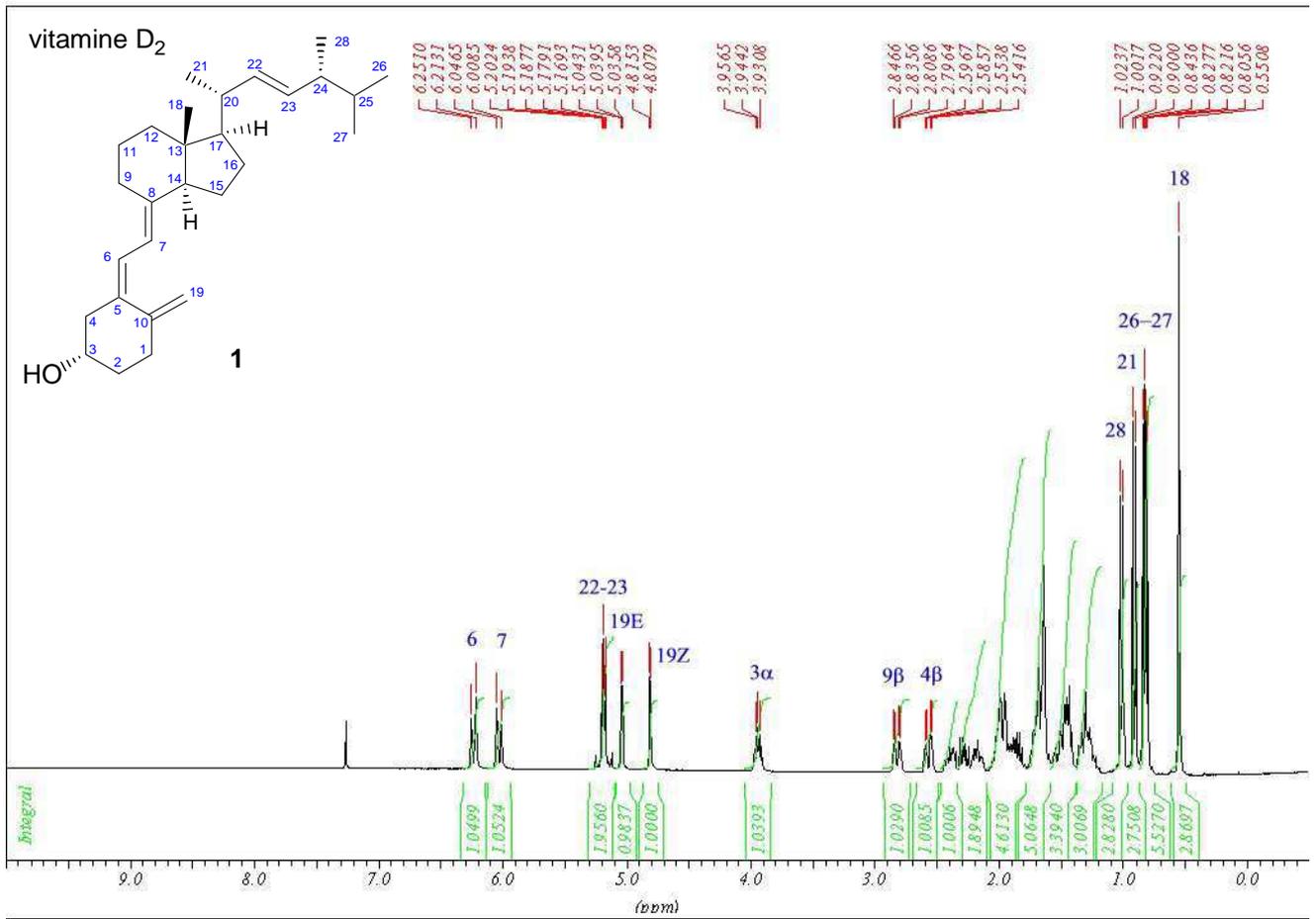
Déplacements <sup>1</sup> H pour les Vitamines D (suite)										
Position	20-CO-NHS	20-CO-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	22-OH	22-OpTs	22-Iodo	22-Azido	22-Amino	22-NH-[3-(imid-4-yl)-prop]	Moy.	Ecart
	21	79		53	54	82	84	75		
1 α	2,18 c	2,17 m	2,18 c	2,17 m	2,18 m	2,17 c	2,17 c	–	2,17	0,00
1 β	2,40 c	2,40 m	2,40 c	2,37 m	2,40 m	2,40 c	2,40 c	2,39 c	2,40	0,01
3 α	3,95 m	3,94 m	3,95 m	3,96 m	3,95 m	3,95 m	3,93 m	3,96 m	3,95	0,01
4 α	2,57	2,57 dd	2,58 dd	2,57 dd	2,57 dd	2,57 dd	2,57 dd	2,57 c	2,57	0,00
4 β	2,29	2,29 dd	2,29 dd	2,28 dd	2,29 dd	2,29 dd	2,28 dd	2,29 dd	2,29	0,01
6	6,22 d	6,22 d	6,24 d	6,21 d	6,43 d	6,43 d	6,43 d	6,23 d	6,25	0,07
7	6,05 d	6,02 d	6,04 d	6,01 d	6,04 d	6,04 d	6,04 d	6,04 d	6,03	0,01
9 β	2,82 c	2,83 dd	2,83 dd	2,82 dd	2,83 dd	2,83 dd	2,83 dd	2,83 d	2,83	0,01
18	0,61 s	0,55 s	0,57 s	0,51 s	0,59 s	0,56 s	0,56 s	0,55 s	0,56	0,02
19 E	5,05 s	5,04 s	5,05 t	5,04 s	5,06 s	5,05 t	5,05 t	5,05 s	5,02	0,08
19 Z	4,81 s	4,80 d	4,82 d	4,80 d	4,82 d	4,81 d	4,82 d	4,81 s	4,84	0,08
21	1,39 d	1,18 d	1,06 d	0,99 d	1,04 d	1,06 d	0,99 d	0,92 d	1,08	0,12
22 α	–	–	3,65 dd	3,98 dd	3,34 dd	3,38 dd	2,75 dd	3,34 dd	4,25	1,66
22 β	–	–	3,38 dd	3,80 dd	3,19 dd	3,07 dd	–	2,98 c	3,88	1,55

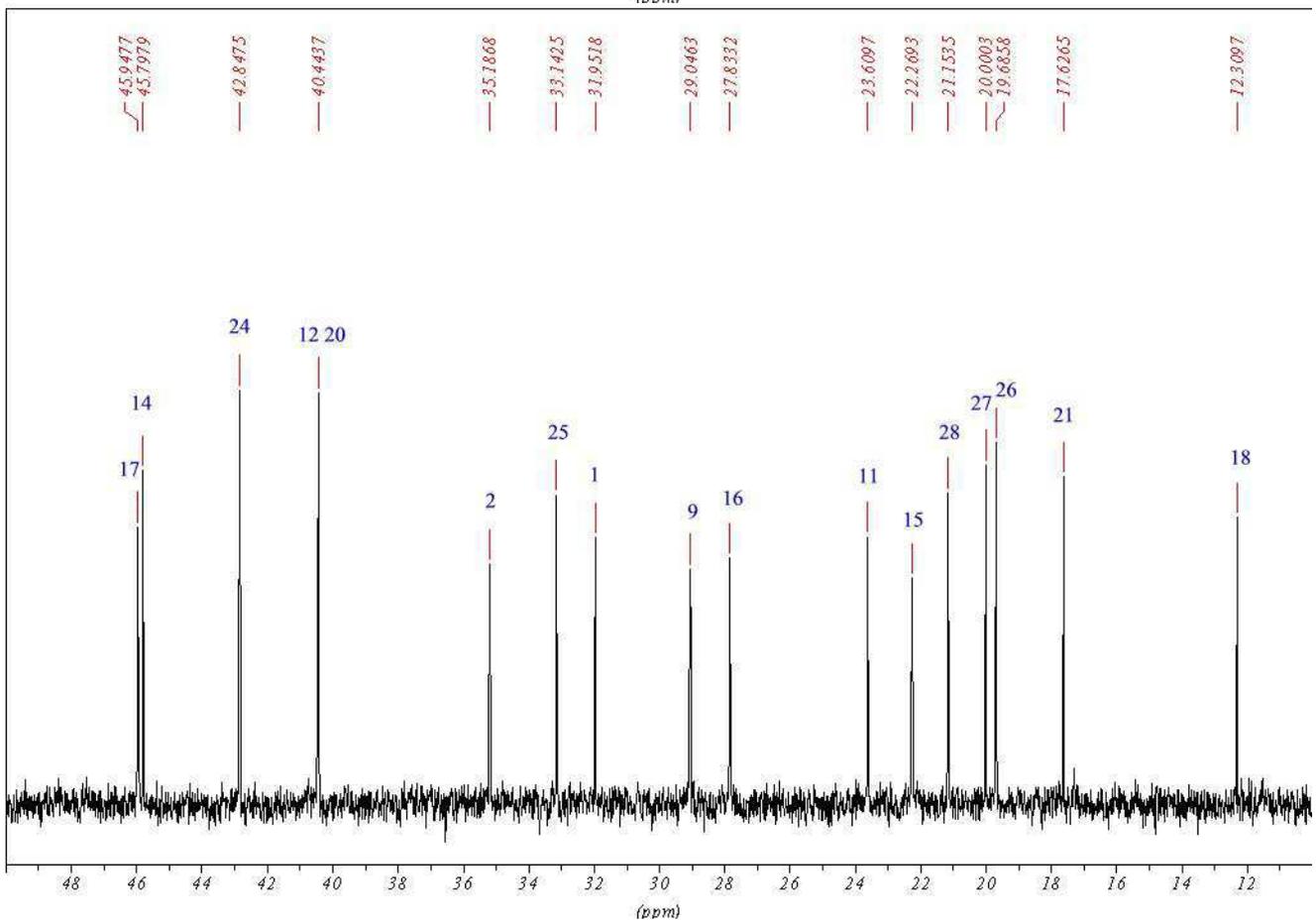
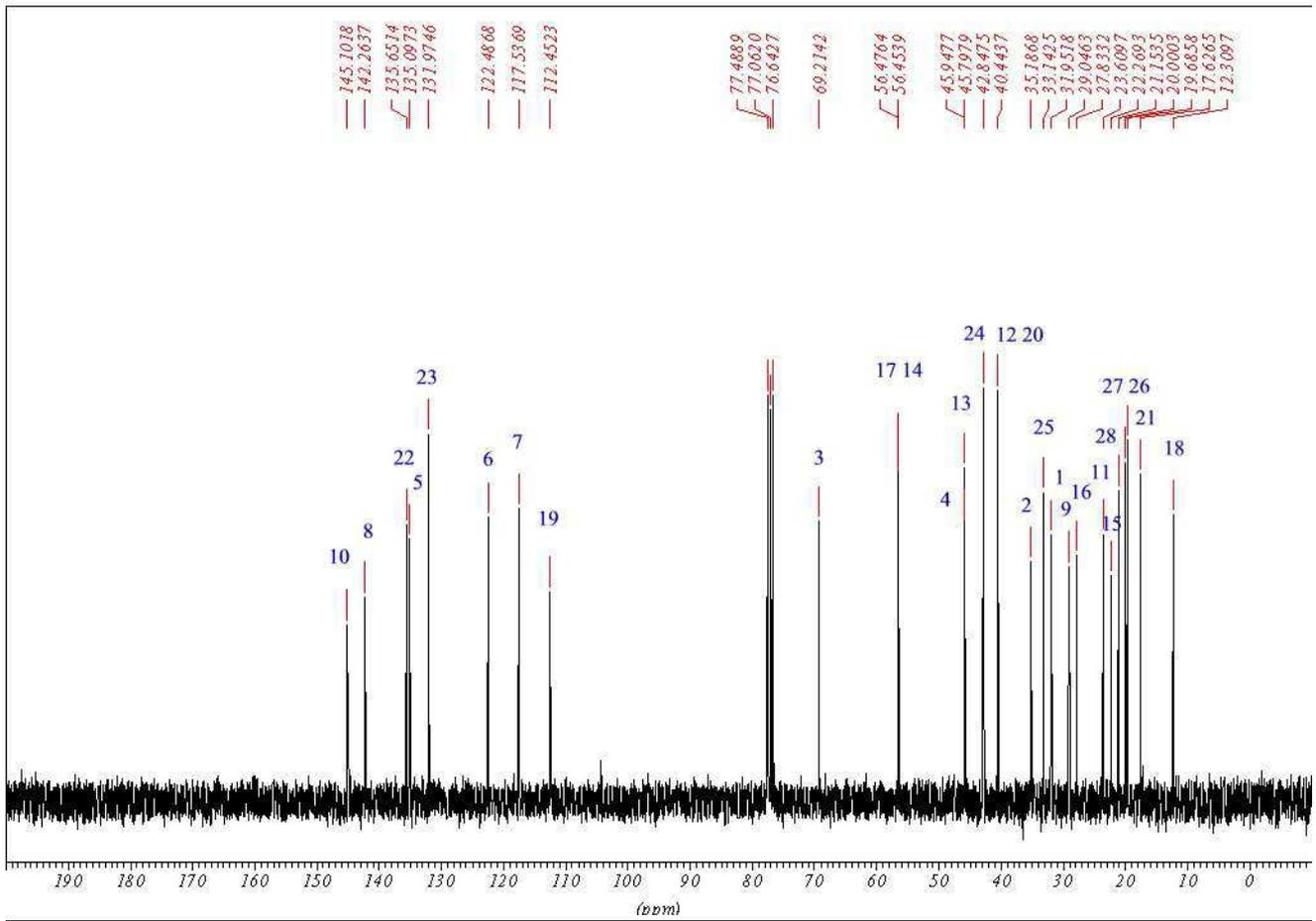
Tableau 17 : Comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H des dérivés « vitamine D »

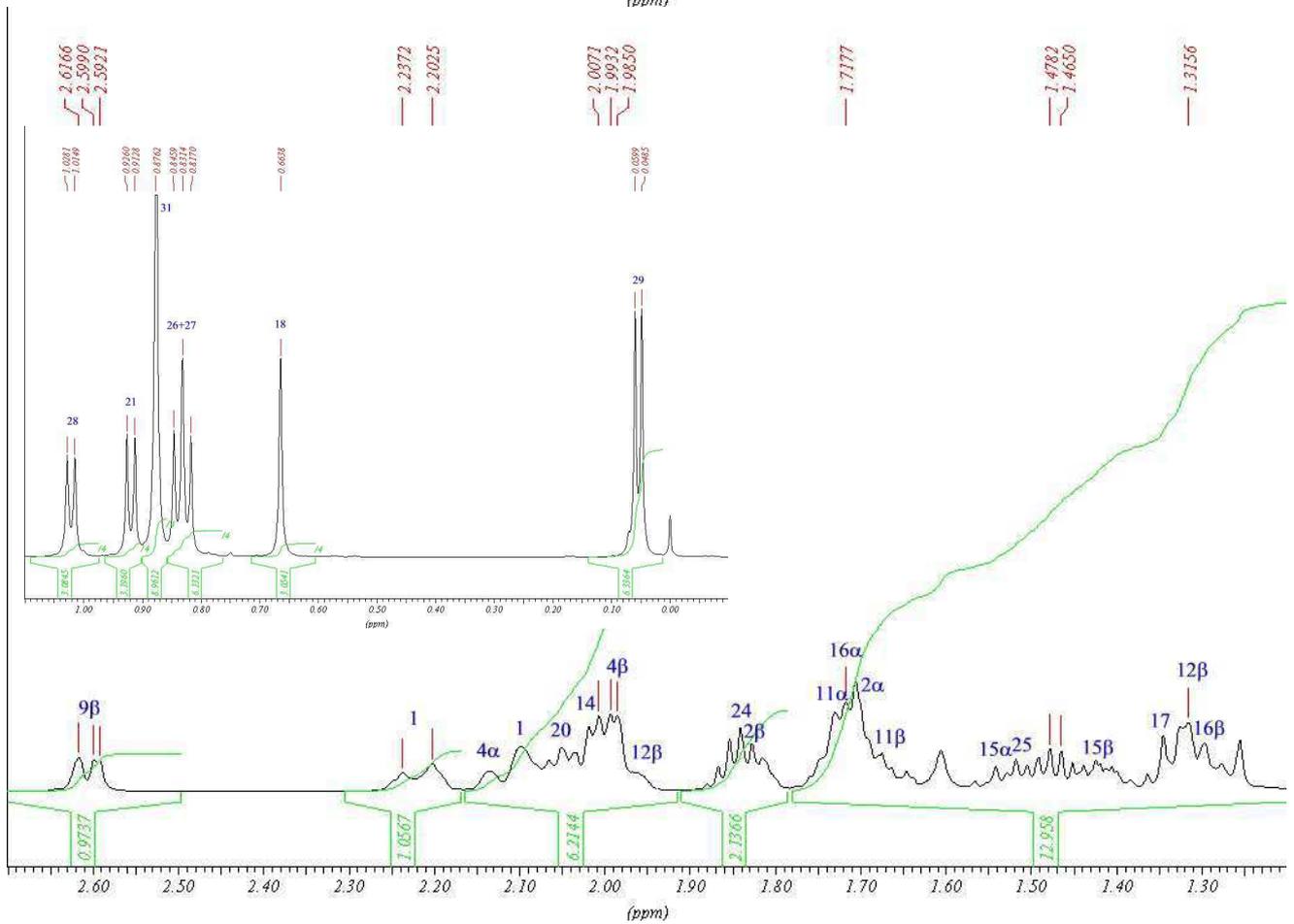
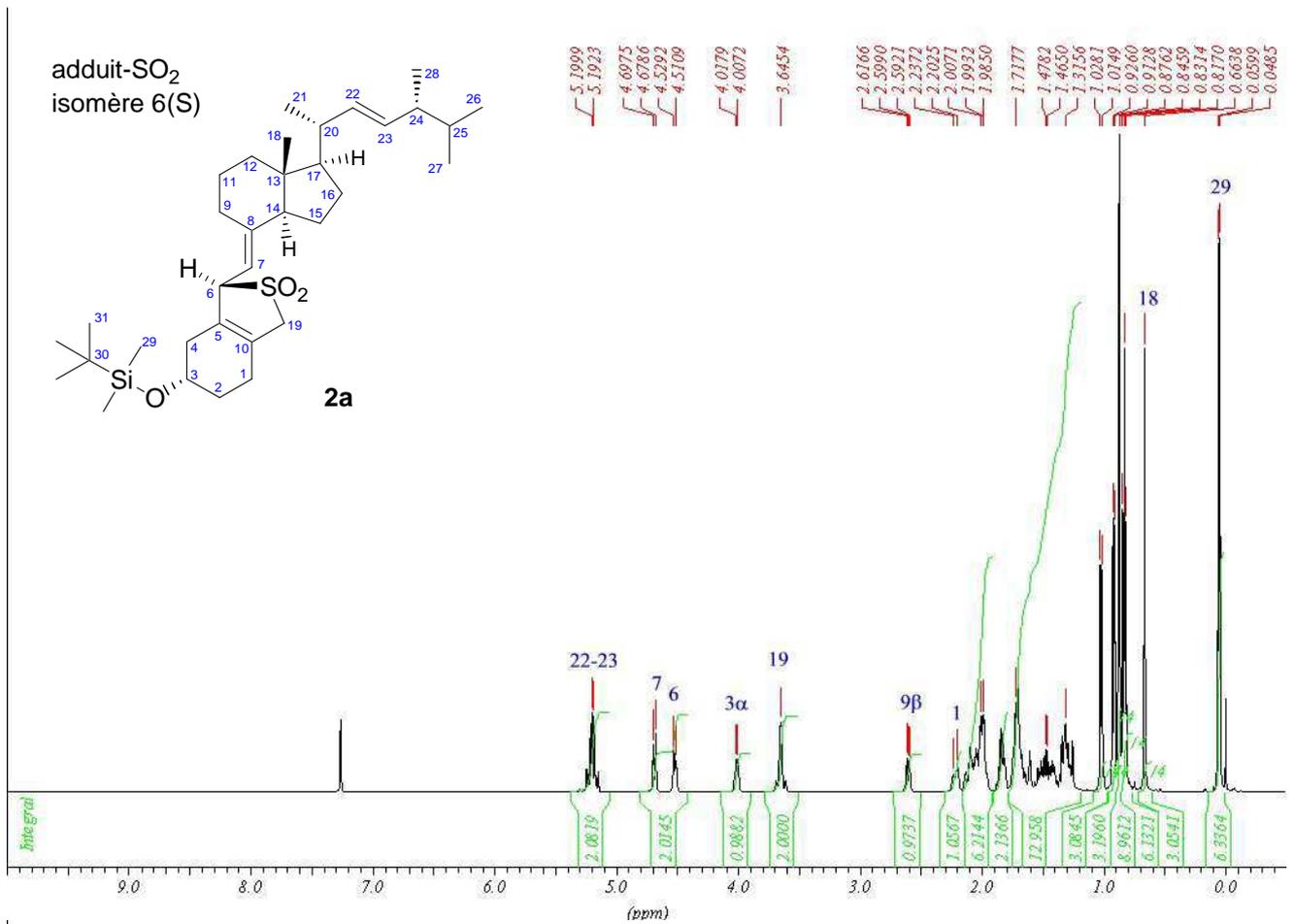
Déplacements $^{13}\text{C}$ pour les Vitamines D										
Position	Vit. D <sub>2</sub>	20-COOH	22-CMO	22-COOH	23-CMO	22-S-Bz-COOH	20-CO-hist.	22-CMO-hist.	23-CMO-hist.	22-(S-Bz-CO-hist.)
	1	20	27	36	38	40	58	64	68	70
(C-1)	32,6	32,0	31,9	31,9	31,9	32,4	32,0	31,9	31,9	31,9
(C-2)	35,8	35,1	35,1	35,2	35,1	35,3	35,2	35,1	35,2	35,2
(C-3)	69,8	69,3	69,3	69,2	69,3	69,4	69,2	69,1	69,1	69,2
(C-4)	46,6	45,9	45,8	45,9	45,9	45,9	45,9	45,8	45,9	45,9
(C-5)	135,7	135,6	135,5	135,3	135,3	135,9	135,5	135,8	135,6	135,5
(C-6)	123,1	122,2	122,3	122,3	122,4	122,0	122,3	122,1	122,2	122,3
(C-7)	118,1	117,9	117,9	117,7	117,7	118,0	117,8	118,0	117,8	117,8
(C-8)	142,9	141,3	141,3	141,7	141,8	141,6	141,5	141,1	141,5	141,6
(C-9)	29,7	28,9	28,9	28,9	28,9	29,0	28,9	28,9	28,9	29,0
(C-10)	145,7	145,0	145,0	145,1	145,0	145,2	145,1	145,1	145,1	145,1
(C-11)	24,2	23,4	23,4	23,5	23,5	23,5	23,4	23,4	23,4	23,5
(C-12)	41,0	40,3	40,2	40,4	40,3	40,4	40,3	40,2	40,4	?
(C-13)	46,4	45,8	46,0	45,9	45,9	46,2	45,7	45,9	45,8	46,1
(C-14)	57,1	55,9	56,1	56,3	56,2	56,2	55,9	56,1	56,3	56,2
(C-15)	22,9	22,3	22,3	22,2	22,2	22,3	22,3	22,3	22,2	22,3
(C-16)	28,4	26,7	26,9	27,7	27,6	27,7	26,8	26,9	27,6	27,6
(C-17)	57,1	52,9	54,1	56,2	56,2	55,9	53,3	54,1	56,1	55,9
(C-18)	12,9	12,2	12,3	12,0	12,0	12,1	12,2	12,3	12,0	12,1
(C-19)	113,1	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5
(C-20)	41,0	42,8	37,3	34,0	34,8	36,6	45,2	37,4	34,8	36,6
(C-21)	18,2	17,2	18,0	19,7	19,1	19,1	17,8	18,0	19,2	19,1
(C-22)	136,3	182,3	157,5	?	35,7	39,8	?	157,8	35,7	?
(C-23)	132,6	-	-	-	152,7	-	-	-	152,9	-

Déplacements $^{13}\text{C}$ pour les Vitamines D (suite)										
Position	20-CO-NHS	20-CO-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NHBOC	22-OH	22-OptS	22-Iodo	22-Azido	22-Amino	22-NH-[3-(imid-4-yl)-prop]	Moy.	Ecart
	21	79		53	54	82	84	75		
(C-1)	31,9	32,0	31,9	31,9	31,9	31,9	32,0	32,3	32,0	0,2
(C-2)	35,2	35,2	35,2	35,1	35,2	35,2	35,3	35,6	35,2	0,2
(C-3)	69,2	69,2	69,2	69,2	69,2	69,2	69,2	69,6	69,3	0,2
(C-4)	45,9	45,9	45,9	45,9	45,9	45,9	46,0	45,4	45,9	0,2
(C-5)	135,8	135,5	135,3	135,5	135,4	135,5	135,4	135,9	135,5	0,2
(C-6)	122,2	122,3	122,3	122,2	122,3	122,3	122,3	122,7	122,3	0,2
(C-7)	118,1	117,8	117,6	117,8	117,8	117,8	117,7	118,2	117,9	0,2
(C-8)	141,0	141,5	141,9	141,5	141,6	141,6	141,9	142,0	141,6	0,4
(C-9)	28,9	28,9	29,0	28,9	28,9	28,9	29,0	29,3	29,0	0,2
(C-10)	145,0	145,1	145,1	145,1	145,1	145,1	145,1	145,5	145,1	0,2
(C-11)	23,4	23,4	23,5	23,4	23,4	23,5	23,5	23,9	23,5	0,2
(C-12)	40,3	40,3	40,4	40,1	40,2	40,3	40,5	40,8	40,4	0,2
(C-13)	46,0	45,1	45,9	45,8	45,8	45,9	45,8	46,3	45,9	0,3
(C-14)	55,8	55,9	56,0	55,9	56,0	56,0	56,2	56,5	56,1	0,3
(C-15)	22,4	22,3	22,3	22,2	22,1	22,3	22,3	22,7	22,3	0,2
(C-16)	26,7	26,9	27,2	26,9	27,0	27,3	27,3	27,8	27,3	0,5
(C-17)	52,8	53,2	52,8	52,1	55,8	53,6	53,9	54,6	54,5	1,5
(C-18)	12,2	12,2	12,1	11,9	12,7	12,1	12,1	12,5	12,2	0,3
(C-19)	112,6	112,5	112,4	112,5	112,5	112,5	112,4	112,9	112,5	0,2
(C-20)	40,6	45,1	39,1	36,5	37,3	37,3	?	37,2	38,5	3,4
(C-21)	17,4	17,8	16,9	17,0	20,9	17,9	17,1	17,9	18,2	1,1
(C-22)	?	171,8	67,9	75,5	21,0	58,0	47,5	58,9	89,0	58,3
(C-23)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

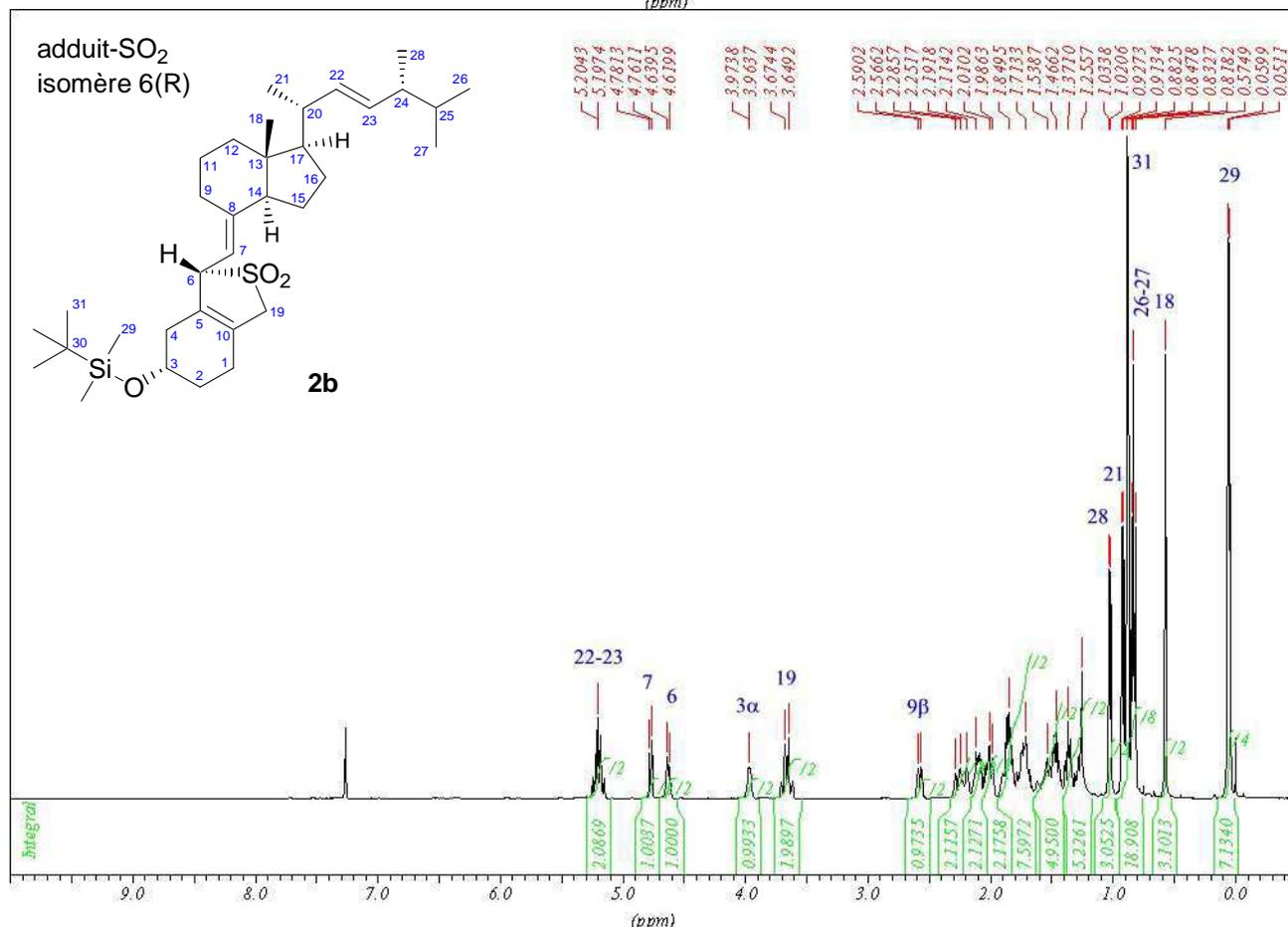
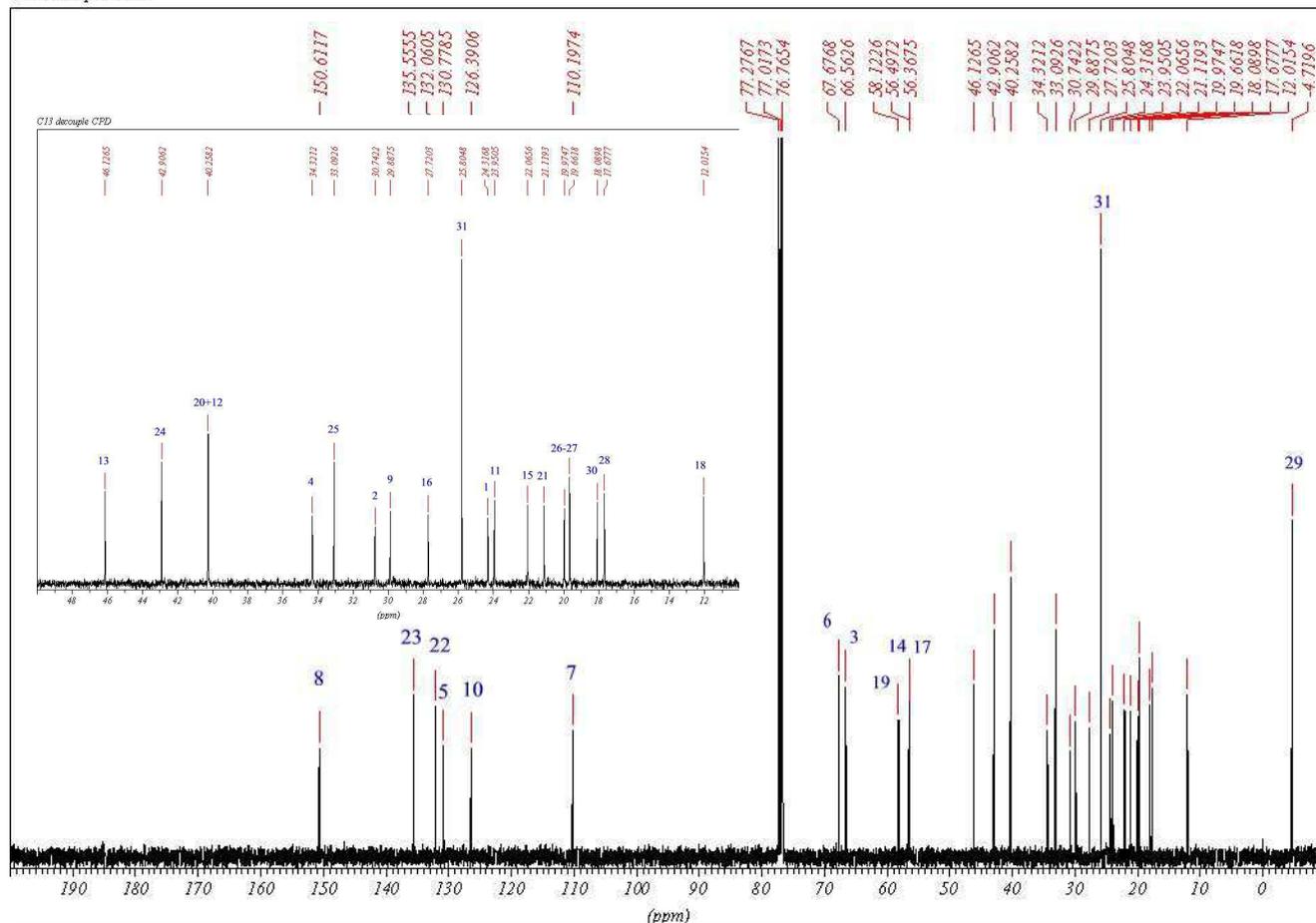
Tableau 18 : Comparaison des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  des dérivés « vitamine D »Annexe B : Spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$

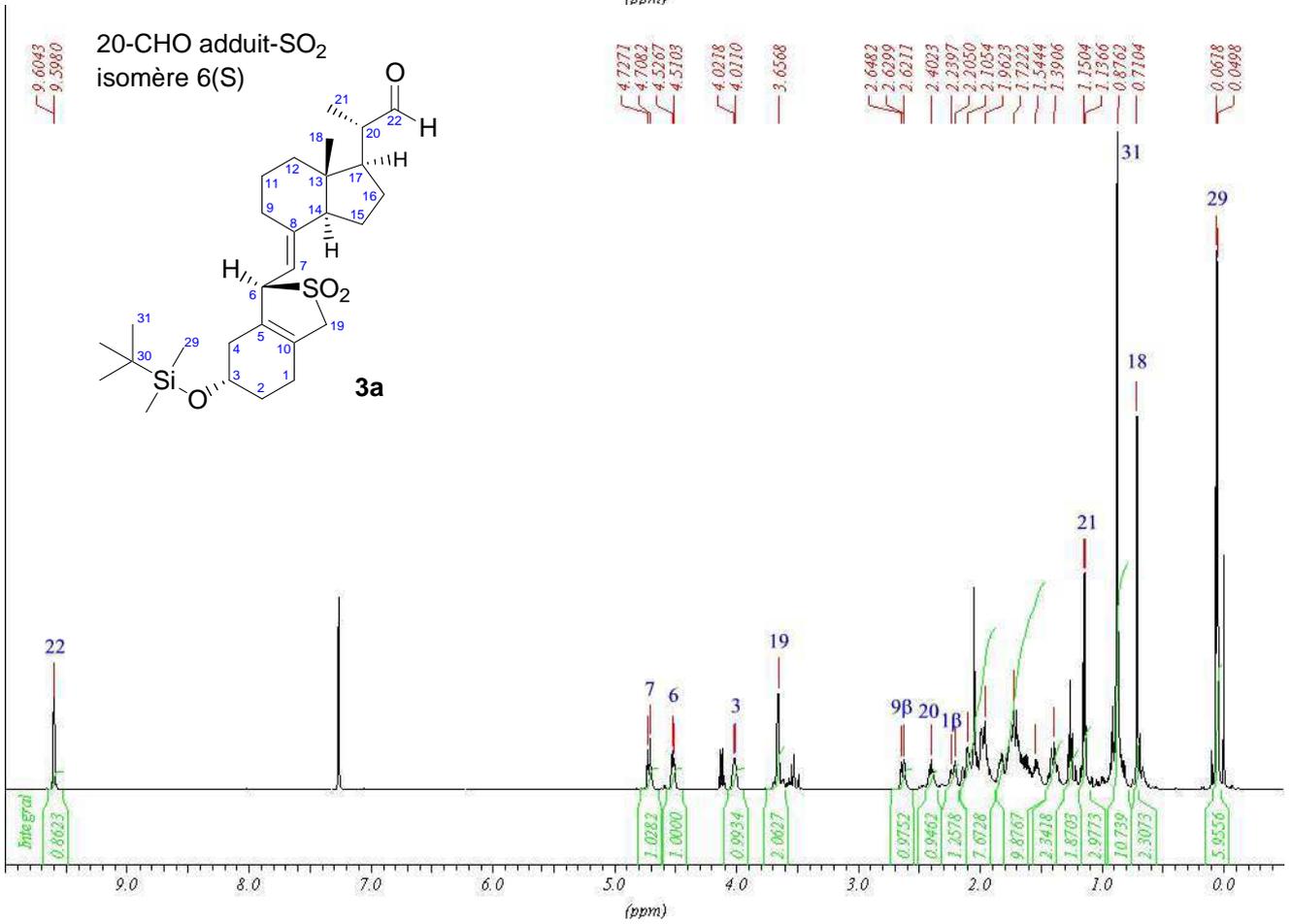
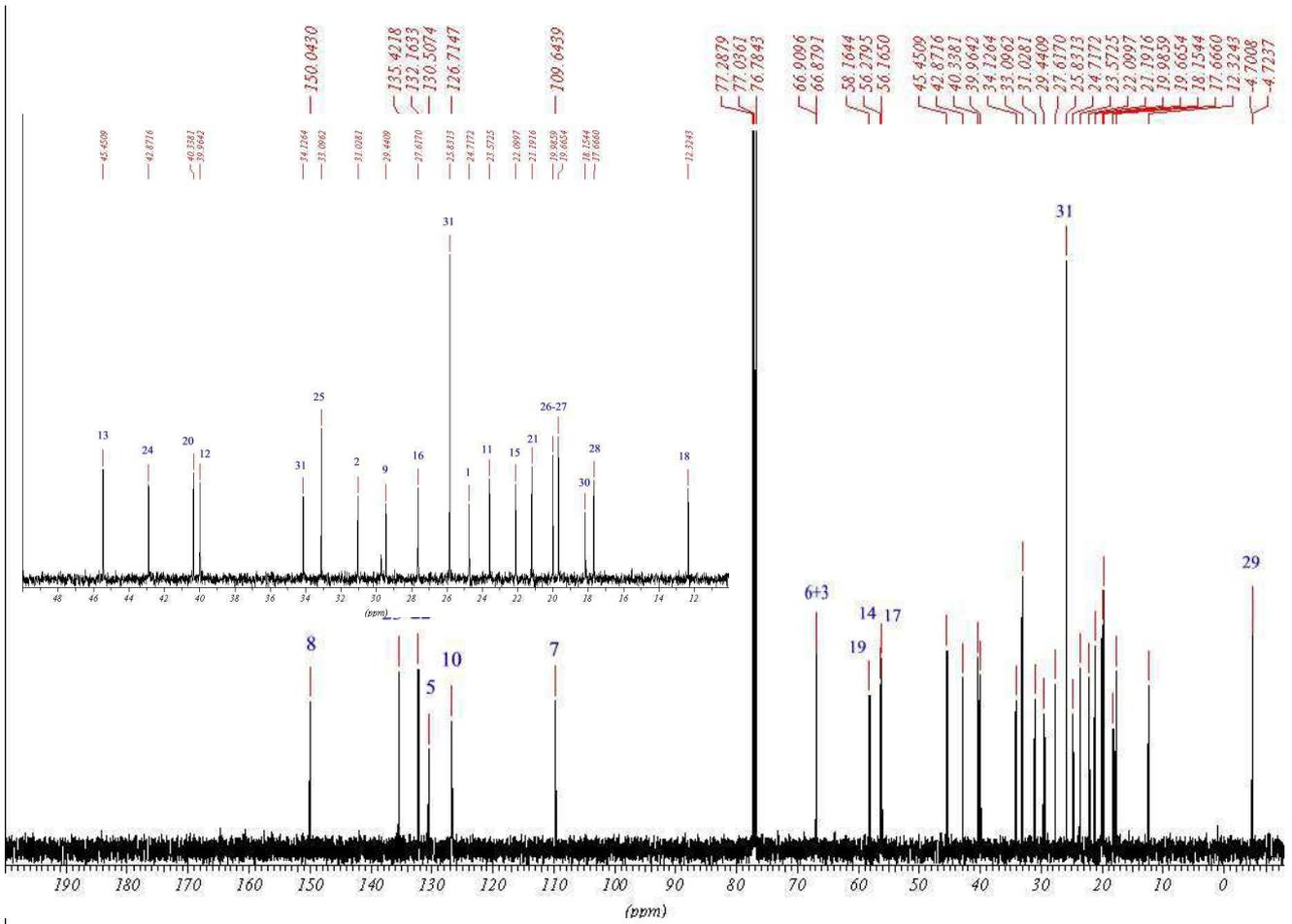


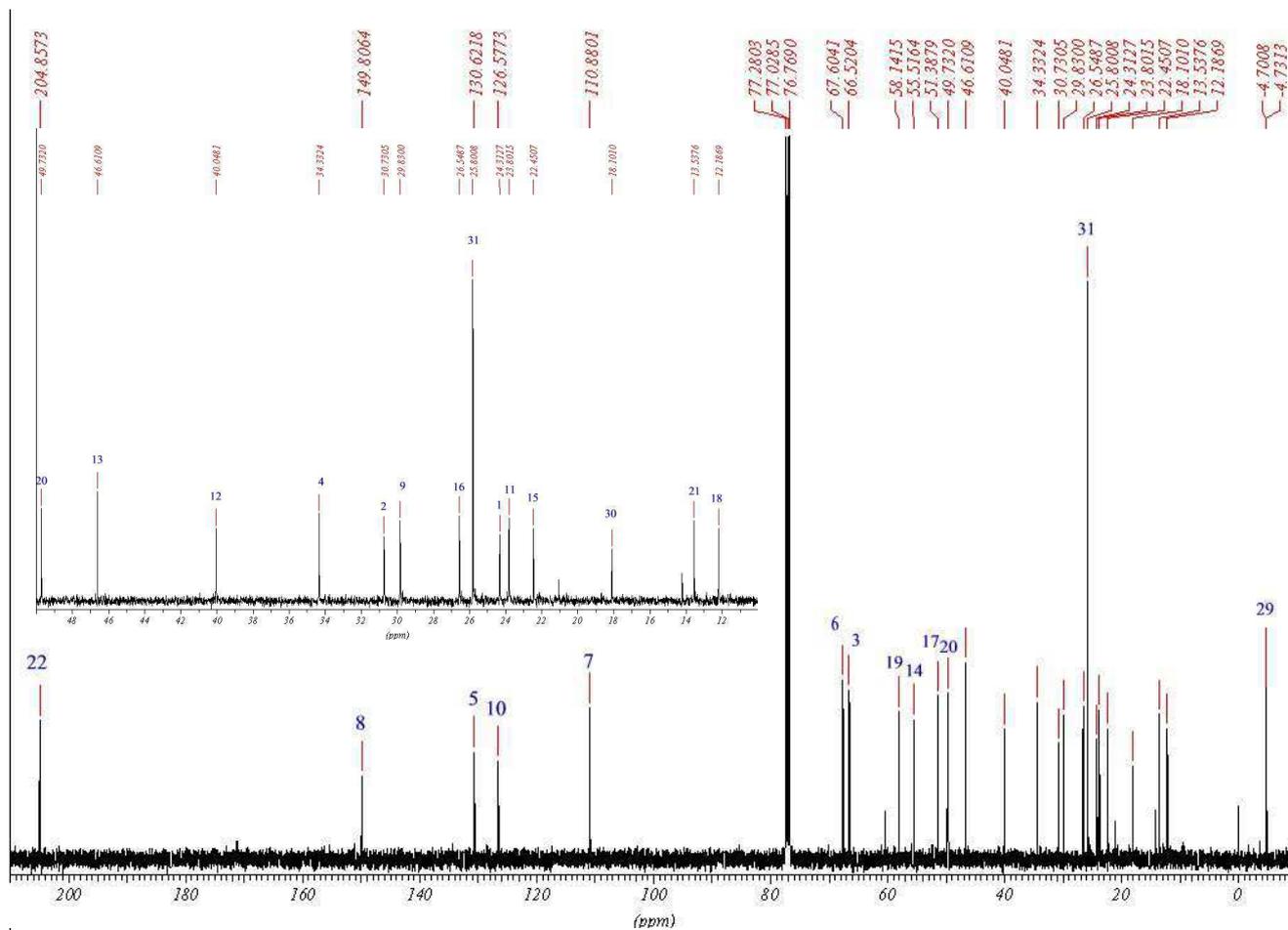




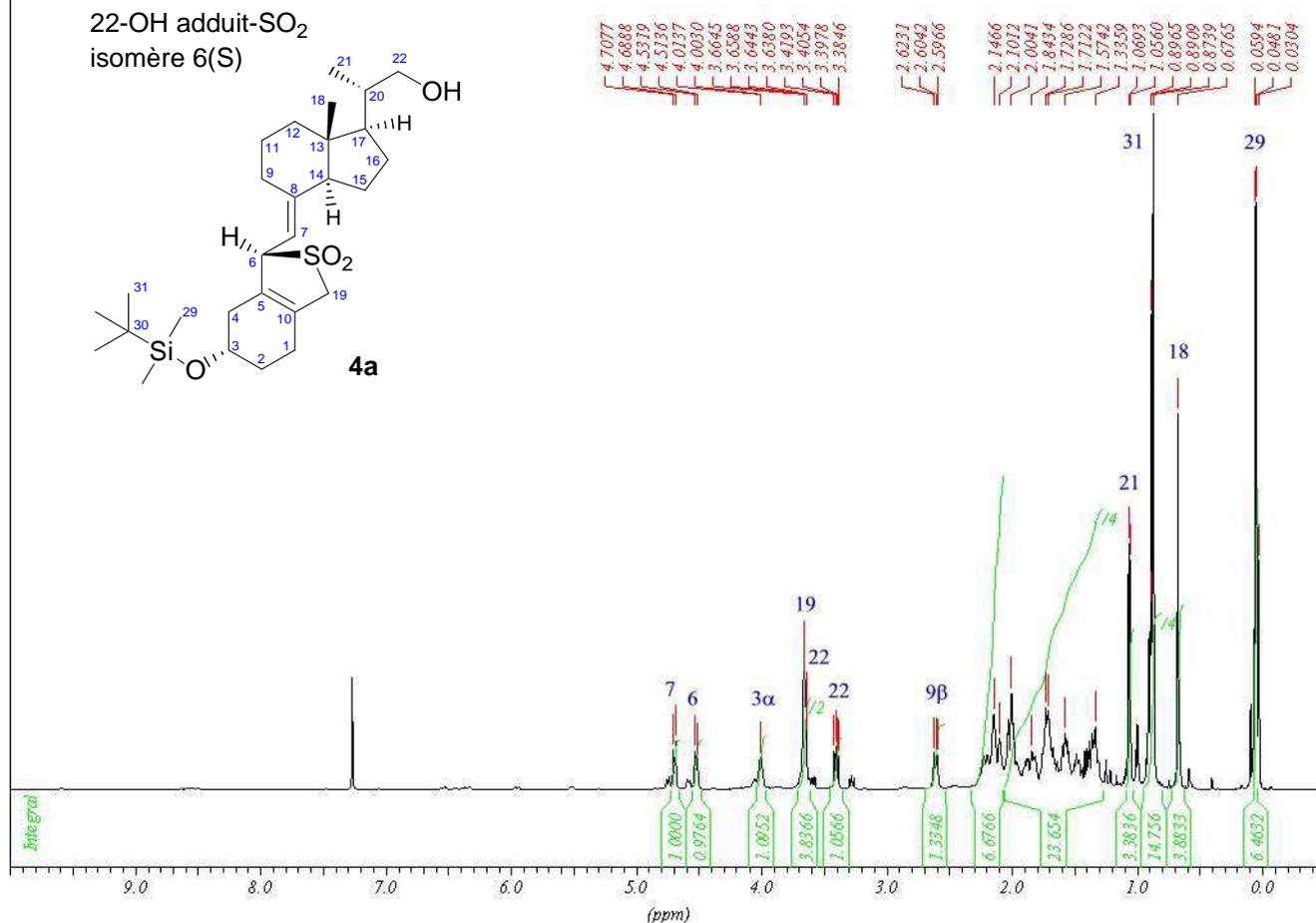
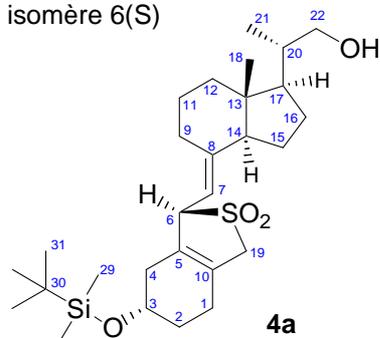
C13 decouple CPD

