

Université du Québec  
Institut national de la recherche scientifique  
INRS-Institut Armand-Frappier

**SYNTHÈSE ET ÉTUDE MÉTABOLIQUE DE LA 17 $\alpha$ -  
MÉTHYLMÉTHÉNOLONE ET DE LA 17 $\alpha$ -MÉTHYLSTENBOLONE**

Par  
Philippe Räss

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences expérimentales de la santé

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Prof. Alain Fournier  
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Dr Donald Poirier  
Département de médecine moléculaire  
Université Laval

Directrice de recherche

Prof. Christiane Ayotte  
INRS-Institut Armand-Frappier



## Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Pr Christiane Ayotte de m'avoir accueilli à la maîtrise dans son laboratoire et de m'avoir confié un projet de recherche stimulant. Cette expérience m'a permis de développer et de bien établir mon intérêt pour la recherche scientifique dans le domaine de la chimie analytique.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire d'avoir su me divertir et me changer les idées quand il le fallait, tant au laboratoire qu'à l'extérieur du travail, spécialement Philippe, Valérie, Nicolas et François. Je remercie Alexandre de m'avoir écouté et conseillé et je remercie Julie de m'avoir pris sous son aile, de m'avoir enseigné comment travailler avec des cellules et de m'avoir préparé pour la maîtrise.

J'aimerais remercier le Dr Donald Poirier pour ses conseils concernant la stratégie de synthèse pour la 17 $\alpha$ -méthylméthénolone. Je remercie le Dr Pierre Lavallée de m'avoir accueilli dans son laboratoire de chimie combinatoire et de m'avoir guidé au travers les nombreuses réactions de synthèse. Il va de soi que je remercie Fabrice Gallaud également, qui s'est montré d'une aide pratique dans le laboratoire de synthèse.

## Résumé

Les stéroïdes anabolisants représentent une classe de composés faisant partie de la liste des substances interdites par l'Agence mondiale antidopage. Le dépistage de l'utilisation de ceux-ci est fait à partir d'un échantillon d'urine des athlètes. Pour confirmer la présence d'un stéroïde ou d'un de ses métabolites (biomarqueurs) dans une urine, les temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse et les patrons de fragmentation en spectrométrie de masse doivent correspondre pour ce composé à ceux obtenus à partir d'une substance de référence dans les mêmes conditions de chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (CG-SM). Afin de procéder à ces analyses, il est nécessaire de connaître l'identité des stéroïdes à détecter ainsi que les produits dont ils sont issus à la suite du métabolisme humain, tous deux étant des biomarqueurs, lorsque identifiés dans l'urine.

De nouveaux stéroïdes ont été découverts ces dernières années (désoxyméthyltestostérone, tétrahydrogestrinone) tandis que la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (17 $\alpha$ -méthylstenbolone) a été repérée dans les forums d'haltérophiles et de conditionnement physique sur internet. Ces quelques exemples sont des dérivés synthétiques d'autres stéroïdes plus accessibles. La 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (17 $\alpha$ -méthylméthénolone) représente un stéroïde qui serait facilement synthétisable à partir de son analogue, la méthénolone. Il ne serait donc pas surprenant d'en retrouver sur de tels sites d'ici quelques années. Ces substances synthétiques sont malheureusement mal connues ou inexistantes de la littérature scientifique en lien avec leur toxicologie. Cette lacune d'information suscite un besoin d'approfondir les connaissances métaboliques reliées à ce type de nouveaux composés. La synthèse de ces deux nouveaux stéroïdes a été réalisée et l'incubation *in vitro* avec des modèles cellulaires a permis d'en simuler le métabolisme chez l'humain.

Les milieux issus des incubations de stéroïdes avec des hépatocytes humains ont été analysés par CG-SM. Trois métabolites ont été détectés à la suite de l'incubation de la 17 $\alpha$ -méthylméthénolone et un seul l'a été suite à l'incubation de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone. Les trois métabolites de la 17 $\alpha$ -méthylméthénolone sont des dérivés hydroxylés en position C-3, C-6 et C-16 respectivement. Le métabolite de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone est un dérivé hydroxylé en position C-16, ce qui semble confirmer les résultats obtenus par Cavalcanti *et al.* lors d'une étude d'excrétion avec quatre volontaires humains (Cavalcanti, Leal et al. 2013).