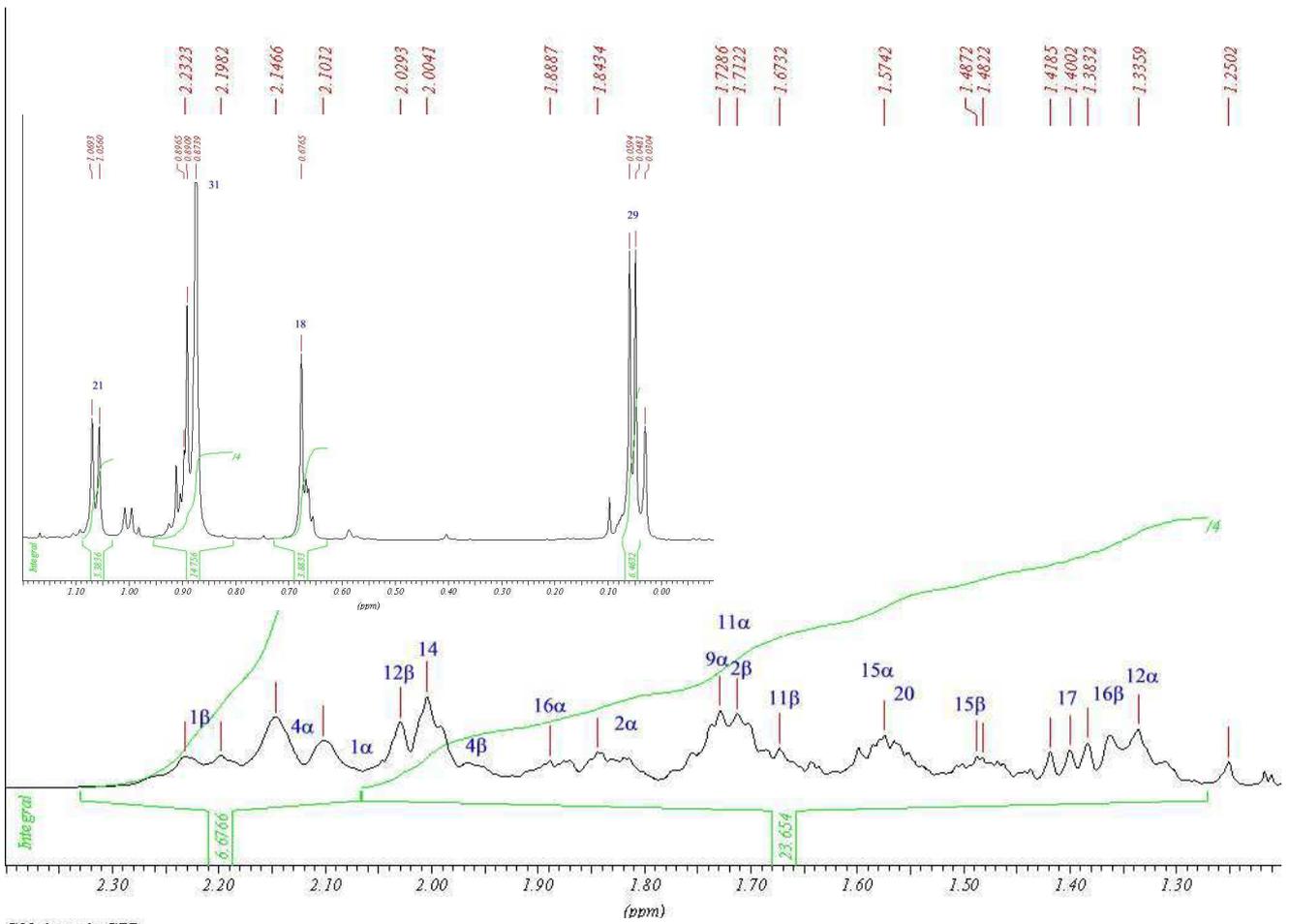




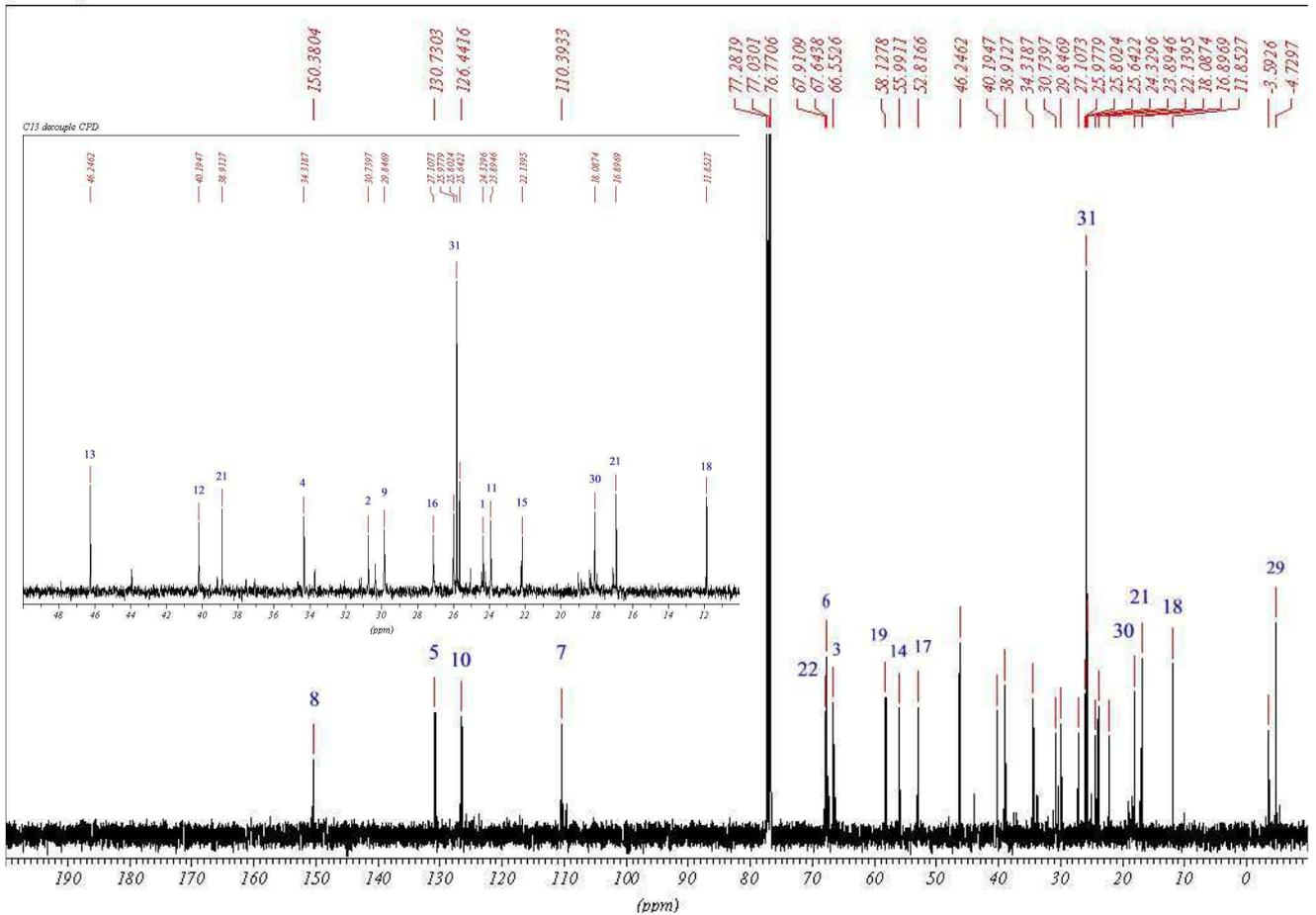


22-OH adduit-SO<sub>2</sub>  
isomère 6(S)

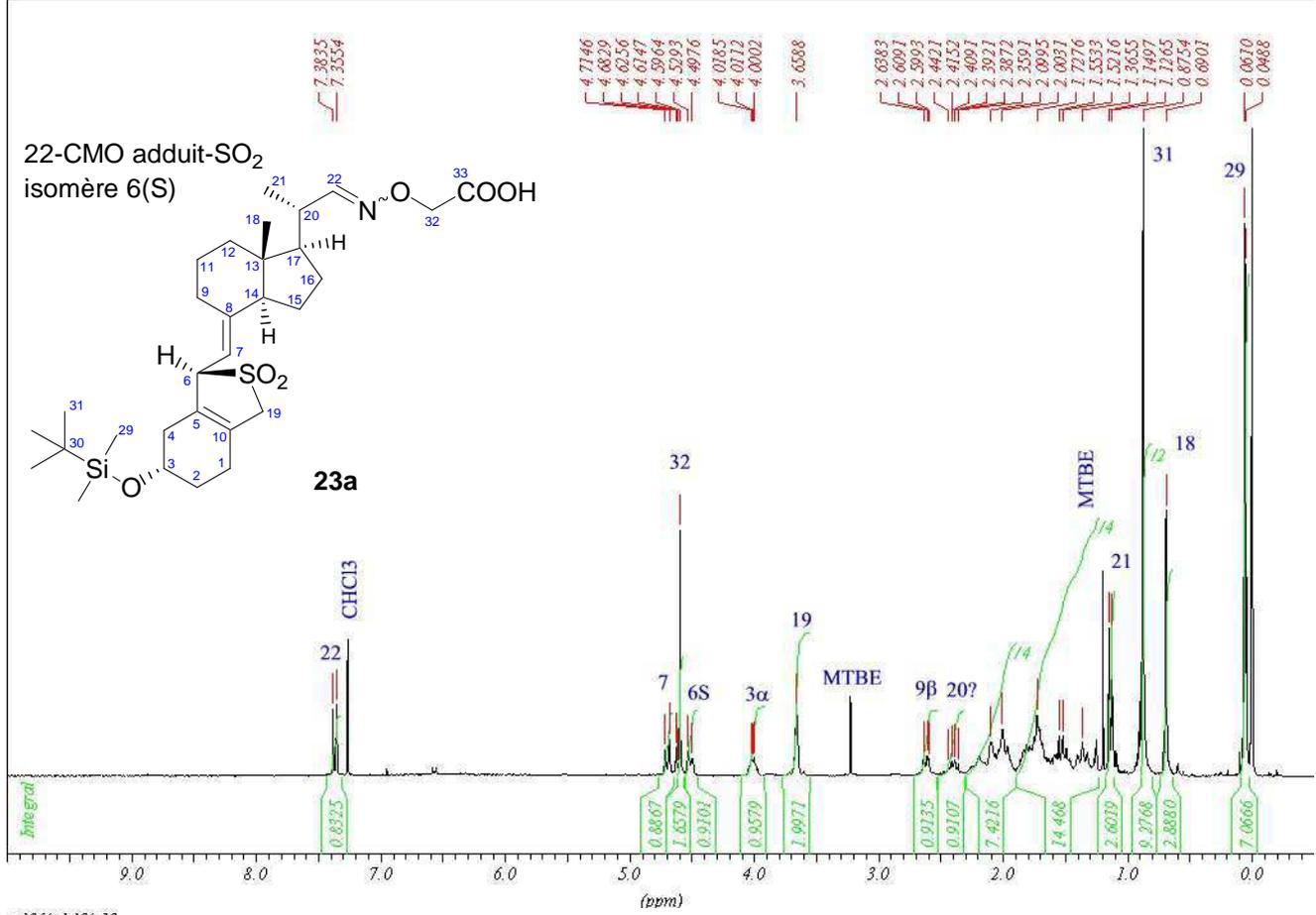




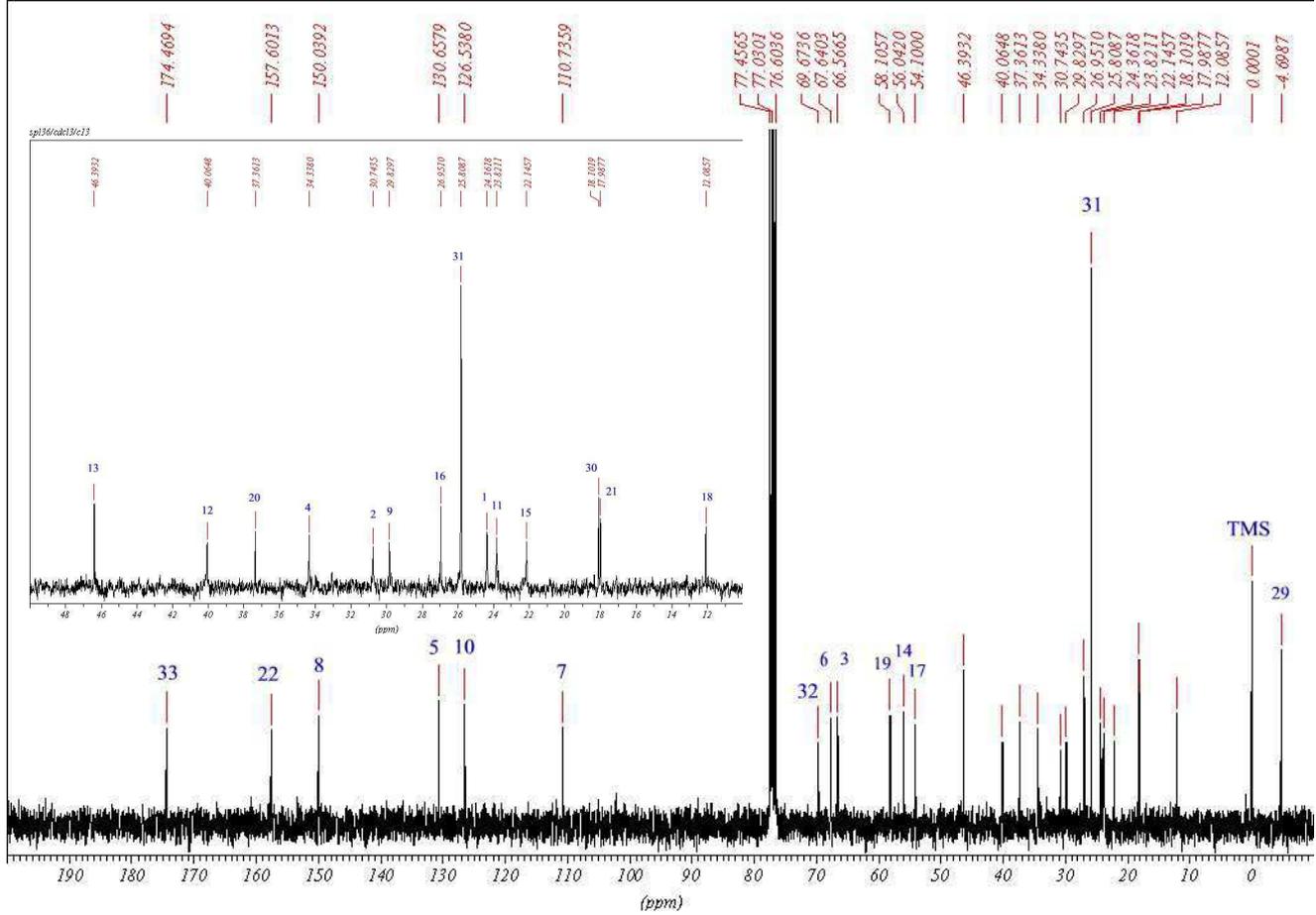
<sup>13</sup>C decouple CPD



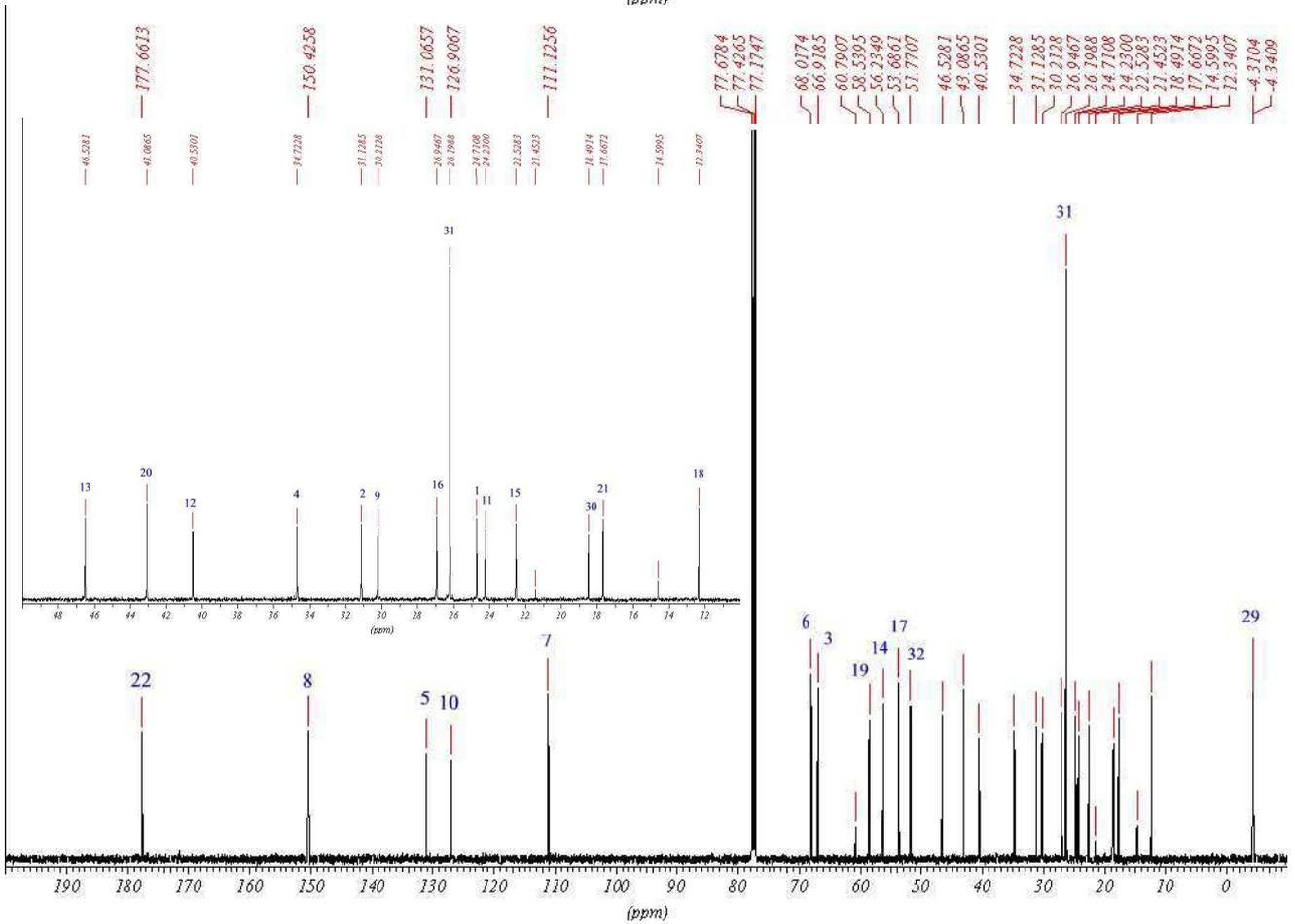
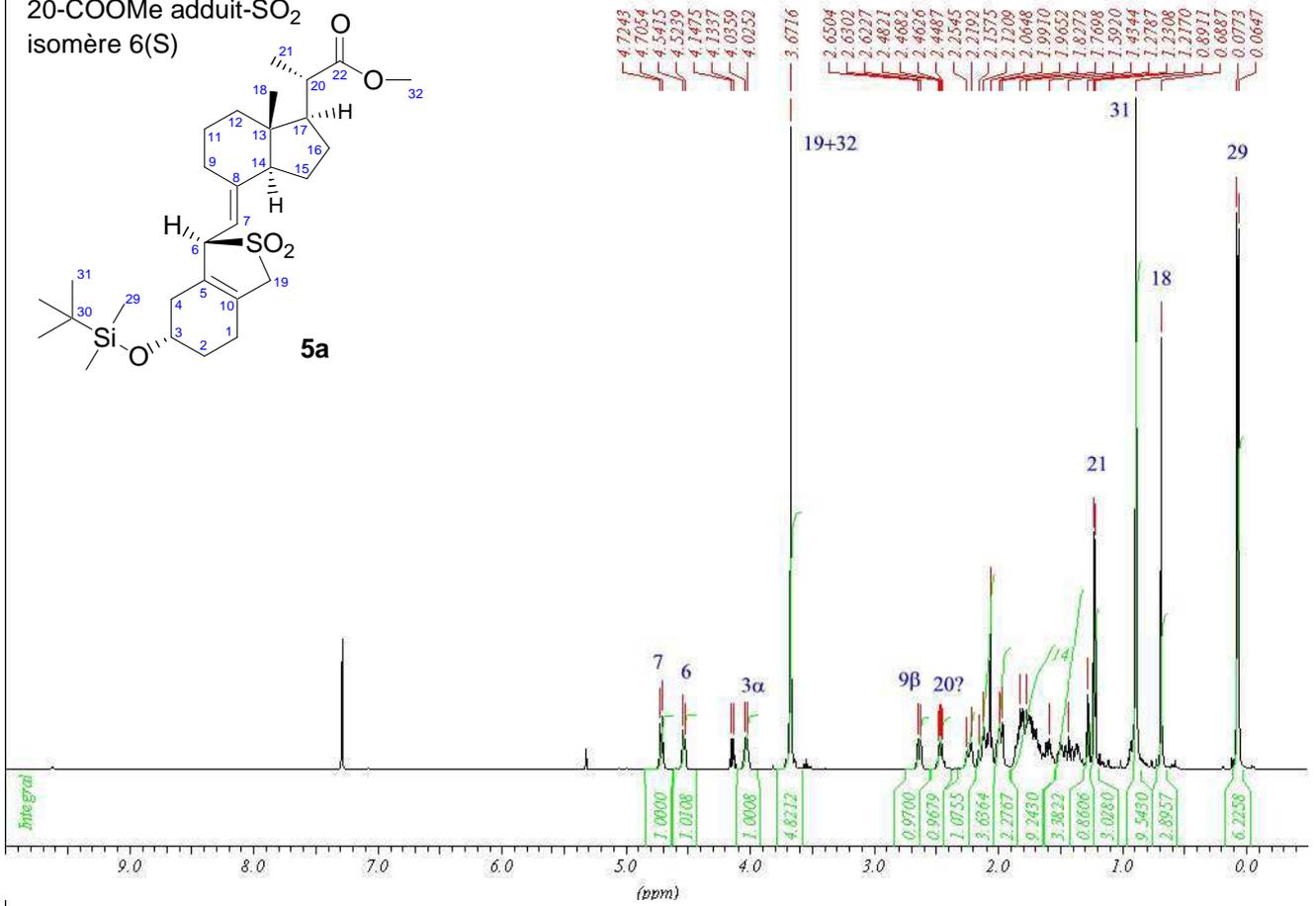
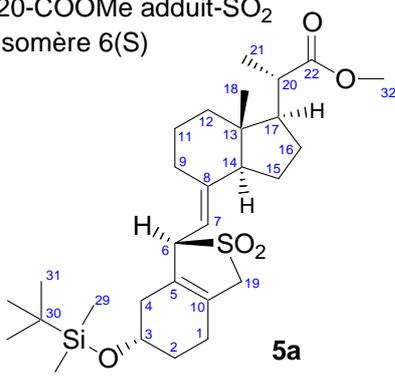
spi36/cdc13/h1



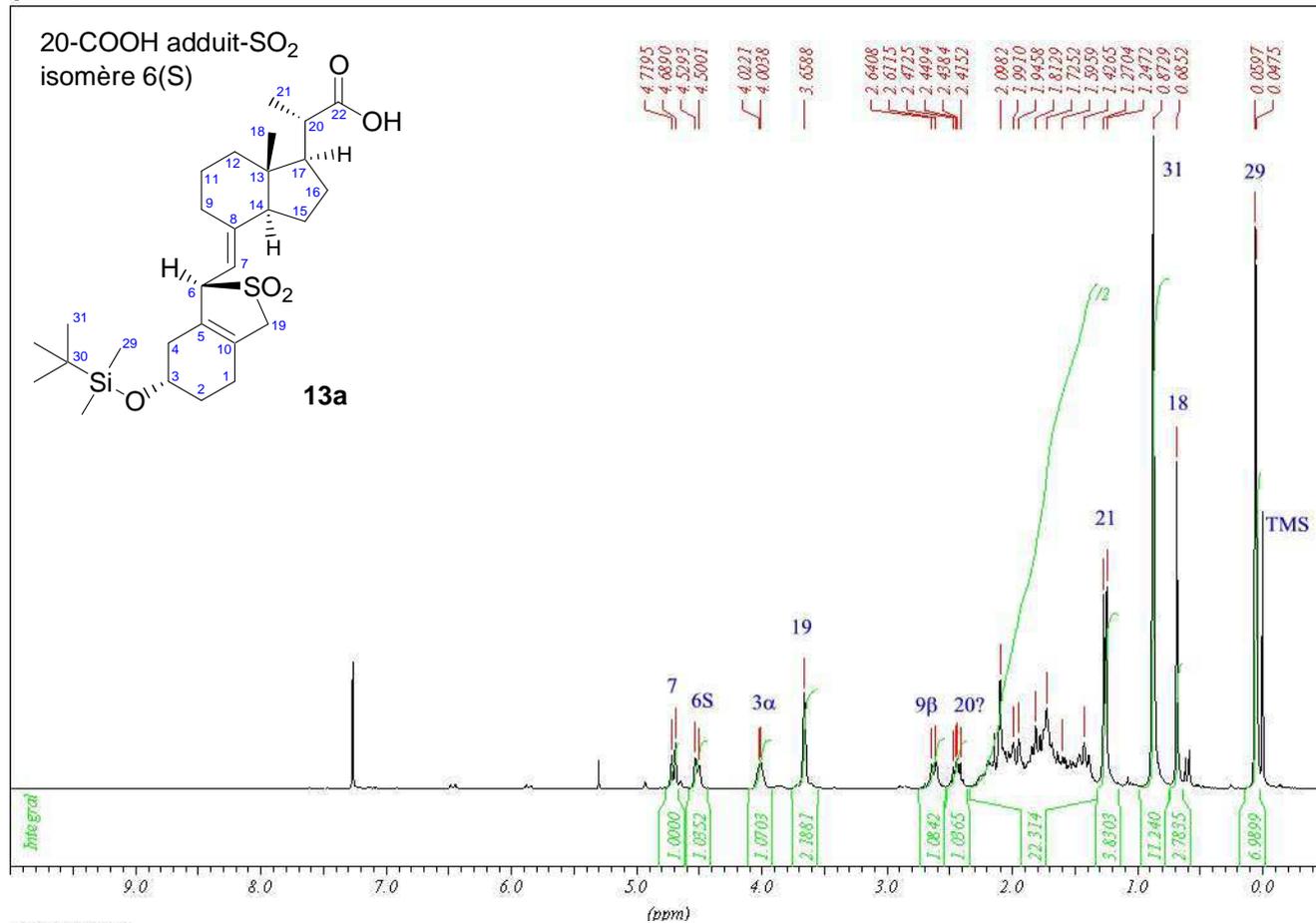
spi36/cdc13/c13



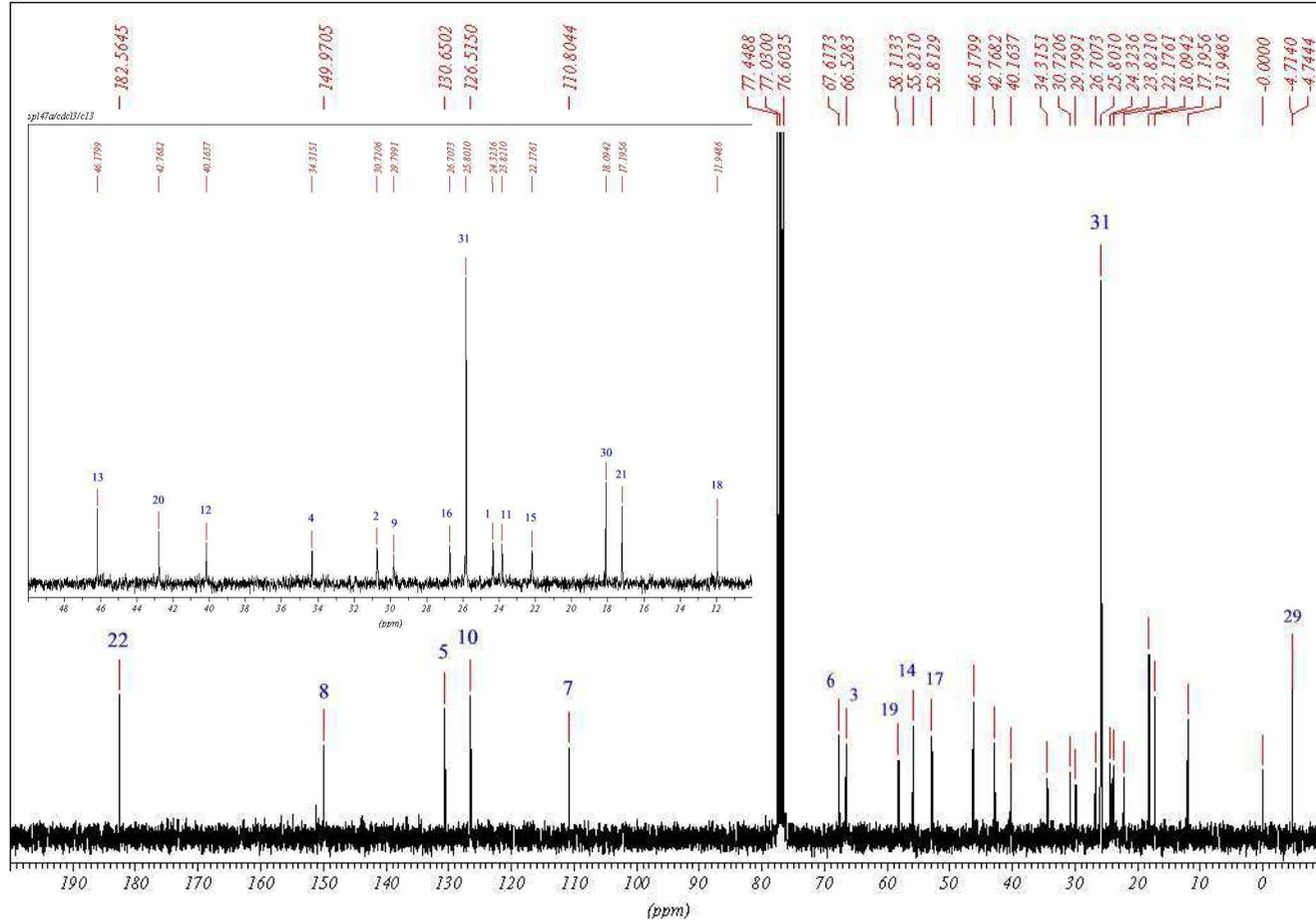
20-COOMe adduit-SO<sub>2</sub>  
isomère 6(S)



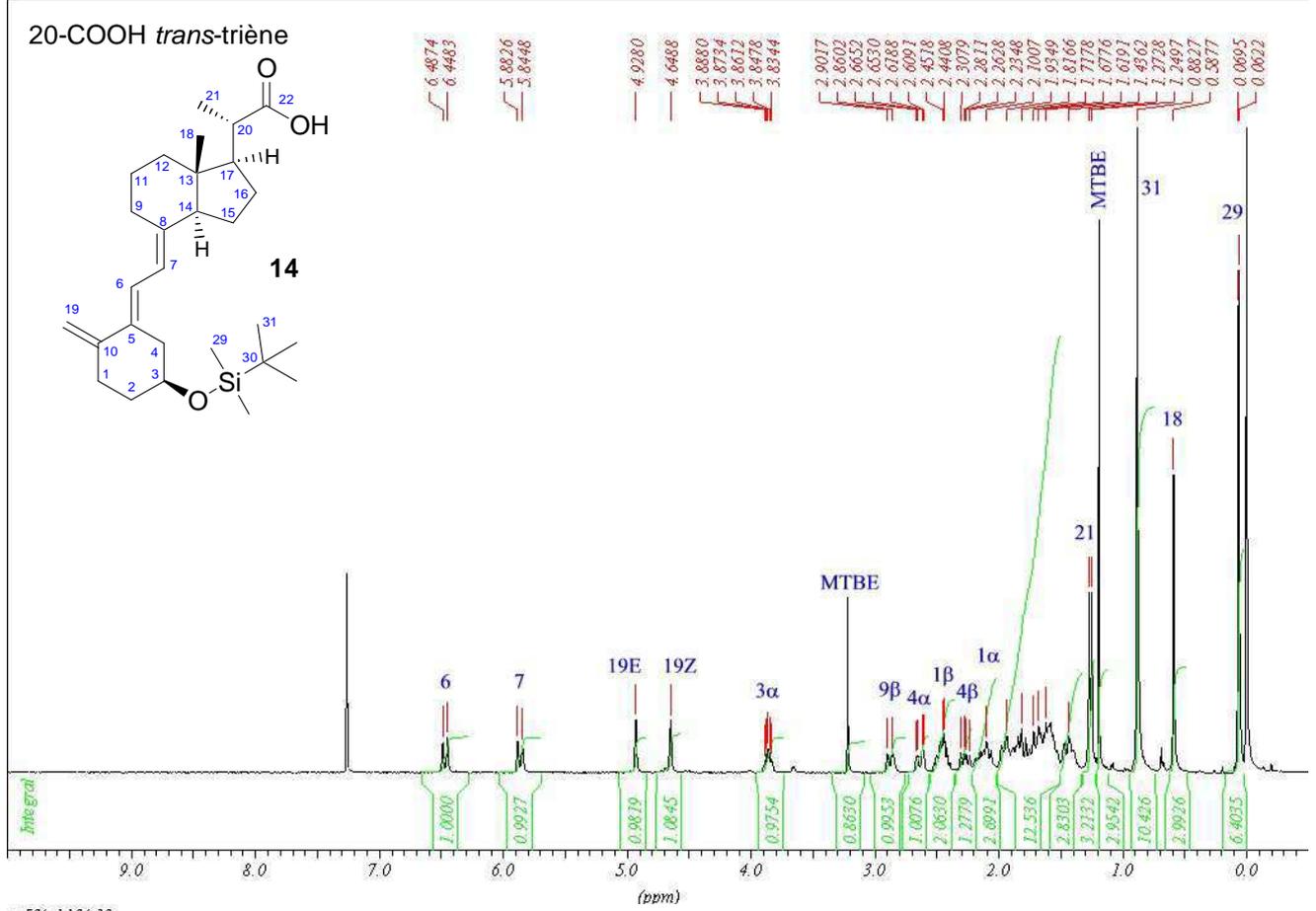
spi47a/cdc13/h1



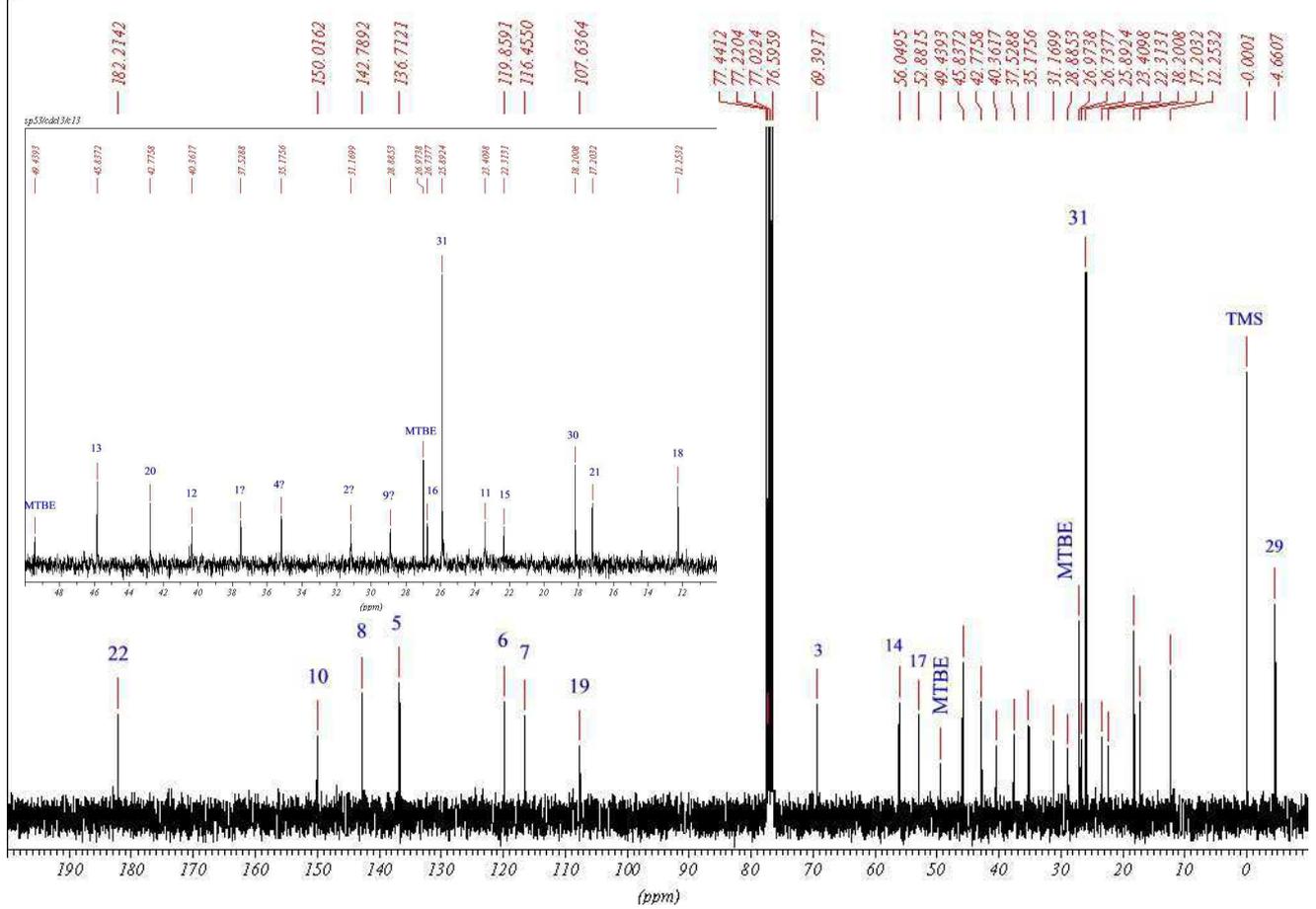
spi47a/cdc13/c13

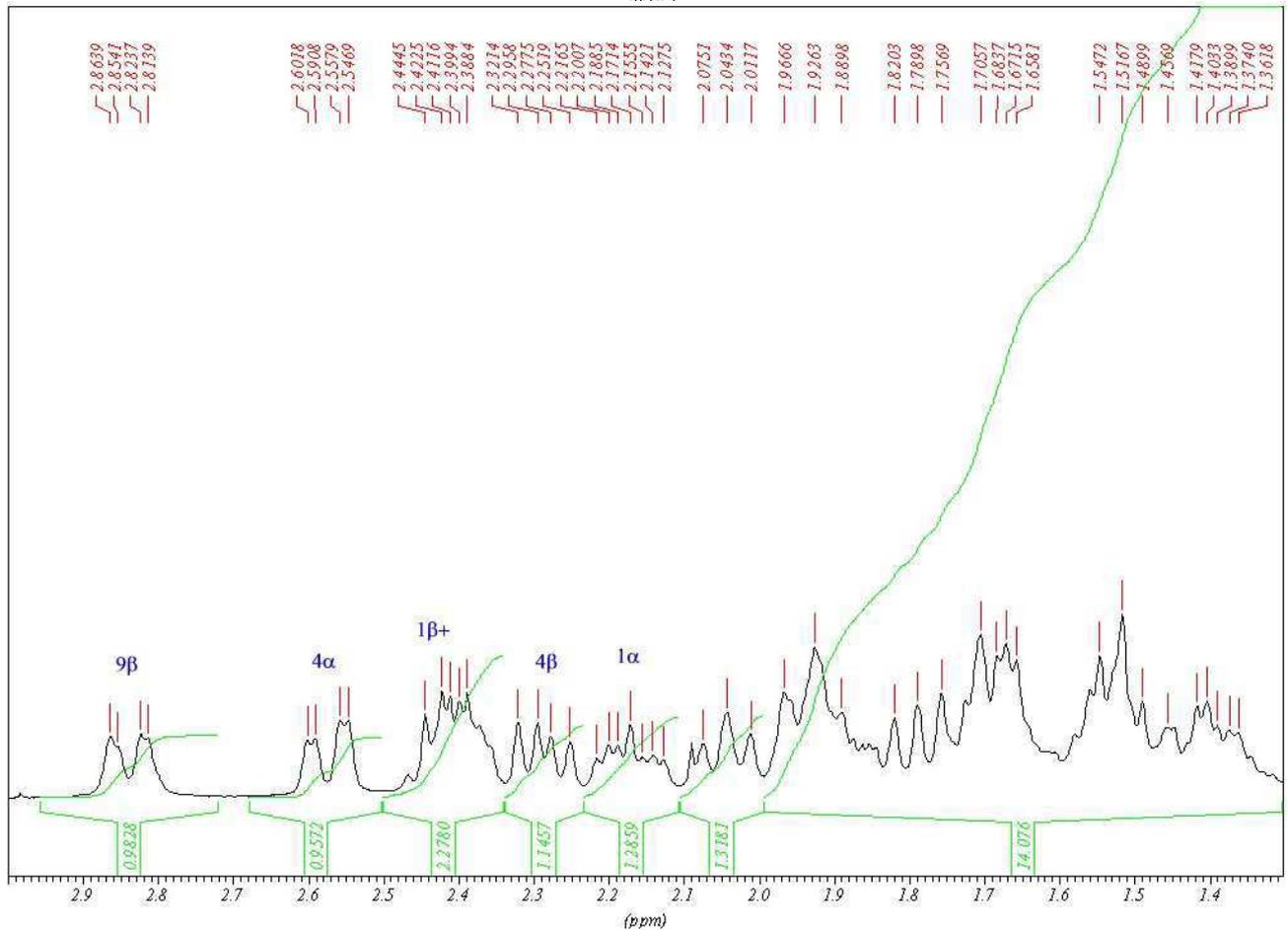
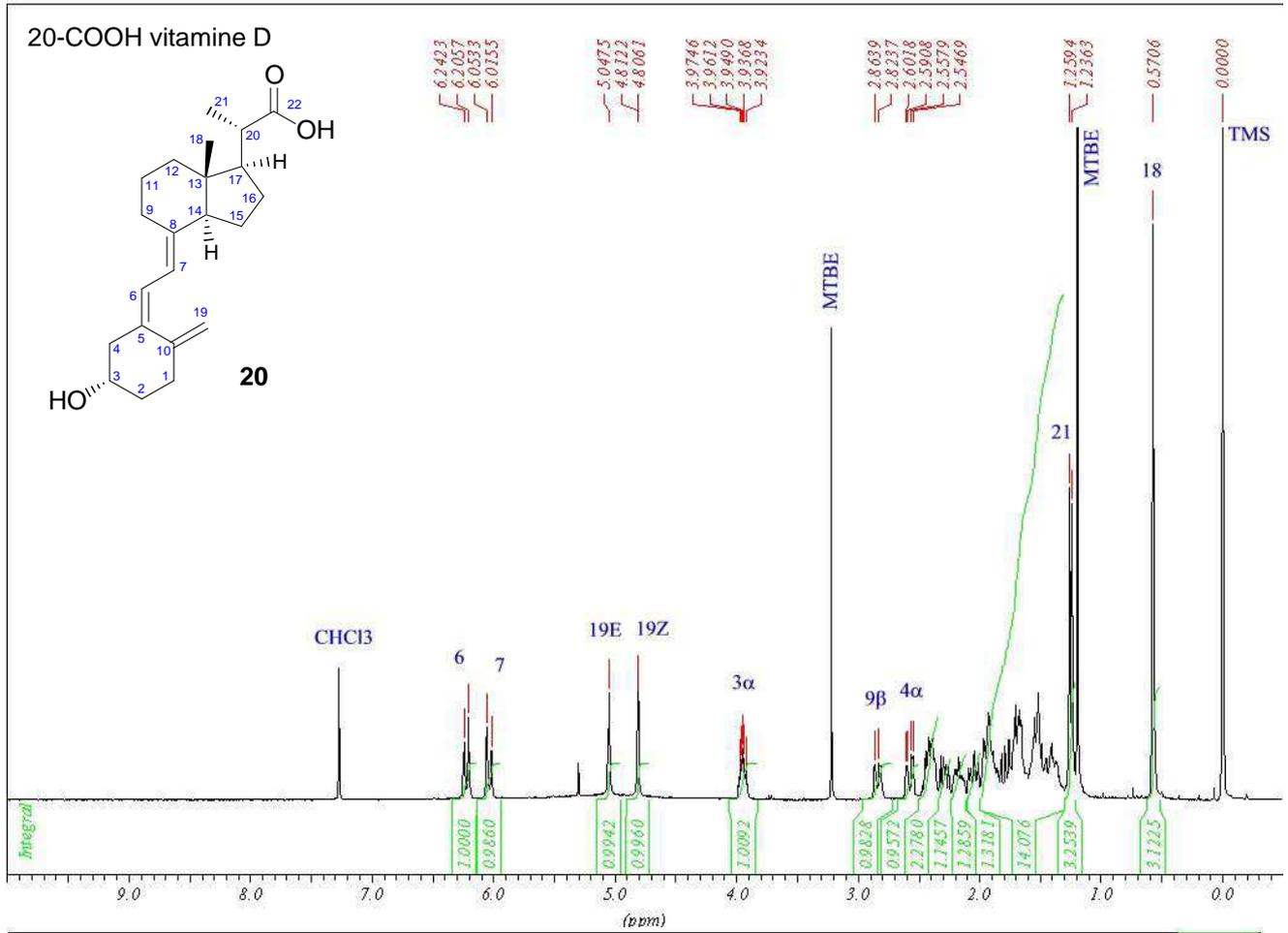


sp153/cdc13/h7

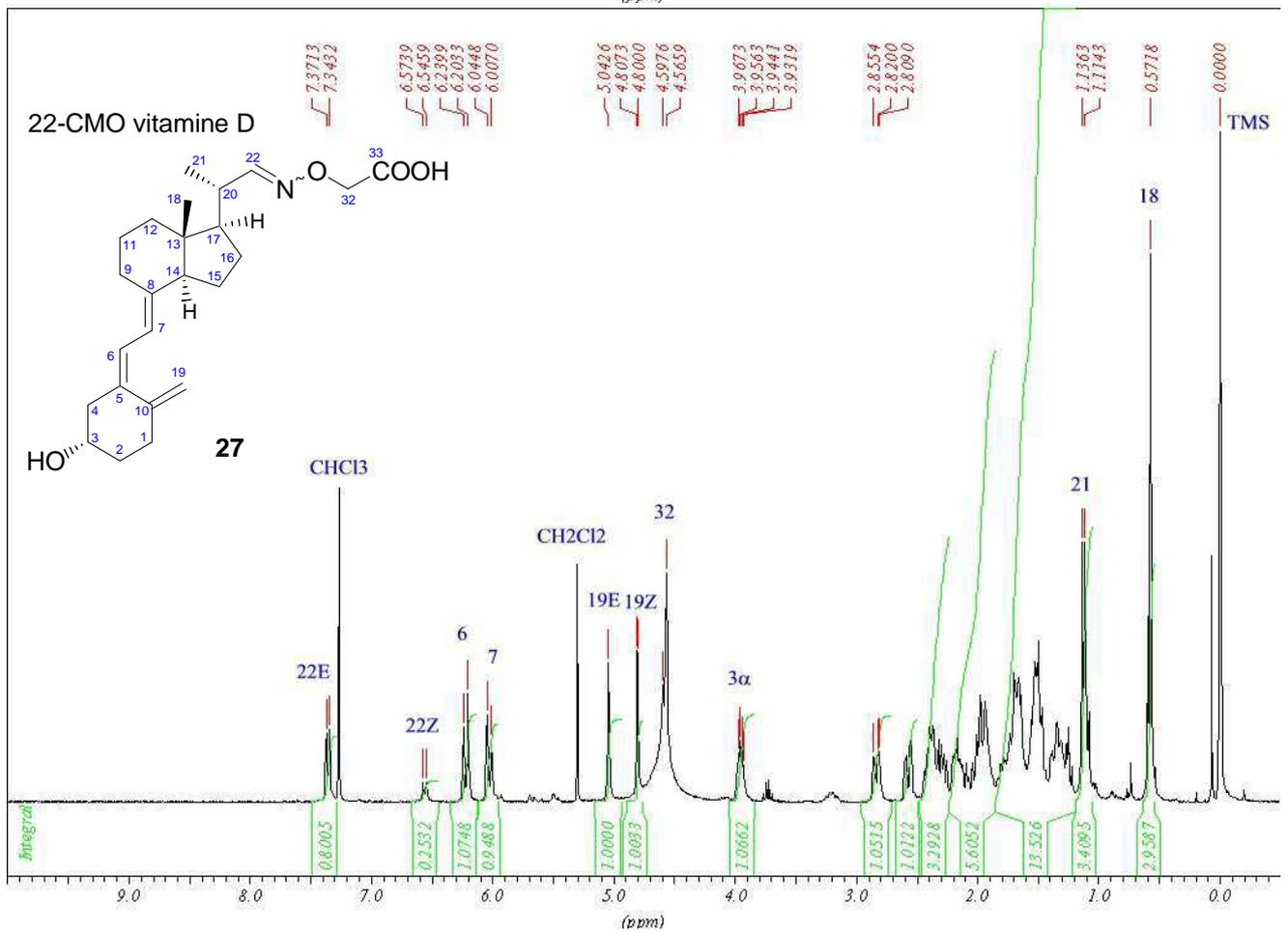
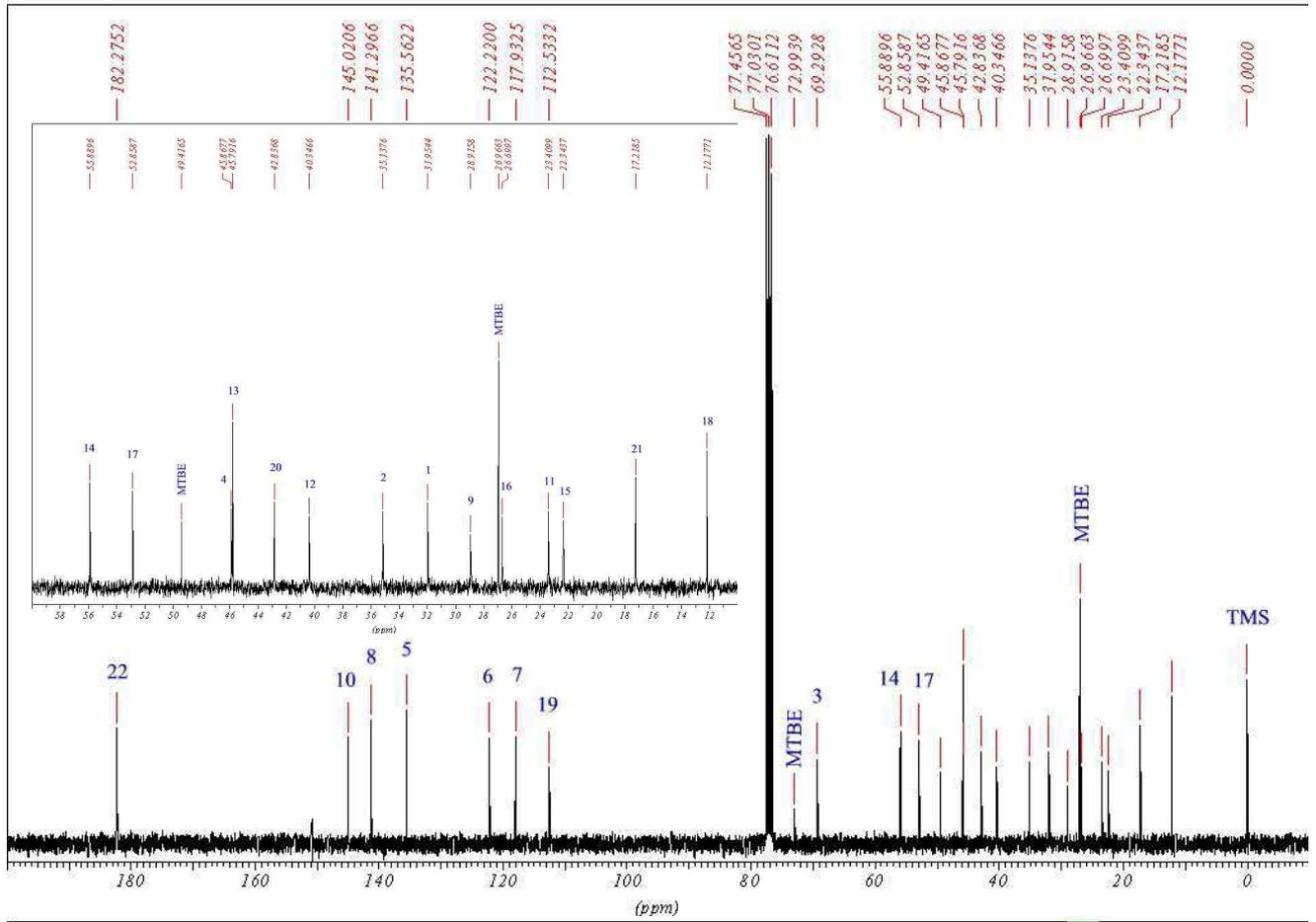


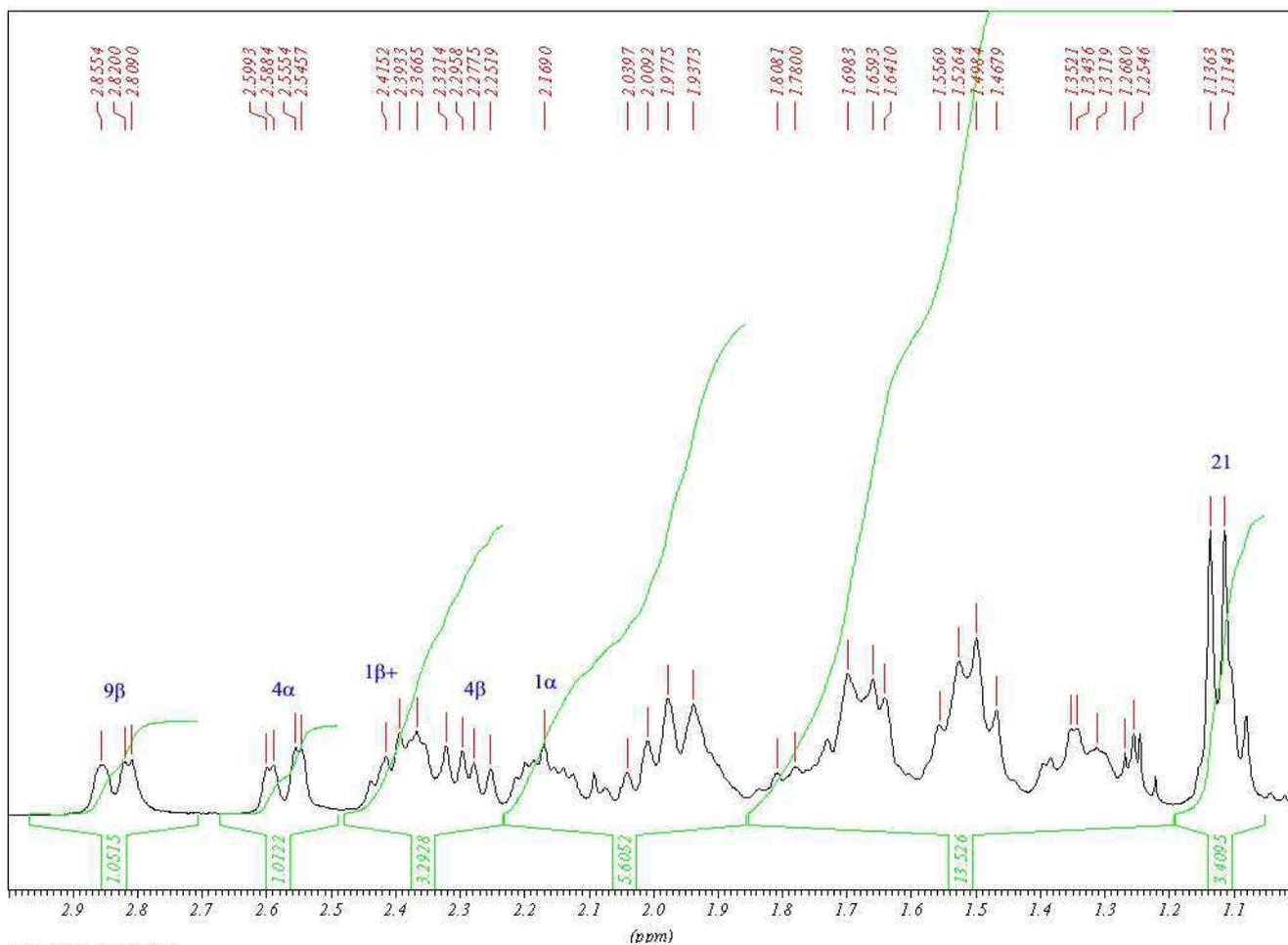
sp53/cdc13/k13



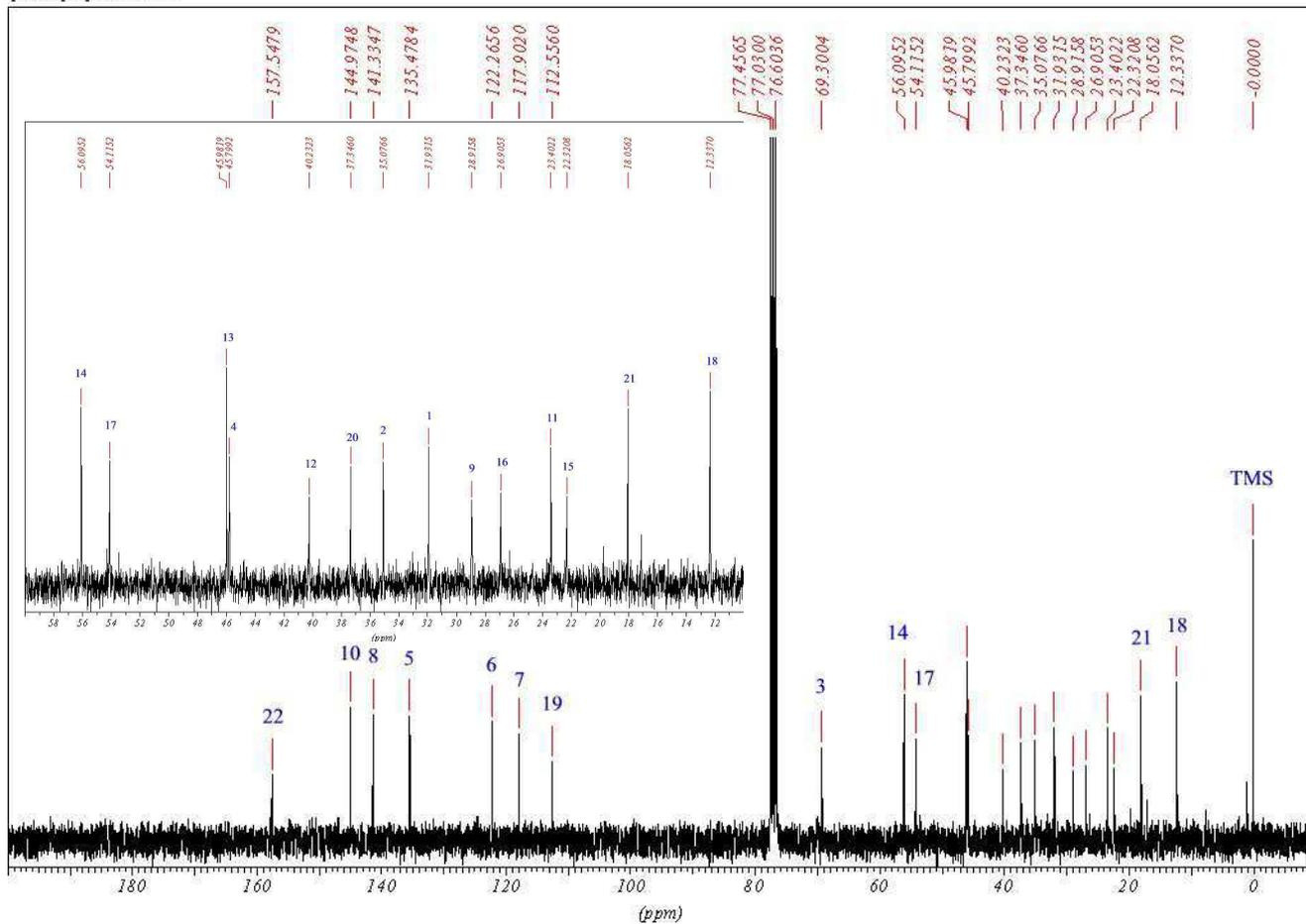


sp118b/cdcl3/c13

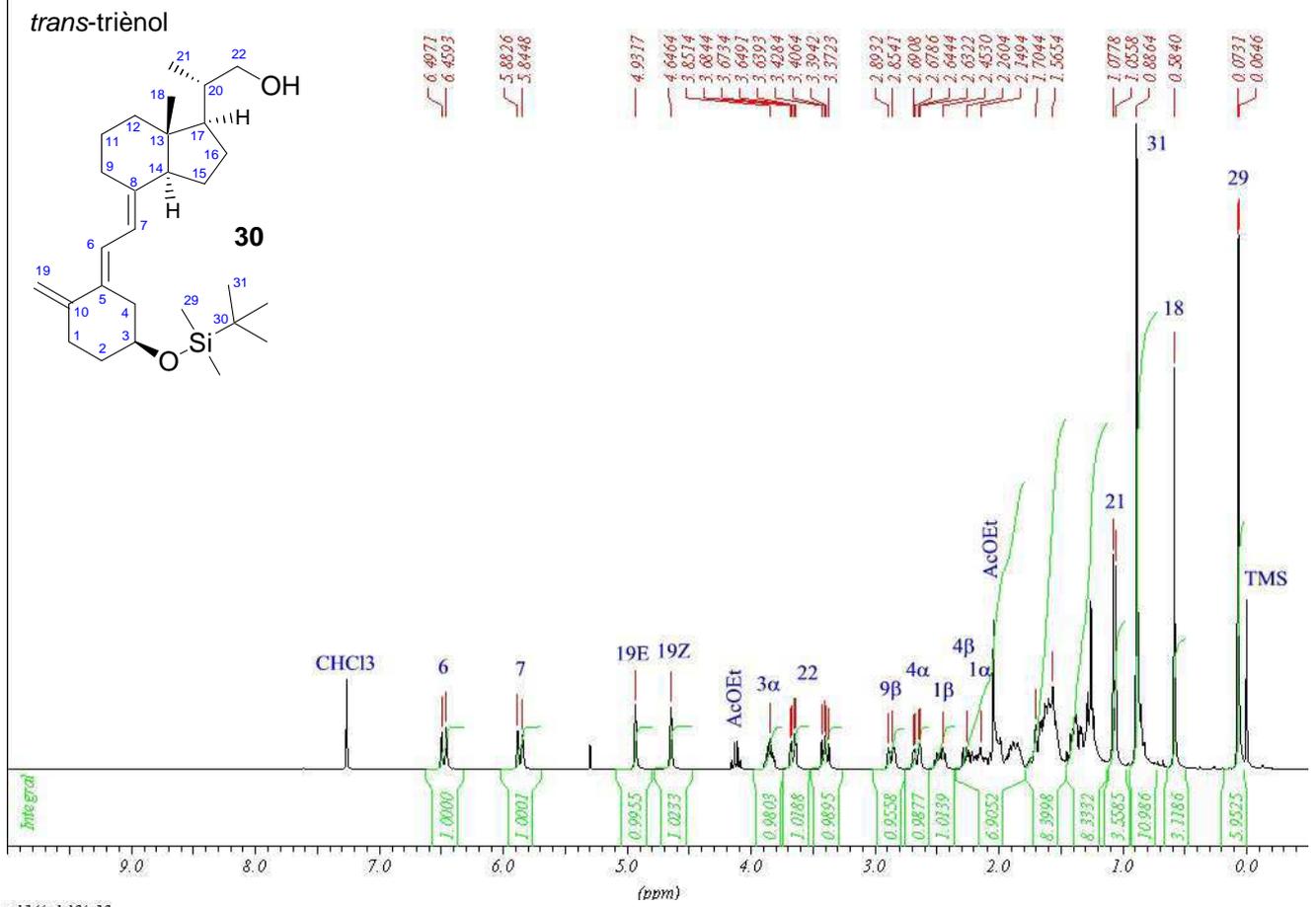




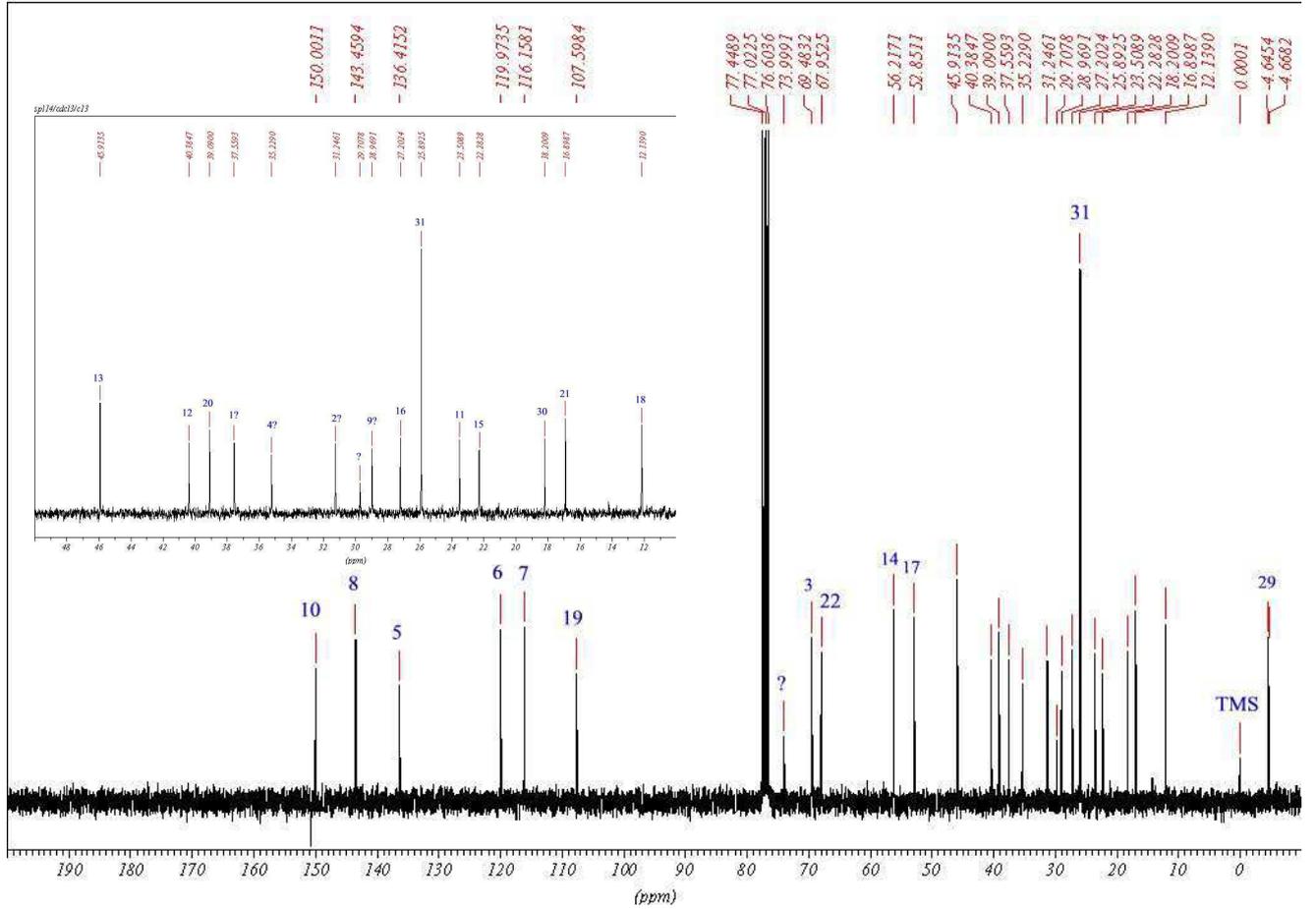
sp1144/rep/cdcl3/c13

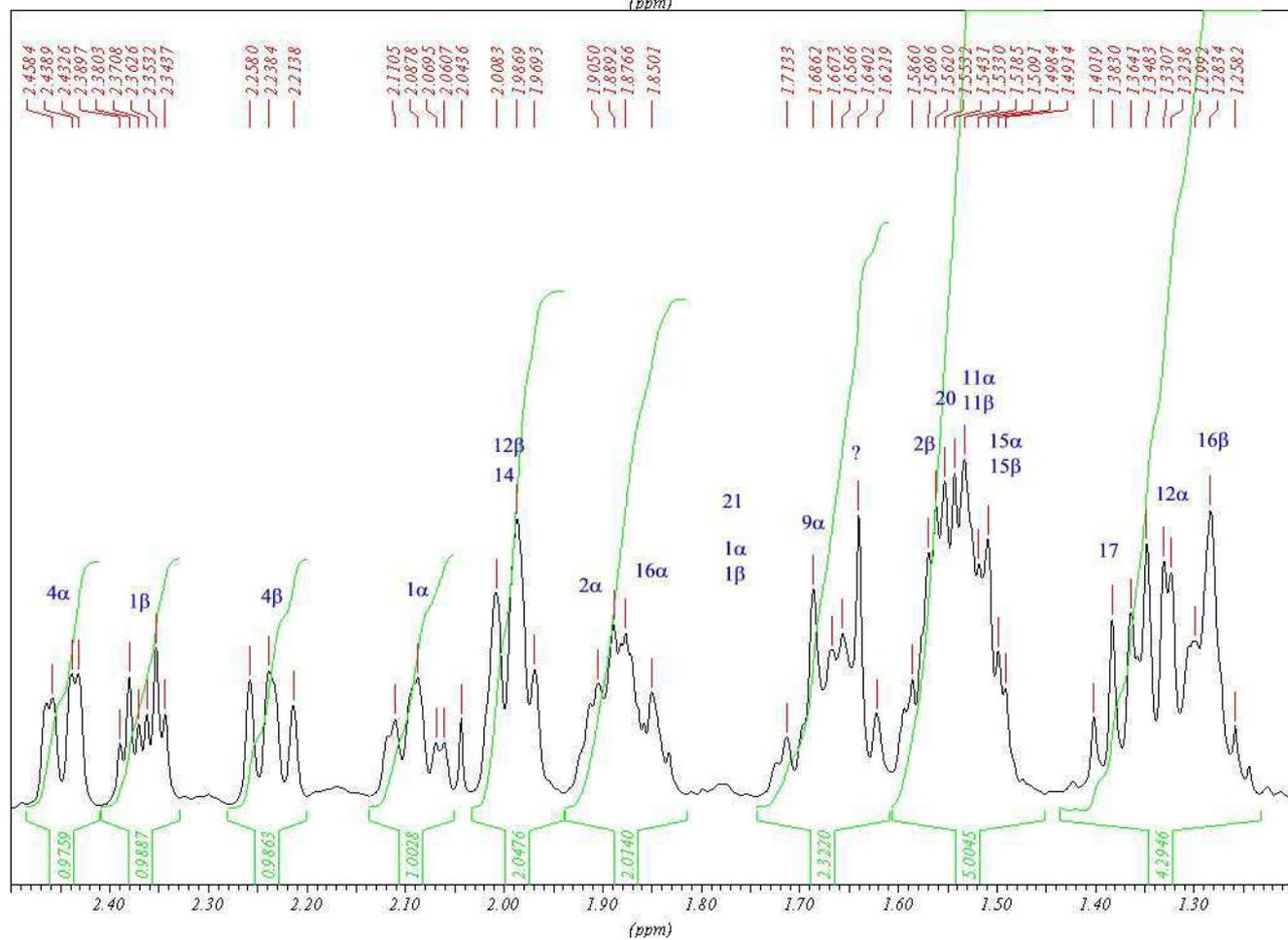
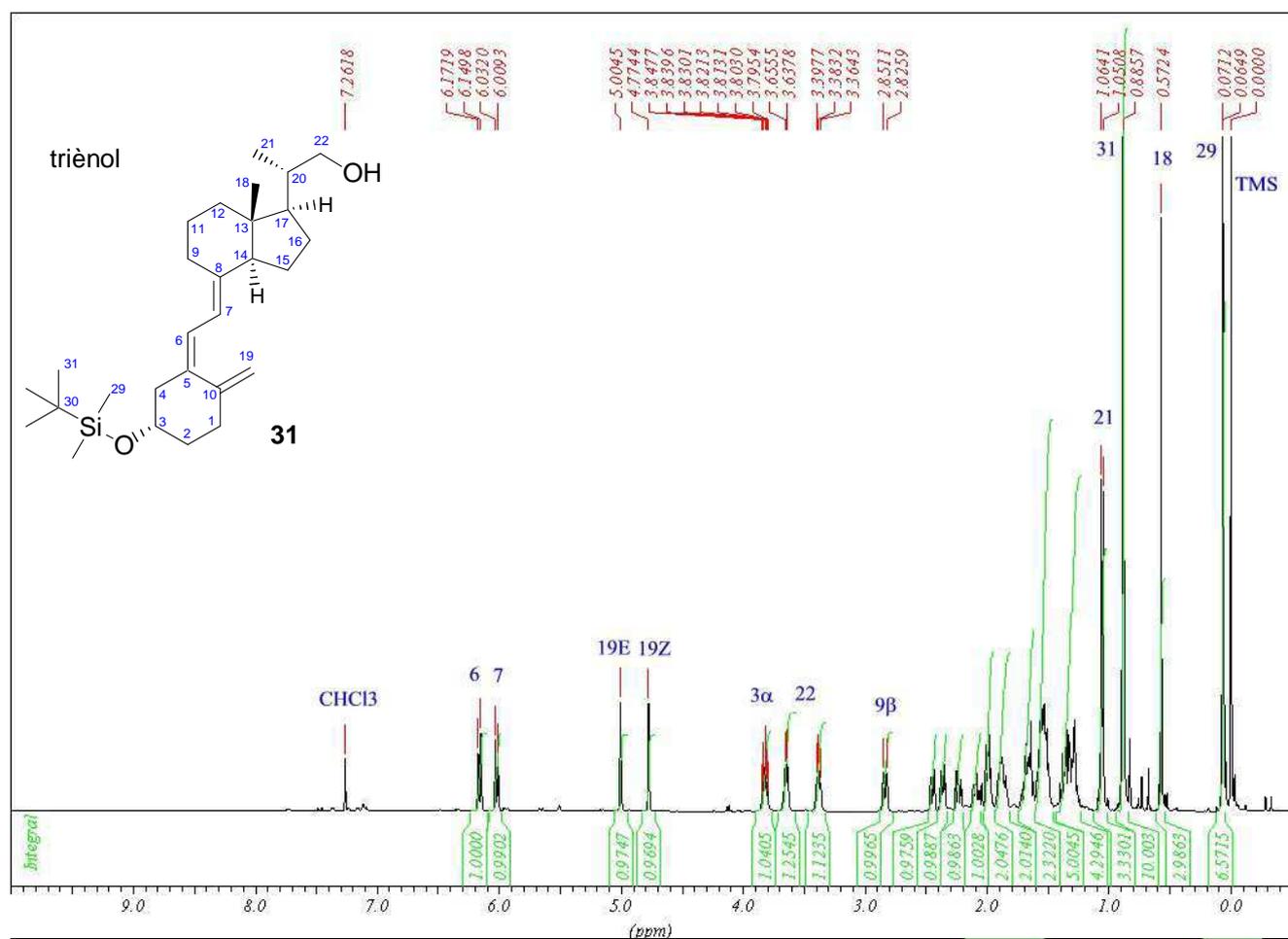


spi14/cdc13/h1

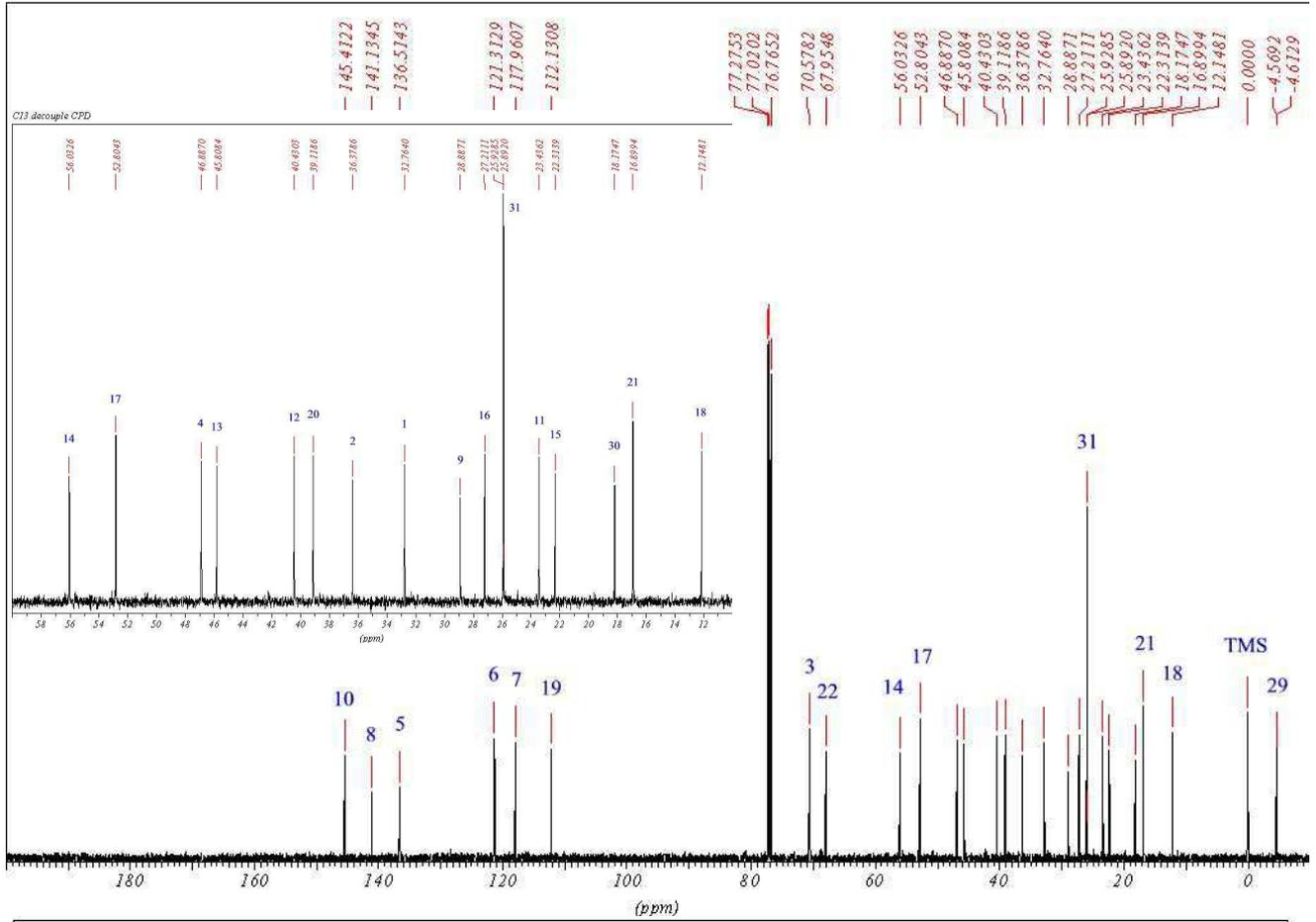


spi14/cdc13/c13

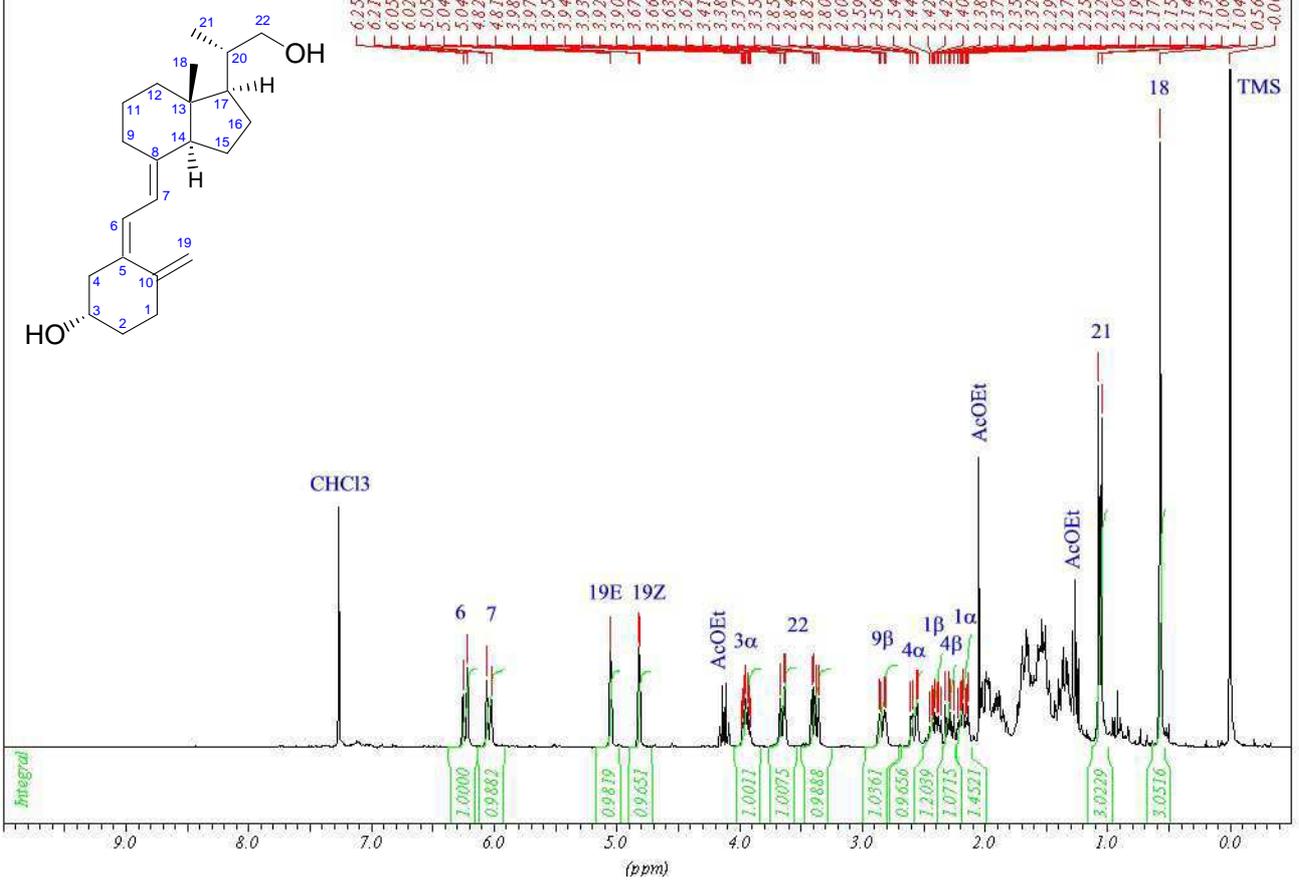


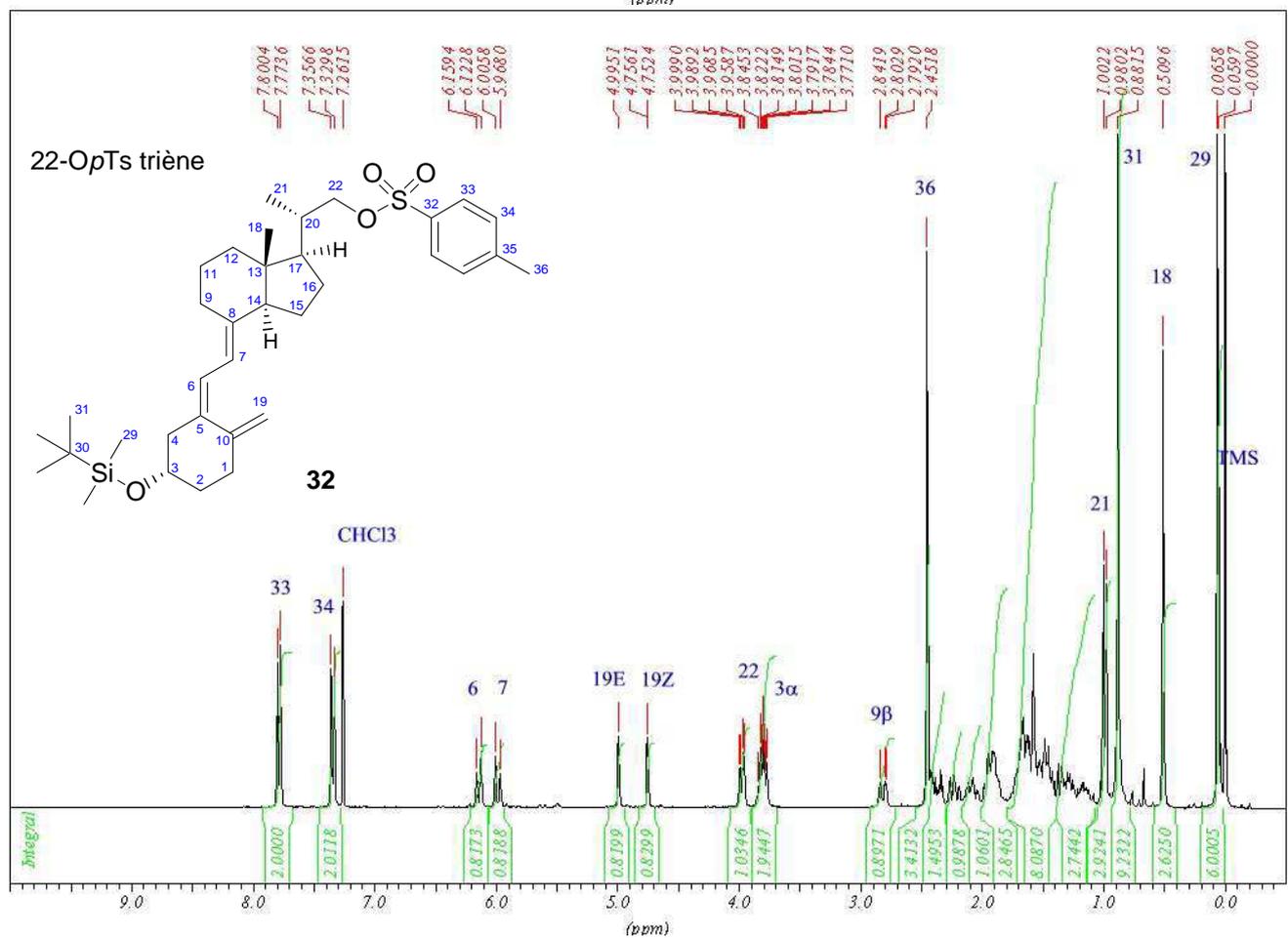
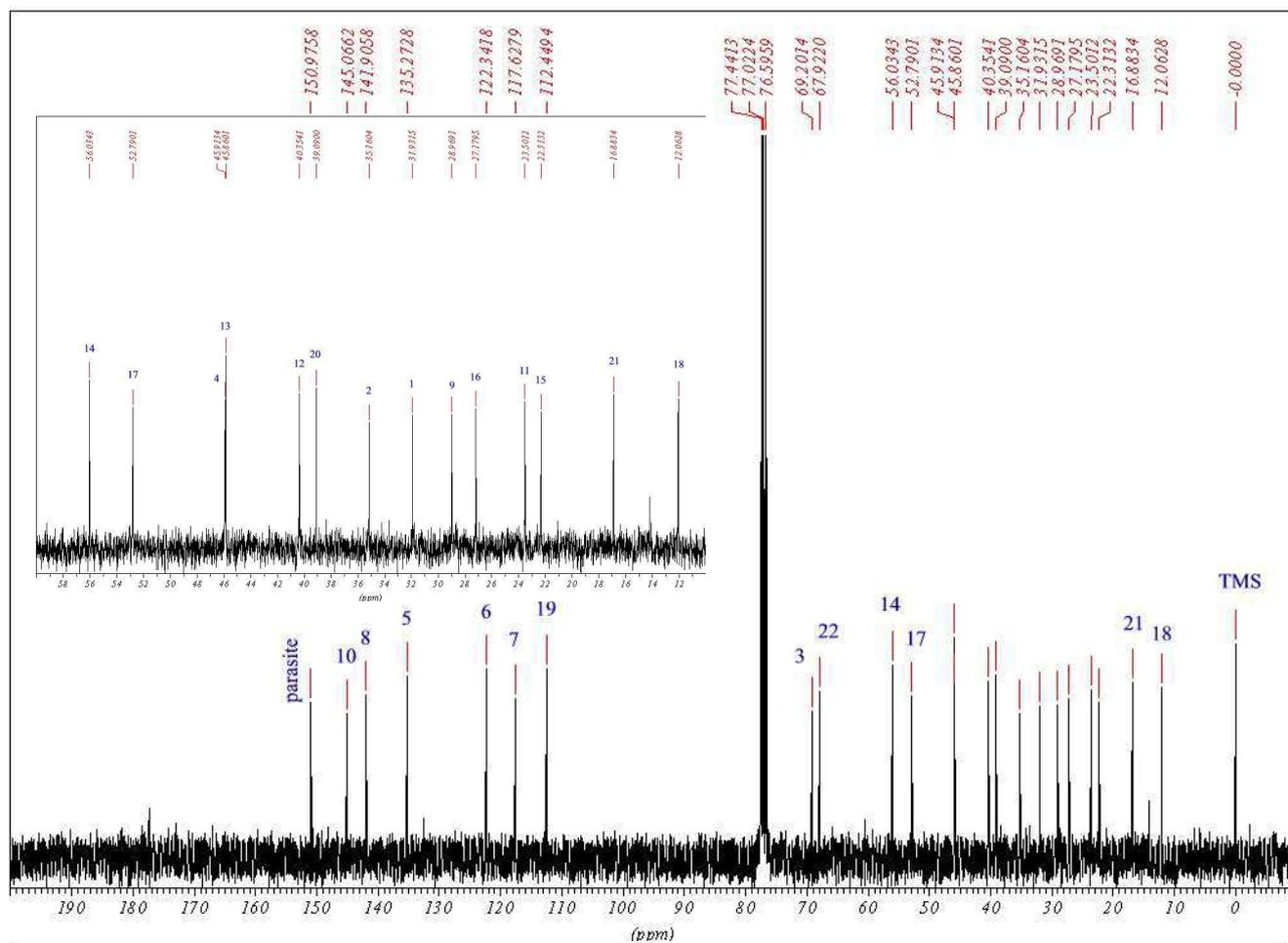


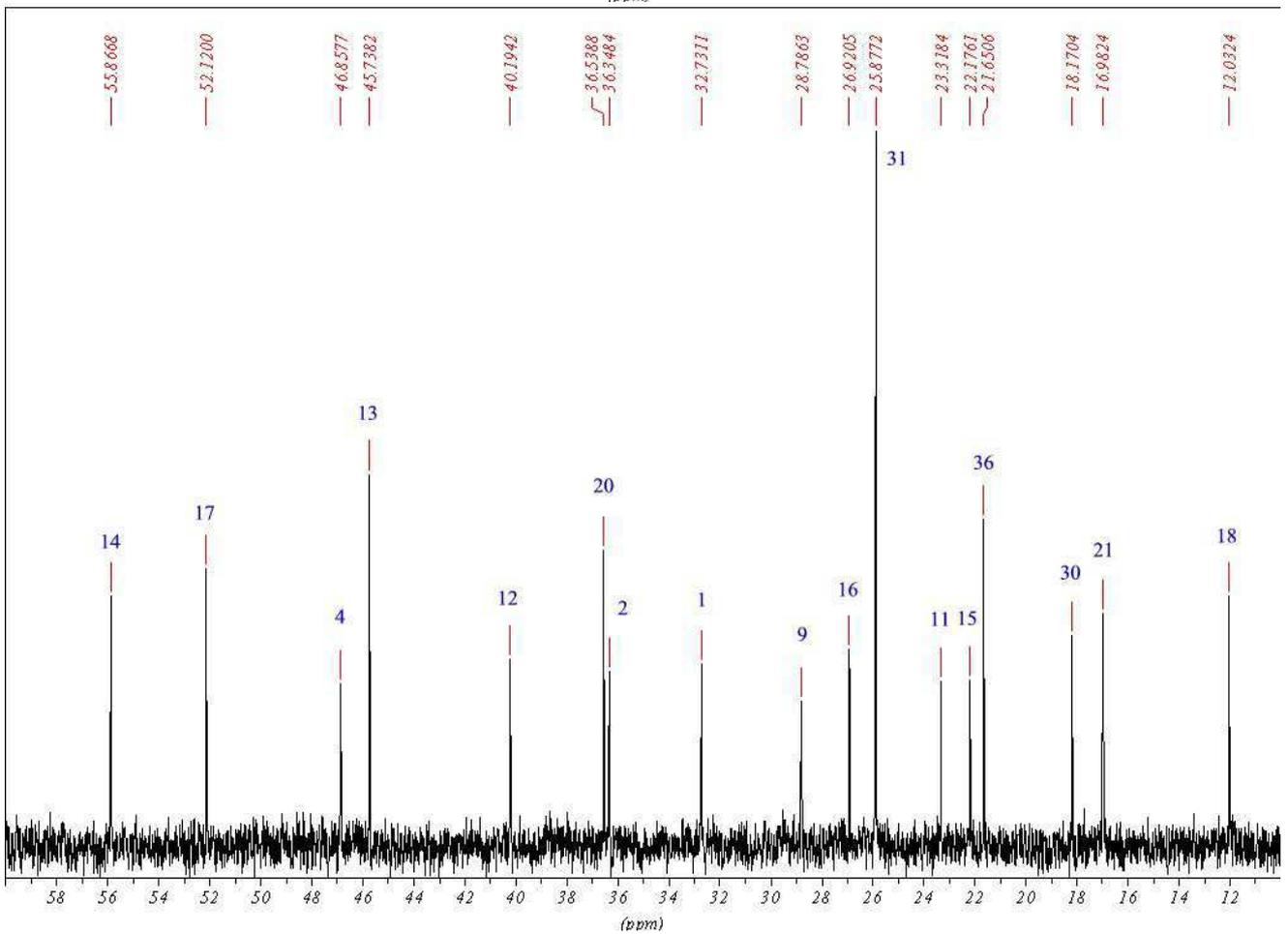
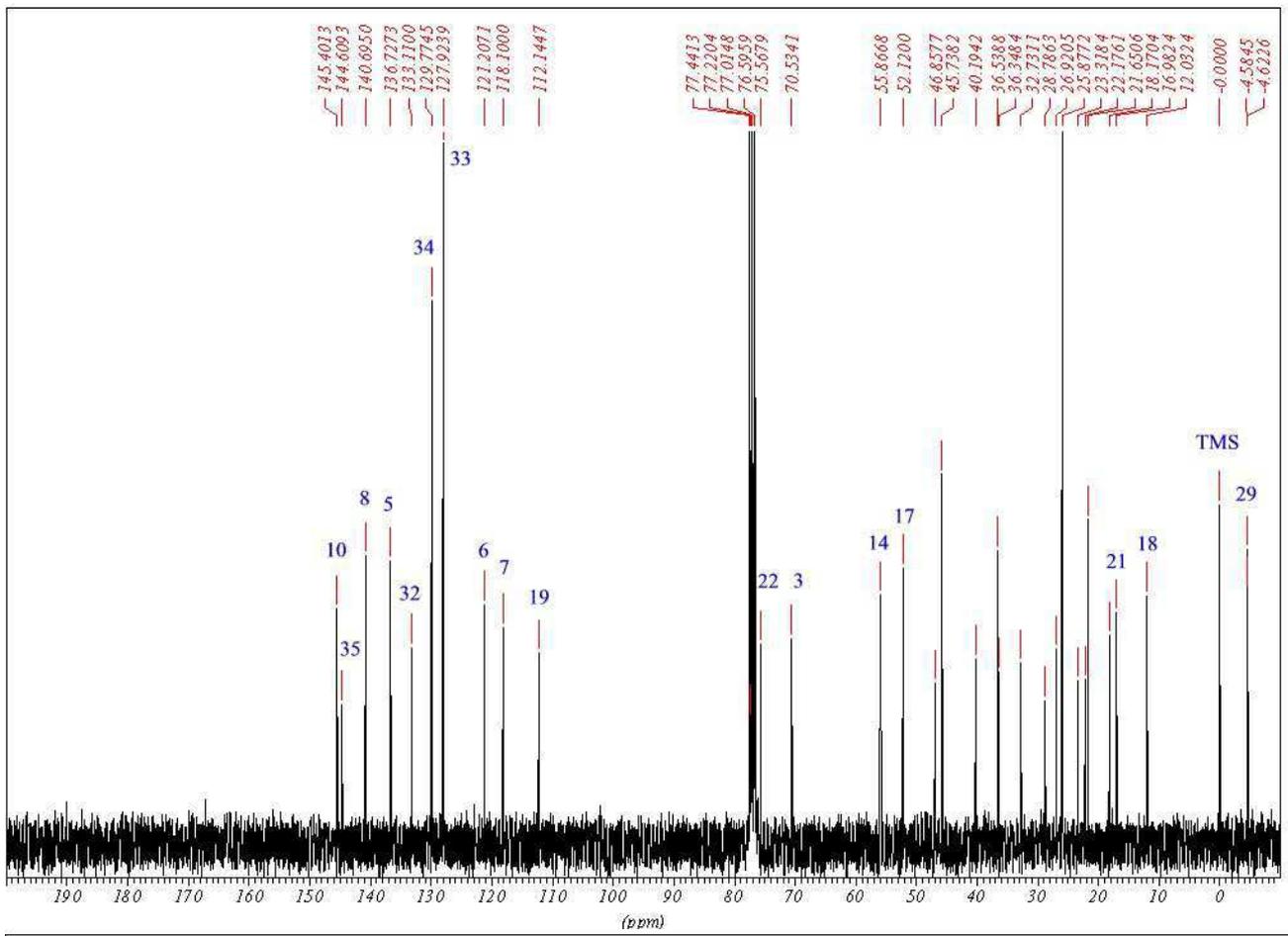
C13 decouple CPD

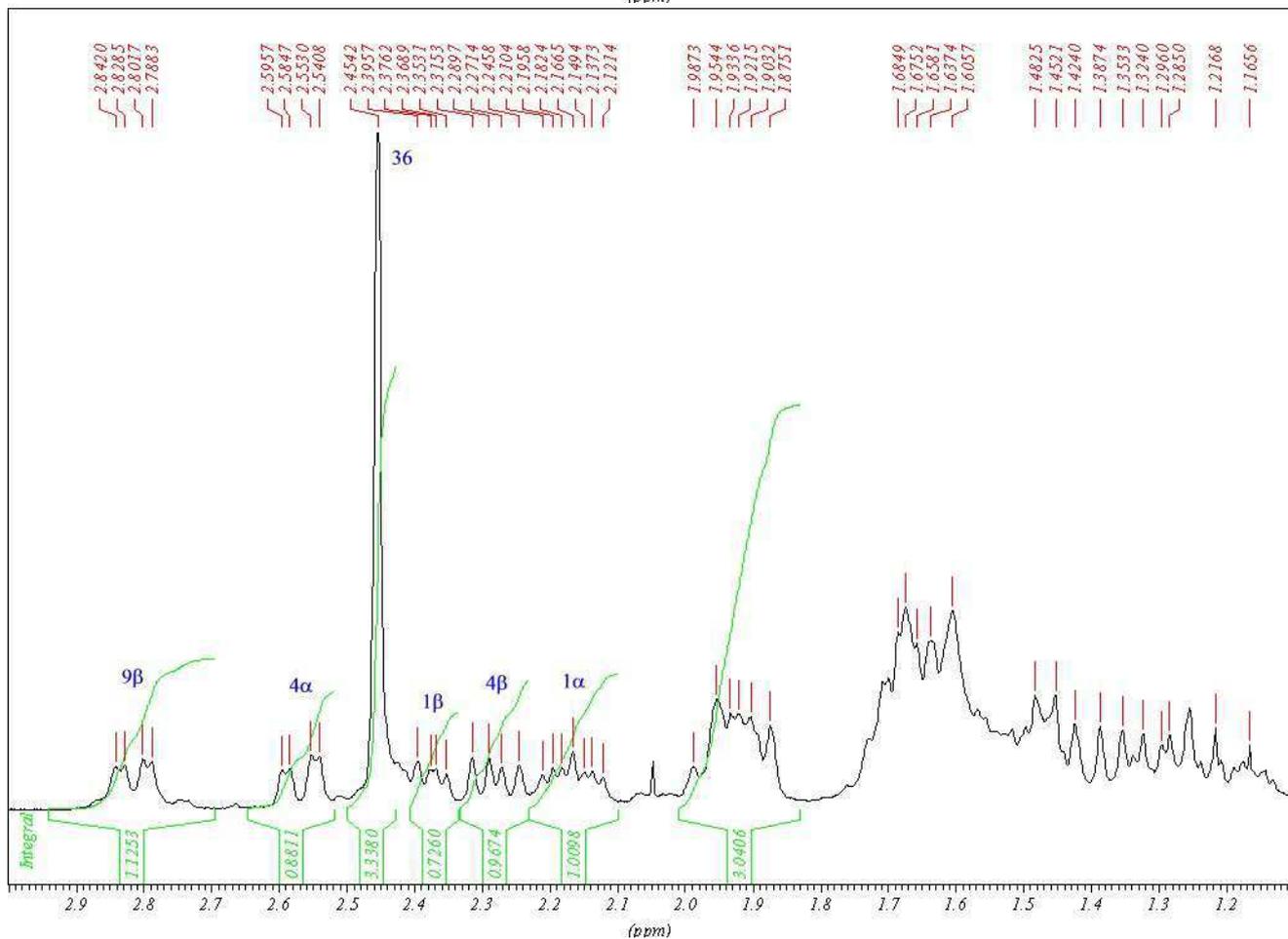
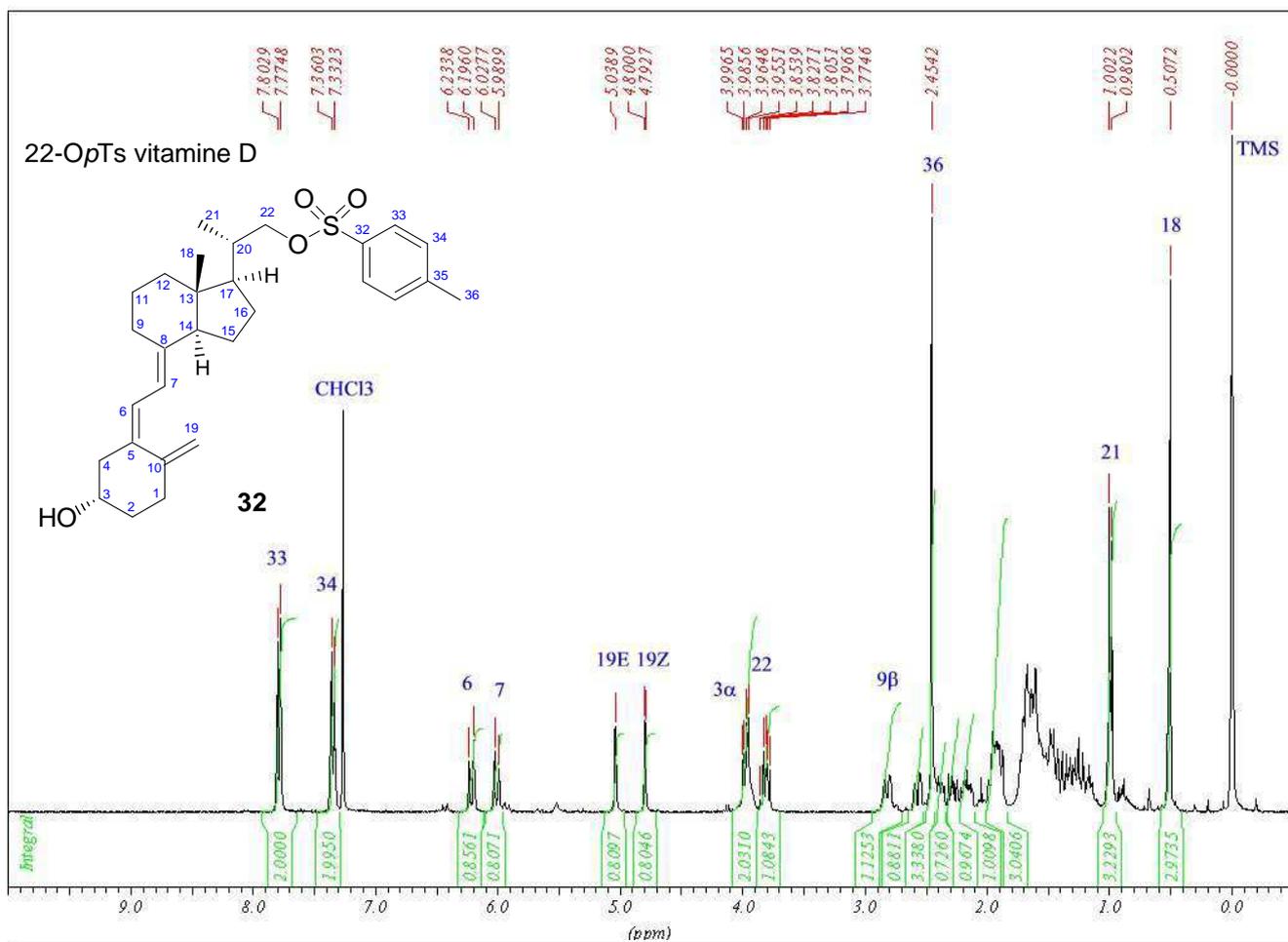