## Table des matières

Remerciements .....	iii
Résumé .....	iv
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xv
Introduction .....	1
<b>Chapitre 1 : <u>Revue de littérature</u></b> .....	<b>4</b>
<b>1 Stéroïdes androgènes anabolisants.....</b>	<b>5</b>
1.1 Stéroïdes androgènes synthétiques .....	6
<b>2 Biotransformation des stéroïdes androgènes anabolisants.....</b>	<b>8</b>
<b>3 Modèles d'études de biotransformation.....</b>	<b>9</b>
3.1 Modèle <i>in vivo</i> .....	9
3.2 Modèles <i>in vitro</i> .....	14
<b>4 Détection et analyse des stéroïdes.....</b>	<b>18</b>
<b>5 Objectifs du projet.....</b>	<b>19</b>
<b>Chapitre 2 : <u>Matériel et méthodes</u></b> .....	<b>20</b>
<b>1 Incubation avec des fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains.....</b>	<b>21</b>
<b>2 Incubation avec des hépatocytes cryopréservés .....</b>	<b>22</b>
<b>3 Analyse CG-SM .....</b>	<b>24</b>
<b>4 Synthèse de la 17<math>\beta</math>-hydroxy-1,17<math>\alpha</math>-diméthyl-5<math>\alpha</math>-androst-1-èn-3-one (1).....</b>	<b>24</b>
4.1 17 $\beta$ -acétoxy-3,3-éthylènedioxy-1-méthylène-5 $\alpha$ -androstane (5).....	25
4.2 3,3-éthylènedioxy-17 $\beta$ -hydroxy-1-méthylène-5 $\alpha$ -androstane (6).....	26
4.3 3,3-éthylènedioxy-1-méthylène-5 $\alpha$ -androstane-17-one (7).....	26
4.4 3,3-éthylènedioxy-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-1-méthylène-5 $\alpha$ -androstane (8).....	27
4.5 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1).....	27
4.6 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (9).....	28
4.7 3 $\beta$ -( <i>p</i> -bromobenzoyloxy)-17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (10).....	29
<b>5 Synthèse de la 17<math>\beta</math>-hydroxy-2,17<math>\alpha</math>-diméthyl-5<math>\alpha</math>-androst-1-èn-3-one (2).....</b>	<b>29</b>
5.1 17 $\beta$ -hydroxy-2-hydroxyméthylène-17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstane-3-one (12).....	31
5.2 17 $\beta$ -hydroxy-2 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androstane-3-one (4).....	31

5.3	3,17 $\beta$ -diacétoxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-2-ène (13).....	31
5.4	17 $\beta$ -acétoxy-2 $\xi$ -bromo-2 $\xi$ ,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androstan-3-one (14).....	32
5.5	17 $\beta$ -acétoxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (15).....	32
5.6	17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2).....	33
5.7	3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (16).....	34
<b>Chapitre 3 : Résultats et discussion</b> .....		<b>36</b>
<b>1</b>	<b>Synthèse de la 17<math>\beta</math>-hydroxy-1,17<math>\alpha</math>-diméthyl-5<math>\alpha</math>-androst-1-èn-3-one (1)</b> .....	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>Synthèse de la 17<math>\beta</math>-hydroxy-2,17<math>\alpha</math>-diméthyl-5<math>\alpha</math>-androst-1-èn-3-one (2)</b> .....	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>Incubation avec les fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains</b> .....	<b>54</b>
3.1	Incubation avec la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1).....	54
3.2	Incubation avec la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2).....	59
<b>4</b>	<b>Incubation avec les hépatocytes humains cryopréservés</b> .....	<b>62</b>
<b>Conclusion</b> .....		<b>64</b>
<b>Références</b> .....		<b>66</b>