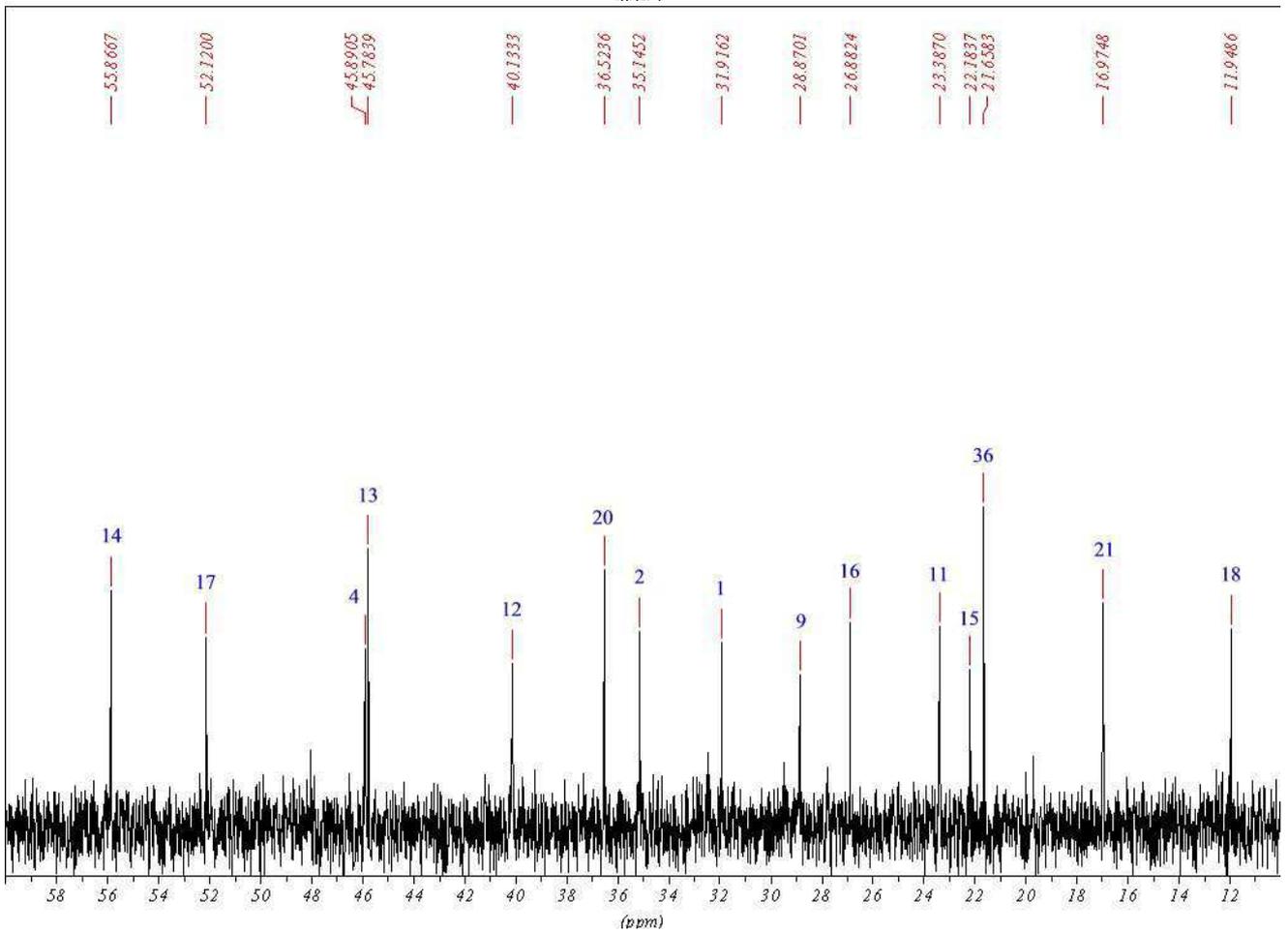
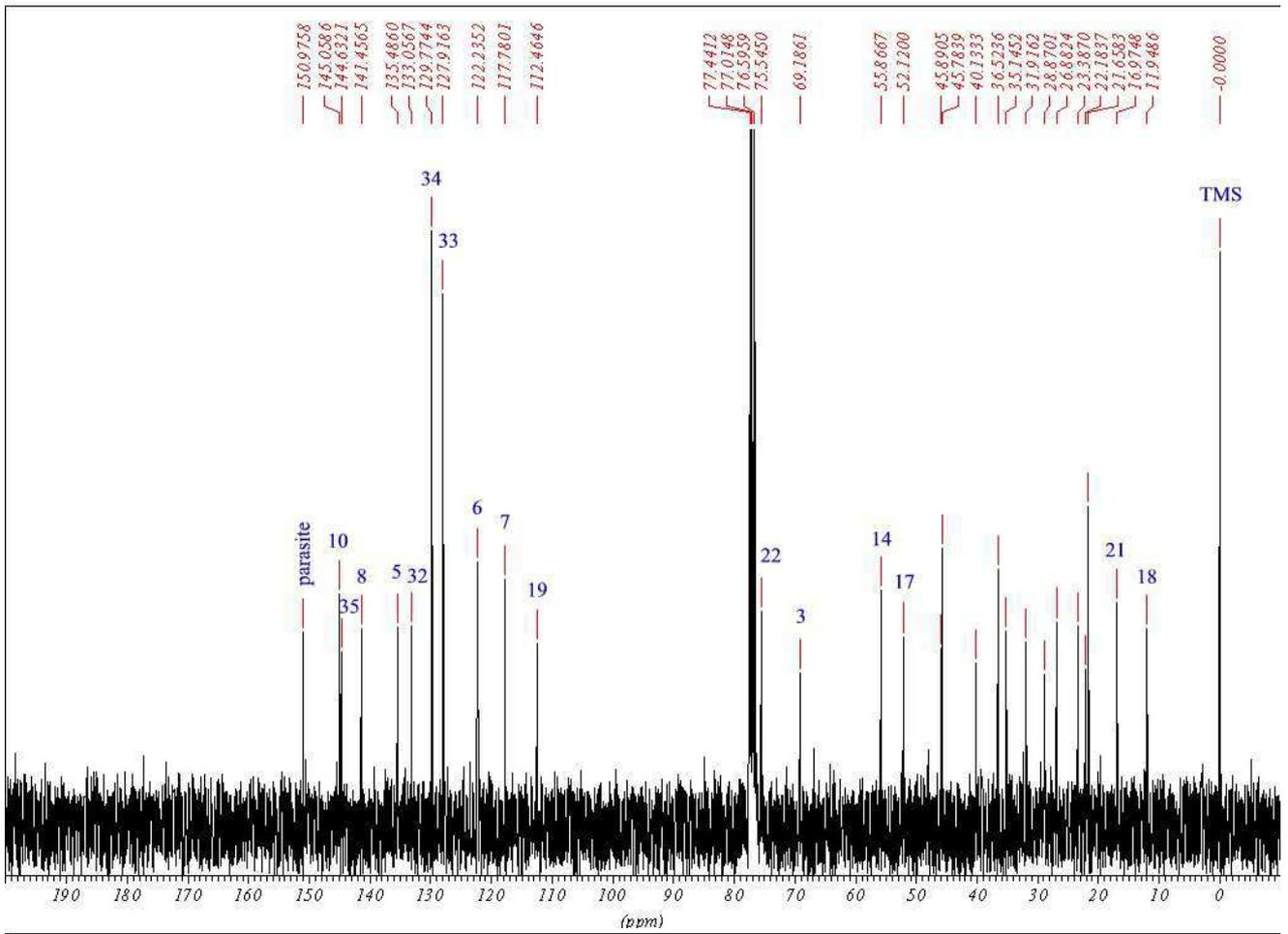
22-OH vitamine D

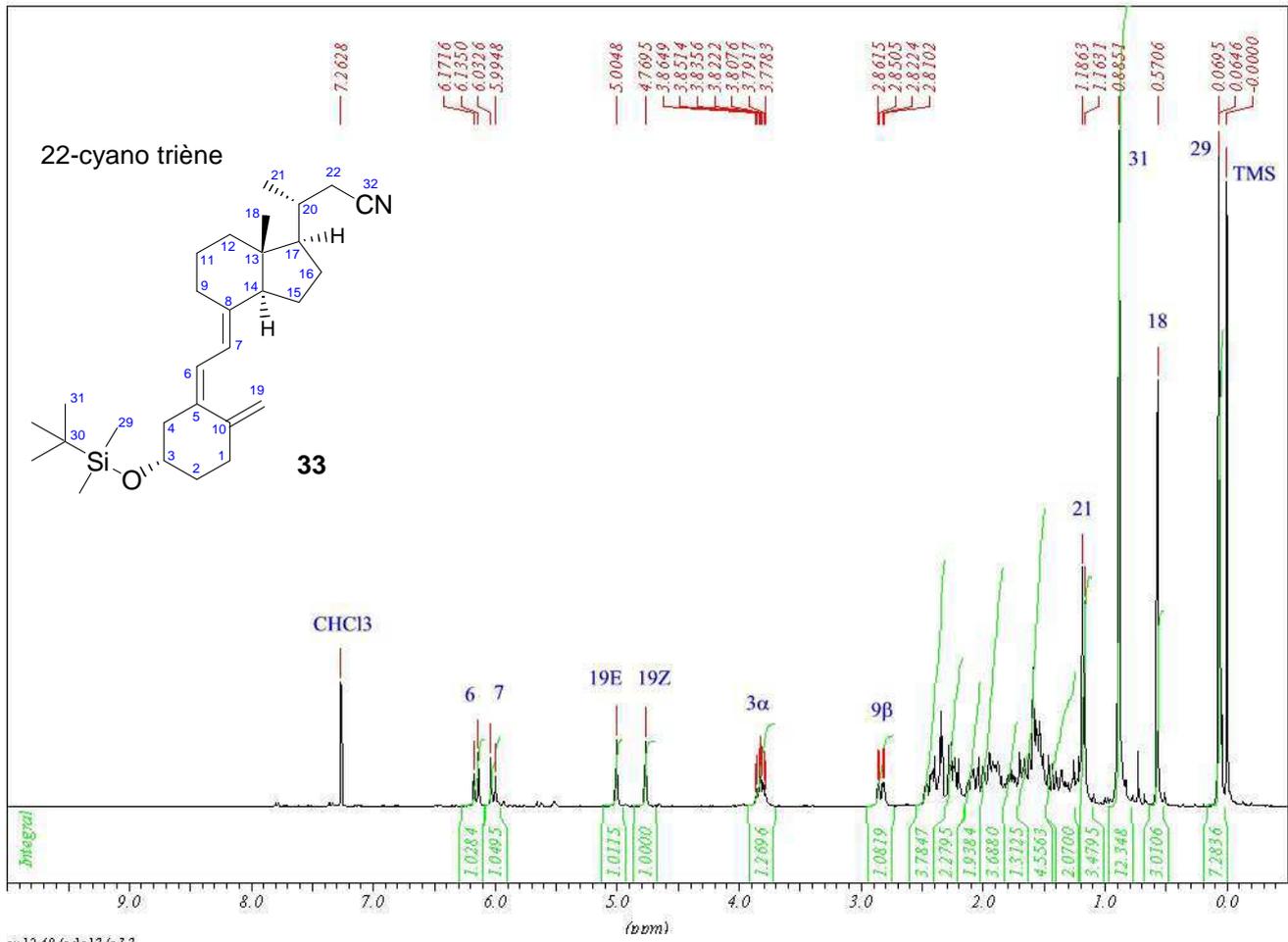




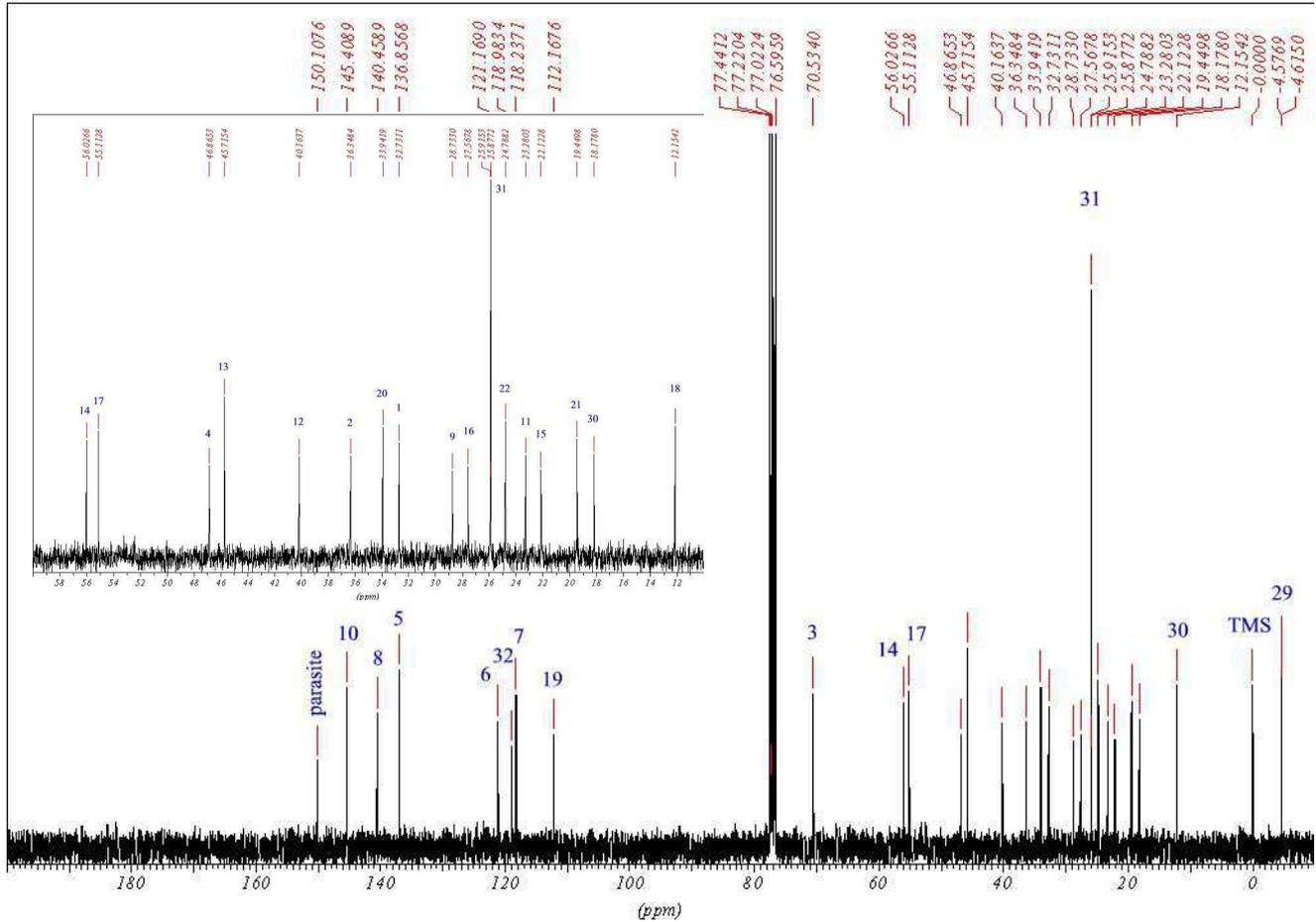


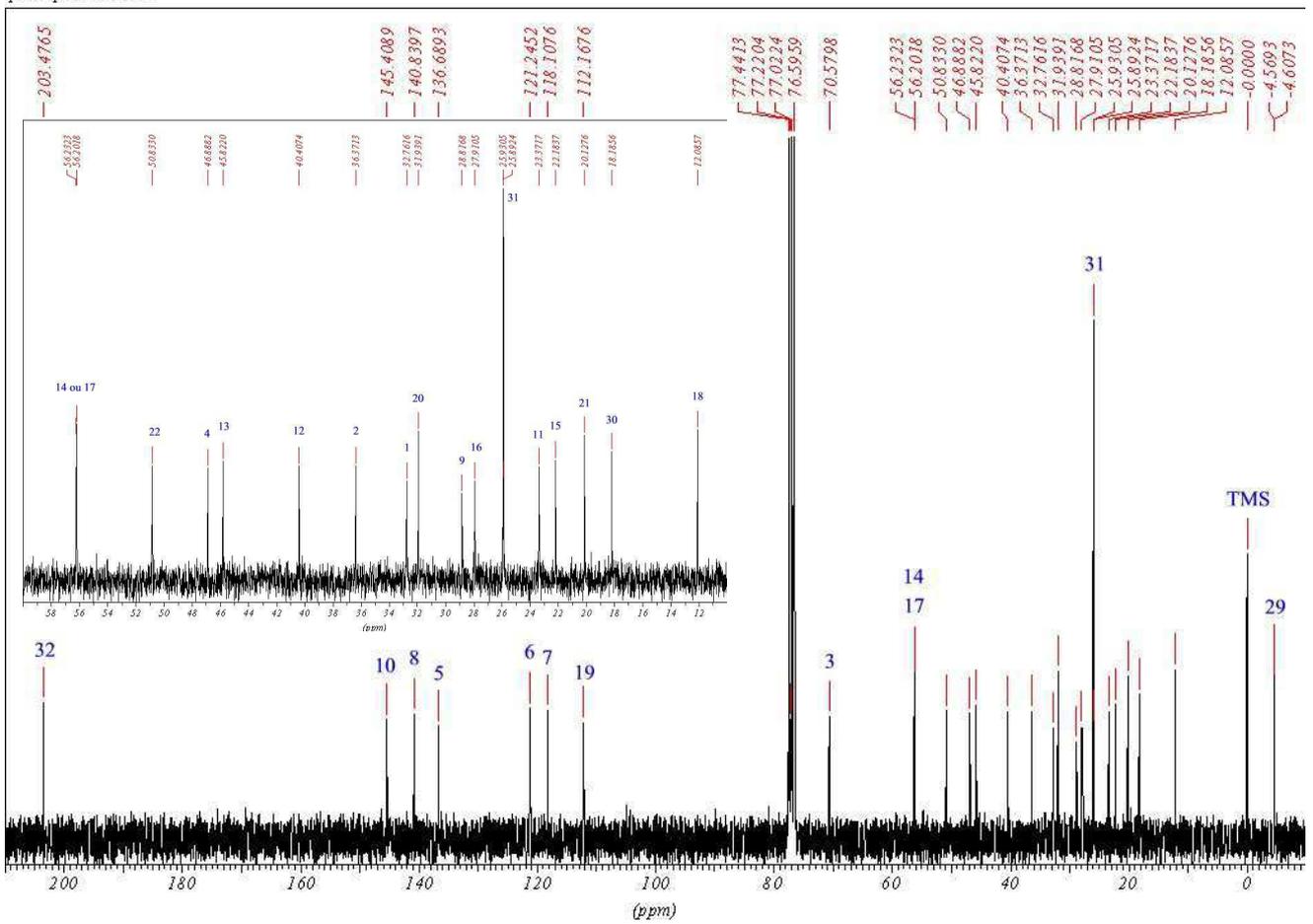
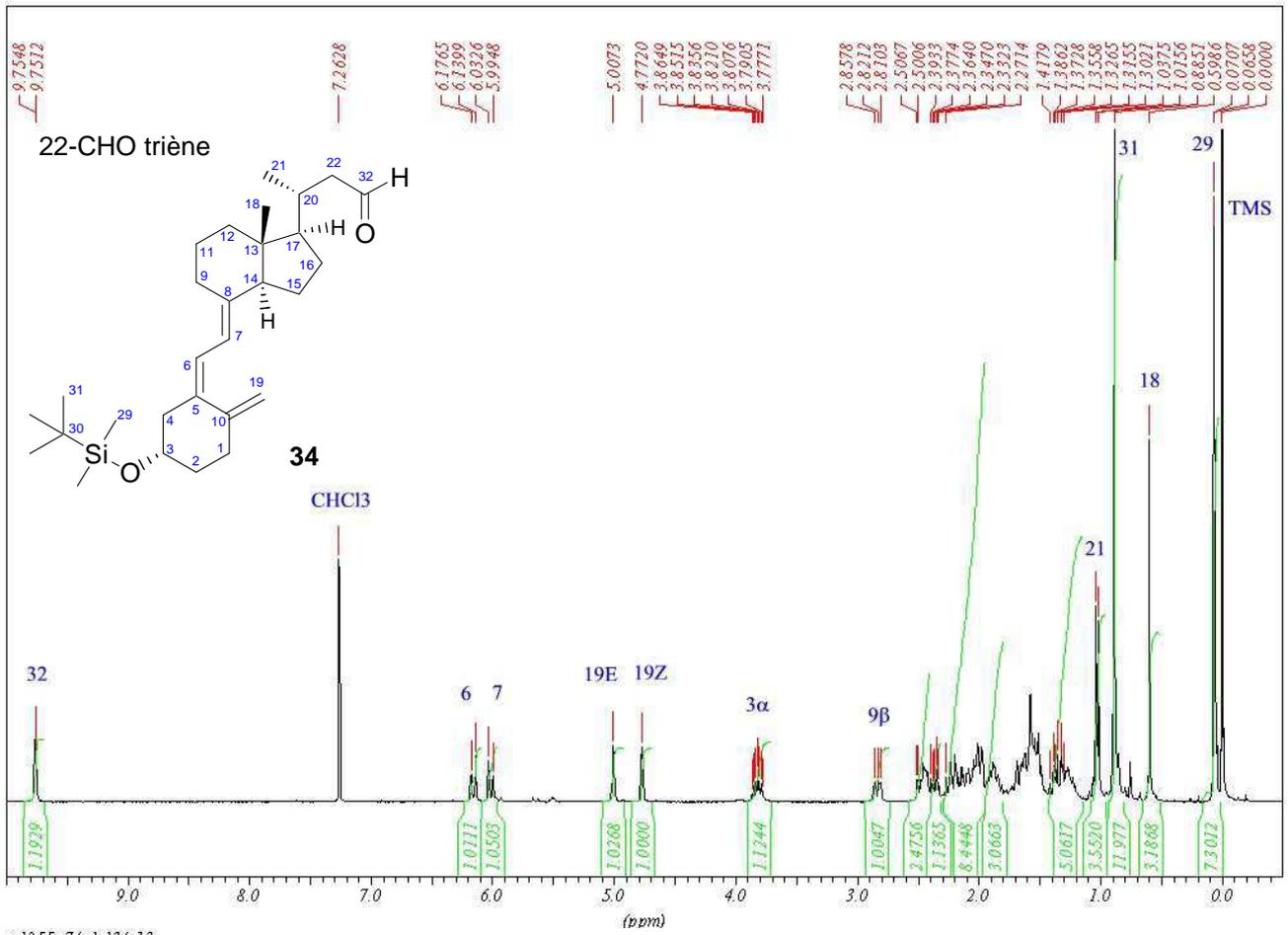


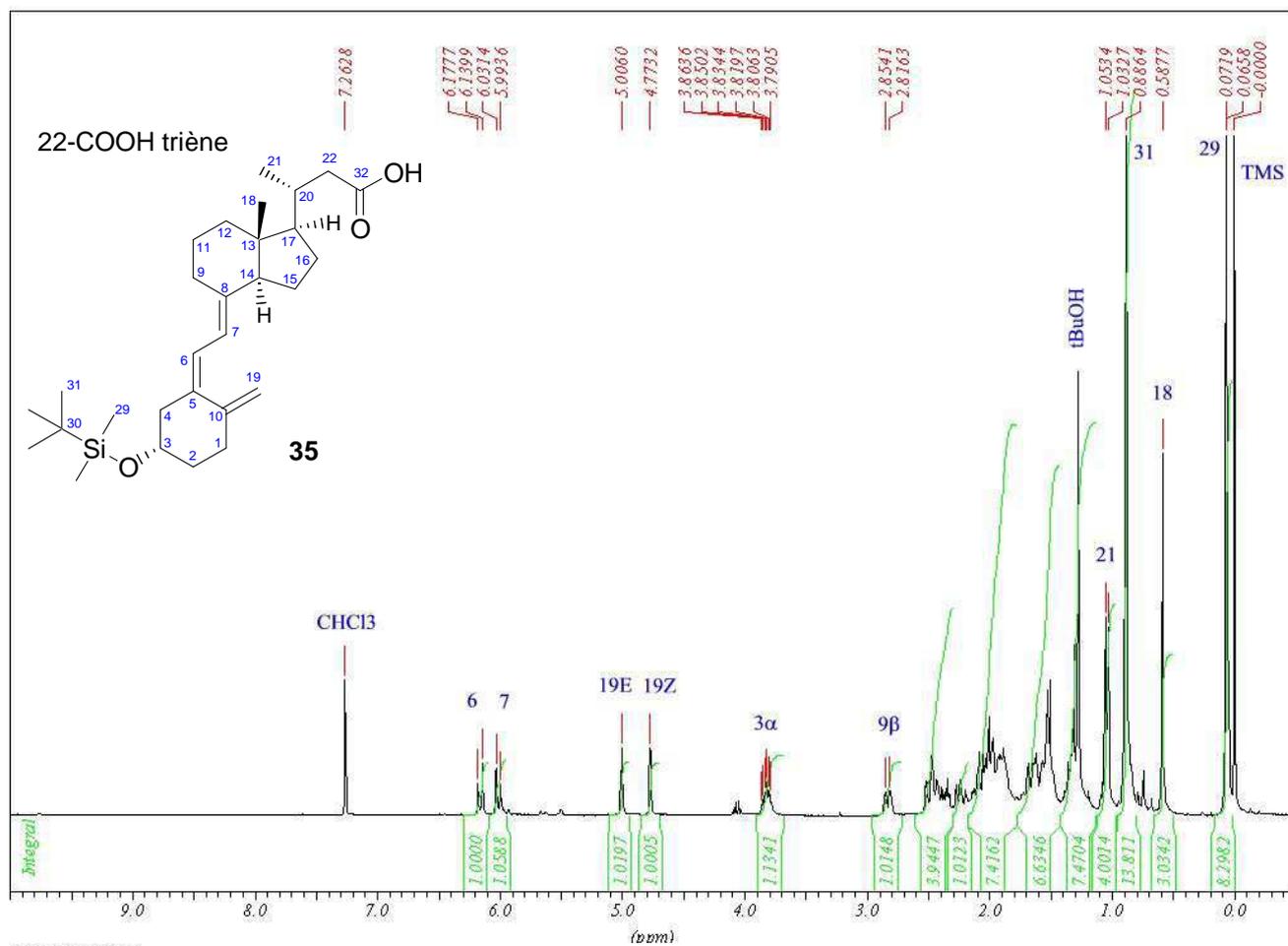




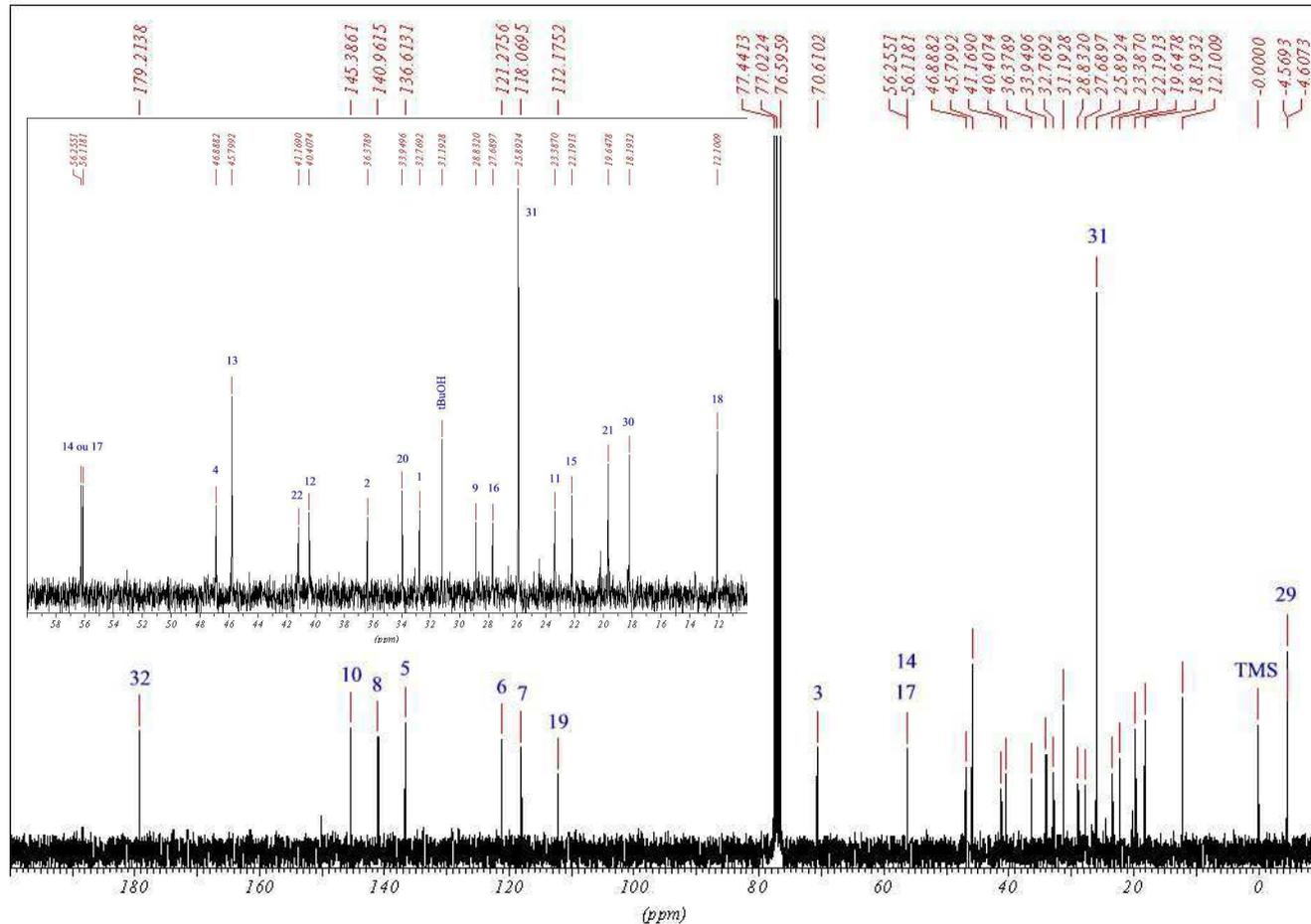
sp12.48/cdcl3/c13

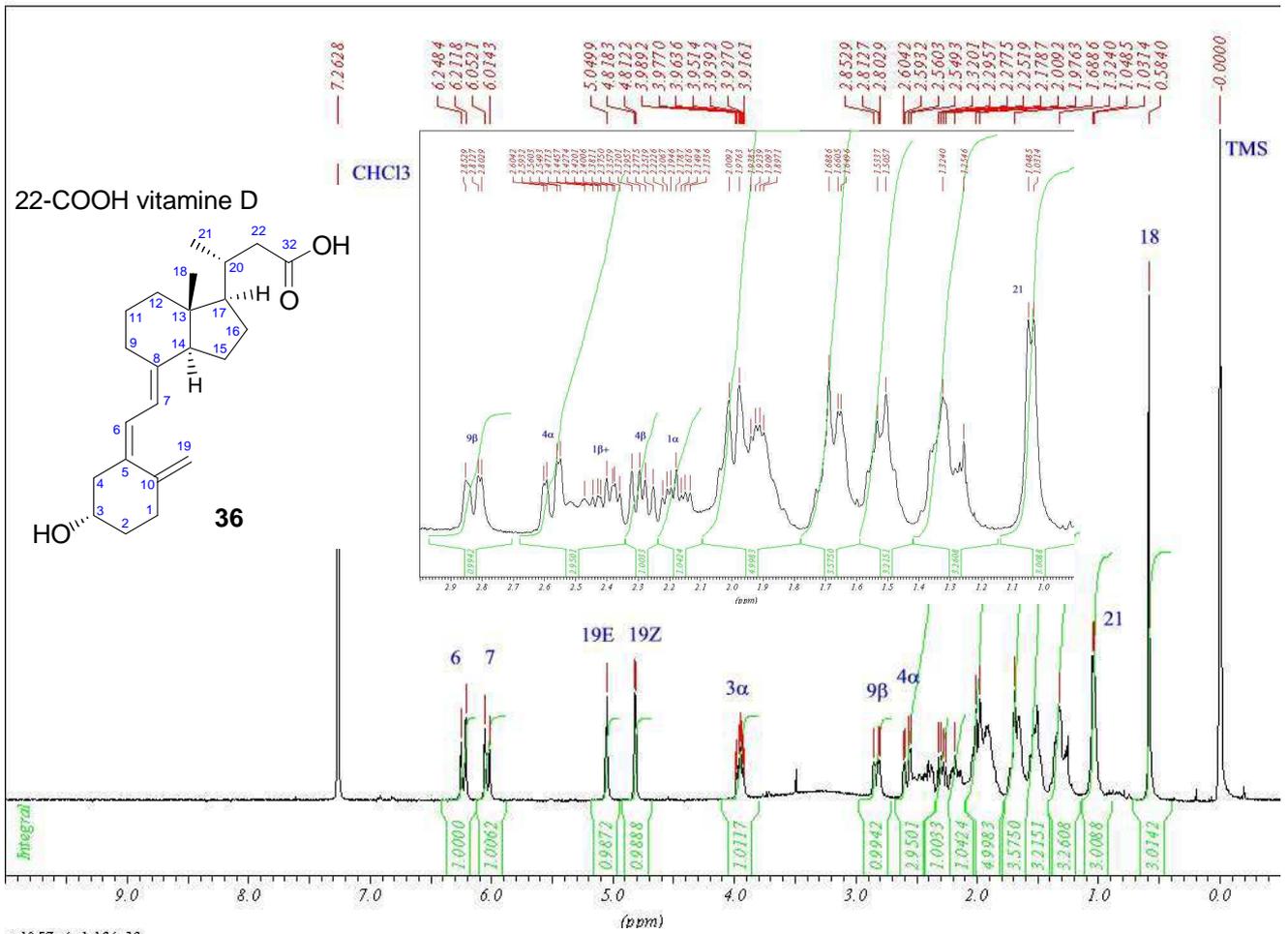




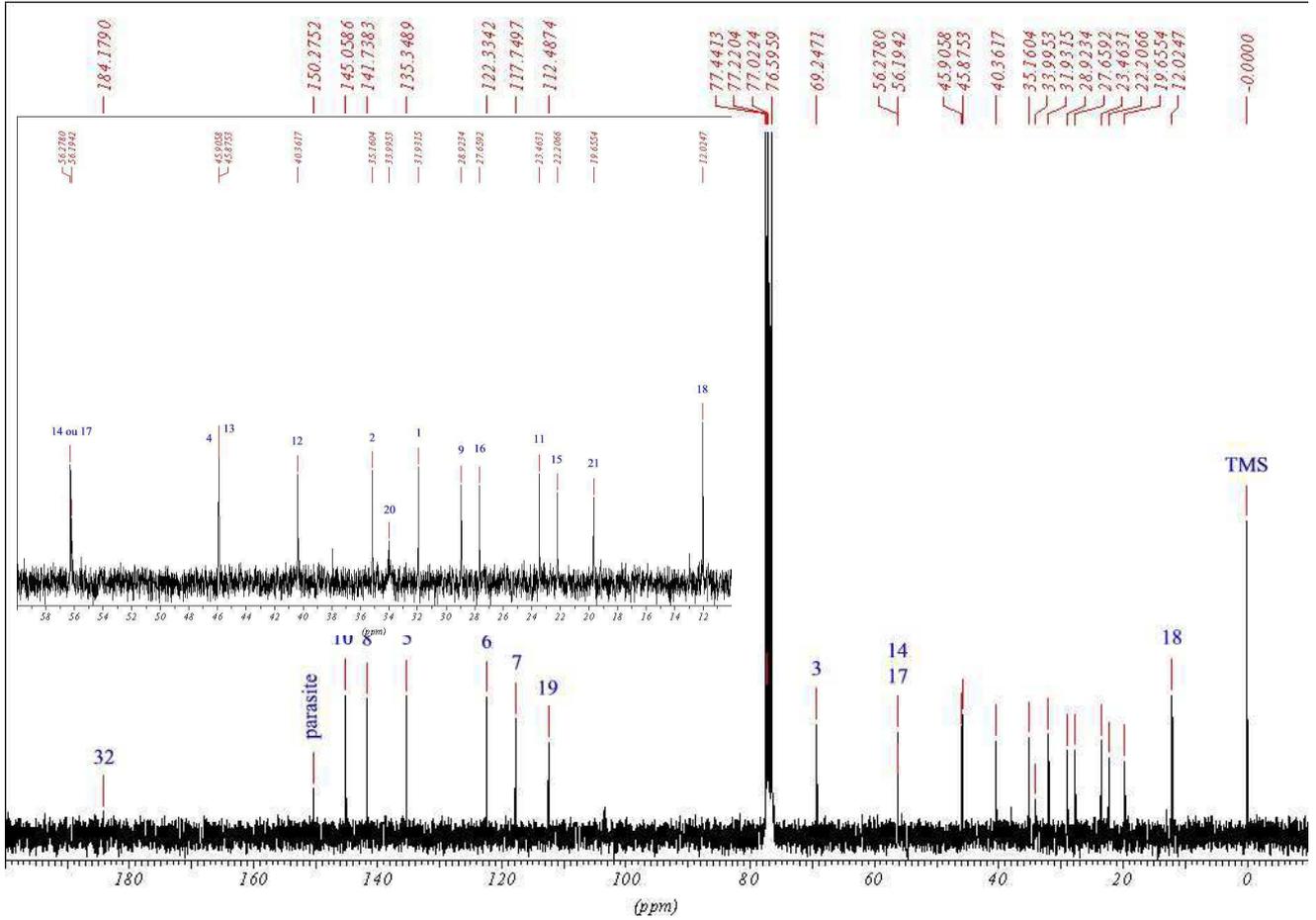


sp1256/cdcl3/c13

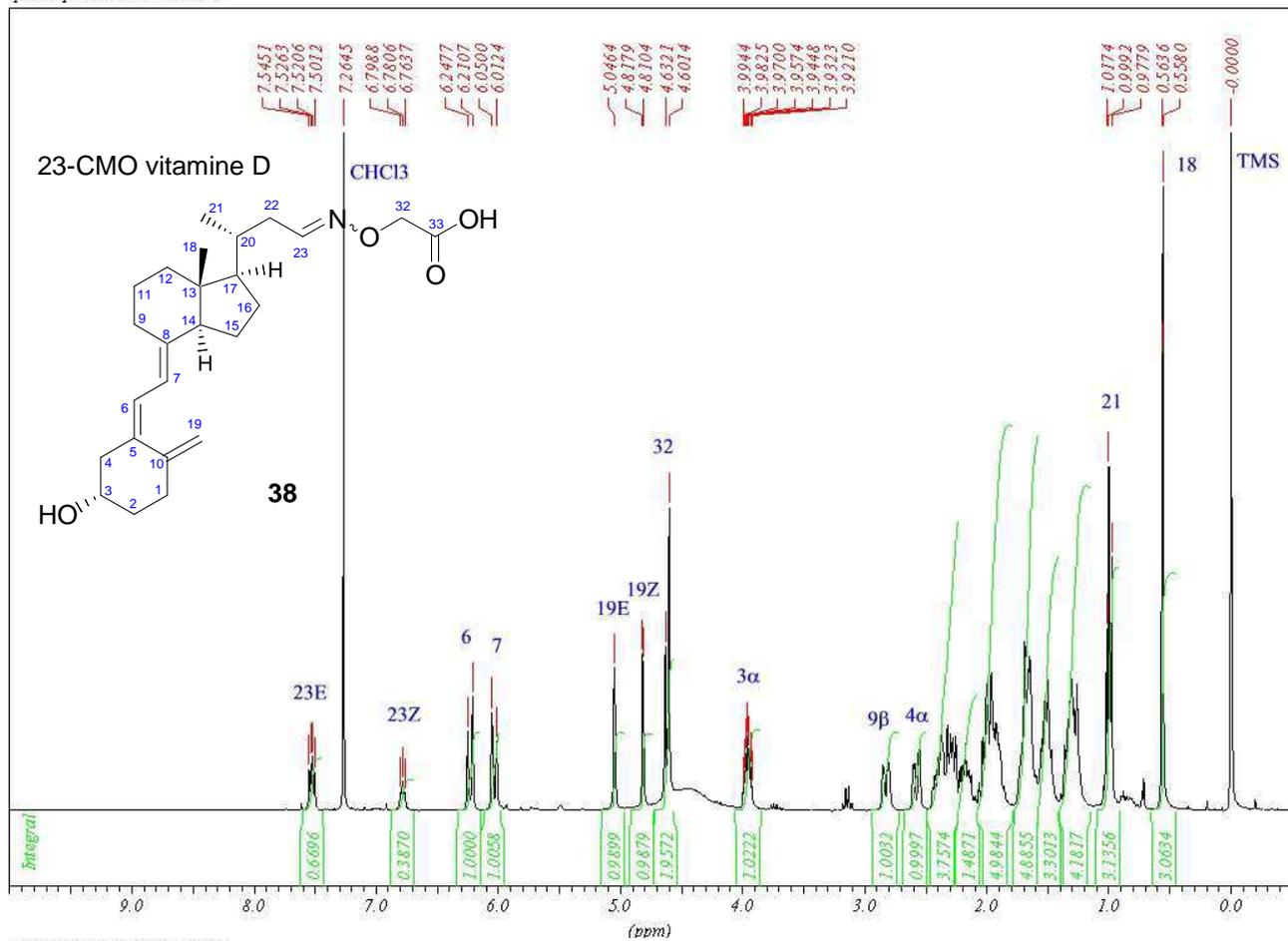




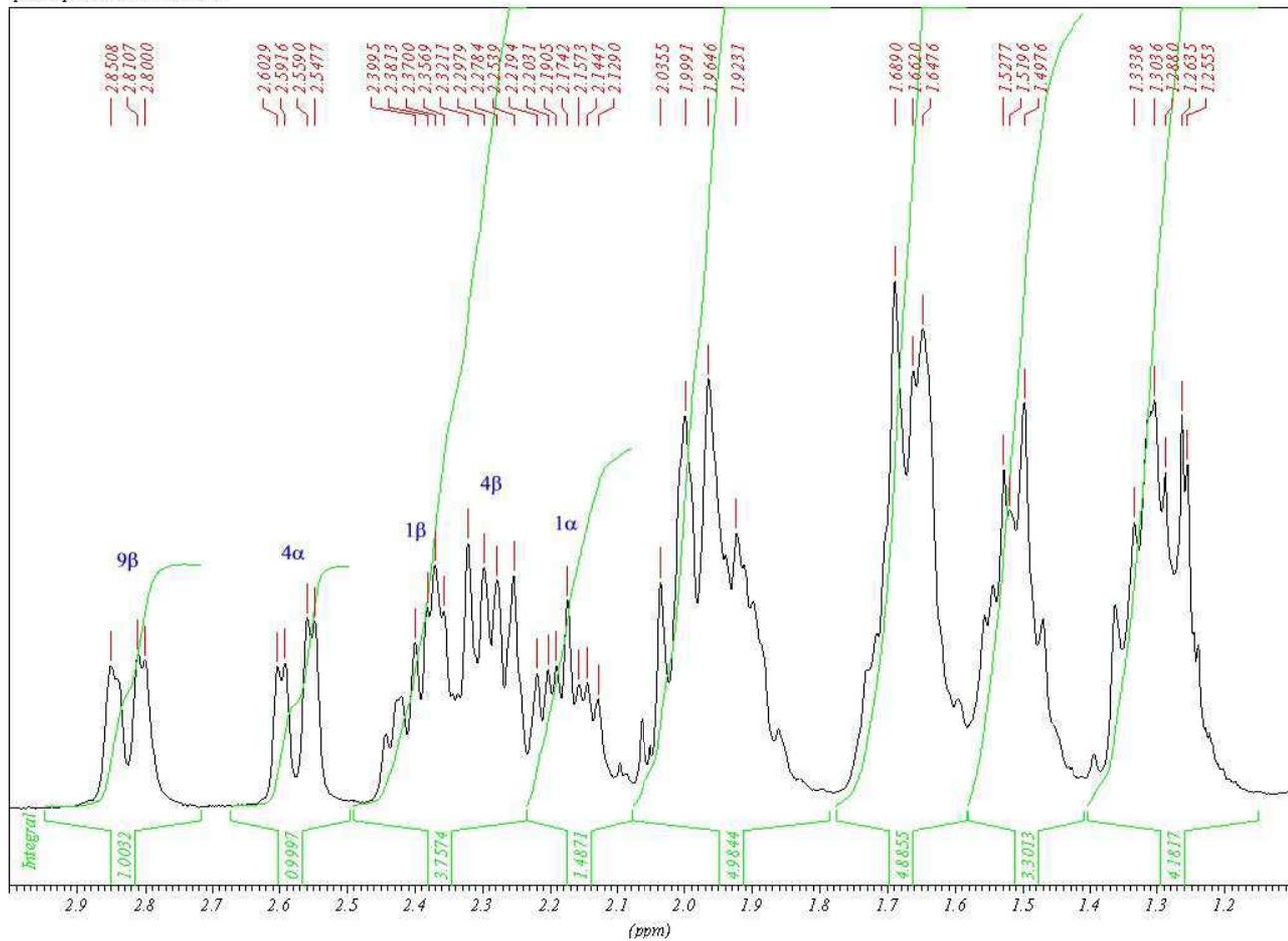
sp1257p/cdc13/c 13



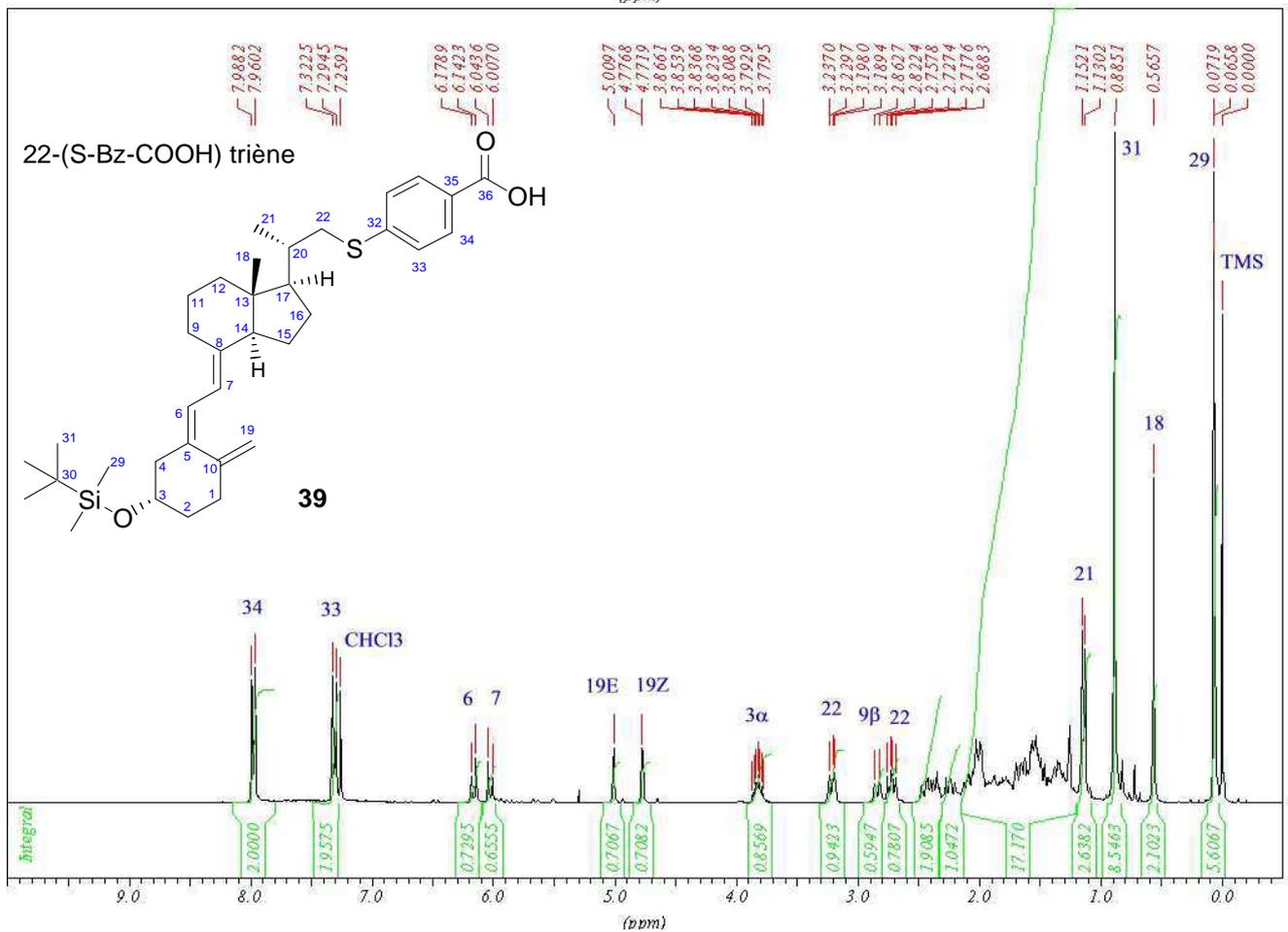
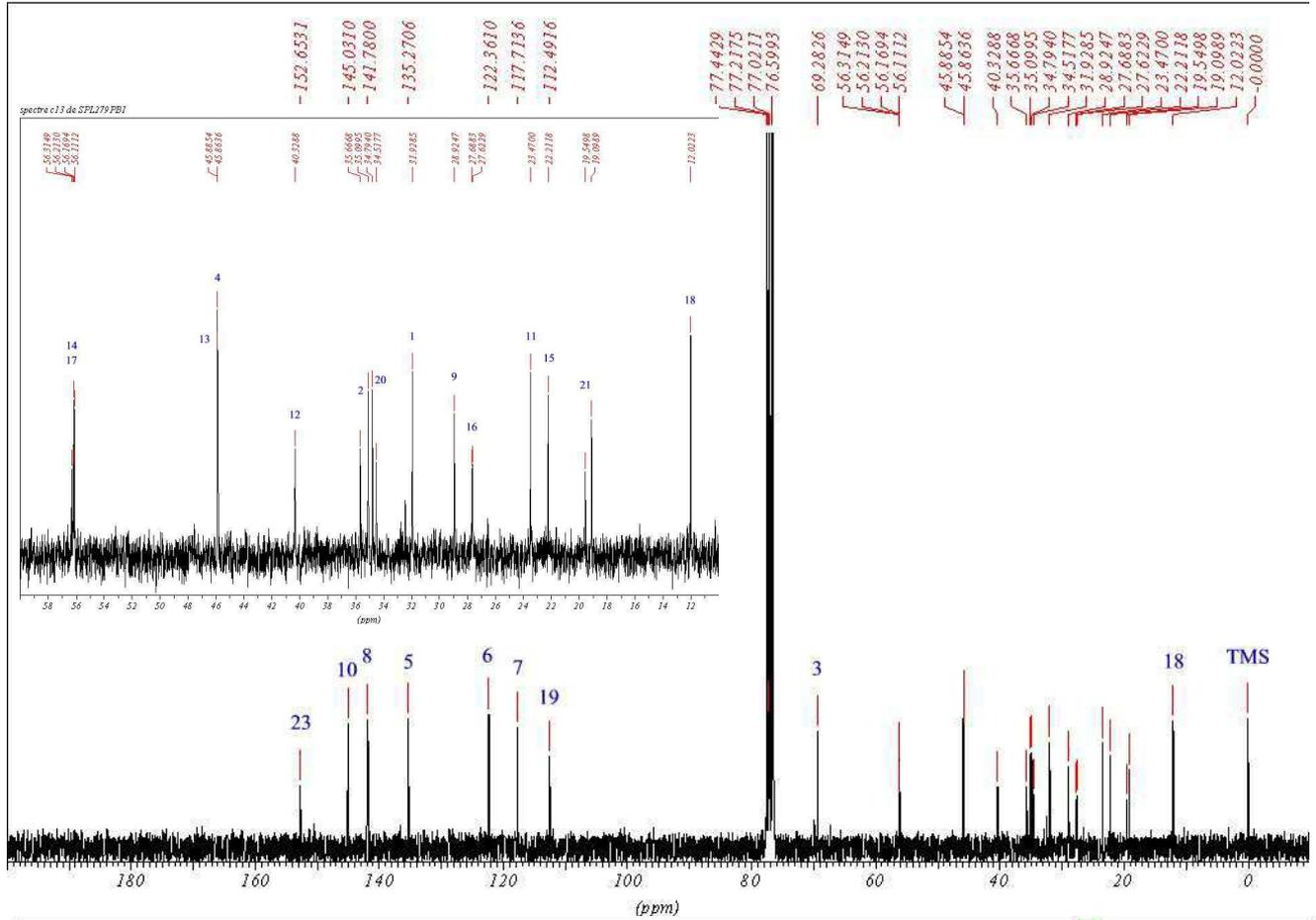
spectre proton de SPL279PB1

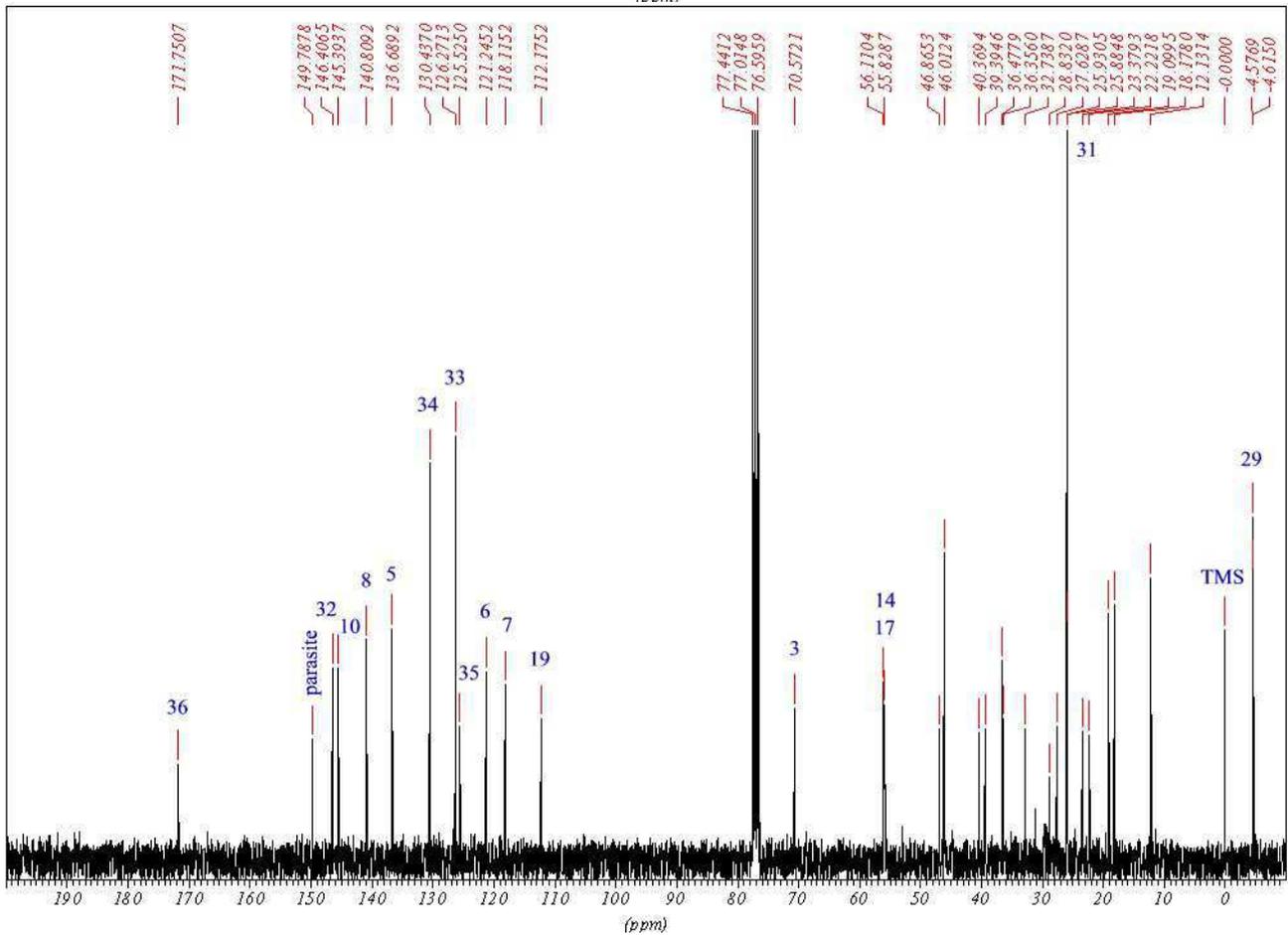
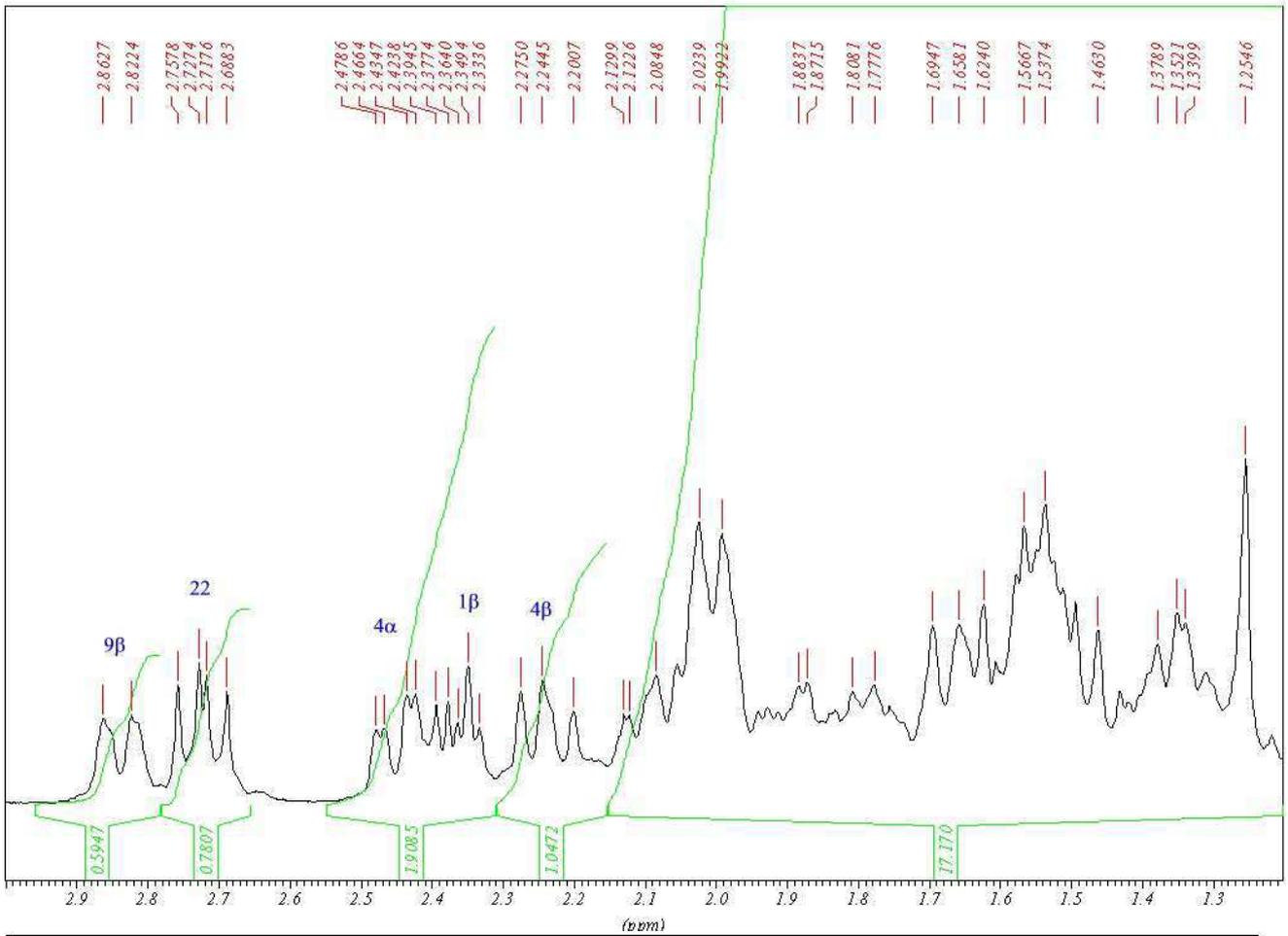


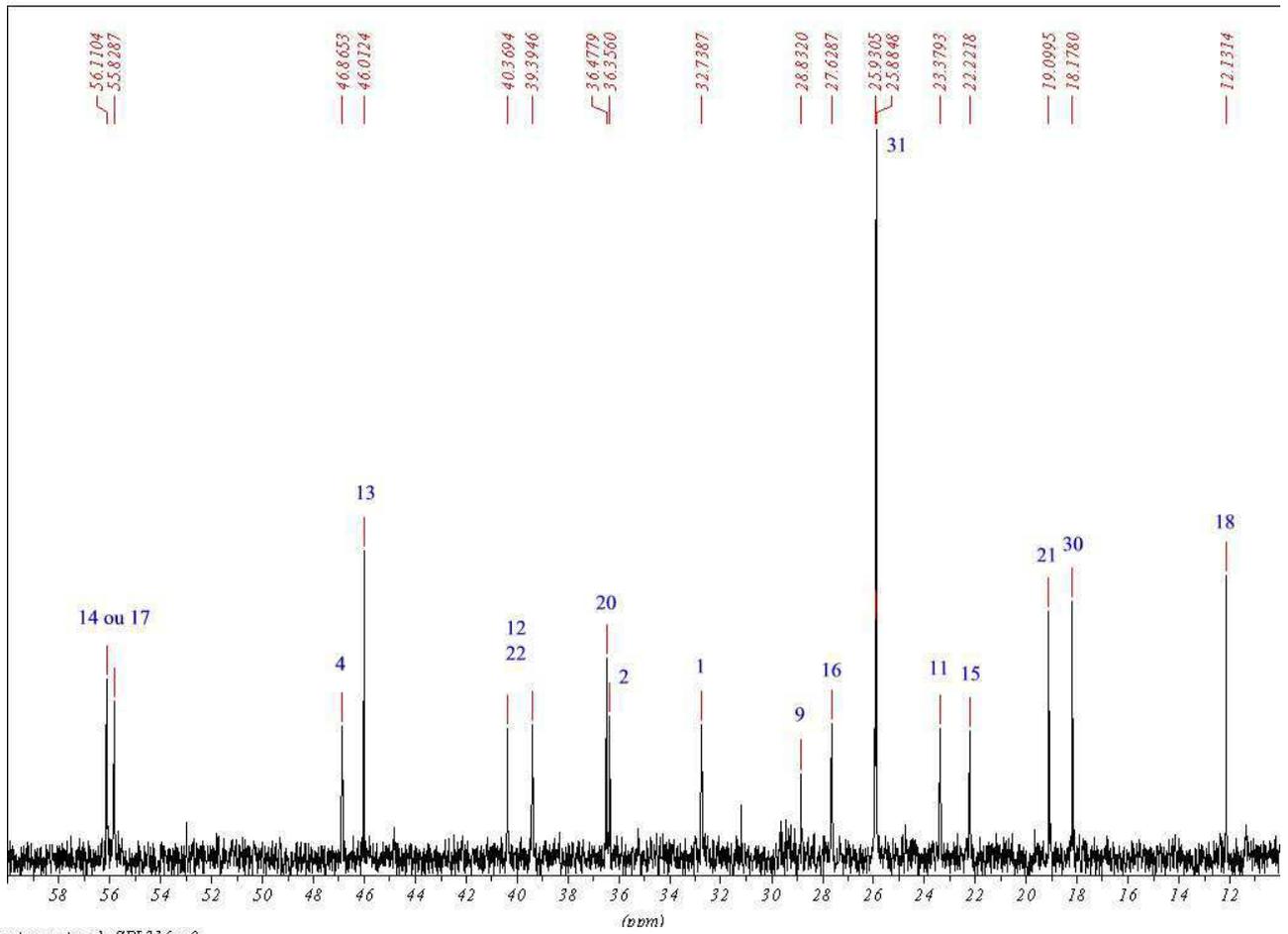
spectre proton de SPL279PB1



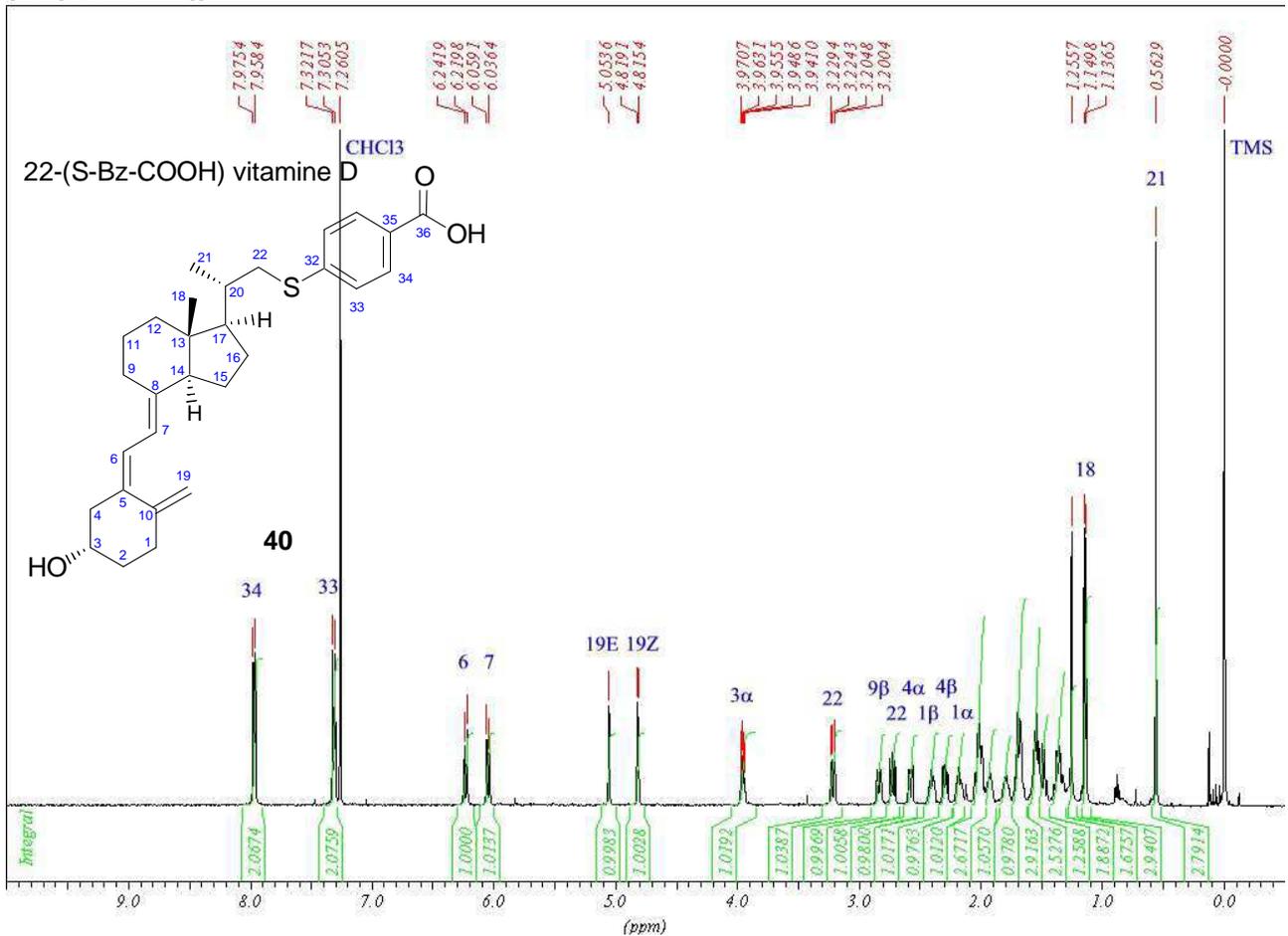
spectre c 13 de SPL279PB1





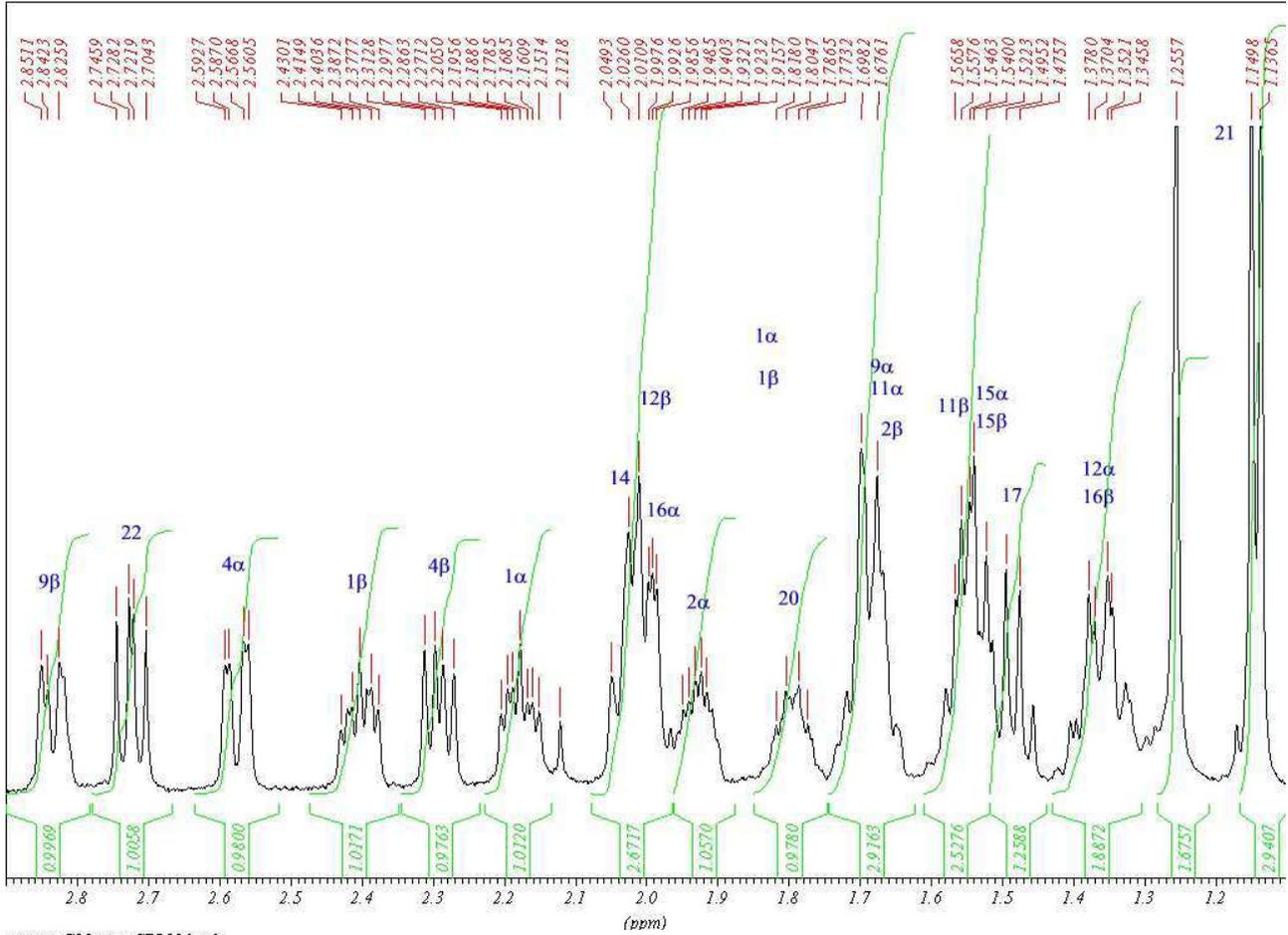


spectre proton de SPL31 6pp9

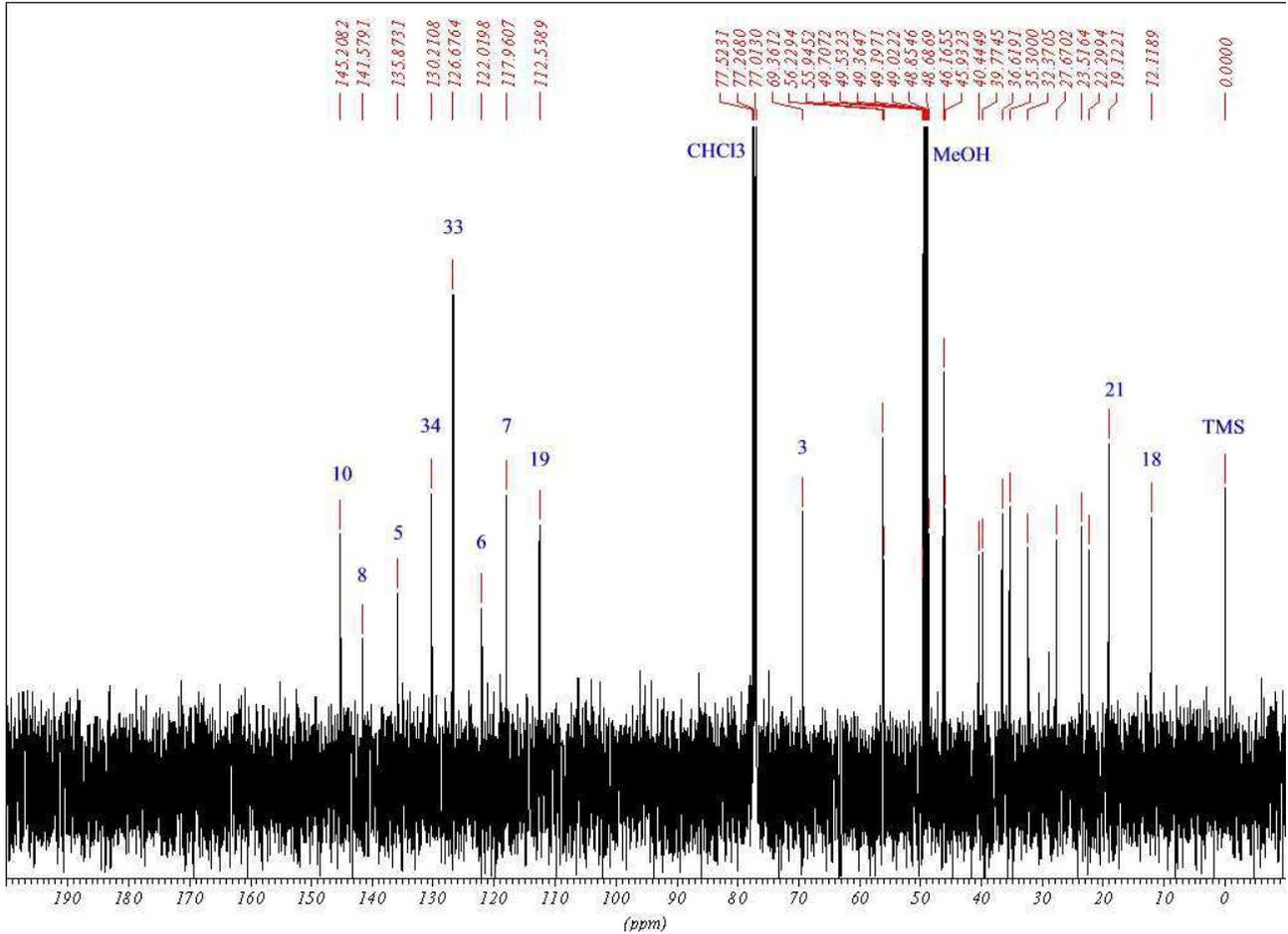


# Annexes

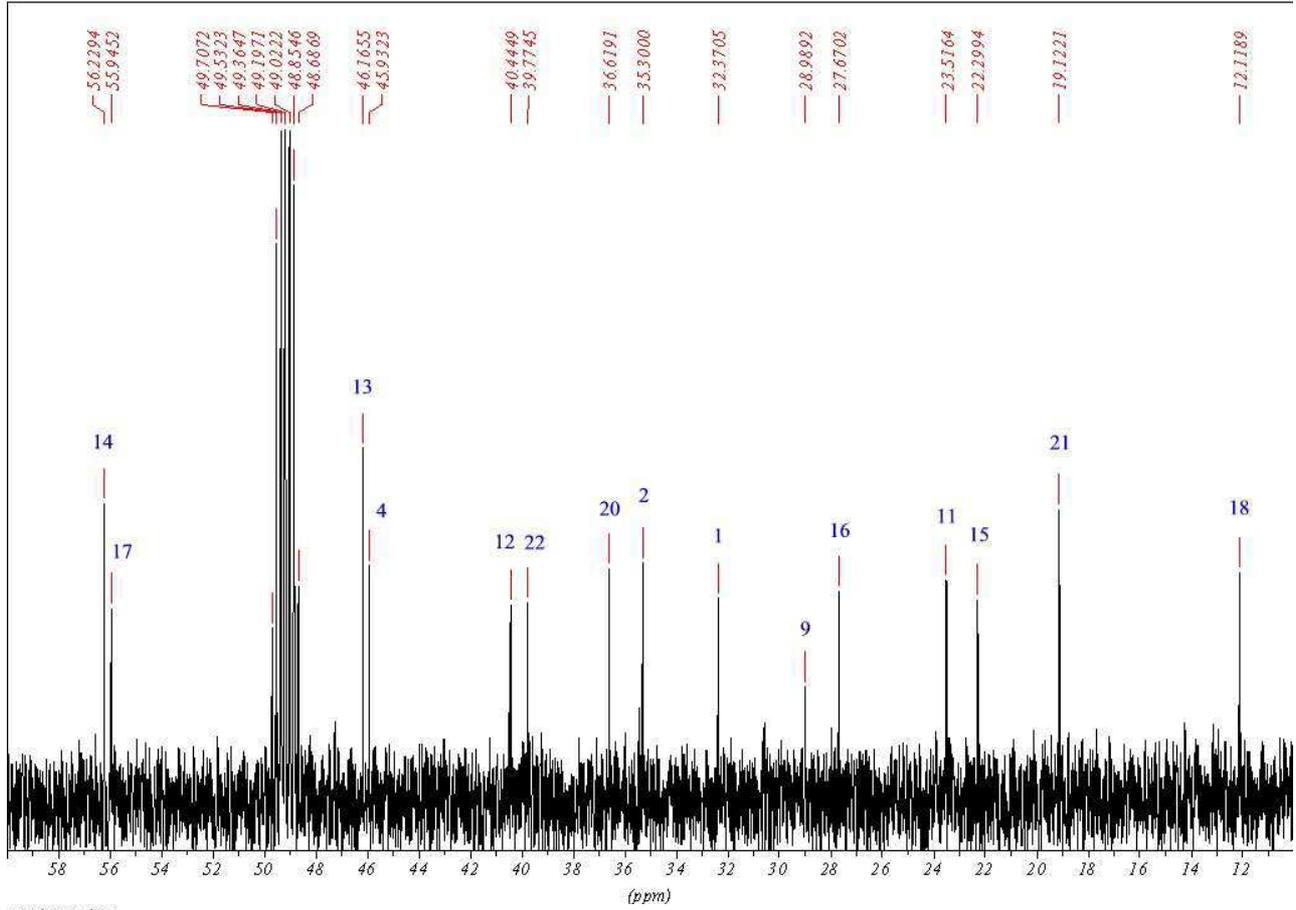
spectre proton de SPL316pp9



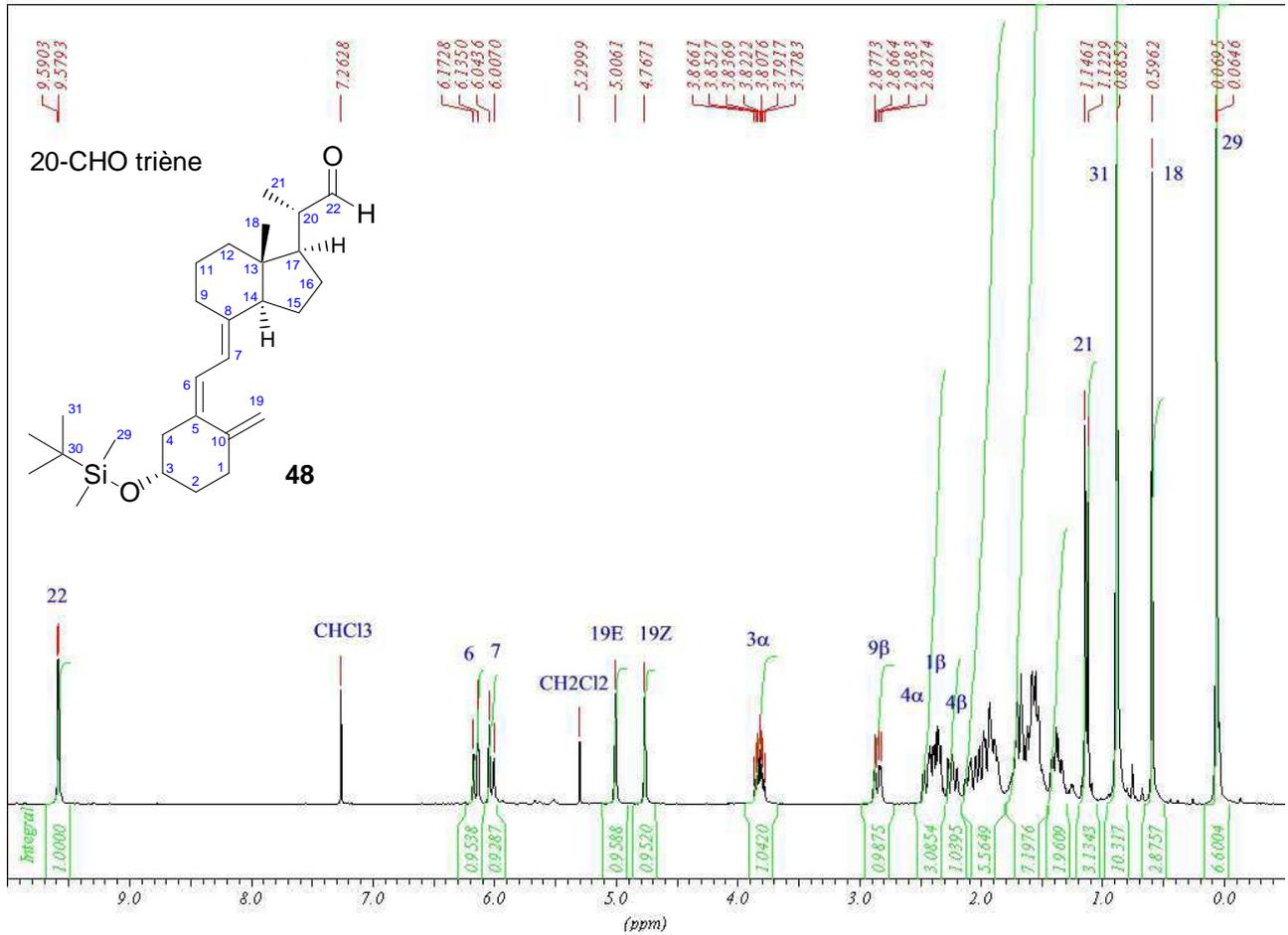
spectre C13 pour SPL316pp9



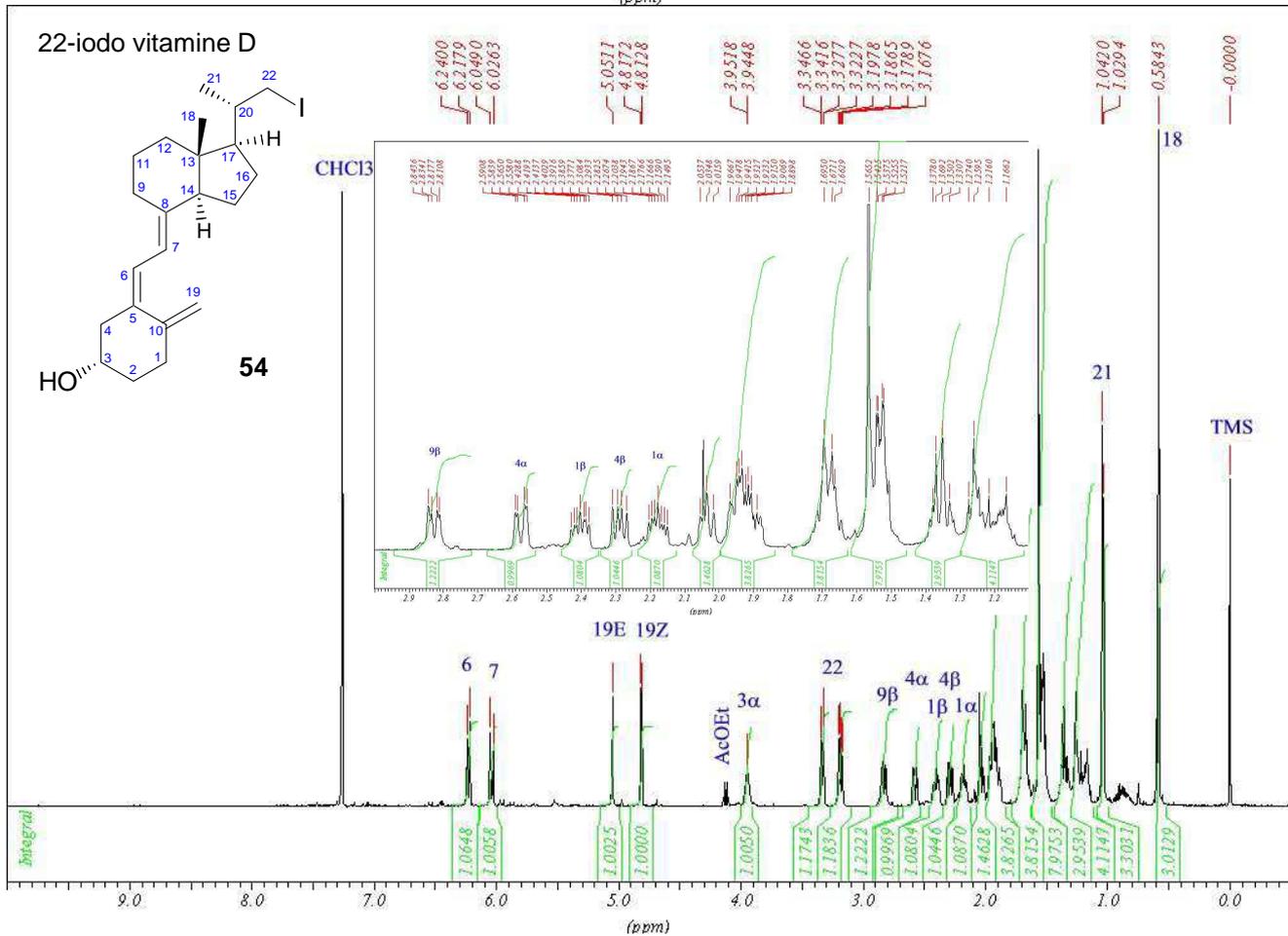
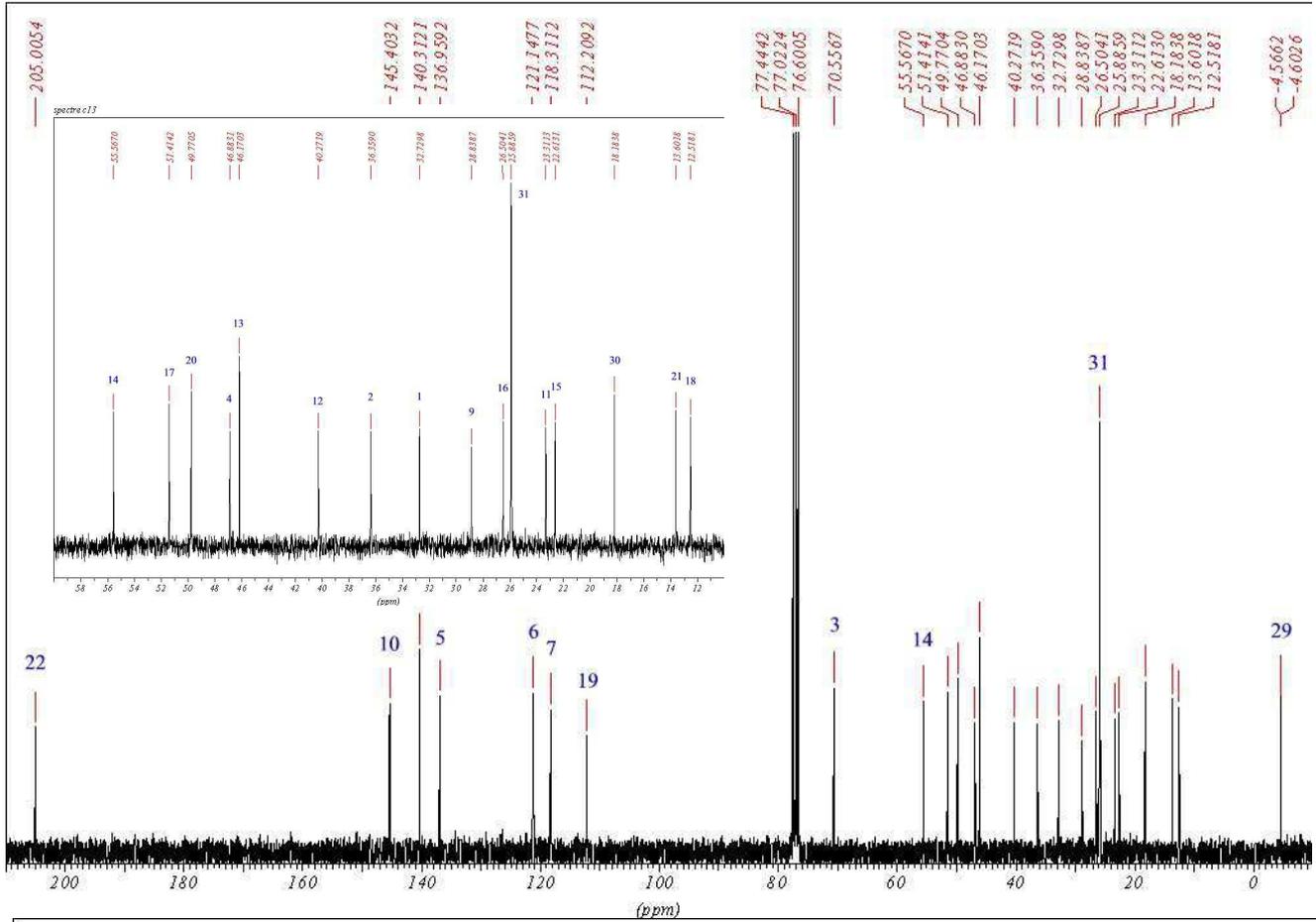
spectre C13 pour SPL3 16pp9



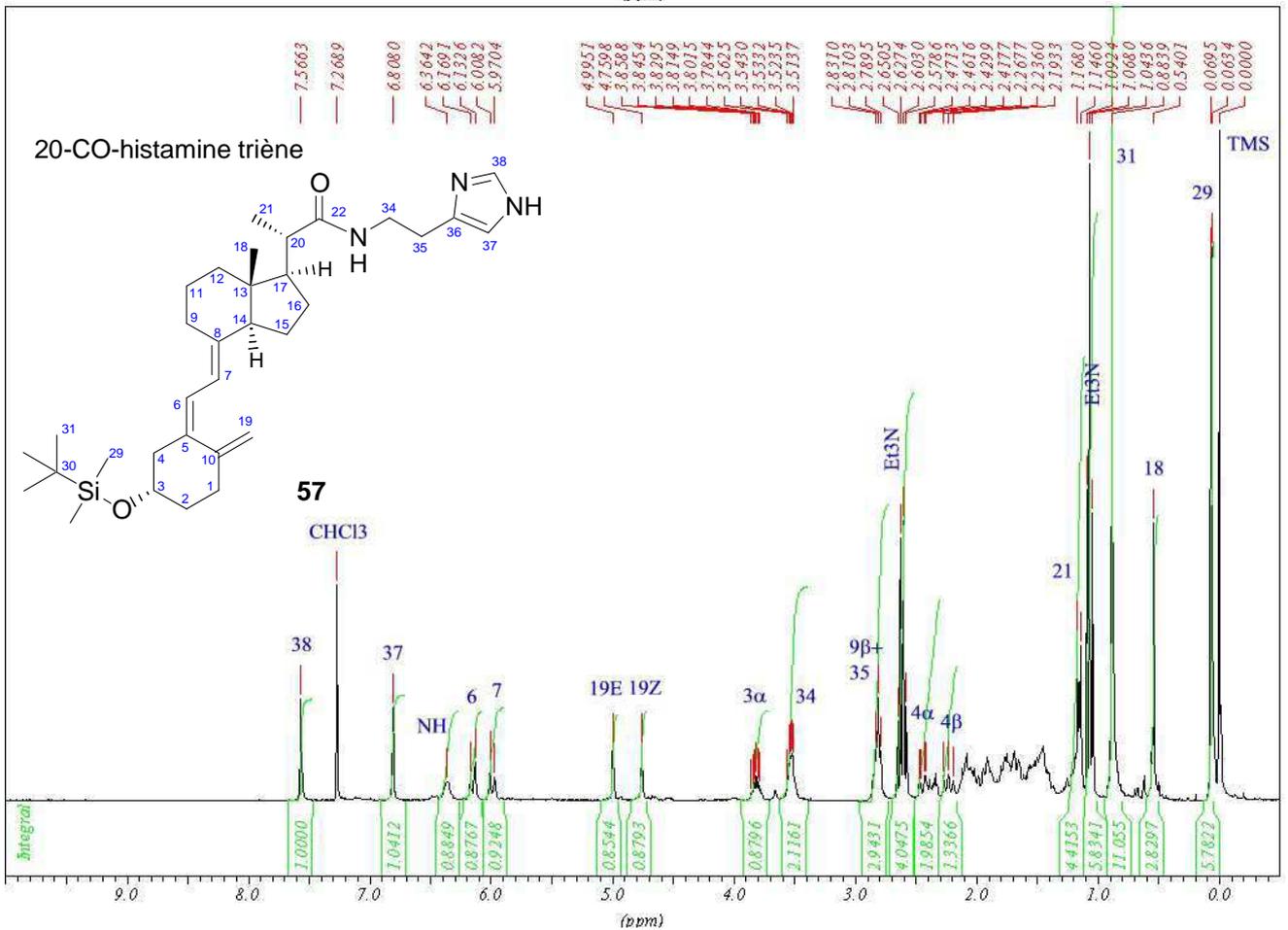
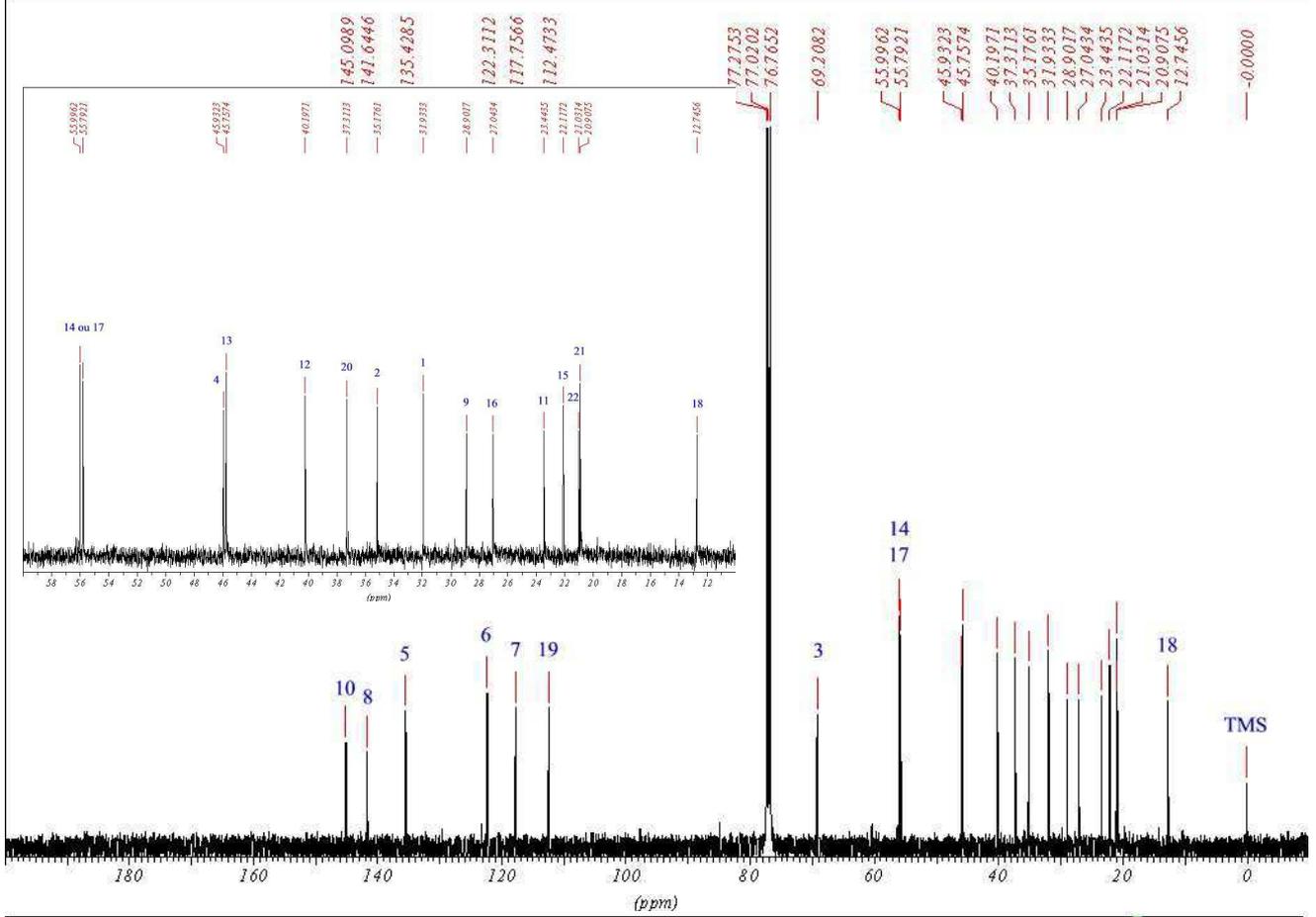
spectre proton

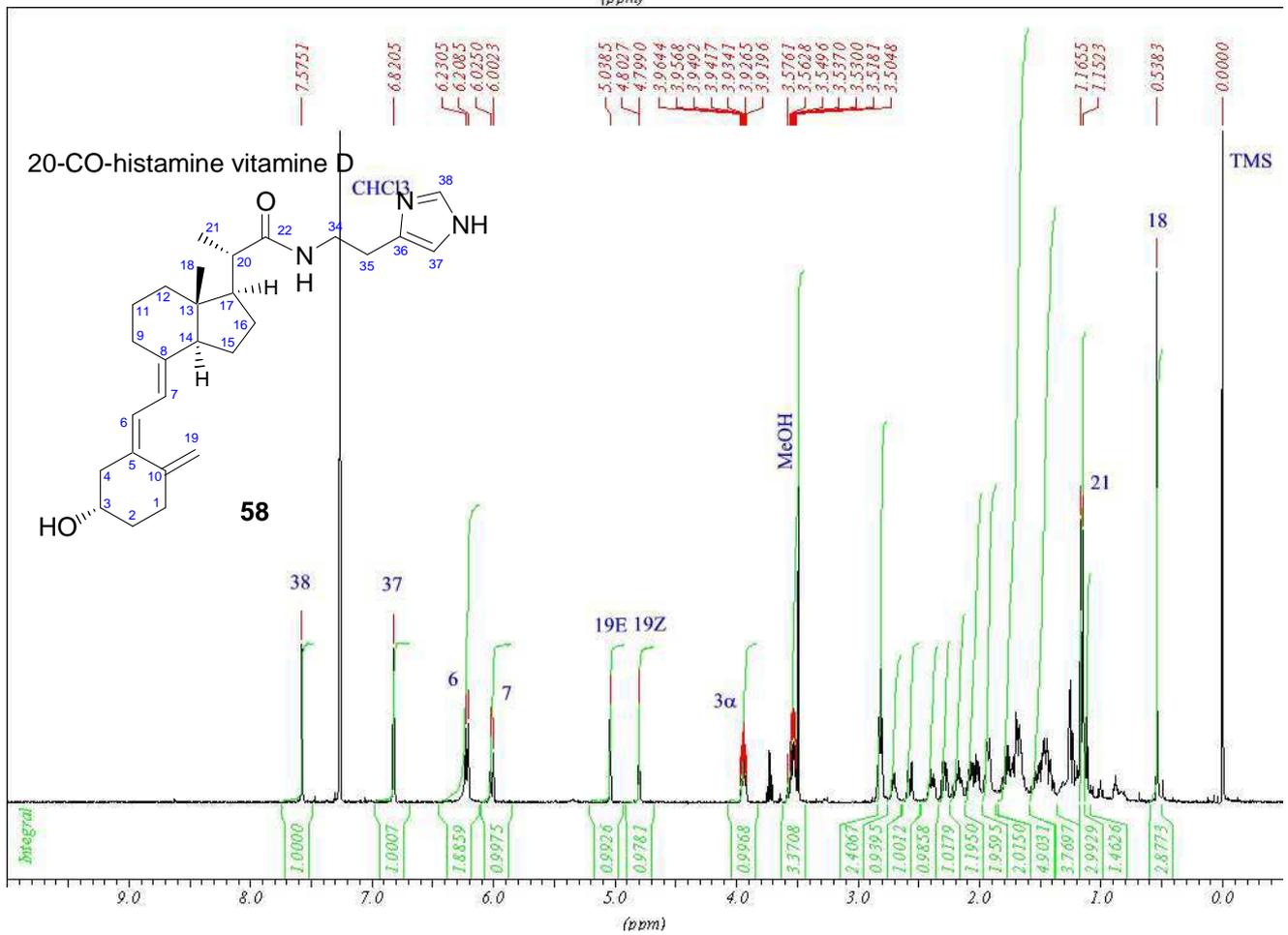
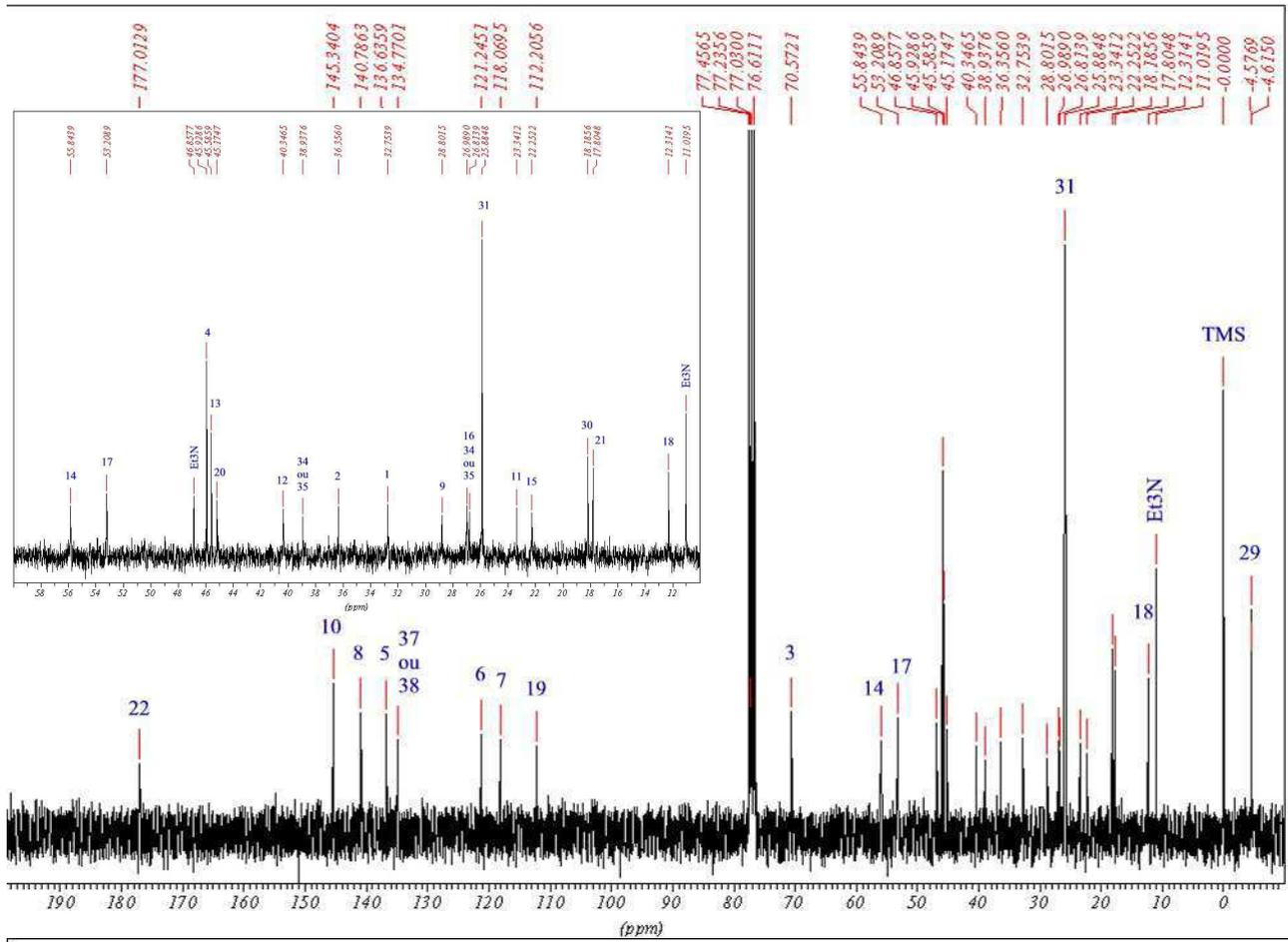