## Liste des tableaux

Tableau I: Déplacements chimiques des signaux RMN de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1- èn-3-one (1) dans le benzène deutéré. ....	28
Tableau II : Déplacements chimiques des signaux RMN de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1- èn-3-one (2) dans le benzène deutéré. ....	34



## Liste des figures

Figure 1 : Structure de la 17 $\alpha$ -méthylméthénolone (1) et de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone (2).....	1
Figure 2: Numérotation du noyau androstane, structure de l'androstérone et structure de la testostérone. .	6
Figure 3 : Structure du stanozolol. ....	7
Figure 4: Structure de la désoxyméthyltestostérone (isomère principal C-2,3) et de la tétrahydrogestrinone. ....	8
Figure 5 : Voies de biotransformation de la méthénolone observées par Goudreault et Massé (1990).....	11
Figure 6 : Voies de biotransformation de la stenbolone observées par Goudreault et Massé (1991).....	12
Figure 7 : Voies de biotransformation de la mestérolone et métabolites hydroxylé en position C-18 de la méthénolone et stenbolone observés par Goudreault et Massé (1992). ....	13
Figure 8: Structure des métabolites de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone proposés par Cavalcanti et al (2013). ...	14
Figure 9: Structure de l'androstènedione, la norandrostènedione, la nortestostérone et la norandrostènediol. ....	15
Figure 10 : Voies de biotransformation pour la drostanolone et la 17 $\alpha$ -méthyldrostanolone observées par Gauthier et al (2009).....	17
Figure 11 : Structure des métabolites de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone proposés par van Eenoo et al (2014)..	18
Figure 12 : Schéma de la voie de synthèse utilisée pour la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1). ....	25
Figure 13 : Schéma de la voie de synthèse utilisée pour l'obtention de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2).....	30
Figure 14 : Mécanisme de fragmentation du cycle A et B de la méthénolone pour produire l'ion à m/z 195. ....	38
Figure 15 : Chromatogramme ionique total, spectre de masse, fragmentation et structure proposée pour le dérivé triméthylsilylé de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) de synthèse préparée au laboratoire Lavallée.....	39
Figure 16 : Spectre de masse, fragmentation et structure du dérivé TMS de la méthénolone.....	40
Figure 17 : Spectre de masse, fragmentation et structure de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1). ....	41
Figure 18 : Spectre de masse, fragmentation et structure de la méthénolone. ....	42
Figure 19 : Spectre NOESY entre le proton 14 $\alpha$ (1.05 ppm) et les protons 17 $\alpha$ -méthyle (1.1 ppm) du 3 $\beta$ -( <i>p</i> -bromobenzoyloxy)-17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (10) dans le benzène deutéré. ....	44

Figure 20 : Spectre NOESY entre le proton 3 $\alpha$ et les protons 4 $\alpha$ et 5 $\alpha$ du 3 $\beta$ -( <i>p</i> -bromobenzoyloxy)-17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (10) dans le benzène deutéré. ....	45
Figure 21 : Schéma de la voie de synthèse utilisée par Poirier et al. pour l'obtention de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2). ....	47
Figure 22 : Chromatogramme ionique total, spectre de masse, fragmentation et structure proposées pour le dérivé triméthylsilyle de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) de synthèse... ..	48
Figure 23 : Spectre de masse, fragmentation et structure du dérivé TMS de la stenbolone. ....	49
Figure 24 : Spectre de masse, fragmentation et structure de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2). ....	50
Figure 25 : Spectre de masse, fragmentation et structure de la stenbolone. ....	51
Figure 26 : Spectre NOESY entre le proton 14 $\alpha$ et les protons 17 $\alpha$ -méthyle de la 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (16) dans le benzène deutéré. ....	53
Figure 27 : Spectre NOESY entre le proton 3 $\alpha$ et les protons 4 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , du méthyle en C2 de la 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (16) dans le benzène deutéré. ....	54
Figure 28 : Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant du contrôle négatif de l'incubation fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains. ....	55
Figure 29 : Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) avec des fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains. ....	56
Figure 30 : Spectre de masse, fragmentation et structure proposée pour le dérivé triméthylsilyle du métabolite (M1) provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) en présence de fractions S9 d'hépatocytes humains. ....	57
Figure 31 : Spectre de masse, fragmentation et structure proposée pour le dérivé triméthylsilyle du métabolite (M2) provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) en présence de fractions S9 d'hépatocytes humains. ....	58
Figure 32 : Spectre de masse, fragmentation et structure proposée pour le dérivé triméthylsilyle du métabolite (M3) provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) en présence de fractions S9 d'hépatocytes humains. ....	59
Figure 33 : Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) avec des fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains. ....	60
Figure 34 : Spectre de masse, fragmentation et structure proposée pour le dérivé triméthylsilyle du métabolite (M4) provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) en présence de fractions S9 d'hépatocytes humains. ....	61