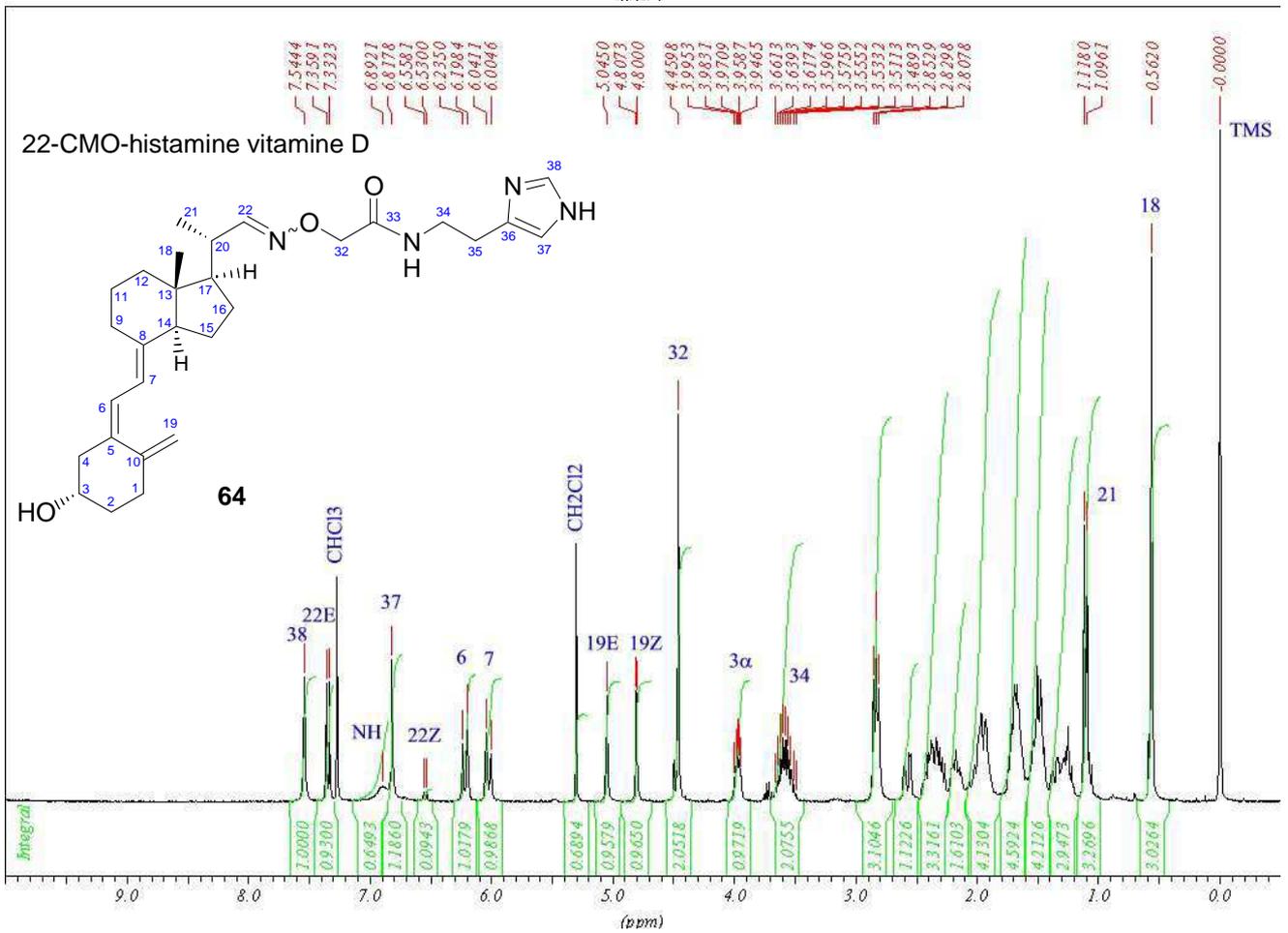
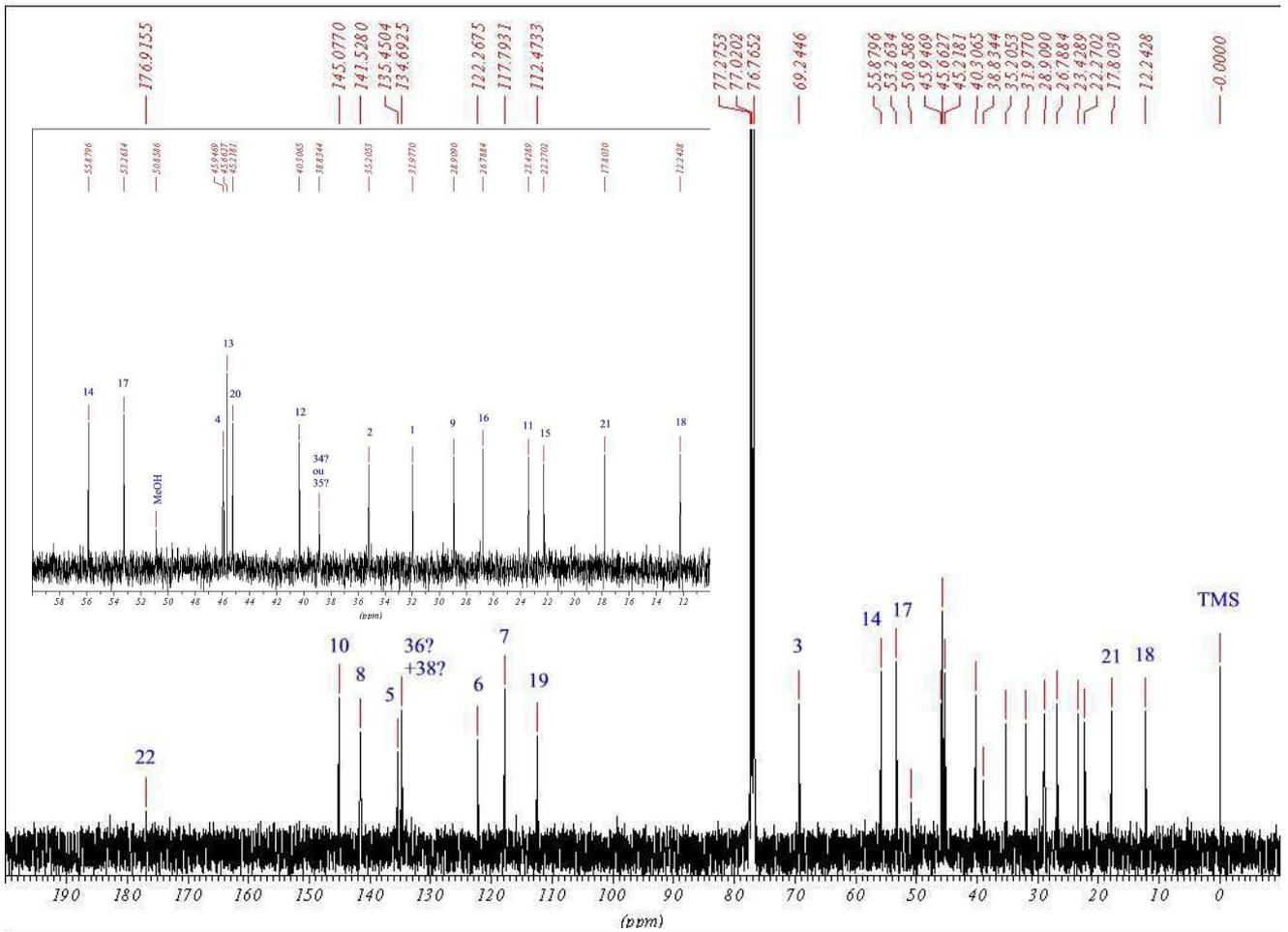
spectre c 13

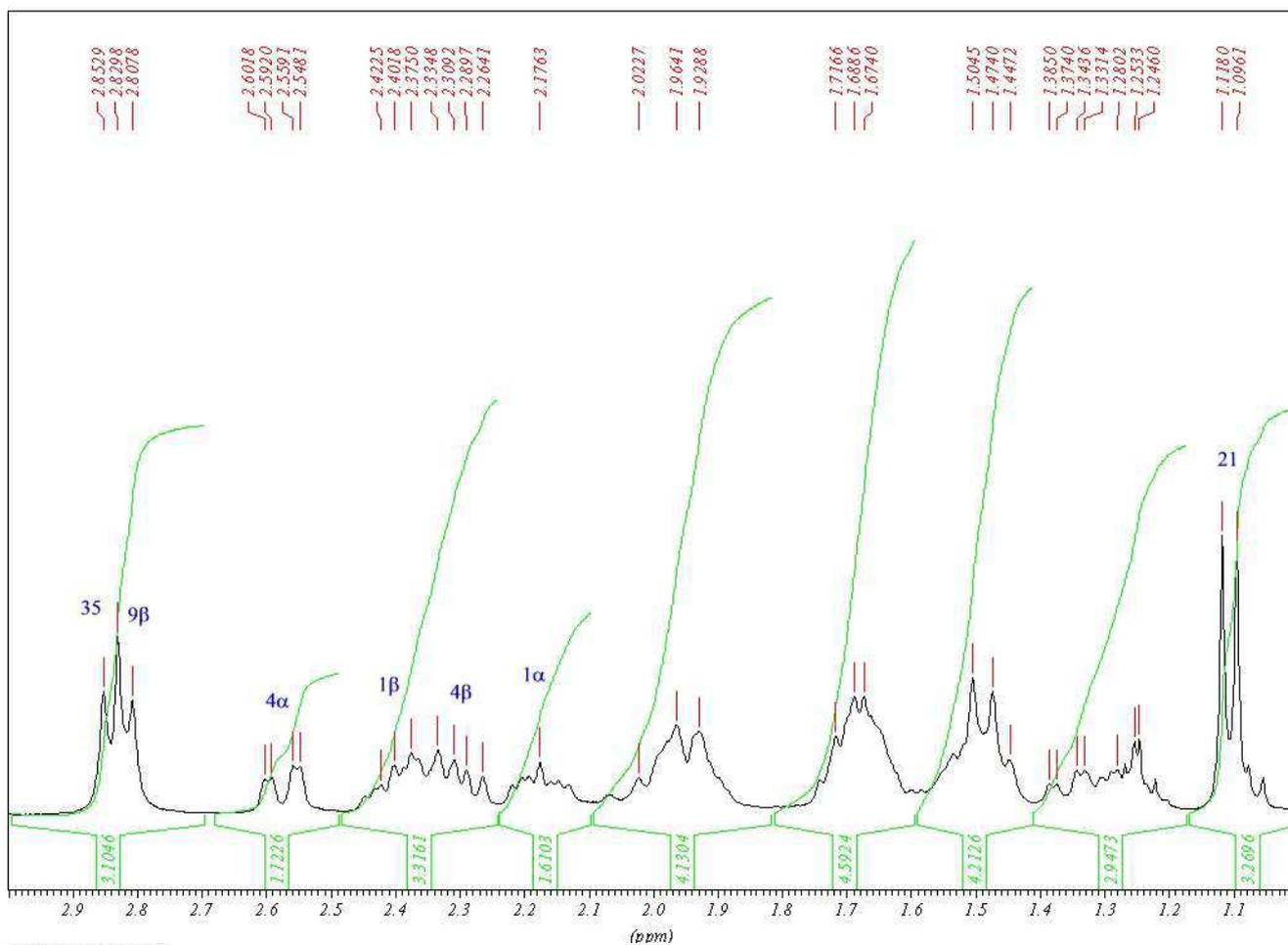


C13 découple CPD

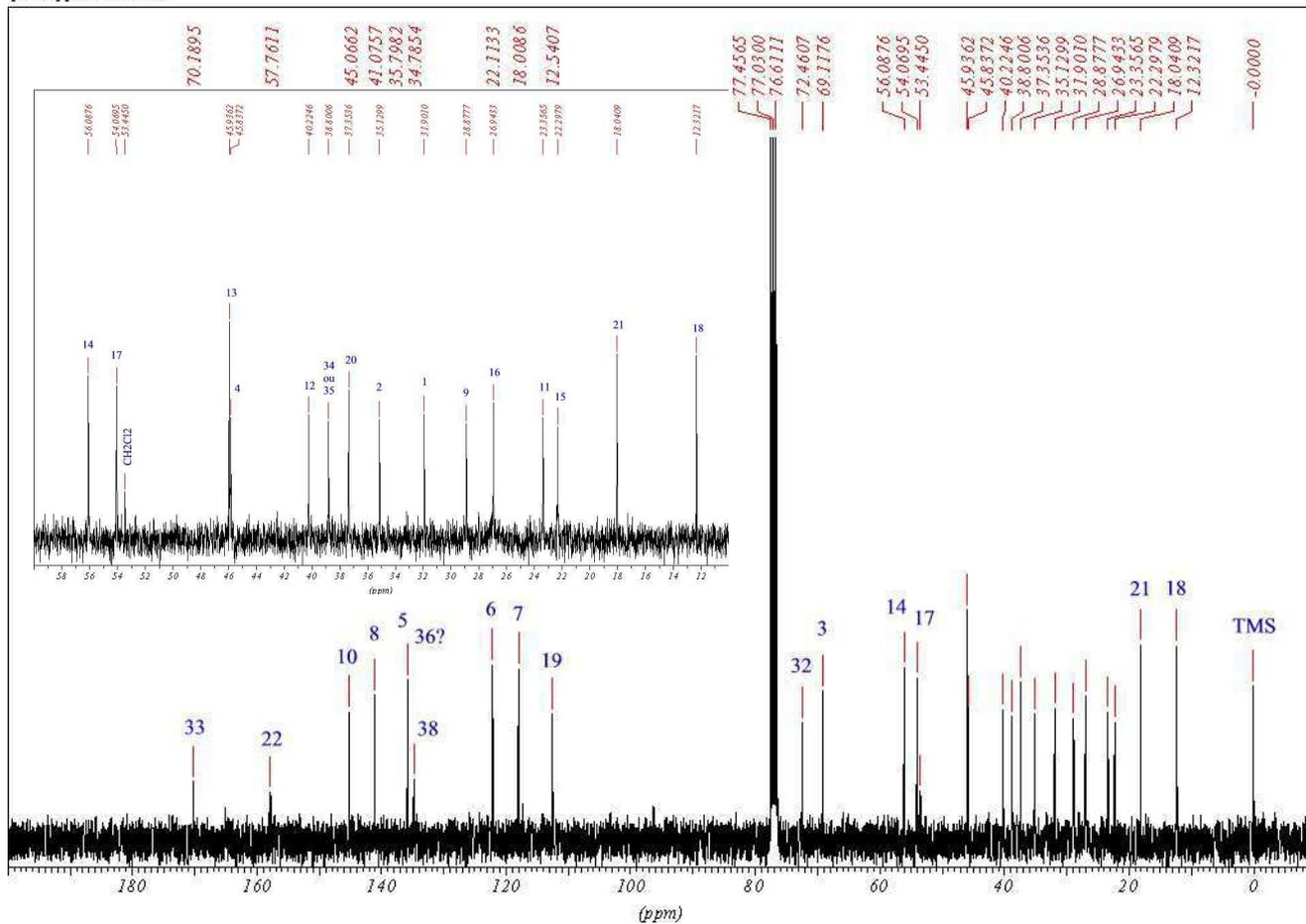




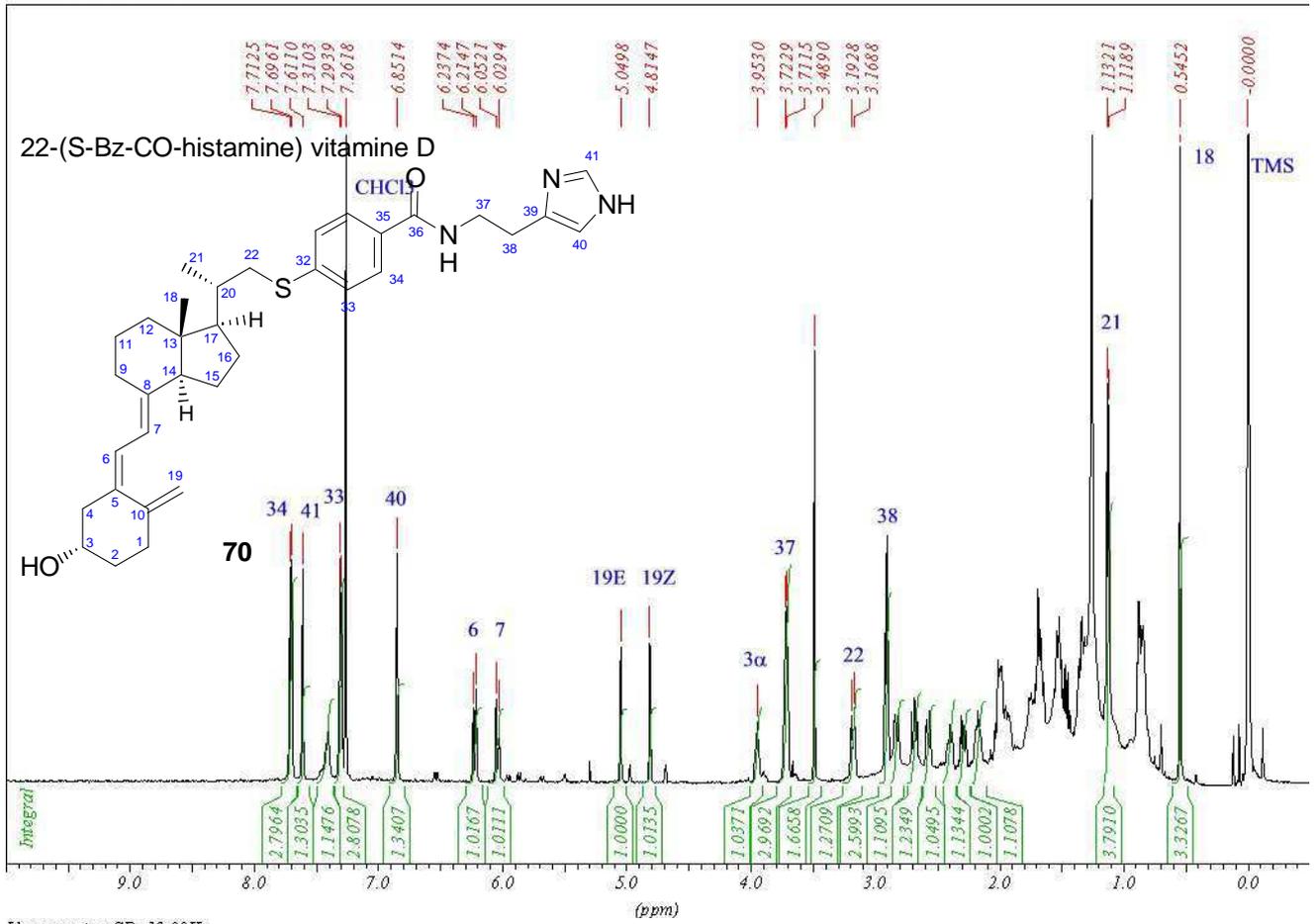




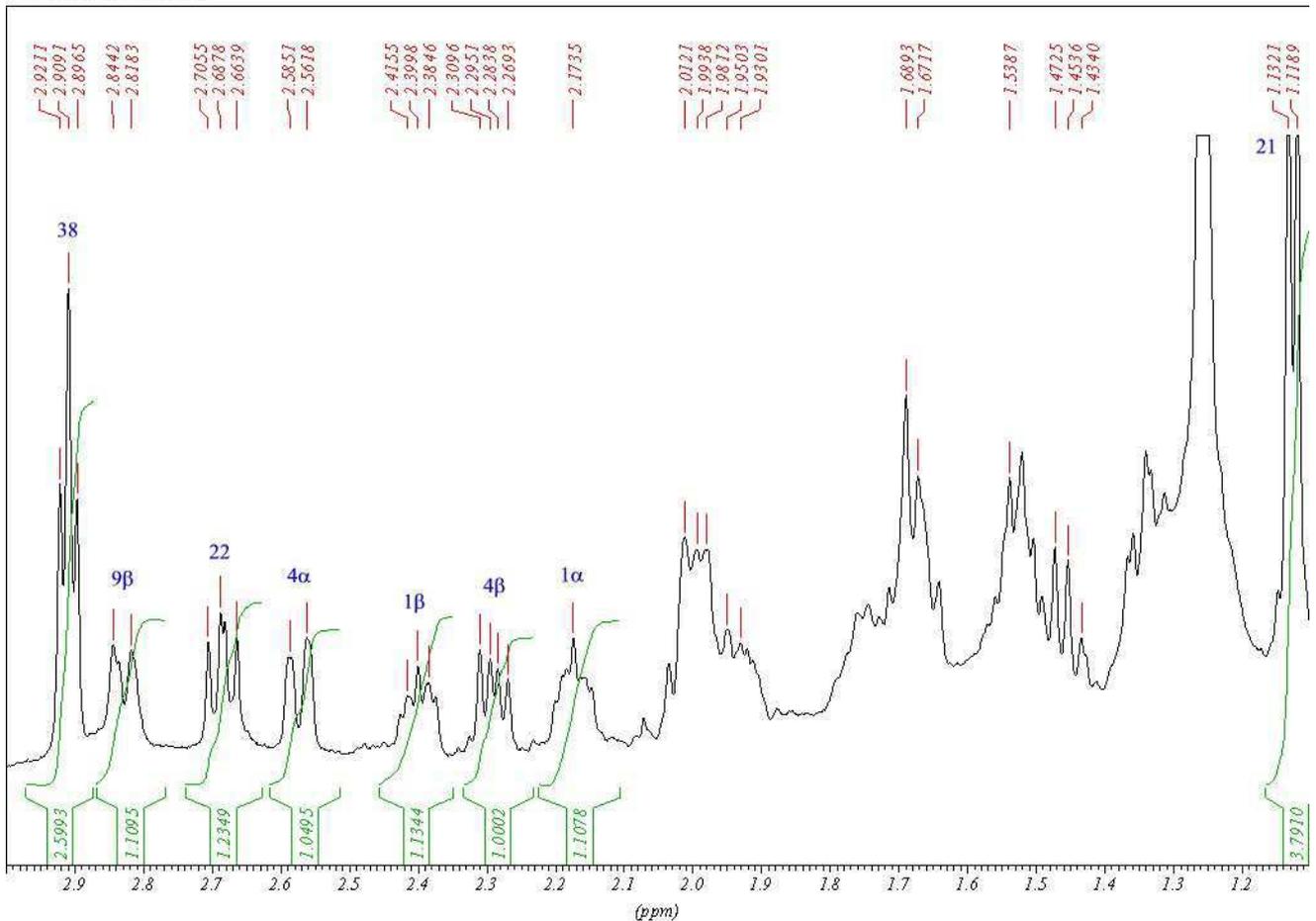
sp12 08 pp 1/cdcl3/c 13



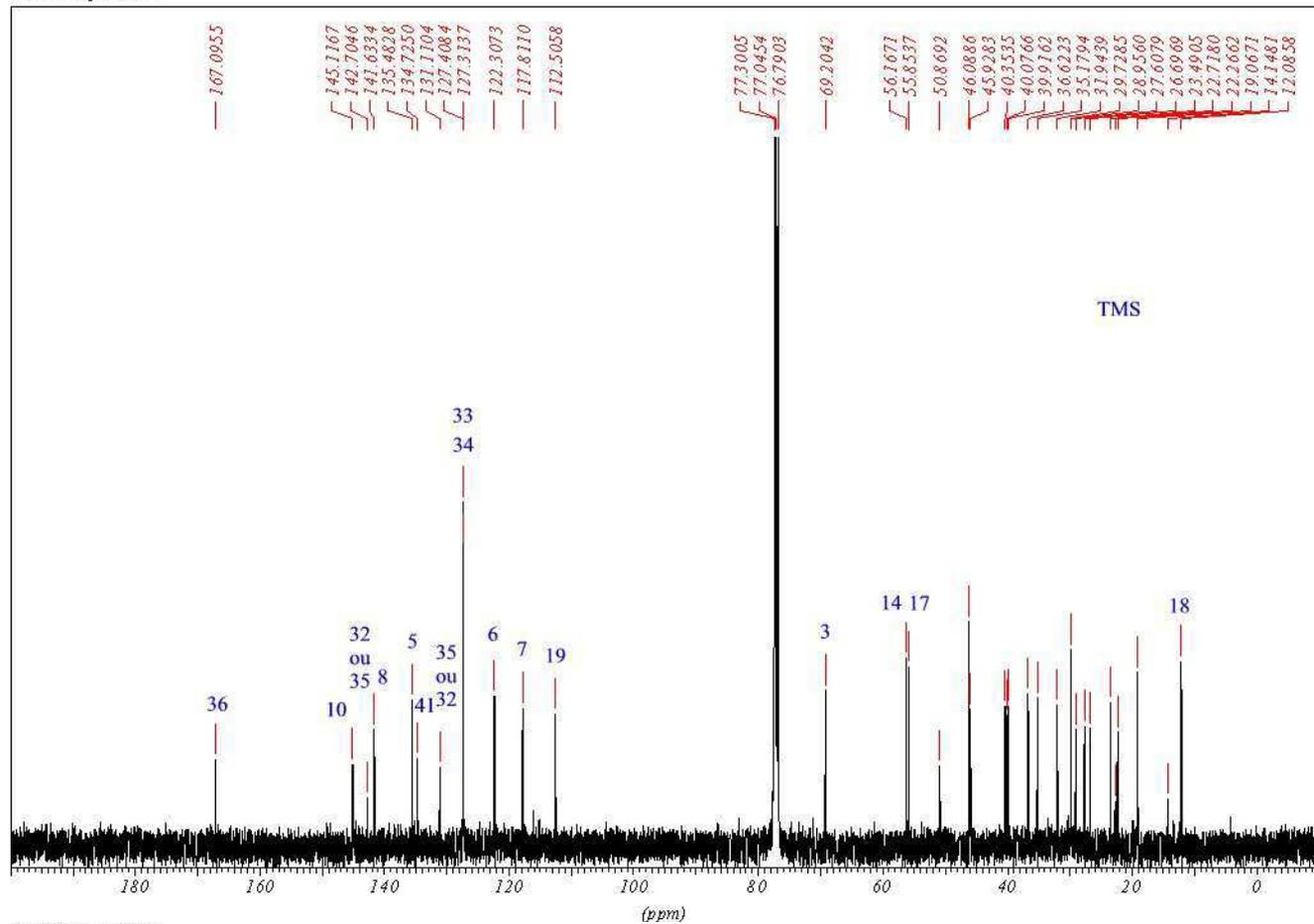
Idem avec tms SR=13.09Hz



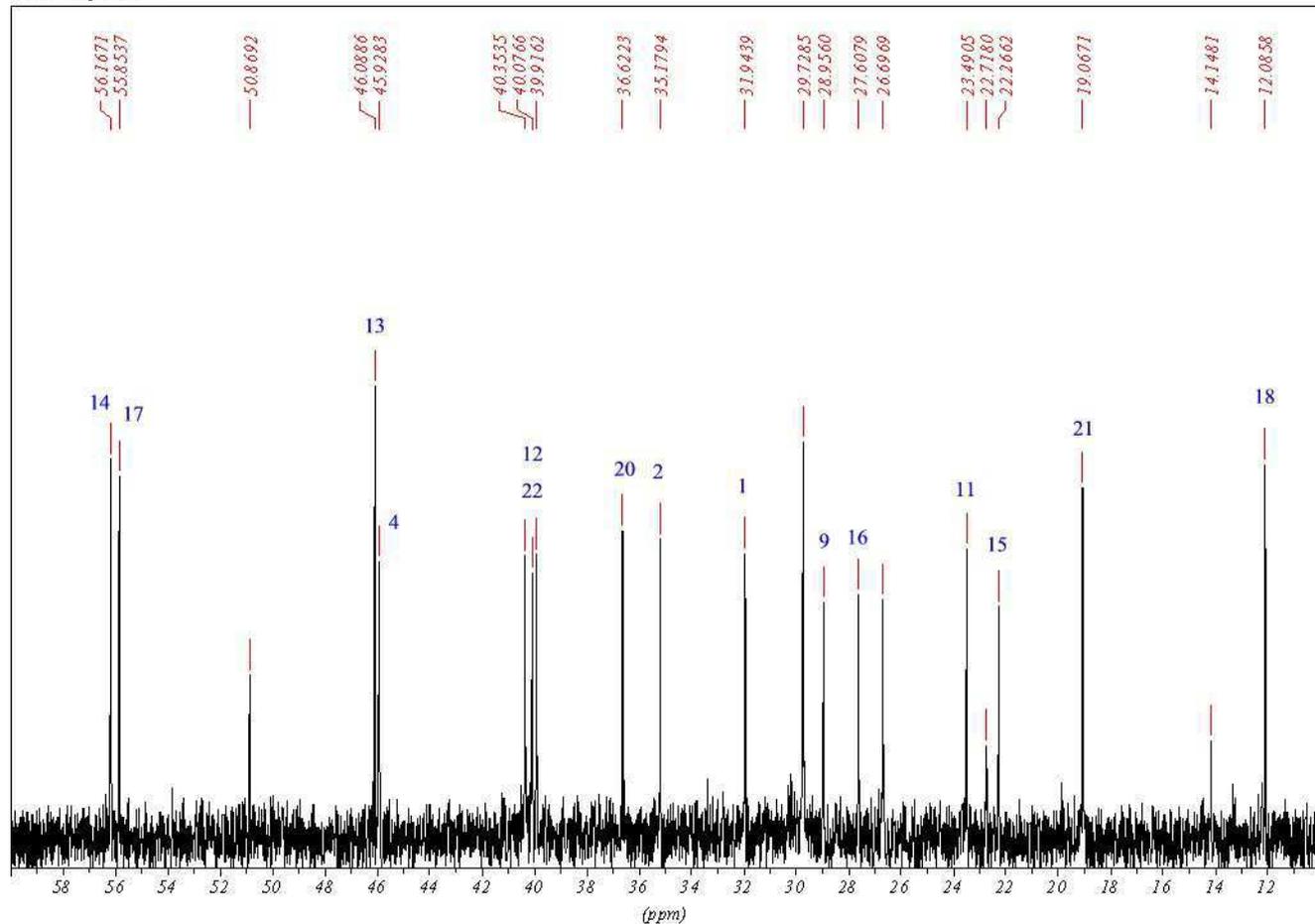
Idem avec tms SR=13.09Hz



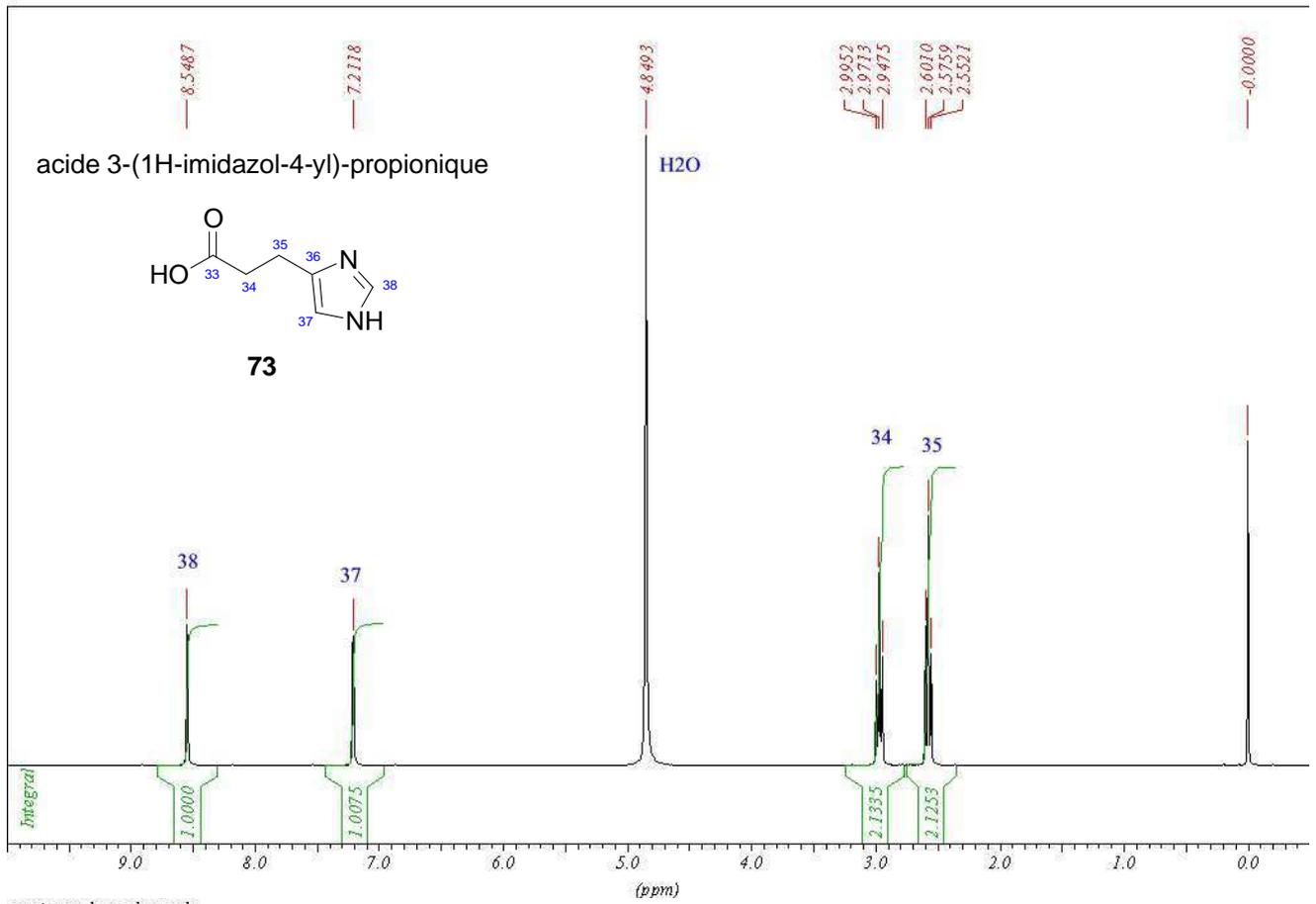
*C13 decouple CPD*



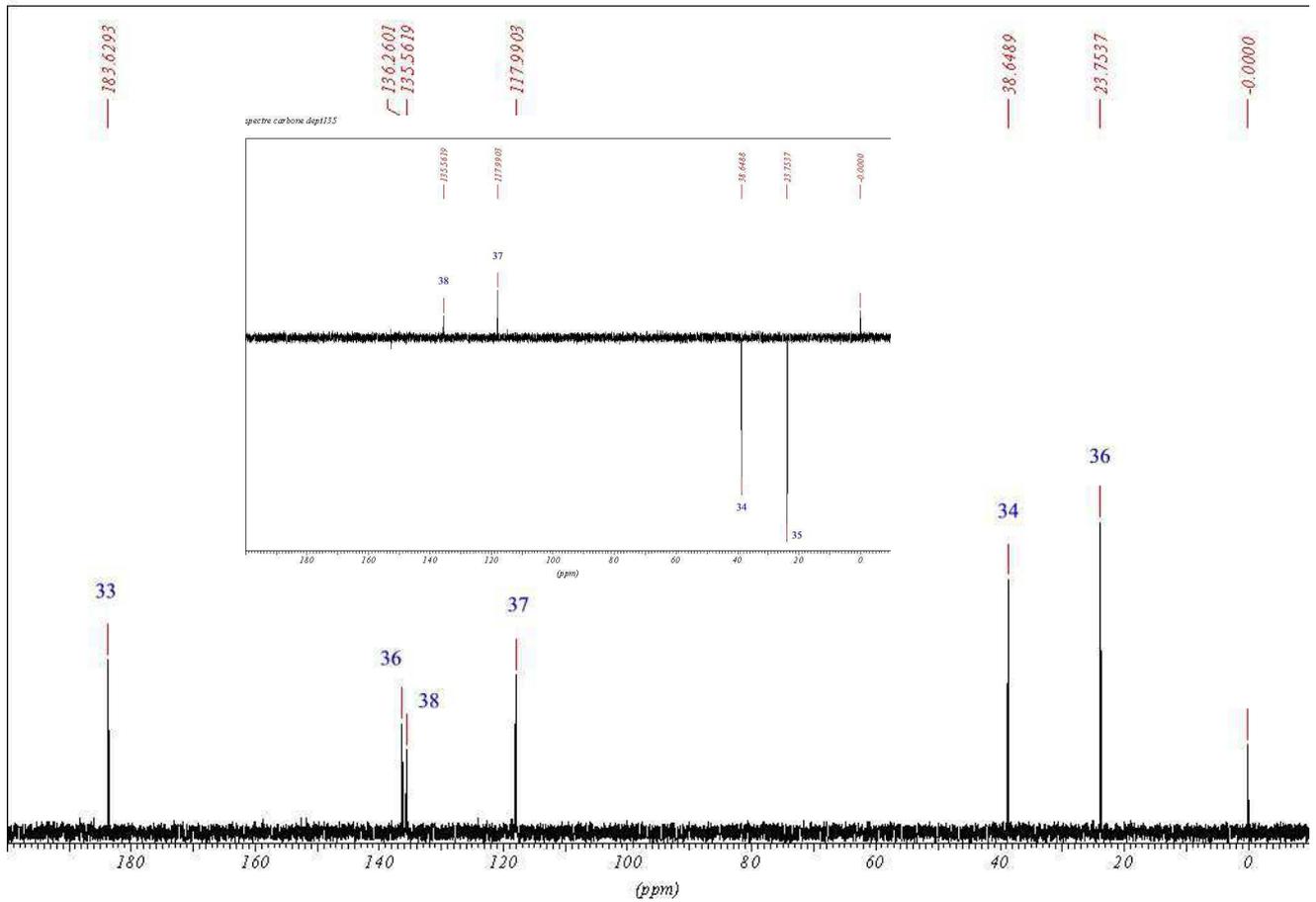
*C13 decouple CPD*



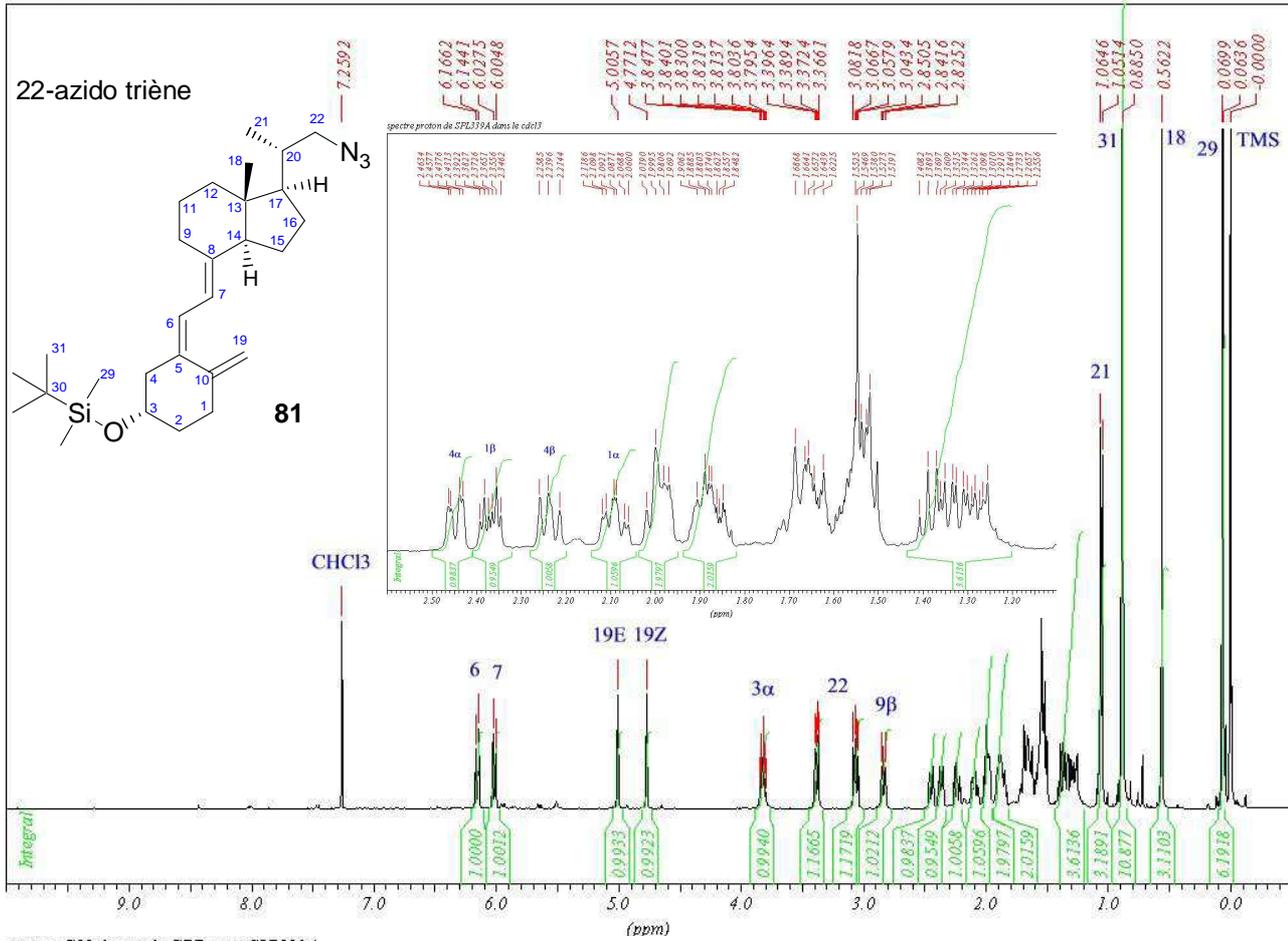
spectre proton



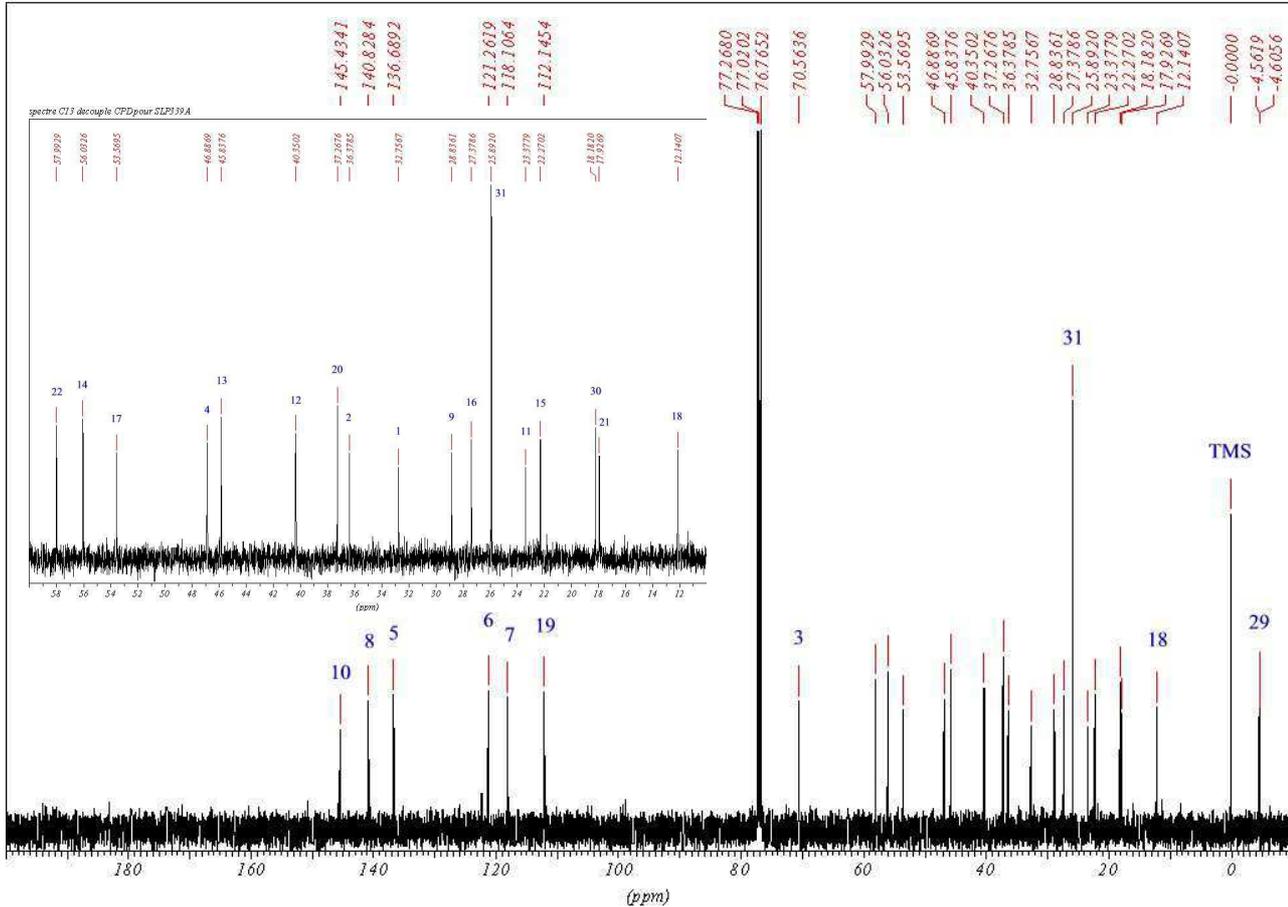
spectre carbone decouple

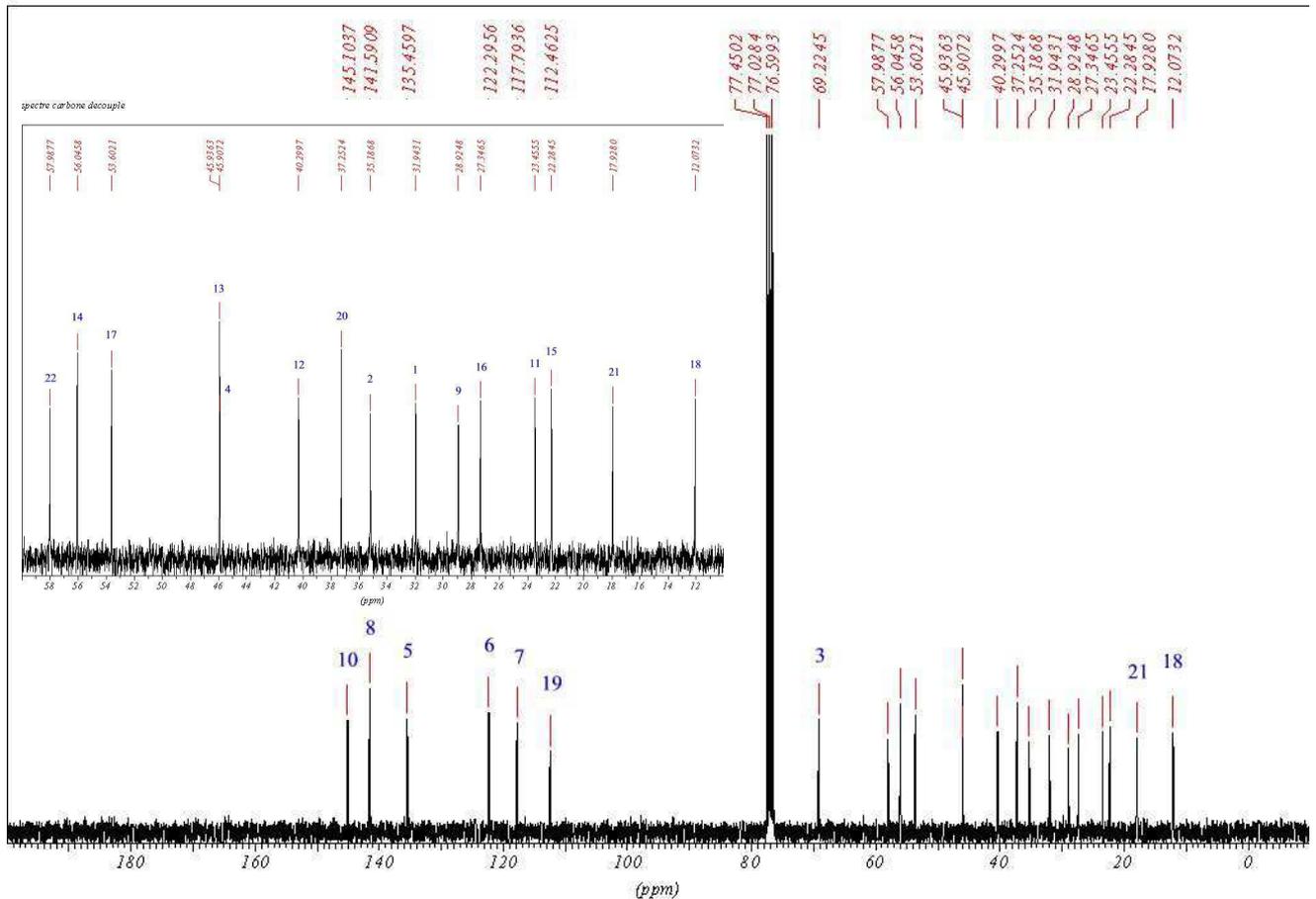
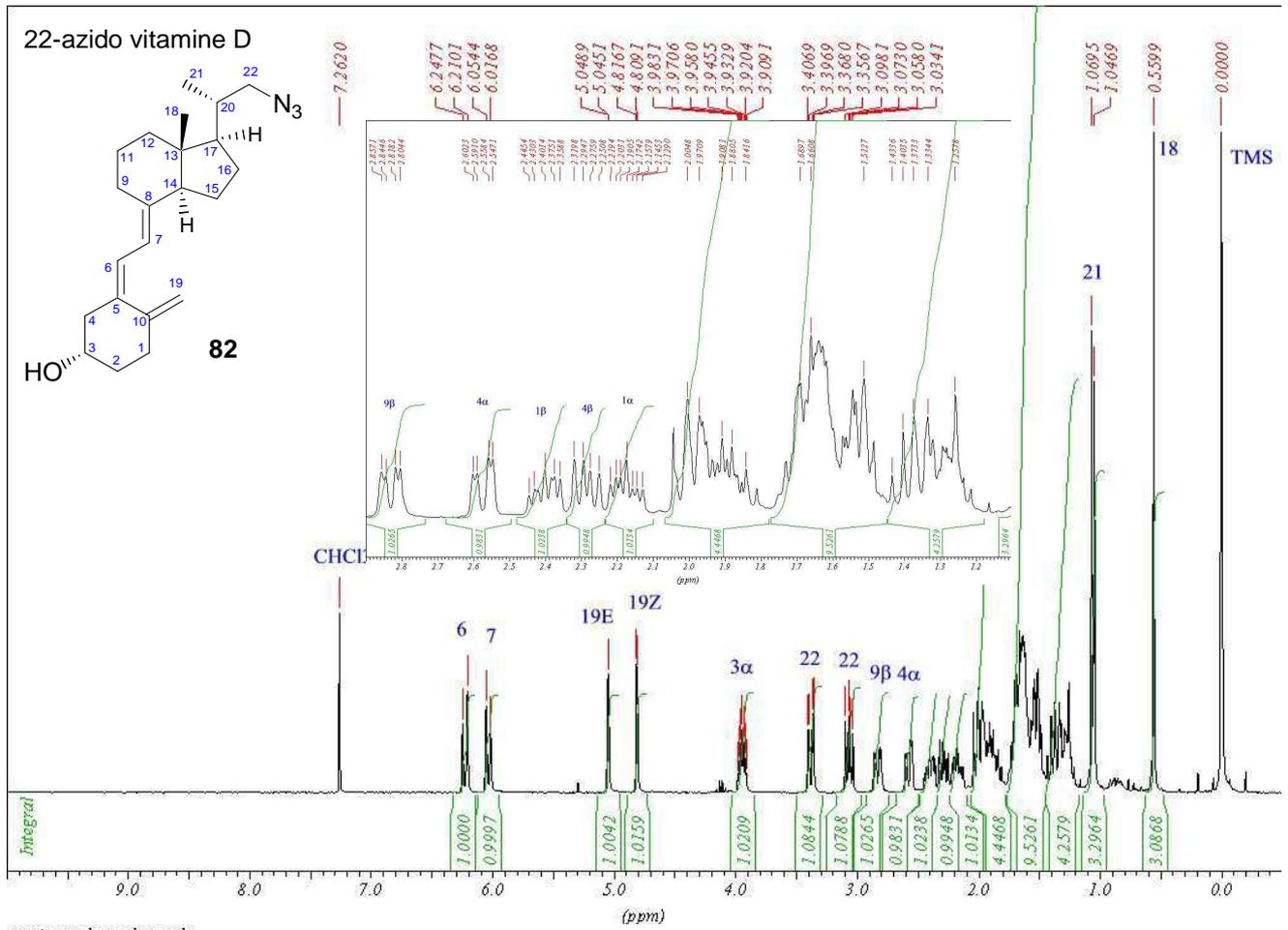


spectre proton de SPL339A dans le cdcl3

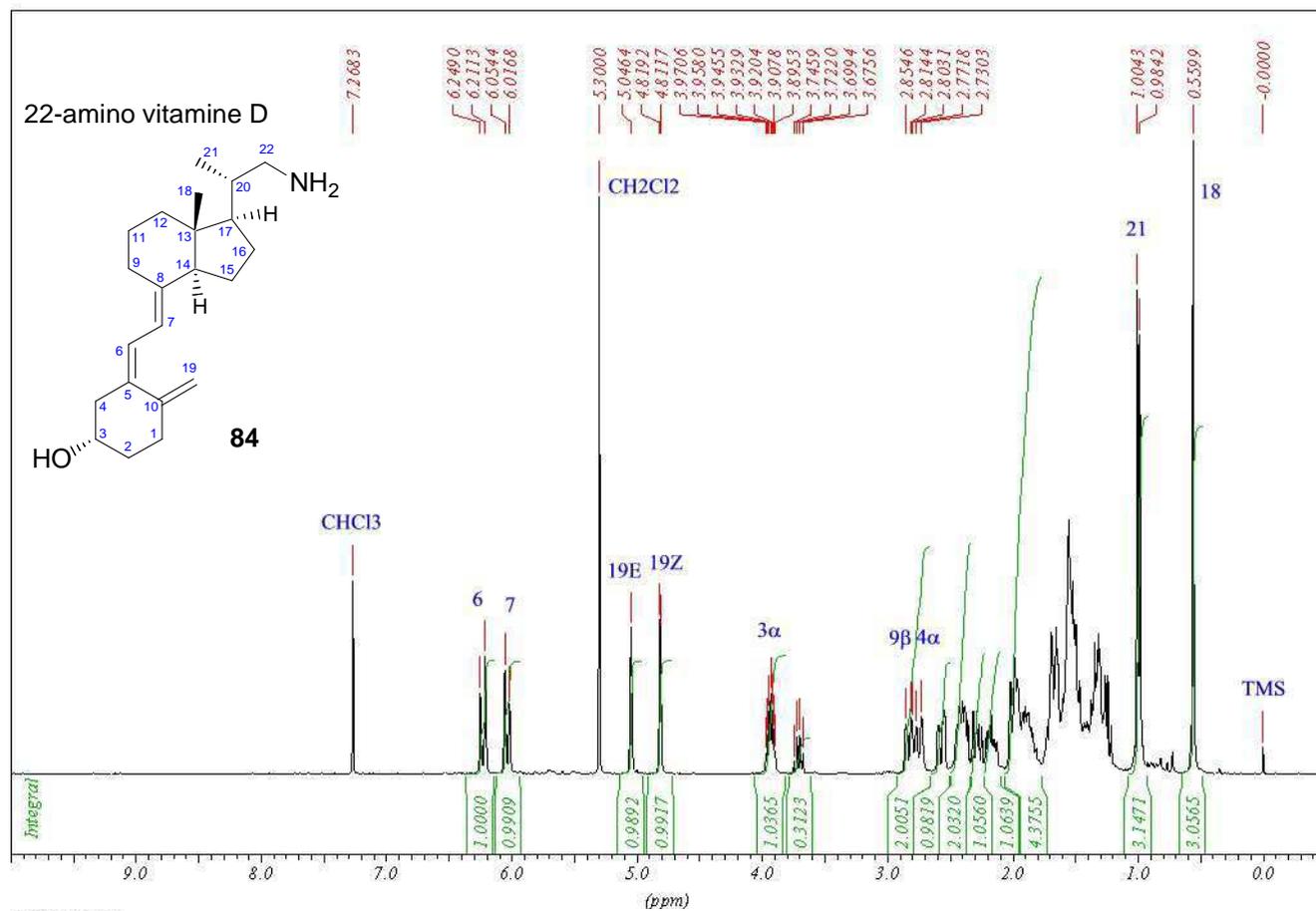


spectre C13 decouple CPD pour SLP339A

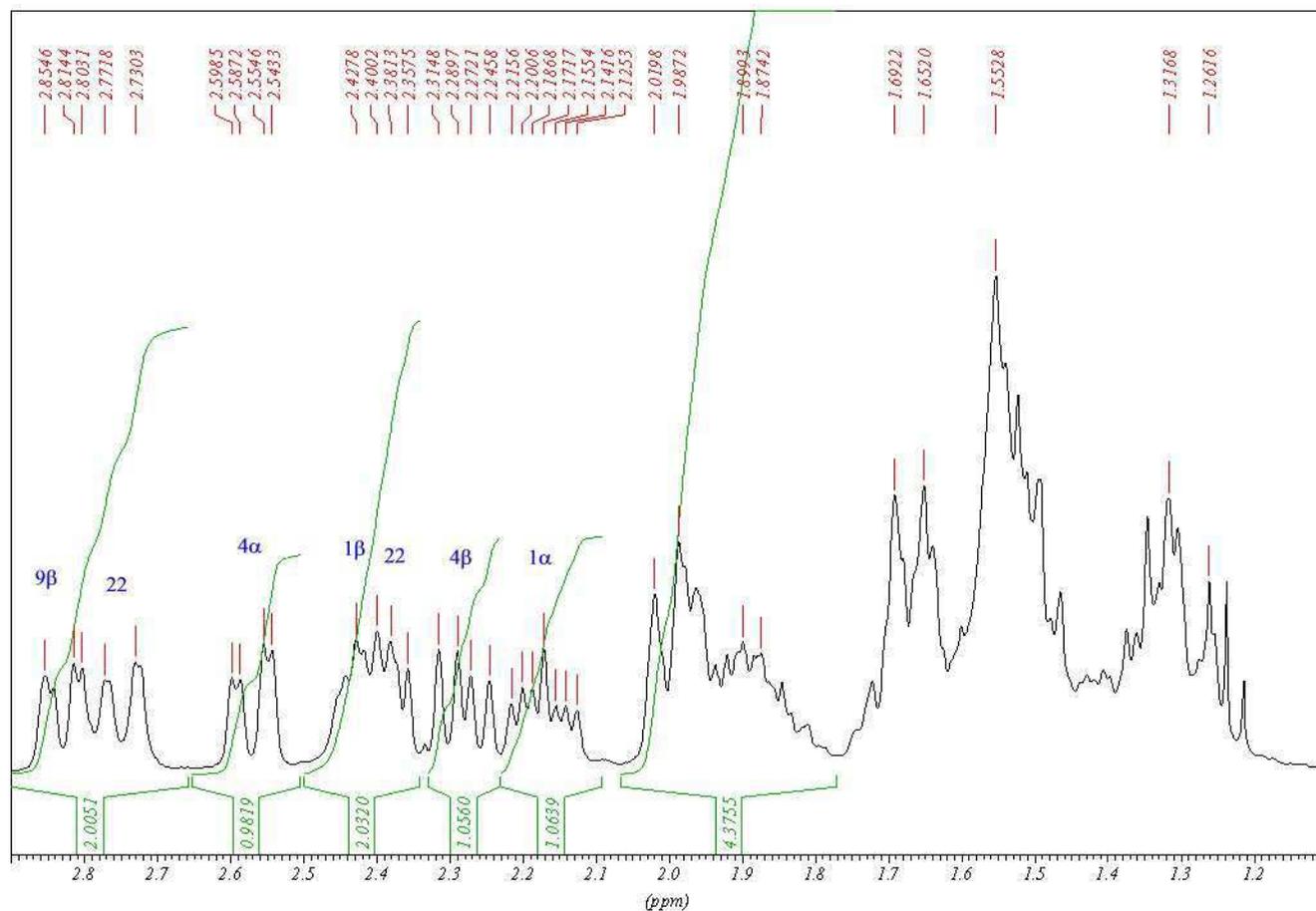




spectre proton

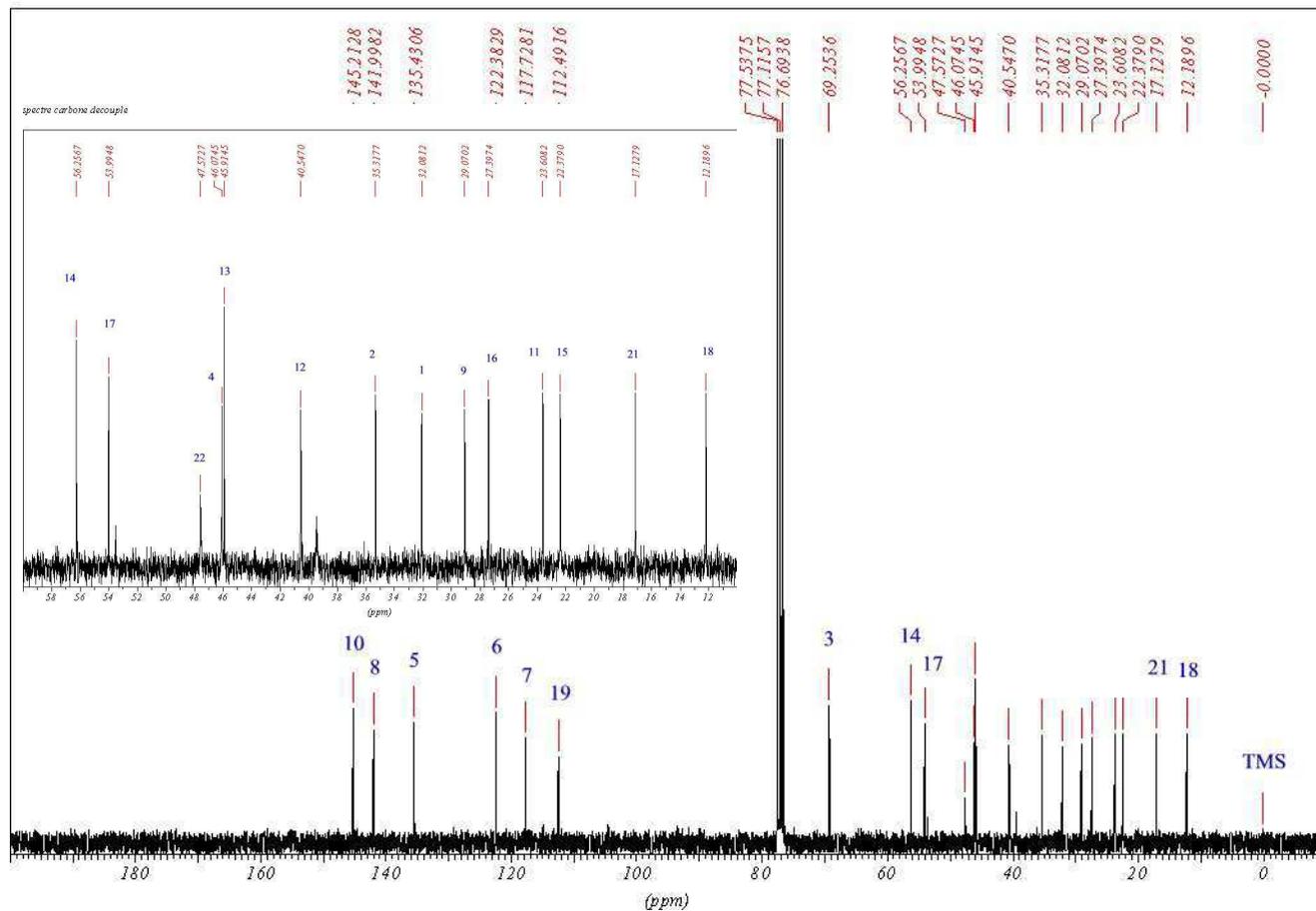


spectre proton



# Annexes

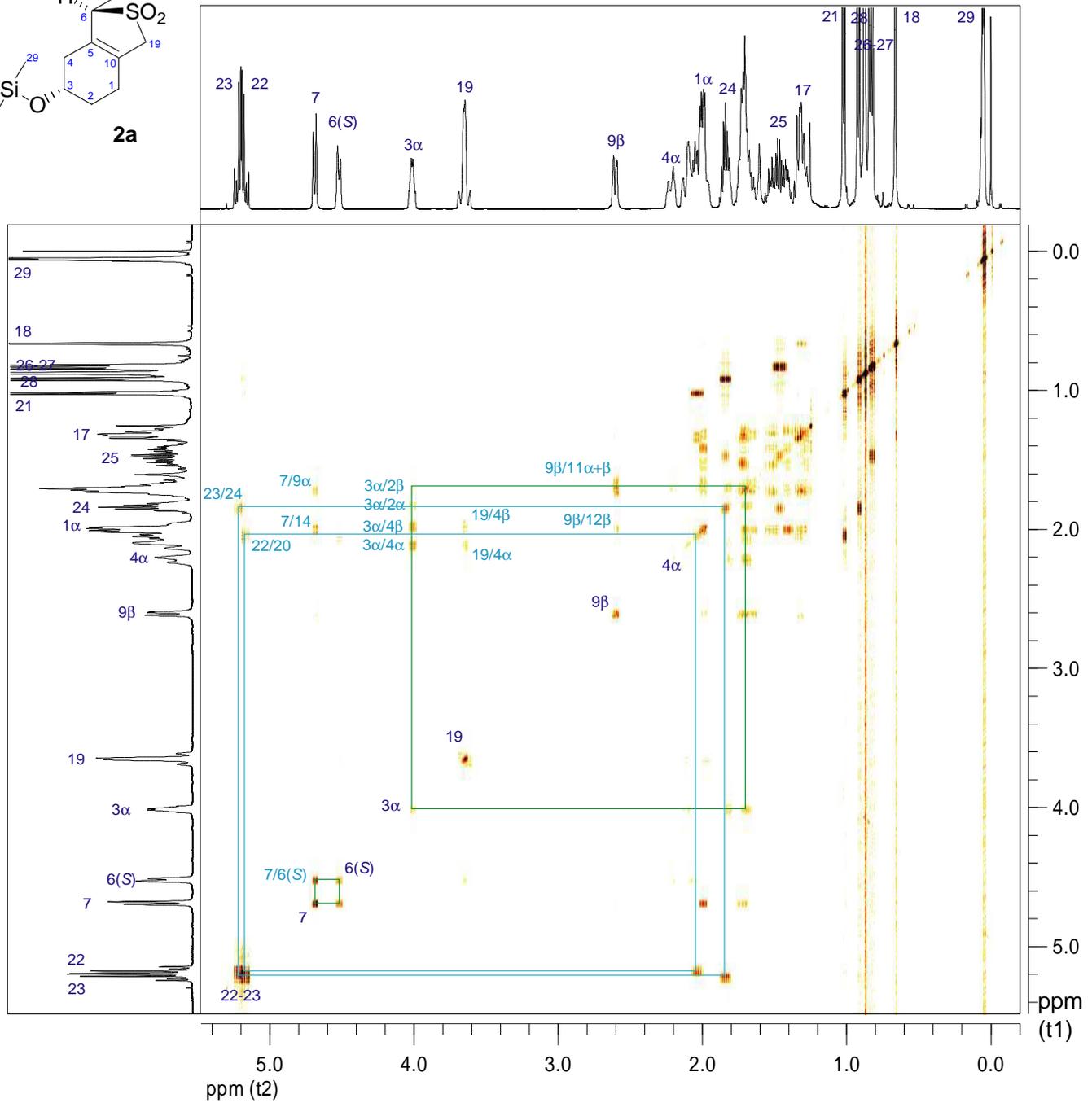
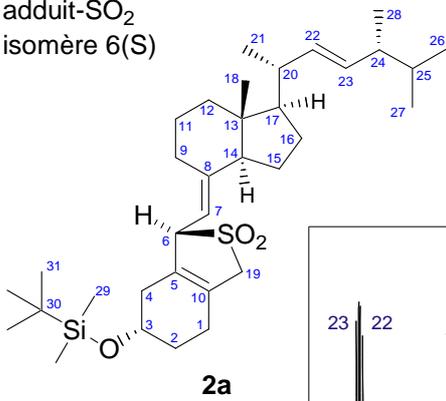
spectre carbone decouple



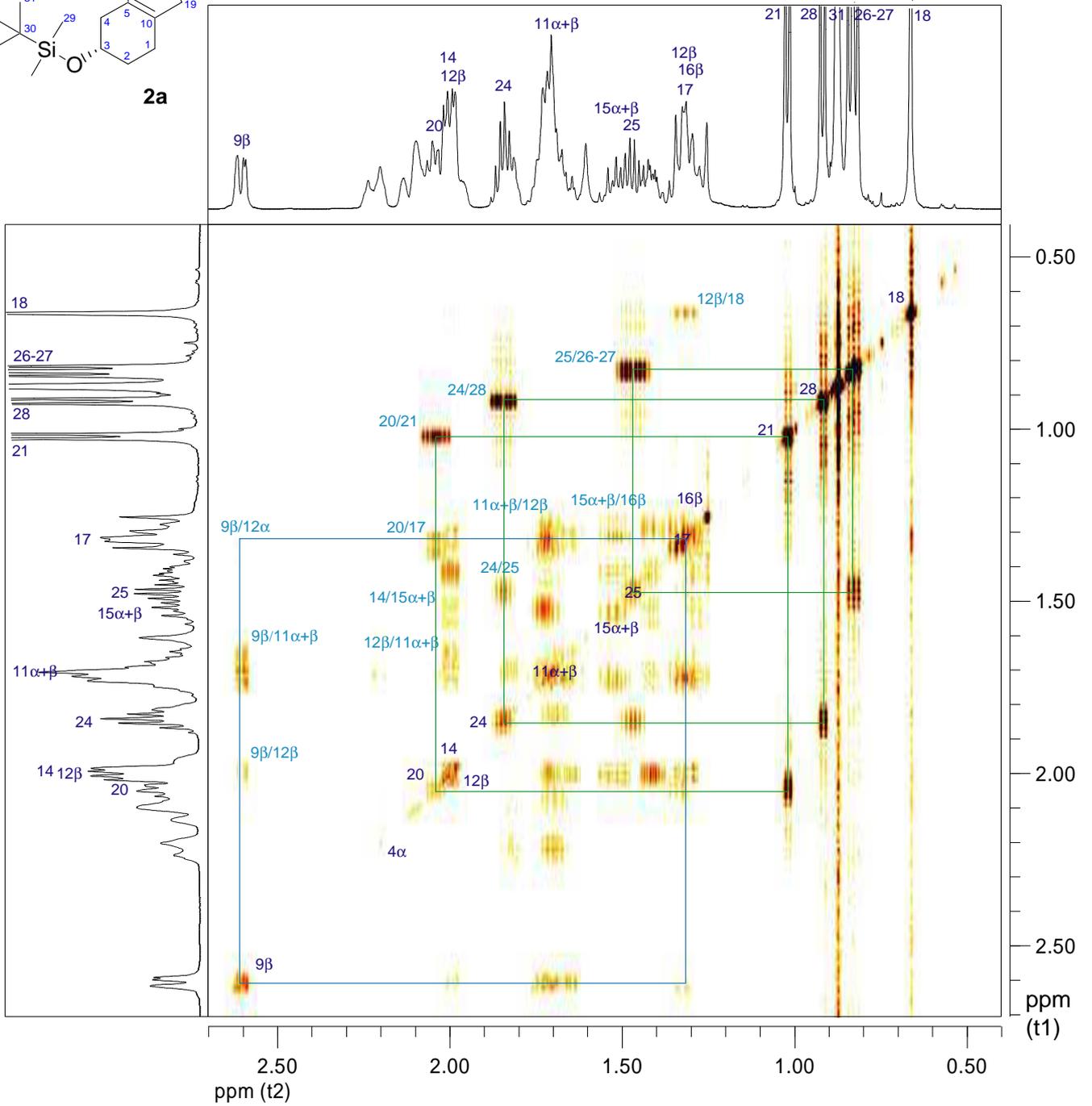
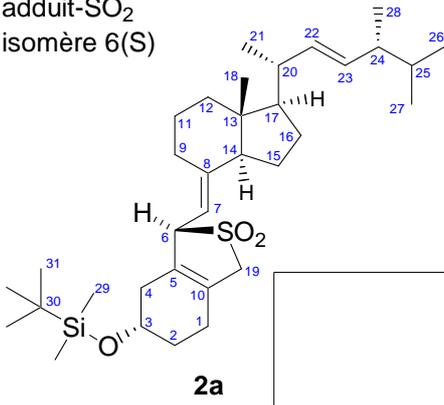
## Annexe C : Spectres RMN 2D

### COSY (d9=15ms) de l'adduit-SO<sub>2</sub> isomère 6(S) 2a

adduit-SO<sub>2</sub>  
isomère 6(S)

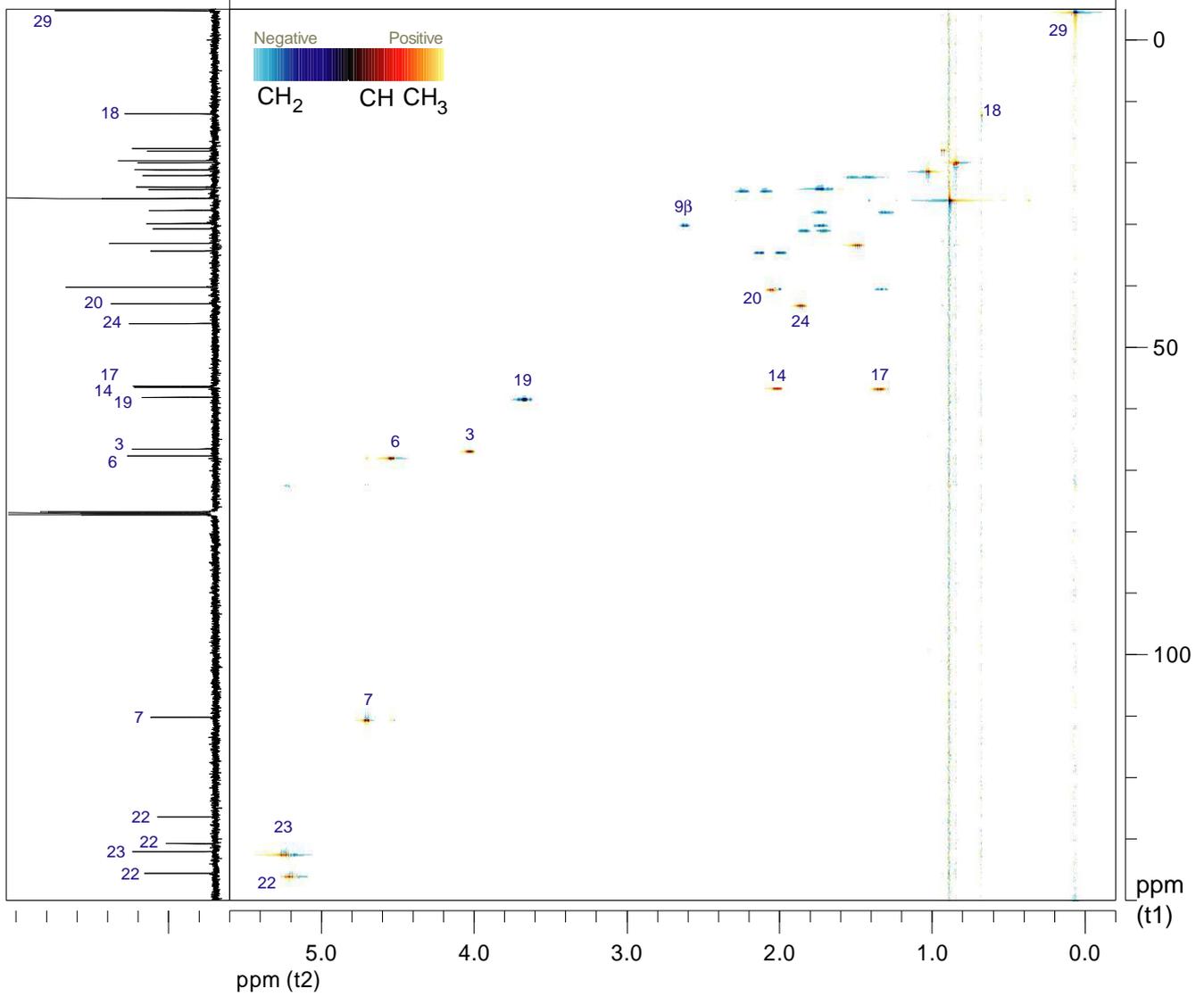
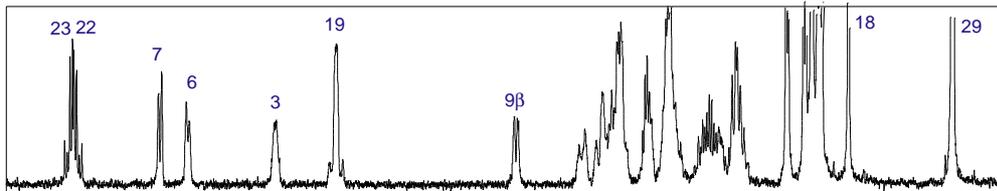
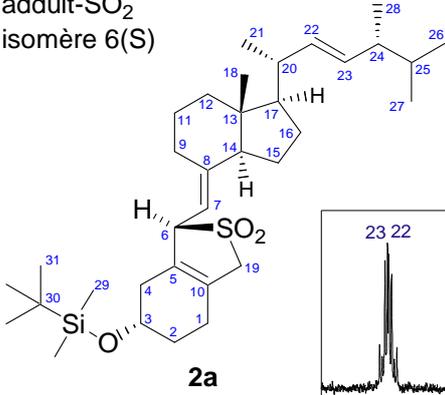


adduit-SO<sub>2</sub>  
isomère 6(S)

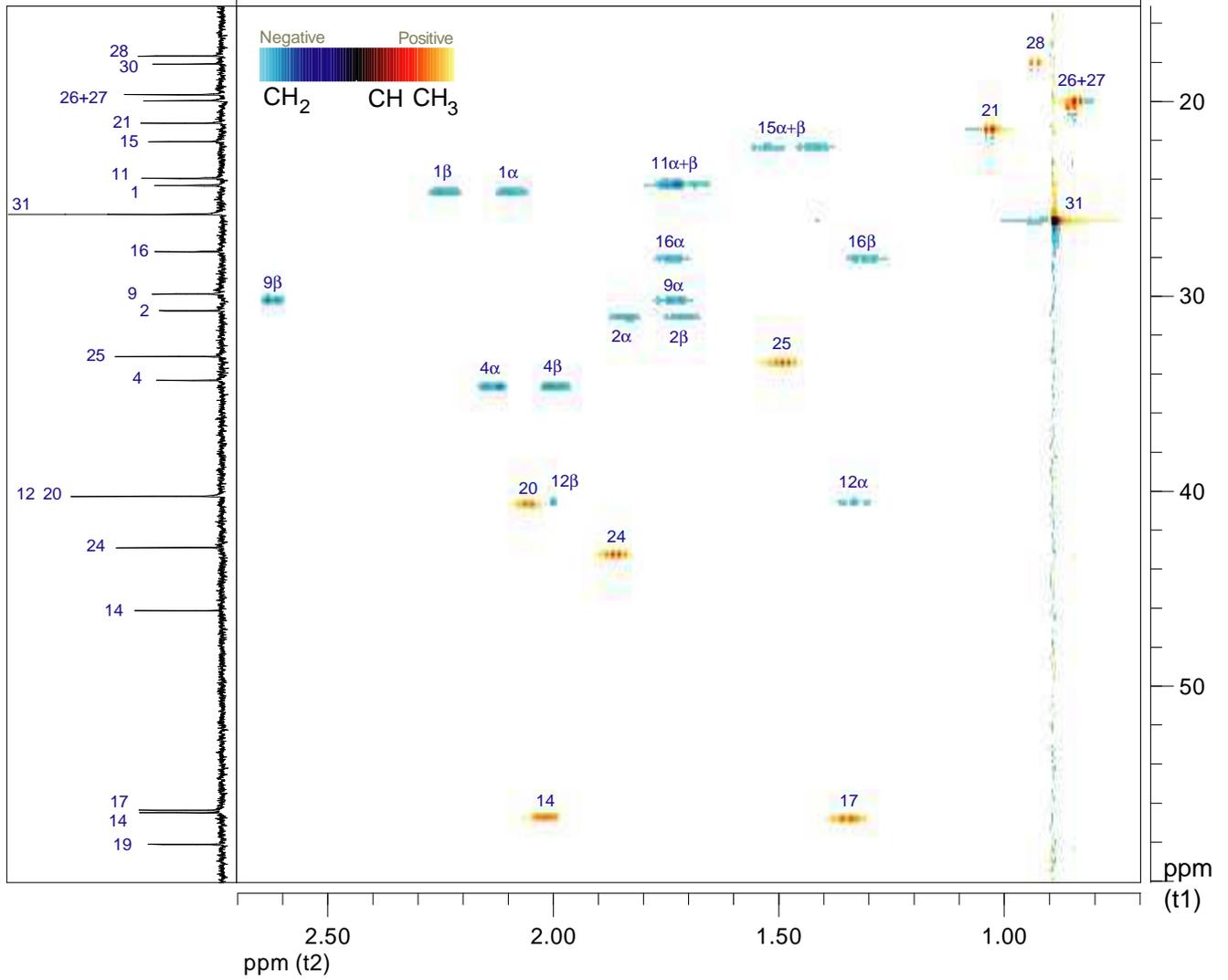
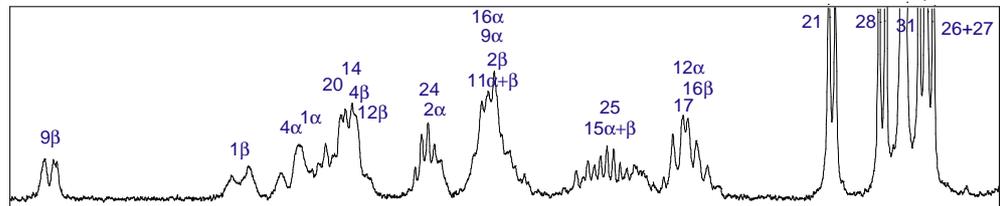
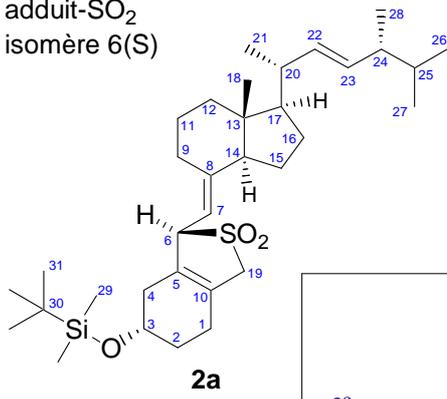


## HSQC (édition CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, CH<sup>+</sup>) de l'adduit-SO<sub>2</sub> isomère 6(S) 2a

adduit-SO<sub>2</sub>  
isomère 6(S)

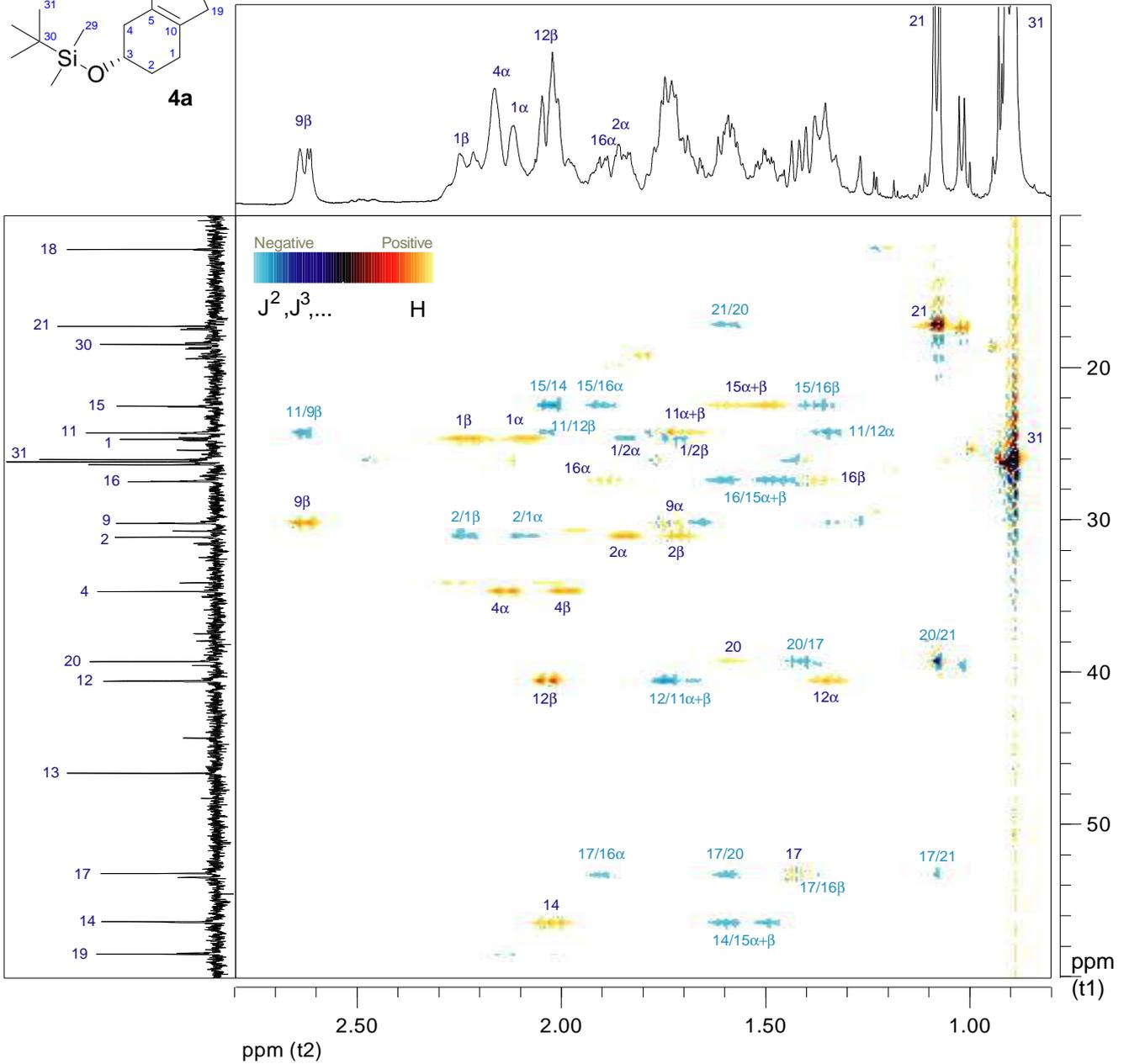
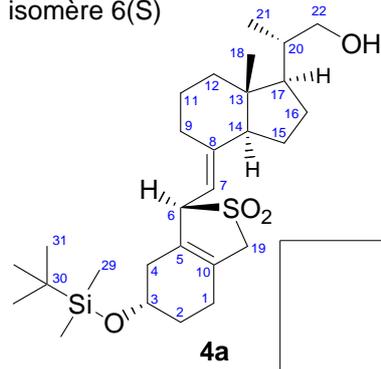


adduit-SO<sub>2</sub>  
isomère 6(S)

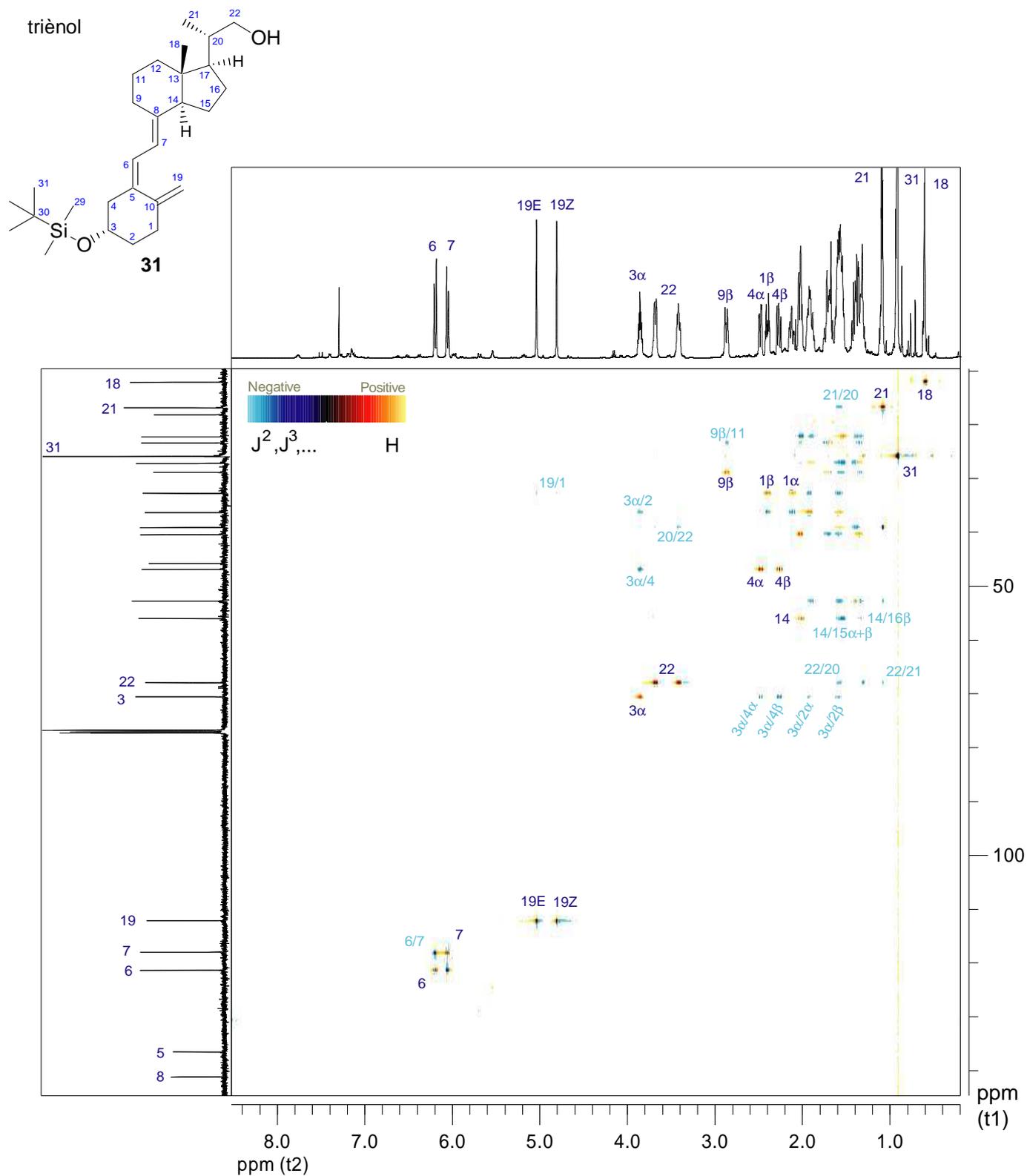




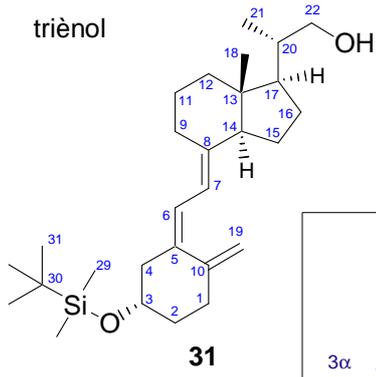
22-OH adduit-SO<sub>2</sub>  
isomère 6(S)



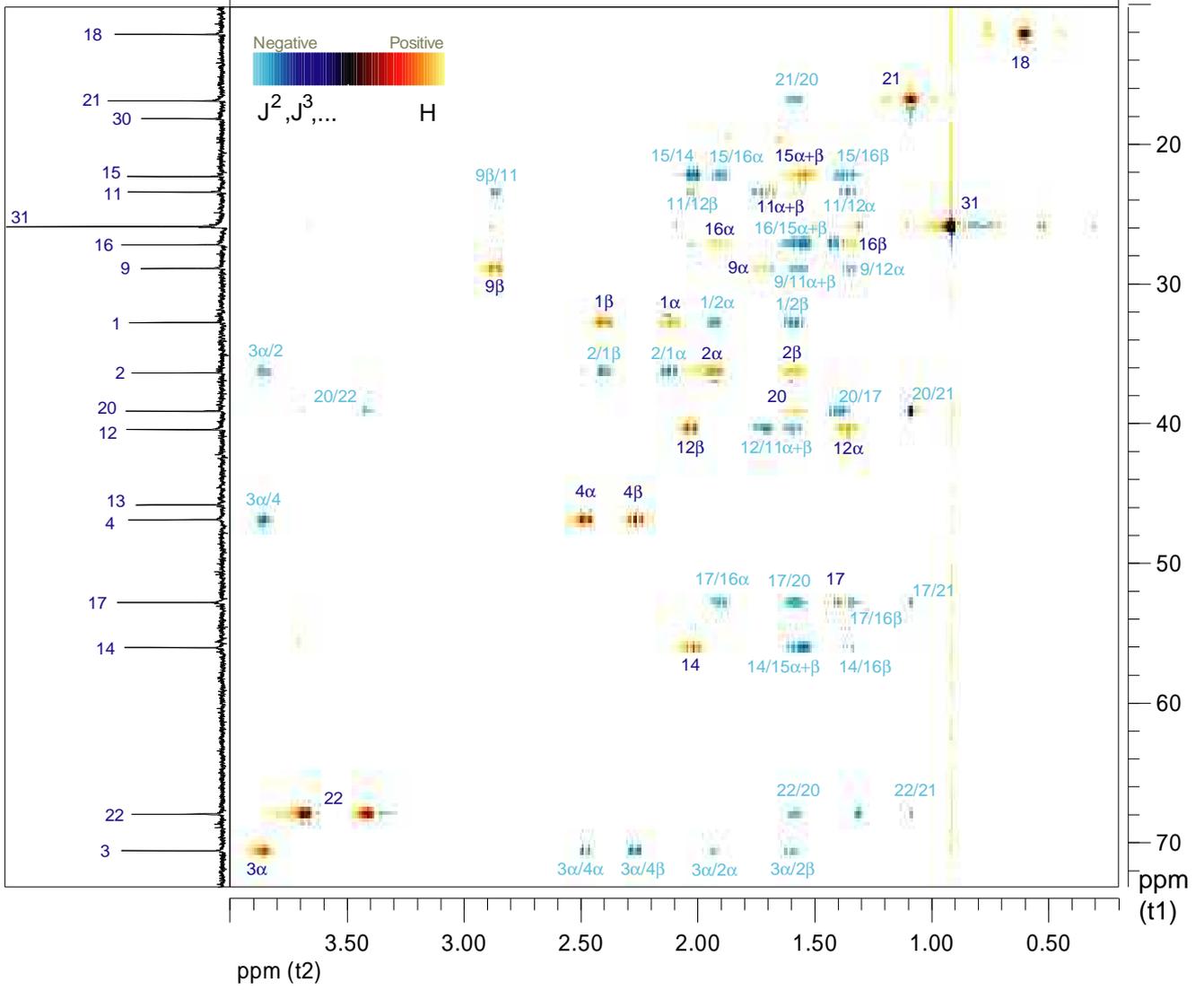
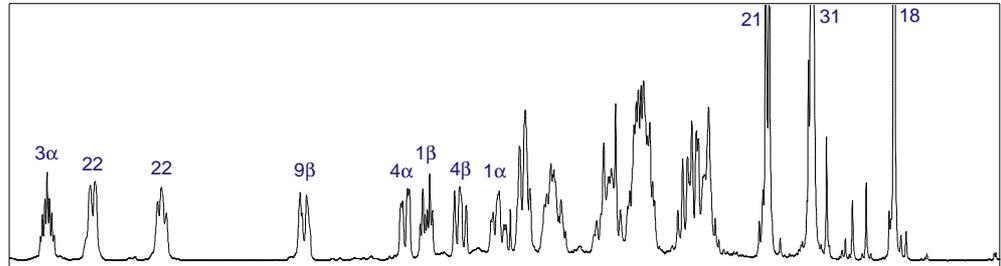
## HSQC-TOCSY (d9=15ms) du triènel 31



triènoles

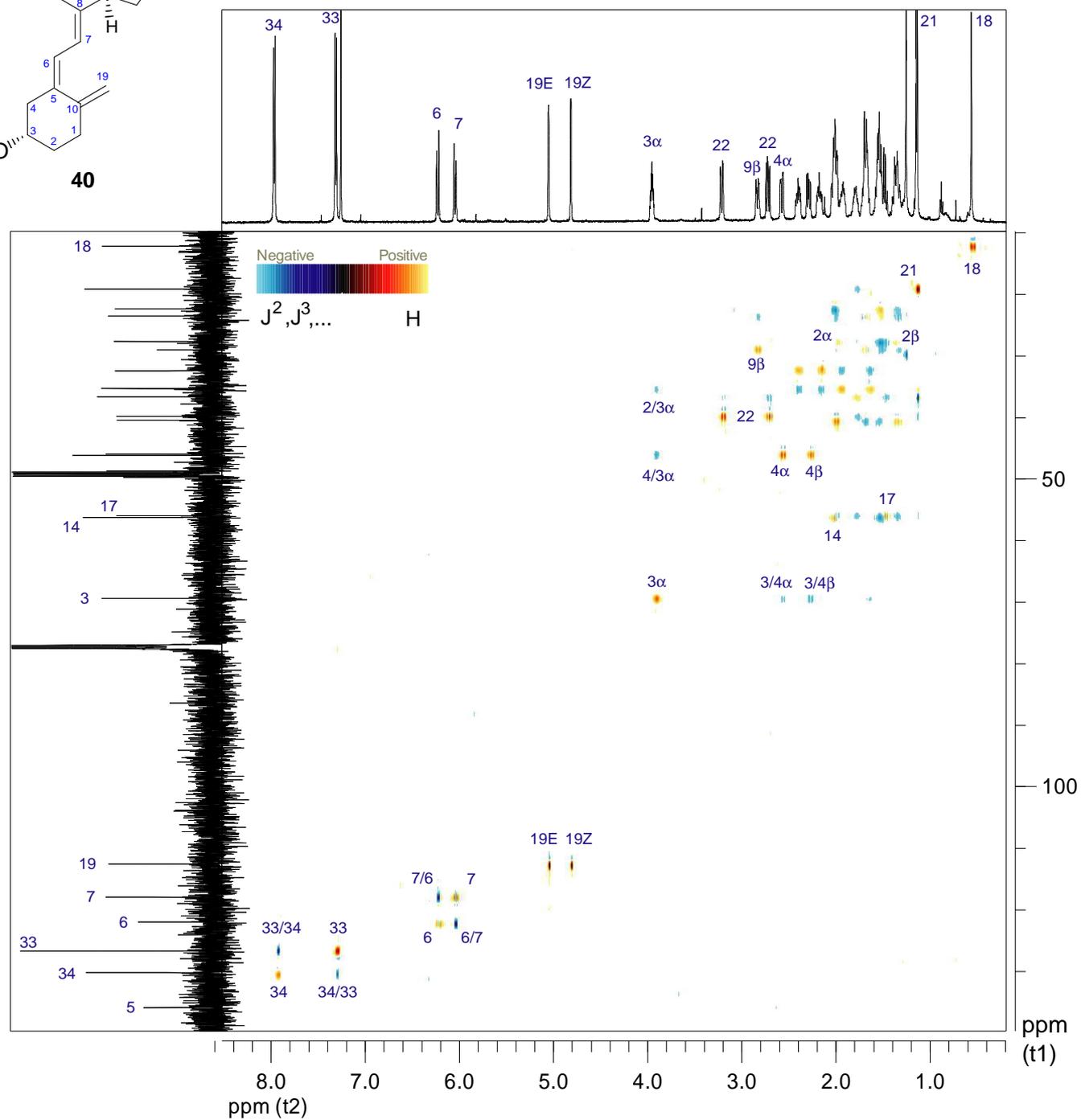
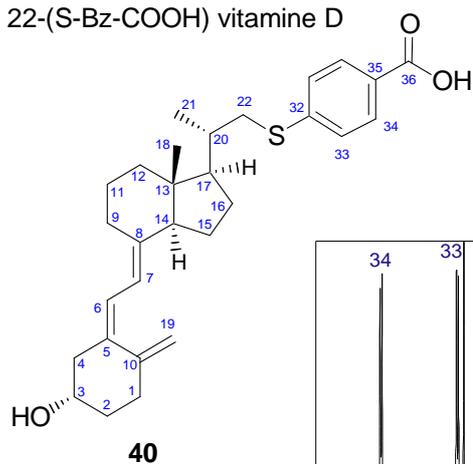


31

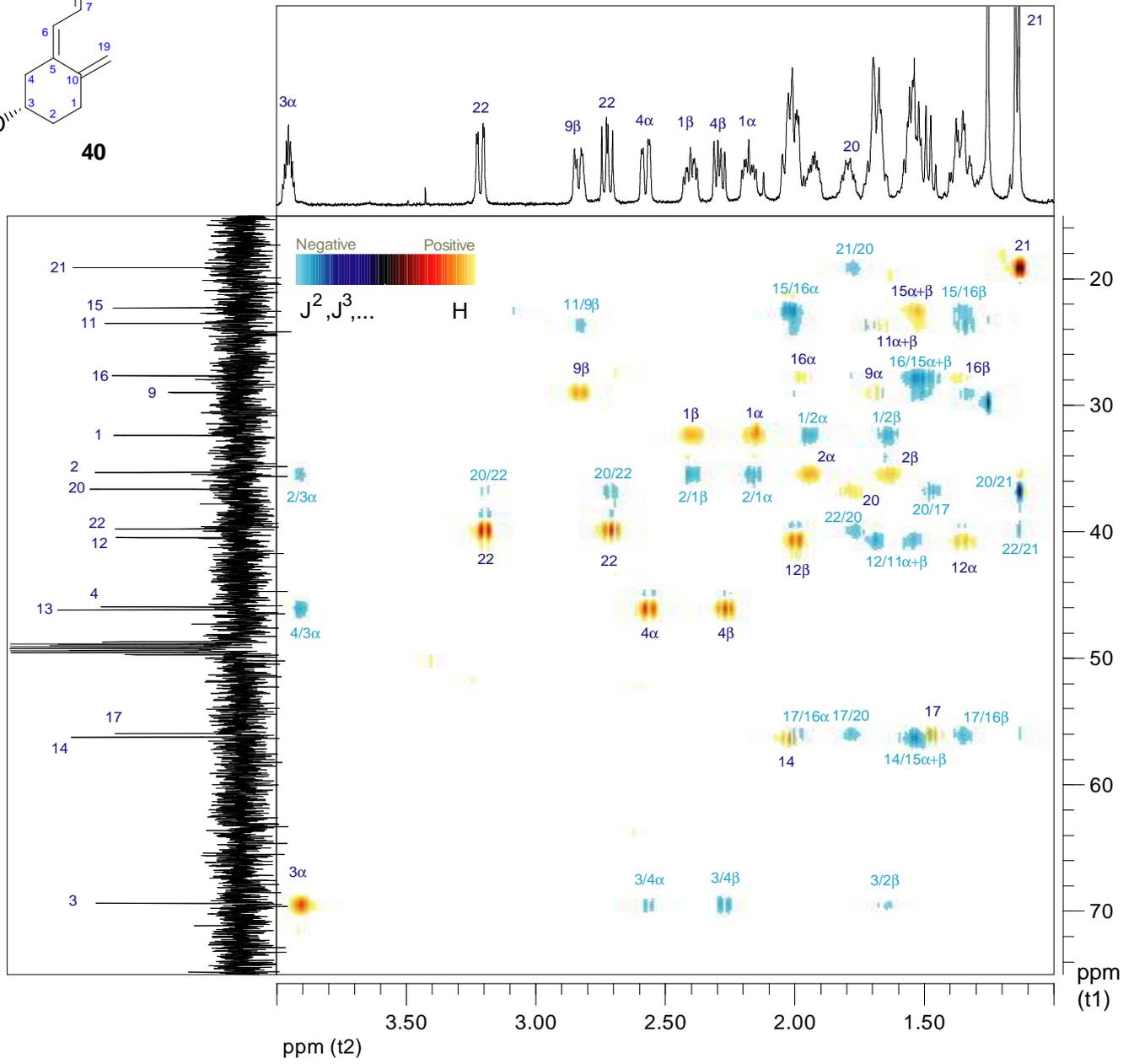
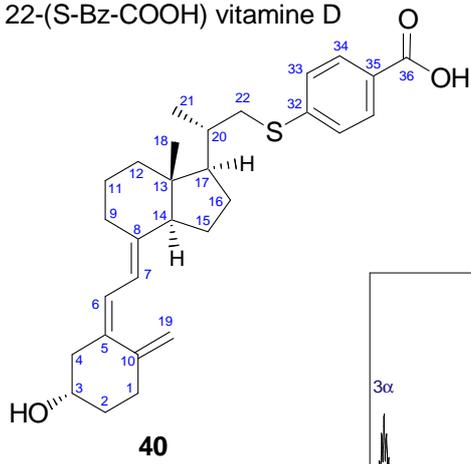