Figure 35 : Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant du contrôle négatif de l'incubation avec des hépatocytes humains.....	62
Figure 36 : Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant de l'incubation de la 17 $\alpha$ -17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) avec des hépatocytes humains. 63	63
Figure 37 : Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) avec des hépatocytes humains.....	64



## Liste des abréviations

$\delta$  : déplacement chimique

AMA : agence mondiale antidopage

CG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse

CL : chromatographie en phase liquide

CLHP-SM : chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à de la spectrométrie de masse

CYP450 : complexe enzymatique cytochrome P450

DCM : dichlorométhane

DMF : diméthylformamide

ICPA : ionisation chimique à pression atmosphérique

m/z : ratio masse/charge

MeLi : méthyllithium

MeOH : méthanol

MeONa : méthanolate de sodium

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

RMN : résonance magnétique nucléaire

SAA : stéroïde androgène anabolisant

SIM : *selective ion monitoring* – mode de détection d'ions sélectionnés

SM : spectrométrie de masse

SMHR : spectrométrie de masse à haute résolution

SRN : solution régénératrice de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

THF : tétrahydrofurane

TMS : triméthylsilyle

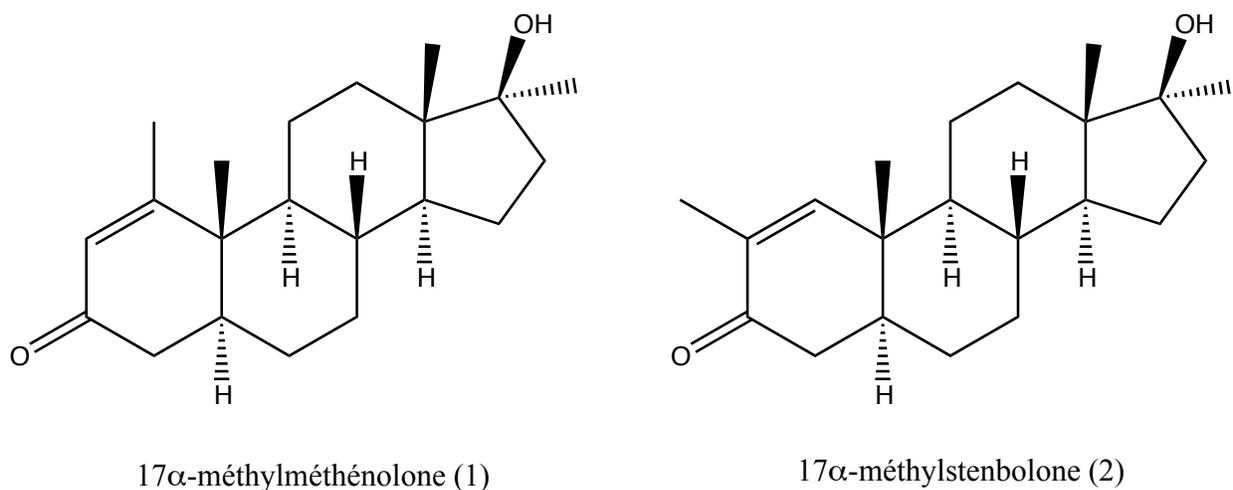
TOF : *time-of-flight* – temps de vol



## Introduction

Au niveau professionnel ou récréatif, des athlètes sont prêts à prendre des risques pour grimper sur le podium, allant même jusqu'à avoir recours au dopage. L'utilisation de certaines substances est interdite et celles-ci sont classées en dix familles: les substances non approuvées, les agents anabolisants, les hormones peptidiques, les facteurs de croissance et substances apparentées, les agonistes bêta-2, les modulateurs hormonaux et métaboliques, les diurétiques et autres agents masquants, les stimulants, les narcotiques, les cannabinoïdes et les glucocorticoïdes. Une liste complète des substances interdites est publiée chaque année par l'Agence mondiale antidopage ([www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org)).

Les substances interdites ainsi que leurs métabolites urinaires sont généralement connus, ce qui en permet l'analyse. Cependant, de nouvelles substances, ou des substances qui ont été rapportées dans la littérature scientifique sont mises en vente sur le réseau internet. Afin de pouvoir les détecter dans l'urine, il faut procéder à une étude approfondie de leur métabolisme. Deux composés susceptibles d'entrer sur la scène du dopage sportif sont la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (17 $\alpha$ -méthylméthénolone) (1) et la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (17 $\alpha$ -méthylstenbolone) (2) (Figure 1), la présence de ce dernier ayant déjà été observée dans des urines de sportifs.