## HSQC-TOCSY (d9=15ms) de la 22-(S-Bz-COOH) vitamine D 40

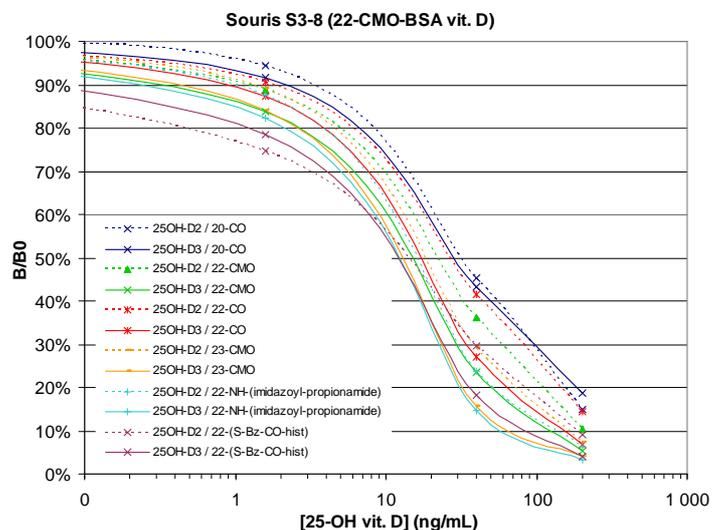
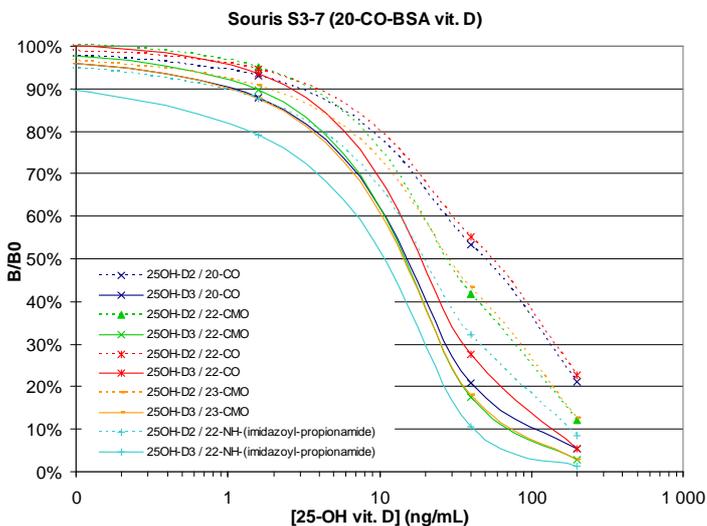
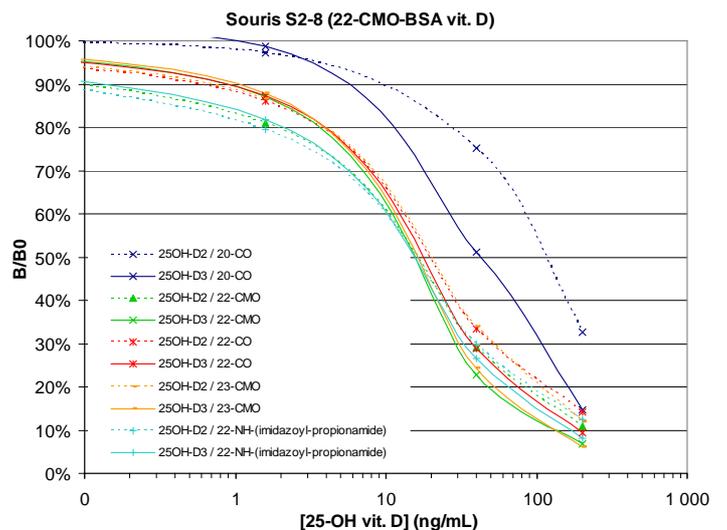
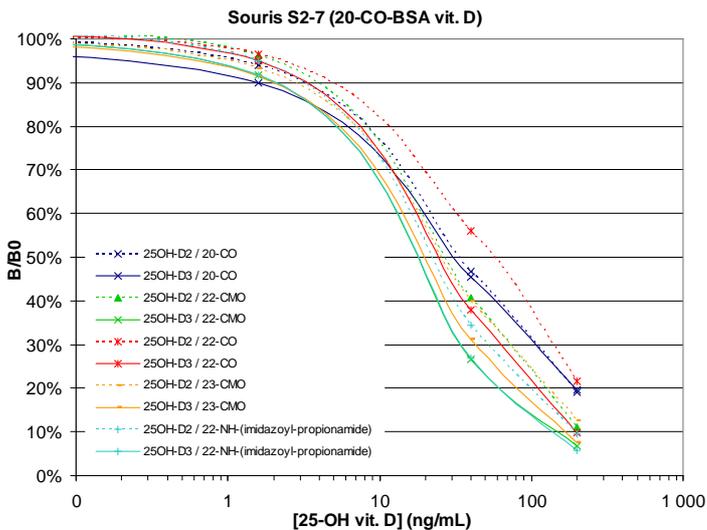
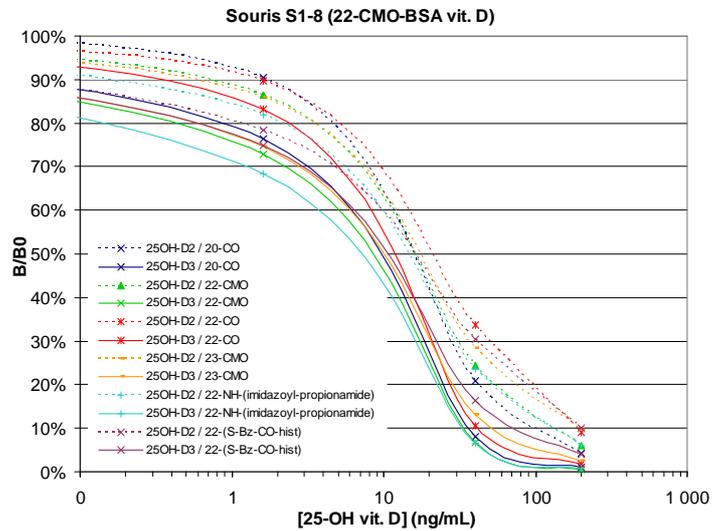
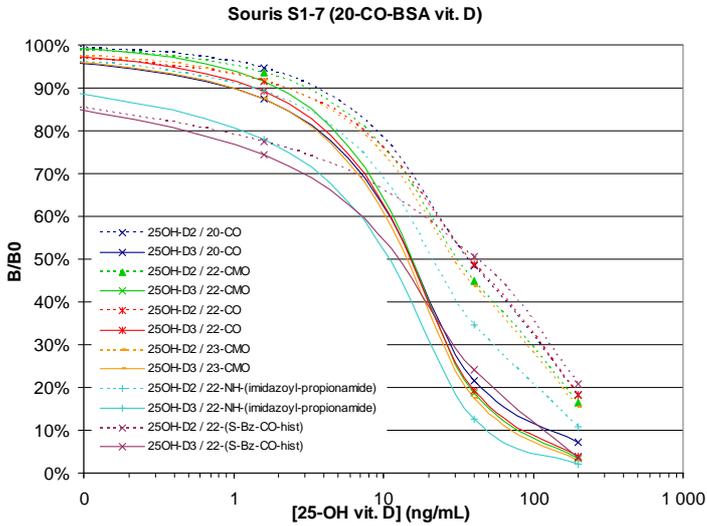
22-(S-Bz-COOH) vitamine D

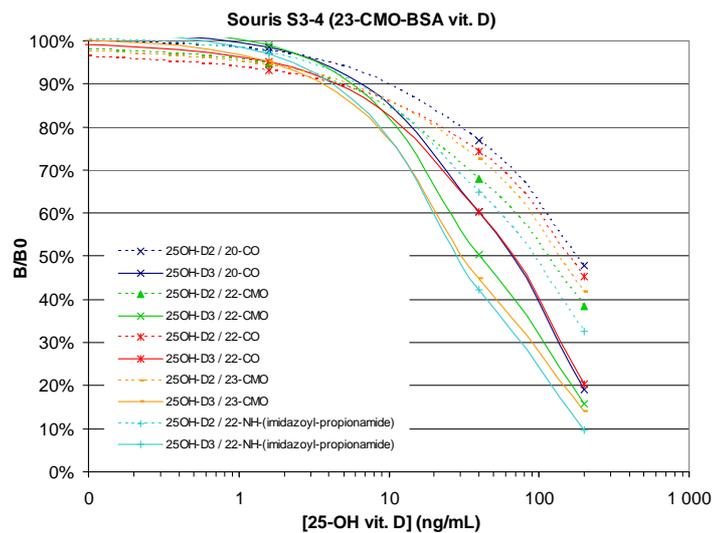
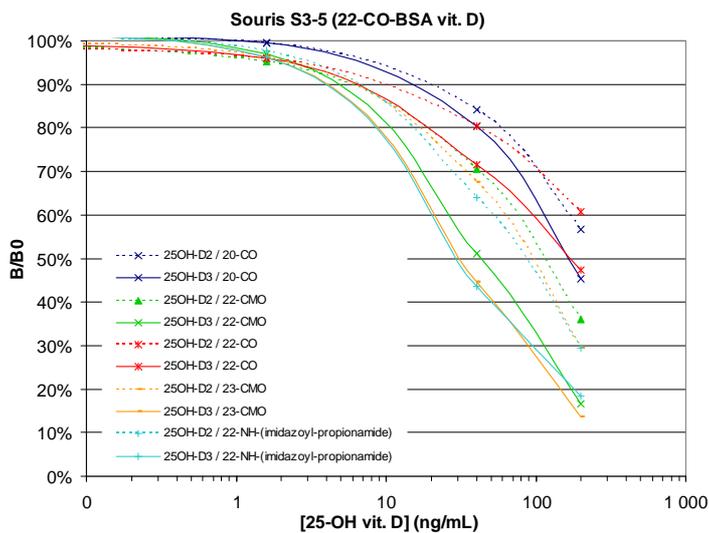
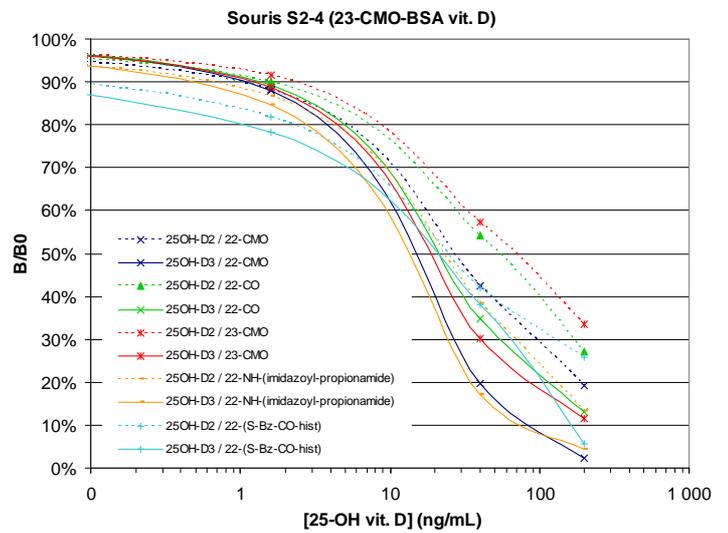
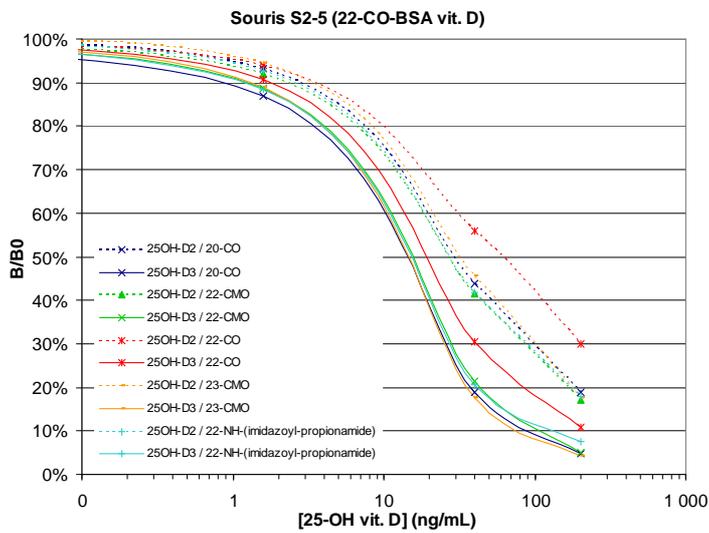
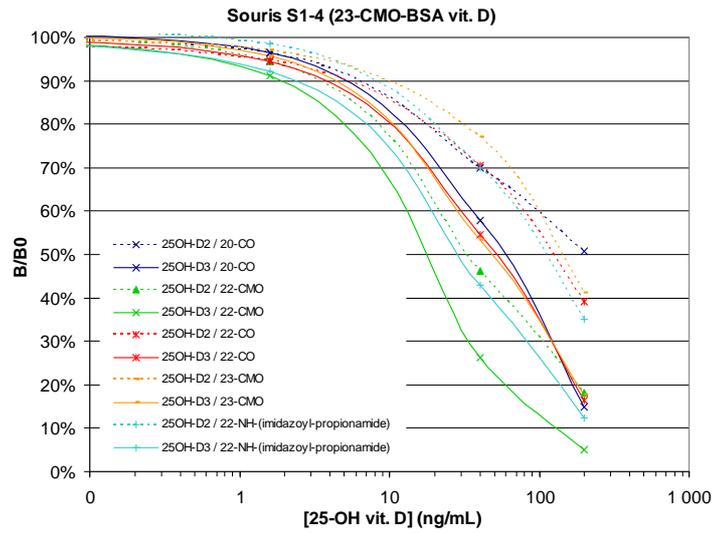
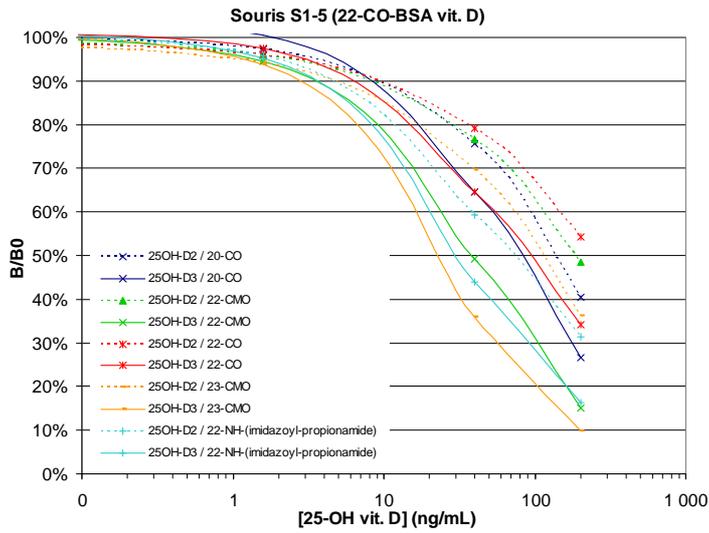


## 22-(S-Bz-COOH) vitamine D



## Annexe D : Courbes de déplacements par les gammes 25-OH vitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> de la liaison des traceurs iodés aux immunosera de chaque souris en immunisation comparative





## Annexe E : Références bibliographiques

- Aberhart; Hsu *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2098.
- Addo, J. K.; Ray, R. *Steroids* **1998**, *63*, 218-223.  
Synthesis and Binding-analysis of 5E-[19-(2-bromoacetoxy)methyl]25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 5E-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-19-methyl[(4-azido-2-nitro)phenyl]glycinate: Novel C19-modified Affinity and Photoaffinity Analogs of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>
- Addo, J. K.; Swamy, N.; Ray, R. *Steroids* **1999**, *64*, 273-282.  
C-6 functionalized analogs of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1[alpha],25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: synthesis and binding analysis with vitamin D-binding protein and vitamin D receptor
- Ali, H.; Rousseau, J.; Gantchev, T. G.; Lier, J. E. v. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4255-4263.  
2- and 4-Fluorinated 16a-<125I>iodoestradiol Derivatives: Synthesis and Effect on Estrogen Receptor Binding and Receptor-Mediated Target Tissue Uptake
- Ali, H.; Rousseau, J.; Lafreniere, J.; van Lier, J. E. *Steroids* **2000**, *65*, 74-84.  
(17[alpha],20E/Z)-iodovinyl- and 16[alpha]-iodo-18-homoestradiol derivatives: synthesis and evaluation for estrogen receptor imaging
- Almatawah, Q. A.; Cowan, D. A. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 718-724.  
Thermostable nitrilase catalysed production of nicotinic acid from 3-cyanopyridine
- Ando, K.; Koike, F.; Kondo, F.; Takayama, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 189-192.  
An Improved Synthesis of 24,24-Difluoro-1a,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> from Readily Available Vitamin D<sub>2</sub>
- Ando, K.; Kondon, F.; Koike, F.; Takayama, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1662-1664.  
An improved synthesis of 24,24-difluoro-1a,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> from vitamin D<sub>2</sub>
- Andrews, D. R.; Barton, D. H. R.; Hesse, R. H.; Pechet, M. M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4819-4828.  
Synthesis of 25-Hydroxy- and 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> from Vitamine D<sub>2</sub>
- Askew, F. A.; Bourdillon, R. B.; Bruce, H. M.; Jenkins, R. G. C.; Webster, T. A. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1931**, *107*, 76-90.  
The distillation of vitamine D
- Baine, N. H.; Owings, F. F.; Kline, D. N.; Resnick, T.; Ping, L.-J.; et al. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5987-5989.  
Improved Syntheses of Epristeride, a Potent Human 5  $\alpha$ -Reductase Inhibitor
- Barger-Lux, M. J.; Heaney, R. P. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 4952-4956.  
Effects of Above Average Summer Sun Exposure on Serum 25-Hydroxyvitamin D and Calcium Absorption
- Barton, D. H. R.; Patin *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1976**, 829.
- Belsey, R. E.; DeLuca, H. F.; Potts, J. T. *J. Endocrinol. Metab.* **1971**, *33*, 554.
- Belsey, R. E.; DeLuca, H. F.; Potts, J. T. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1974**, *38*, 1046-1051.  
A Rapid Assay for 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub> Without Preparative Chromatography
- Bikle, D. D. *Endocr. Rev.* **1992**, *13*, 765-784.  
Clinical counterpoint: vitamin D : new actions, new analogs, new therapeutic potential
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911.
- Boland, R. *Endocr. Rev.* **1986**, *7*, 434-448.  
Role of vitamin D in skeletal muscle function
- Bouillon, R.; De Clerco, P. J.; Eliard, P.; Vanderwalle, M. US5232836 **1992**.  
Vitamin D derivatives: therapeutic applications and applications to assays of metabolites of vitamin D
- Bouillon, R.; Okamura, W. H.; Norman, A. W. *Endocr. Rev.* **1995**, *16*, 200-257.  
Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system
- Bouillon, R.; Van Herck, E.; Jans, I.; Tan, B. K.; Van Baelen, H.; De Moor, P. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1984**, *30*, 1731-1736.  
Two direct (nonchromatographic) assays for 25-hydroxyvitamin D
- Bowden; Heilbron; Jones, E. *J. Chem. Soc.* **1946**, 39.
- Braun, M.; Camps, X.; Vostrowsky, O.; Hirsch, A.; Endress, E.; Bayerl, T. M.; Birkert, O.; Gauglitz, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1173-1182.  
Synthesis of a Biotinatyed Lipofullerene as a New Type of Transmembrane Anchor
- Brown, A. J. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1999**, *14*, 11-16.

## Regulation of vitamin D action

Brown, A. J.; Dusso, A.; Slatopolsky, E. In *The Kidney : Physiology and Pathophysiology*; Second Edition ed.; Seldin, D. W., Ed.; Raven Press, Ltd: New York, 1992, p 1505-1552.

Brown, A. J.; Dusso, A.; Slatopolsky, E. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **1999**, *277*, F157-175.  
Vitamin D

Calverley, M. J. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4609-4619.

Synthesis of mc 903, a biologically active vitamin D metabolite analogue

Carlsen, P. H. J.; Katsuki, T.; Martin, V. S.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3936-3938.

A Greatly Improved Procedure for Ruthenium Tetraoxide Catalyzed Oxidations of Organic Compounds

Carroll, T. R.; Davison, A.; Jones, A. G. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1821-1826.

Functional Cholesteryl Binding Agents: Synthesis, Characterization, and Evaluation of Antibody Binding to Modified Phospholipid Vesicles

Castedo, L.; Mascarenas, J. L.; Mourino, A.; Sarandeses, L. A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1203-1206.

Palladium-catalyzed synthesis of dienynes related to 1[alpha],25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>

Choudhry, S. C.; Belica, P. S.; Coffen, D. L.; Focella, A.; Maehr, H.; et al. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1496-1500.

Synthesis of a Biologically Active Vitamine-D<sub>2</sub> Metabolite

Christakos, S.; Dhawan, P.; Liu, Y.; Peng, X.; Porta, A. *J. Cell. Biochem.* **2003**, *88*, 695-705.

New insights into the mechanisms of vitamin D action

Clemens, T. L.; Adams, J. S.; Nolan, J. M.; Holick, M. F. *Clin. Chim. Acta* **1982**, *121*, 301-308.

Measurement of circulating vitamin D in man

Cooke, N. E.; Haddad, J. G. *Endocr. Rev.* **1989**, *10*, 294-307.

Vitamin D binding protein (Gc-globulin)

Corey, E. J.; Schmidt, G. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 399-402.

Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media

Coulon, S.; Pellequer, J. L.; Blachere, T.; Chartier, M.; Mappus, E.; Chen Sw, S. W.; Cuilleron, C. Y.; Baty, D. *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 6-18.

Functional characterization of an anti-estradiol antibody by site-directed mutagenesis and molecular modelling: modulation of binding properties and prominent role of the V(L) domain in estradiol recognition

Dalcanale, E.; Montanari, F. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 567-569.

Selective Oxidation of Aldehydes to Carboxylic Acids with Sodium Chlorite-Hydrogen Peroxide

Damodaran, S. *Biochim Biophys Acta* **1987**, *914*, 114-121.

Influence of solvent conditions on refolding of bovine serum albumin

David, L.; Kirkley, B. A. WO98/21580 **1996**.

Vitamin D Immunoassay Systems

DeLuca, H. F. *FASEB J.* **1988**, *2*, 224-236.

The vitamin D story : a collaborative effort of basic science and clinical medicine

DeLuca, H. F.; Cantorna, M. T. *FASEB J.* **2001**, *15*, 2579-2585.

Vitamin D : its role and uses in immunology

Eguchi, T.; Sai, H.; Takatsuto, S.; Hara, N.; Ikekawa, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 2303-2311.

Synthesis of 26,27-Dialkyl Analogues of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>

Eisman, J. A.; Shepard, R. M.; DeLuca, H. F. *Anal. Biochem.* **1977**, *80*, 298-305.

Determination of 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human plasma using high-pressure liquid chromatography

Farah, K.; Farouk, N. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1998**, *41*, 255-260.

Electrophilic radioiodination of tyrosine derivatives

Fraser, D. R.; Kodicek, E. *Nature* **1970**, *228*, 764-766.

Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite

Frigerio, M.; Santagostino, M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8019-8022.

A mild oxidizing reagent for alcohols and 1,2-diols: o-Iodoxybenzoic acid (IBX) in DMSO

Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538.

A User-Friendly Entry to 2-Iodoxybenzoic Acid (IBX)

Ganellin, C. R.; Fkyerat, A.; Bang-Andersen, B.; Athmani, S.; Tertiuk, W.; et al. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3806-3813.

A Novel Series of (Phenoxyalkyl)imidazoles as Potent H<sub>3</sub>-Receptor Histamine Antagonists

- Garcia-Pascual, B.; Peytremann, A.; Courvoisier, B.; Lawson, D. E. *Clinica Chimica Acta* **1976**, *68*, 99-105.  
A simplified competitive protein-binding assay for 25-hydroxycalciferol
- Gliesing, S.; Ilge, H.-D.; Reichenbaecher, M.; Fassler, D. *Z. Chem.* **1984**, *24*, 150-151.  
Photokinetische Untersuchungen zur Isomerisierung von Provitamin D<sub>3</sub>
- Granja, J. R.; Castedo, L.; Mourino, A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 124-131.  
Studies on the Opening of Dioxanone and Acetal Templates and Application to the Synthesis of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>
- Griesbaum, K.; Neumeister, J. *Chem. Ber.* **1982**, *115*, 2697-2706.  
Ozonolysis of Symmetrically 1,2-Disubstituted Ethylenes in HCl/Methanol Solutions: Acid Catalyzed Reactions of Primary Cleavage Products
- Guinot, C.; Malvy, D.; Preziosi, P.; Galan, P.; Chapuy, M.; Maamer, M.; Arnaud, S.; Meunier, P.; Tschachler, E.; Herberg, S. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2000**, *127*, 1073-1076.  
Vitamin D concentrations in blood and skin phototype in a general adult population in France
- Haddad, J. G.; Hu, Y. Z.; Kowalski, M. A.; Laramore, C.; Ray, K.; Robzyk, P.; Cooke, N. E. *Biochemistry* **1992**, *31*, 7174-7181.  
Identification of the sterol- and actin-binding domains of plasma vitamin D binding protein (Gc-globulin)
- Haddad, J. G.; Stamp, T. C. B. *Am. J. Med.* **1974**, *57*, 57-62.  
Circulating 25-hydroxyvitamin D in man
- Haffner, C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4039-4042.  
Synthesis of 6-Azacholesten-3-ones: Potent Inhibitors of 5[ $\alpha$ ]-Reductase.
- Hatakeyama, S.; Okano, T.; Maeyama, J.; Esumi, T.; Hiyamizu, H.; Iwabuchi, Y.; Nakagawa, K.; Ozono, K.; Kawase, A.; Kubodera, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 403-415.  
Synthesis and evaluation of A-ring diastereomers of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-22-oxavitamin D<sub>3</sub> (OCT)
- Haussler, M. R.; Myrtle, J. F.; Norman, A. W. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 4055-4064.  
The association of a metabolite of vitamin D<sub>3</sub> with intestinal mucosa chromatin in vivo
- Head, J. F.; Swamy, N.; Ray, R. *Biochemistry* **2002**, *41*, 9015-9020.  
Crystal structure of the complex between actin and human vitamin D-binding protein at 2.5 Å resolution
- Hegarty, A. F.; Tuohey, P. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1980**, 1313-1317.  
Nitrile-forming Eliminations from Oxime Ethers
- Hillman, L. S.; Haddad, J. G. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1983**, *56*, 189-191.  
Serial analyses of serum vitamin D-binding protein in preterm infants from birth to postconceptual maturity
- Holick, M. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *61*, 638-645.  
Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D
- Holick, M. F.; Frommer, J. E.; McNeill, S. C.; Richtand, N. M.; Henley, J. W.; Potts, J. T., Jr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *76*, 107-114.  
Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D<sub>3</sub> in skin
- Holick, M. F.; Holick, S. A.; Uskokovic, M. R.; Baggolini, E. G.; Meng, X.; Henderson, S.; Clemens, T. L. *Steroids* **1983**, *42*, 503-508.
- Holick, M. F.; MacLaughlin, J. A.; Doppelt, S. H. *Science* **1981**, *211*, 590-593.  
Regulation of cutaneous previtamin D<sub>3</sub> photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator
- Holick, M. F.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F.; Suda, T.; Cousins, R. J. *Biochemistry* **1971**, *10*, 2799-2804.  
Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine
- Hollis, B.; Napoli, J. L. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1985**, *31*, 1815-1819.  
Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status
- Hollis, B. W. EP0753743 **1996**.  
Vitamin D assay
- Hollis, B. W. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **2000**, *46*, 1657-1661.  
Comparison of Commercially Available 125I-based RIA Methods for the Determination of Circulating 25-Hydroxyvitamin D
- Hollis, B. W.; Franck, N. E. *J. Chromatogr.* **1985**, *343*, 43-49.  
Solid phase extraction system for vitamin D and its major metabolites in human serum
- Hollis, B. W.; Kamerud, J. Q.; Selvaag, S. R.; Lorenz, J. D.; Napoli, J. L. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1993**, *39*, 529-533.

- Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an <sup>125</sup>I- labeled tracer  
Hollis, B. W.; Roos, B. A.; Lambert, P. W. *Steroids* **1981**, *37*, 609-620.  
Vitamin D in Plasma: Quantitation by a Nonequilibrium Ligand Binding Assay
- Holt, D. A.; Levy, M. A.; Ladd, D. L.; Oh, H.-J.; Erb, J. M.; et al. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 937-942.  
Steroidal A Ring Aryl Carboxylic Acids: A New Class of Steroid 5  $\alpha$ -Reductase Inhibitors
- Horst, R. L.; Littledike, E. T.; Riley, J. L.; Napoli, J. L. *Anal. Biochem.* **1981**, *116*, 189-203.  
Quantitation of vitamin D and its metabolites and their plasma concentrations in five species of animals
- Horst, R. L.; Reinhardt, T. A.; Beitz, D. C.; Littledike, E. T. *Steroids* **1981**, *37*, 581-591.  
A sensitive competitive protein binding assay for vitamin D in plasma
- Houen, G.; Svaerke, C.; Barkholt, V. *Acta Chem Scand* **1999**, *53*, 1122-1126.  
The solubilities of denatured proteins in different organic solvents
- Hummer, L.; Nilas, L.; Tjellesen, L.; Christiansen, C. *Scand J Clin Lab Invest* **1984**, *44*, 163-167.  
A selective and simplified radioimmunoassay of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>
- Idziak, I.; Gravel, D.; Zhu, X. X. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 9167-9170.  
Polymer-catalyzed aminolysis of covalently imprinted cholic acid derivative
- Ikeda, M.; Takahashi, K.; Dan, A.; Koyama, K.; Kubota, K.; Tanaka, T.; Hayashi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1809-1817.  
Synthesis and biological evaluations of A-ring isomers of 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>
- Inhoffen, H. H.; Quinkert, G.; Hess, J. J.; Erdmann, H. M. *Chem.Ber.* **1956**, *89*, 2273.
- Inhoffen, H. H.; Quinkert, G.; Schütz, S.; Friedrich, G.; Tober, E. *Chem.Ber.* **1958**, *91*, 181-191.
- Jacobson, A. L.; Krueger, P. J. *Biochim Biophys Acta* **1975**, *393*, 274-283.  
Infrared spectroscopic studies of solvent-induced conformational changes in globular proteins
- Janout, V.; Lanier, M.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 640-647.  
Design and Synthesis of Molecular Umbrellas
- Jean, J.; Turcotte, C.; Simard, R. E.; Fliss, I. *J. Immunol. Methods* **1999**, *223*, 155-163.  
Production and characterization of polyclonal antibodies against cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>)
- Jones, G.; DeLuca, H. F. *Monogr Endocrinol* **1988**, *30*, 95-139.  
High-performance liquid chromatography of vitamin D and its application to endocrinology
- Jones, G.; Strugnell, S. A.; DeLuca, H. F. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 1193-1231.  
Current understanding of the molecular actions of vitamin D
- Klempier, N.; de Raadt, A.; Faber, K.; Griengl, H. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 341-344.  
Selective transformation of nitriles into amides and carboxylic acids by an immobilized nitrilase
- Kobayashi, N.; Higashi, T.; Saito, K.; Murayama, T.; Douya, R.; Shimada, K. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *62*, 79-87.  
Specificity of polyclonal antibodies raised against a novel 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-bovine serum albumin conjugant linked through the C-11 $\alpha$  or C-3 position
- Kobayashi, N.; Hisada, A.; Shimada, K. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *48*, 567-572.  
Specificity of the polyclonal antibodies raised against a novel 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-bovine serum albumin conjugate linked through the C-11  $\alpha$  position
- Kobayashi, N.; Imazu, T.; Ebisawa, A.; Shimada, K. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *63*, 127-137.  
Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against a Novel 1[ $\alpha$ ],25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Bovine Serum Albumin Conjugate Linked through the 11[ $\alpha$ ]-Position
- Kobayashi, N.; Sato, A.; Takagi, K.; Shimada, K. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 948-953.  
Production and characterization of monoclonal antibodies against two haptenic derivatives of 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> conjugated with bovine serum albumin through the C-3 or C-24 position
- Kobayashi, N.; Takama, A.; Shiomura, K.; Tabata, Y.; Takagi, K.; Shimada, K. *Steroids* **1994**, *59*, 404-411.  
Production of a group-specific antibody to 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D and its derivatives having the 1  $\alpha$ ,3  $\beta$ -dihydroxylated A-ring structure
- Kobayashi, N.; Ueda, K.; Kitahori, J.; Shimada, K. *Steroids* **1992**, *57*, 488-493.  
Production and specificity of antisera raised against 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-[C-3]-bovine serum albumin conjugates
- Kobayashi, N.; Ueda, K.; Shimada, K. *Clinica Chimica Acta* **1992**, *209*, 83-88.  
Evaluation of solubilizing agents for 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> immunoassays
- Kobayashi, N.; Ueda, K.; Tsutsumi, M.; Tabata, Y.; Shimada, K. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *44*, 93-100.

Enzyme immunoassay for plasma 25-hydroxyvitamin D3 employing immunoaffinity chromatography as a pretreatment method

Koch, C.; Jensen, S. S.; Oster, A.; Houen, G. *Apmis* **1996**, *104*, 115-125.

A comparison of the immunogenicity of the native and denatured forms of a protein

Koyama, H.; Prahl, J. M.; Uhland, A.; Nanjo, M.; Inaba, M.; Nishizawa, Y.; Morii, H.; Nishii, Y.; DeLuca, H. F. *Anal. Biochem.* **1992**, *205*, 213-219.

A new, highly sensitive assay for 1,25-dihydroxyvitamin D not requiring high-performance liquid chromatography: application of monoclonal antibody against vitamin D receptor to radioreceptor assay

Kratky, C.; Reischl, W.; Altmann, E.; Zbiral, E. *Monatsh. Chem.* **1982**, *113*, 439-448.

Synthesis of (5,10)-(7,8)-Bisepoxides from a and b-4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dione Adducts of Vitamin D<sub>3</sub> and X-Ray Crystal Structure of one Benzoyl Derivative

Kumar, R. *Physiological Reviews* **1984**, *64*, 478-504.

Metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>

Kutner, A.; Link, R. P.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. *Bioorg. Chem.* **1986**, *14*, 134-147.

Photoactivable analogs for labeling 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> serum binding protein and for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> intestinal receptor protein

Kutner, A.; Perlman, K. L.; Lago, A.; Sicinski, R. R.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3450-3457.  
Novel Convergent Synthesis of Side-Chain-Modified Analogues of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol and 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyergocalciferol

Kutner, A.; Perlman, K. L.; Sicinski, R. R.; Phelps, M. E.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6129-6132.

Vitamin D C-22 Aldehydes. New Key Intermediates for the Synthesis of Side Chain Modified Vitamin D Analogues

Labaree, D. C.; Hoyte, R. M.; Nazareth, L. V.; Weigel, N. L.; Hochberg, R. B. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2021-2034.  
7 $\alpha$ -Iodo and 7 $\alpha$ -Fluoro Steroids as Androgen Receptor-Mediated Imaging Agents

Lambert, P. W.; Syverson, B. W.; Arnaud, C. D.; Spelsberg, T. C. *Journal of Steroid Biochemistry* **1977**, *8*, 929.

Lawson, D. E.; Fraser, D. R.; Kodicek, E.; Morris, H. R.; Williams, D. H. *Nature* **1971**, *230*, 228-230.

Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism

Lee, N. E.; Williard, P. G.; Brown, A. J.; Campbell, M. J.; Koeffler, H. P.; Peleg, S.; Rao, D. S.; Reddy, G. S. *Steroids* **2000**, *65*, 252-265.

Synthesis and biological activities of the two C(23) epimers of 1[ $\alpha$ ],23,25-trihydroxy-24-oxo-19-nor-vitamin D<sub>3</sub>: novel analogs of 1[ $\alpha$ ],23(S),25-trihydroxy-24-oxo-vitamin D<sub>3</sub>, a natural metabolite of 1[ $\alpha$ ],25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>

Lindback, B.; Berlin, T.; Bjorkhem, I. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **1987**, *33*, 1226-1227.

Three commercial kits and one liquid-chromatographic method evaluated for determining 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in serum

Link, R. P.; Kutner, A.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. *Biochemistry* **1987**, *26*, 3957-3964.

Photoaffinity labeling of serum vitamin D binding protein by 3-deoxy-3-azido-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>

Lips, P.; Chapuy, M. C.; Dawson-Hughes, B.; Pols, H. A.; Holick, M. F. *Osteoporos. Int.* **1999**, *9*, 394-7.

An international comparison of serum 25-hydroxyvitamin D measurements

Lovely, C. J.; Bhat, A. S.; Coughenour, H. D.; Gilbert, N. E.; Brueggemeier, R. W. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3756-3764.  
Synthesis and Biological Evaluation of 4-(Hydroxyalkyl)estradiols and Related Compounds

Lythgoe, B.; Moran, T. A.; Nambudiry, M. E. N.; Tideswell, J.; Wright, P. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 590-595.

Marshall, J. A.; Garofalo, A. W. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3675-3680.

Oxidative Cleavage of Mono-, Di-, and Trisubstituted Olefins to Methyl Esters through Ozonolysis in Methanolic NaOH

Mascarenas, J. L.; Mourino, A.; Castedo, L. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1269-1272.

Studies on the Synthesis of Side-Chain Hydroxylated Metabolites of Vitamin D. 3. Synthesis of 25-Ketovitamin D<sub>3</sub> and 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>

Mascarenas, J. L.; Sarandeses, L. A.; Castedo, L.; Mourino, A. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3485-3498.

Palladium-catalysed coupling of vinyl triflates with enynes and its application to the synthesis of 1[ $\alpha$ ],25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>

Mattos, C.; Ringe, D. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 761-764.

Proteins in organic solvents

Mattson, R. J.; Pham, K. M.; Leuck, D. J.; Cowen, K. A. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2552-2554.

An Improved Method for Reductive Alkylation of Amines Using Titanium(IV) Isopropoxide and Sodium Cyanoborohydride

- Mawer, E. B.; Berry, J. L.; Bessone, J.; Shany, S.; Smith, H.; White, A. *Steroids* **1985**, *46*, 741-754.  
Selection of high-affinity and high-specificity Monoclonal Antibodies for 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D
- Mawer, E. B.; Hann, J. T. *Journal of Chromatography* **1987**, *415*, 305-316.  
Rapid automated high-performance liquid chromatographic assay for ercalcidiol and calcidiol (25-hydroxyvitamins D2 and D3) using trans-calcidiol as an ultraviolet-absorbing internal standard
- McLeod, J. F.; Cooke, N. E. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21760-21769.  
The vitamin D-binding protein, alpha-fetoprotein, albumin multigene family: detection of transcripts in multiple tissues
- Mellanby, E. *Lancet* **1919**, *1*, 407-412.  
An experimental investigation on rickets
- Mizhiritskii, M. D.; Konstantinovskii, L. E.; Vishkautsan, R. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 1239-1252.  
2D NMR Study of Solution Conformations and Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Chemical Shifts Assignments of Vitamin D Metabolites and Analogs
- Myles, D. C.; Danishefsky, S. J.; Schulte, G. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1636-1648.  
Development of a Fully Synthetic Stereoselective Route to 6-Deoxyerythronolide B by Reiterative Applications of the Lewis Acid Catalyzed Diene Aldehyde Cyclocondensation Reaction: A Remarkable Instance of Diastereofacial Selectivity
- Norman, A. W.; DeLuca, H. F. *Biochemistry* **1963**, *2*, 1160-1168.  
The preparation of <sup>3</sup>H-vitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> and their localization in kidney and intestine
- Offermann, G.; Dittmar, F. *Horm. Metab. Res.* **1974**, *6*, 534.  
A direct protein-binding assay for 25-hydroxycalciferol
- Okamura, W. H.; Zhu, G. D.; Hill, D. K.; Thomas, R. J.; Ringe, K.; Borchardt, D. B.; Norman, A. W.; Mueller, L. J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1637-50.  
Synthesis and NMR studies of (13)C-labeled vitamin D metabolites
- Omdahl, J. L.; Morris, H. A.; May, B. K. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 139-166.  
Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway : expression, function, and regulation
- Oshida, J.-I.; Nishikawa, O.; Ishimaru, K.; Tsuruta, H.; Takeshita, T.; Yamamoto, I. EP0092004 **1982**.  
Novel vitamin D3 derivatives, processes for preparation thereof, and antigens comprising said derivatives to be used for preparation of antibodies for immunochemical assay and antibodies prepared therefrom.
- Oshida, J.-I.; Nishikawa, O.; Tsuruta, H.; Takeshita, T.; Yamamoto, I.; Ishimaru, K. US4456553 **1983**.  
Vitamin D3 derivatives, process for preparation thereof, and antigens comprising said derivatives to be used for preparation of antibodies for immunochemical assay and antibodies prepared therefrom.
- Osprian, I.; Jarret, C.; Strauss, U.; Kroutil, W.; Orru, R. V. A.; Felfer, U.; Willetts, A. J.; Faber, K. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 555-560.  
Large-scale preparation of a nitrile-hydrolysing biocatalyst: Rhodococcus R 312 (CBS 717.73)
- Owoyale, J. A.; Szinai, S. S. *Steroids* **1981**, *37*, 133-142.  
3-Ethyl and 3-Methyl Ethers of 19-Iodocholesterol as Potential Adrenal Scanning Agents
- Pejkovic-Tadic, I.; Hanisavljevic-Jakovljevic, M.; Nestic, S.; Pascual, C.; Simon, W. *Helv. Chim. Acta* **1965**, *48*, 1157-1159.
- Perez-Sestelo, J.; Mascarenas, J. L.; Castedo, L.; Mourino, A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 275-278.  
A short, flexible approach to vitamin D3 analogues with modified side chains
- Pernod, J.; Rousseau-Tsangaris, M.; Dubois, D.; Caillot, A. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* **1994**, *9*, 308-312.  
Dosage radio-immunologique tritié et iodé de la vitamine D : Correlation avec la technique chromatographique liquide haute performance
- Porteous, C. E.; Coldwell, R. D.; Trafford, D. J.; Makin, H. L. *Journal of Steroid Biochemistry* **1987**, *28*, 785-801.  
Recent developments in the measurement of vitamin D and its metabolites in human body fluids
- Pouzar, V.; Cerny, I. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1995**, *60*, 137-149.
- Proudfoot, J. R.; Li, X.; Djerassi, C. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2026-2030.  
Minor and Trace Sterols from Marine Invertebrates. 50. Stereostructure and Synthesis of Nicasterol, a Novel Cyclopropane-Containing Sponge Sterol
- Ray, R.; Bouillon, R.; Van Baelen, H.; Holick, M. F. *Biochemistry* **1991**, *30*, 7638-7642.  
Photoaffinity labeling of human serum vitamin D binding protein and chemical cleavages of the labeled protein: identification of an 11.5-kDa peptide containing the putative 25-hydroxyvitamin D3 binding site
- Ray, R.; Bouillon, R.; Van Baelen, H.; Holick, M. F. *Biochemistry* **1991**, *30*, 4809-4813.  
Synthesis of 25-hydroxyvitamin D3 3 beta-3'-[N-(4-azido-2-nitrophenyl)amino]propyl ether, a second-generation photoaffinity analogue of 25-hydroxyvitamin D3: photoaffinity labeling of rat serum vitamin D binding protein

- Ray, R.; Holick, S. A.; Hanafin, N.; Holick, M. F. *Biochemistry* **1986**, *25*, 4729-4733.  
Photoaffinity labeling of the rat plasma vitamin D binding protein with [26,27-<sup>3</sup>H]-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 3 beta-[N-(4-azido-2-nitrophenyl)glycinate]
- Reddy, G. S.; Tserng, K. Y. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1763-1769.  
Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> through C-24 oxidation pathway
- Reichenbacher, M.; Gliesing, S.; Lange, C.; Gonschior, M.; Schönecker, B. *J. Prakt. Chem.* **1996**, *338*, 634-641.  
Ein effektives Verfahren zur Herstellung von 1,25-Dihydroxy-cholecalciferol (Calcitriol) aus 1,3,25-Trihydroxy-cholesta-5,7-dien (Procalcitriol).
- Reischl, W.; Zbiral, E. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1978**, 745-754.
- Reischl, W.; Zbiral, E. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 1763.
- Ross, T. K.; Darwish, H. M.; DeLuca, H. F. *Vitam. Horm.* **1994**, *49*, 281-326.  
Molecular biology of vitamin D action
- Safadi, F. F.; Thornton, P.; Magiera, H.; Hollis, B. W.; Gentile, M.; Haddad, J. G.; Liebhaber, S. A.; Cooke, N. E. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 239-251.  
Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein
- Sam, D. J.; Simmons, H. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4024-4025.  
Crown Polyether Chemistry. Potassium Permanganate Oxidations in Benzene
- Sardina, F. J.; Mourino, A.; Castedo, L. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1264-1269.
- Scheddin, D.; Mayer, H.; Schonecker, B.; Gliesing, S.; Reichenbacher, M. *Steroids* **1998**, *63*, 633-643.  
Synthesis and biological activities of 2[beta]-chloro-, 2[beta]-fluoro-, and 2[beta]-methoxy-1[alpha],25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>
- Scheddin, D.; Mayer, H.; Wittmann, S.; Schönecker, B.; Gliesing, S.; Reichenbacher, M. *Steroids* **1996**, *61*, 598-608.
- Seamark, D. A.; Trafford, D. J.; Makin, H. L. *Journal of Steroid Biochemistry* **1981**, *14*, 111-123.  
The estimation of vitamin D and its metabolites in human plasma
- Sestelo, J. P.; Mascarenas, J. L.; Castedo, L.; Murino, A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 118-123.  
Ultrasonically Induced Conjugate Addition of Iodides to Electron-Deficient Olefins and Its Application to the Synthesis of Side-Chain Analogs of the Hormone 1 a,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>
- Sharma, R. K.; Fry, J. L. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2112-2114.  
Instability of Anhydrous Tetra-n-alkylammonium Fluorides
- Sheves, Mazur *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6249.
- Sheves, Mazur *Tetrahedron Lett.* **1976**, 1913-1915.
- Sheves, M.; et al. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 554-555.
- Surendra, K.; Srilakshmi Krishnaveni, N.; Arjun Reddy, M.; Nageswar, Y. V. D.; Rama Rao, K. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2058-2059.
- Sutton, A. L. M.; MacDonald, P. N. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 777-791.  
Vitamin D: More Than a "Bone-a-Fide" Hormone
- Swamy, N.; Addo, J.; Vskokovic, M. R.; Ray, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *373*, 471-478.  
Probing the vitamin D sterol-binding pocket of human vitamin D-binding protein with bromoacetate affinity labeling reagents containing the affinity probe at C-3, C-6, C-11, and C-19 positions of parent vitamin D sterols
- Swamy, N.; Dutta, A.; Ray, R. *Biochemistry* **1997**, *36*, 7432-7436.  
Roles of the structure and orientation of ligands and ligand mimics inside the ligand-binding pocket of the vitamin D-binding protein
- Swamy, N.; Head, J. F.; Weitz, D.; Ray, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 14-23.  
Biochemical and preliminary crystallographic characterization of the vitamin D sterol- and actin-binding by human vitamin D-binding protein
- Swamy, N.; Ray, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *319*, 504-507.  
25-Hydroxy[26,27-methyl-<sup>3</sup>H]vitamin D<sub>3</sub>-3 beta-(1,2-epoxypropyl)ether: an affinity labeling reagent for human vitamin D-binding protein
- Swamy, N.; Ray, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *333*, 139-144.  
Affinity labeling of rat serum vitamin D binding protein
- Takayama, H.; Konno, K.; Fujishima, T.; Maki, S.; Liu, Z.; Miura, D.; Chokki, M.; Ishizuka, S.; Smith, C.; DeLuca, H. F.; Nakagawa, K.; Kurobe, M.; Okano, T. *Steroids* **2001**, *66*, 277-285.

- Systematic studies on synthesis, structural elucidation, and biological evaluation of A-ring diastereomers of 2-methyl-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) and 20-epi-2-methyl-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3)
- Tanabe, M. EP0312360 **1988**.  
25-Hydroxy vitamin D3 derivatives
- Tanabe, M.; Harada, M.; Ikuta, S.; Nakagawa, N.; Otani, M. *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* **1989**, 1220-1221.  
Synthesis of a 125I-labelled Derivative of 25-Hydroxyvitamin D3
- Tanabe, M.; Ikuta, S. US5214170 **1993**.  
Radioisotope iodine-labeled 1a (or 24R), 25-dihydroxy vitamin D3 derivatives
- Tanabe, M.; Nakagawa, N.; Ikuta, S. US5075465 **1991**.  
25-Hydroxy vitamin D derivatives, Process for their production, and assay method using the same
- Tanabe, M.; Nakagawa, N.; Ikuta, S. US5202266 **1993**.  
25-Hydroxy vitamin D derivatives, Process for their production, and assay method using the same
- Tominaga, M.; Paiva, A. C. M. *J. Med. Chem.* **1969**, 12, 693-694.
- Trafford, D. J.; Makin, H. L. *Clinica Chimica Acta* **1983**, 129, 19-25.  
Studies on the presence of 25-hydroxyvitamin D in human saliva
- Trost, B. M.; Ariza, X. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10727-10737.  
Enantioselective Allylations of Azlactones with Unsymmetrical Acyclic Allyl Esters
- Trost, B. M.; Dumas, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 9836-9845.
- Trost, B. M.; Kulawiec, R. J.; Hammes, A. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 587-590.  
Ruthenium Catalyzed Reconstitutive Condensation. Application to Functionalized Steroid Side Chains
- Verboven, C.; Rabijns, A.; De Maeyer, M.; Van Baelen, H.; Bouillon, R.; De Ranter, C. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 131-136.  
A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein
- Veysoglu, T.; Mitscher, L. A.; Swayze, J. K. *Synthesis* **1980**, October, 807-810.  
A Convenient Method for the Control of Selective Ozonizations of Olefins
- Walters, M. R. *Endocr. Rev.* **1992**, 13, 719-764.  
Newly identified actions of the vitamin D endocrine system
- Webb, A. R.; DeCosta, B. R.; Holick, M. F. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1989**, 68, 882-887.  
Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D3 by causing its photodegradation
- White, P.; Cooke, N. *Trends Endocrinol. Metab.* **2000**, 11, 320-327.  
The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein
- Wilson, S. R.; Jacob, L. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4380-4385.  
An Intramolecular Diels-Alder Approach to the Cis Ring Fused Isomer of the 25-Hydroxy Vitamin D2 Grundmann Ketone
- Windaus, A.; Schenck, F. R.; von Werder, F. *Z. Physiol.* **1936**, 241, 100-103.  
Uber das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus 7-deshydrocholesterin
- Wing, R. M.; Okamura, W. H.; Rego, A.; Pirio, M. R.; Norman, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 4980-4985.  
Vitamin D and its analogs. VII. Solution conformations of vitamin D3 and 1. $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 by high-resolution proton magnetic resonance spectroscopy
- Zanoni, G.; Vidari, G. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5319-5323.  
A Facile Stereoselective Synthesis of (3aR\*,4R\*,6aS\*)-4-(Hydroxymethyl)-3,3a,4,6a-tetrahydrocyclopenta<b>furan-2-one and Other Useful Cyclopentanoid Building Blocks
- Zimmerman, D. R.; Reinhardt, T. A.; Kremer, R.; Beitz, D. C.; Reddy, G. S.; Horst, R. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 392, 14-22.  
Calcitroic Acid Is a Major Catabolic Metabolite in the Metabolism of 1[ $\alpha$ ]-Dihydroxyvitamin D2
- Zoretic, P. A.; Zhang, Y.; Fang, H.; Ribeiro, A. A.; Duba, G. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 1162-1167.  
Advanced Tetracycles in a Stereoselective Approach to d,l-Spongiatriol and Related Metabolites: The Use of Radicals in the Synthesis of Angular Electrophores

---

**Préparation d'haptènes de la vitamine D et obtention d'anticorps monoclonaux anti-25-hydroxyvitamine D pour la mise au point d'un immunodosage simultané des deux 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>**

---

Dans le but d'accéder à un radioimmunos dosage simultané des 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>, qui sont un bon indicateur de la quantité de vitamine D disponible dans l'organisme, 5 haptènes de la vitamine D de chaînons variables à fonction acide carboxylique terminale ont été préparés par hémisynthèse à partir de la chaîne latérale de la vitamine D<sub>2</sub>. Ces 5 haptènes ont été couplés à la sérum albumine bovine pour immuniser des souris, des rats et des lapins ou bien à l'histamine pour donner des traceurs radioactifs, marqués par l'iode (<sup>125</sup>I).

Les animaux ont bien répondu en sécrétant des anticorps dirigés contre les deux 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> avec des reconnaissances presque identiques. Les cellules spléniques de 3 de ces rats ont pu être fusionnées avec un myélome de souris afin de les immortaliser. Deux hybridomes sécrétant d'anticorps monoclonaux qui reconnaissent les deux vitamines similairement et ne croisent pas avec l'hormone 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D ont pu être sélectionnés.

---

**Synthesis of vitamin D haptens and production of monoclonal anti-25-hydroxyvitamin D antibodies for the optimization of a simultaneous 25-hydroxyvitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> immunoassay**

---

Vitamin D status can be determined by a radioimmunoassay measurement of 25-hydroxyvitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> in plasma. For this purpose, 5 vitamin D haptens with different terminal carboxylic acid side chains were synthesised from vitamin D<sub>2</sub>. Rabbits, rats and mouse antibodies were generated by immunisation with bovine serum albumin conjugates of these 5 haptens. Histamine conjugates gave precursors of the radioiodinated tracers.

25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> antibodies were obtained from all these animals with more or less equal recognition. Spleen cells from 3 rats immunised were fused with mouse myeloma cells. Two different hybridoma clones secreting monoclonal antibodies with equal response for the two vitamins and no cross-reaction with 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D were selected.

---

**Discipline :** Chimie

---

**Mots-cles :** vitamine D ; haptènes 25-hydroxyvitamines D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> ; immunodosage ; anticorps anti-25-hydroxyvitamine D ; traceurs

---

**Adresse du laboratoire :**

INSERM ERM 0322, Interactions Stéroïdes-Protéines et Applications Immunodiagnostiques et Biocliniques  
Hôpital Debrousse, Bat. A  
29, rue Soeur Bouvier  
69 322 LYON Cedex 05