**Figure 1 :** Structure de la 17 $\alpha$ -méthylméthénolone (1) et de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone (2).

L'étude des métabolites urinaires de la 17 $\beta$ -acétoxy-1-méthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (acétate de méthénolone) et de la 17 $\beta$ -acétoxy-2-méthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (acétate de sténbolone) a été réalisée avec la participation d'un volontaire humain (Goudreault et Massé 1990, Goudreault et Massé 1991). L'urine était analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (CG-SM). Des structures pour les marqueurs urinaires détectés ont été proposées et vérifiées. Ces métabolites ont subi majoritairement une oxydation de l'hydroxyle en position C-17 $\beta$  suivie d'une réduction de la cétone en C-3 ou d'une hydroxylation du squelette stéroïdien. Les voies de biotransformation observées pour la méthénolone et la sténbolone sont conséquentes avec le métabolisme usuel chez les stéroïdes androgènes anabolisants. L'introduction d'un groupement méthyle en position C-17 $\alpha$  empêchera les réactions enzymatiques ciblant l'oxydation du groupement 17 $\beta$ -hydroxyle en favorisant d'autres voies de biotransformation (Schanzer 1996). À défaut de pouvoir procéder à une étude d'excrétion chez un volontaire, il existe d'autres modèles pour élucider le métabolisme d'un xénobiotique: les hépatocytes humains ainsi que leurs fractions subcellulaires microsomales et S9. Ces modèles ont fait leurs preuves dans le passé et peuvent adéquatement remplacer le modèle *in vivo* traditionnel utilisé pour produire et caractériser des métabolites de stéroïdes (Lévesque, Gaudreault et al. 2002, Lévesque, Gaudreault et al. 2005, Lévesque, Templeton et al. 2005, Gauthier, Goudreault et al. 2009, Gauthier, Poirier et al. 2012).

Pour ce travail, la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (17 $\alpha$ -méthylméthénolone) (1) et la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (17 $\alpha$ -méthylsténbolone) (2), provenant d'une synthèse effectuée par D. Poirier *et al.* (2006, résultats non publiés), ont été biotransformées à l'aide de modèles hépatiques humains *in vitro*. Les deux stéroïdes 17 $\alpha$ -méthylés ont également été synthétisés et caractérisés. Les analyses par CG-SM ont permis de proposer des structures pour les métabolites issus des incubations et celles-ci pourront être intégrées dans les méthodes d'analyses de contrôle du dopage sportif.

Depuis le début de ces travaux, les groupes de Cavalcanti (Cavalcanti, Leal et al. 2013) et van Eenoo (Geldof, Lootens et al. 2014) ont suggéré des structures pour les métabolites de la

méthylstenbolone issus d'études *in vitro* et de l'analyse d'urines de volontaires humains ou de souris chimériques. Le groupe de Cavalcanti propose deux métabolites hydroxylés isolés à partir de l'urine de volontaires humains. Par ailleurs, le groupe de van Eenoo parvient à détecter dix différents composés monohydroxylés à partir de la méthylstenbolone, issus d'incubations avec des microsomes de foie humain et seulement deux métabolites dihydroxylés extraits de l'urine de souris chimériques.

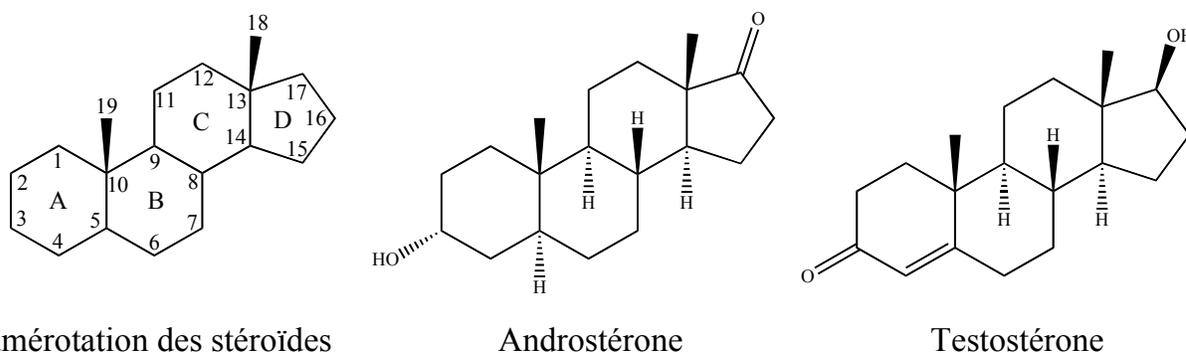
## **Chapitre 1 : Revue de littérature**

## 1 Stéroïdes androgènes anabolisants

Comme décrit dans la revue de Freeman, Bloom *et al.* (2001), les premières utilisations thérapeutiques de stéroïdes anabolisants androgènes remontent à l'année 1889 lorsque Charles Edouard Brown-Séquard rapportait pour la première fois les vertus qu'il attribuait à des auto-injections d'extraits testiculaires de chiens et de cochons d'Inde. Selon Brown-Séquard, ces injections lui permettaient d'augmenter sa force physique, ses habiletés mentales ainsi que son appétit. En 1931, Butenandt parvenait à isoler 15 mg d'une substance pure à partir de 15 000 L d'urine. Ce composé avait été identifié comme étant de l'androstérone. En 1934, Leopold Ruzicka synthétisait et confirmait la structure chimique du stéroïde en question. Peu après, une hormone ayant un caractère androgénique encore plus fort a été identifiée dans les testicules. Il s'agissait de la testostérone, isolée et synthétisée en 1935.

La nomenclature et la numérotation particulière des androgènes (C19-stéroïdes) ainsi que la structure de l'androstérone et de la testostérone sont illustrées à la figure 2. Il est important de noter que les annotations  $\alpha$  et  $\beta$  des groupements fonctionnels correspondent à leur orientation par rapport au plan du stéroïde ( $\alpha$  indique sous le plan et  $\beta$  indique au-dessus du plan).

En circulant dans le sang, les hormones stéroïdiennes androgènes interagissent avec le récepteur des androgènes et sont responsables du développement et du maintien des caractéristiques physiques masculines. Il est établi que la prise de stéroïdes androgènes anabolisants permet d'observer un gain de masse musculaire et osseuse ainsi qu'une certaine virilisation. Par contre, ce n'est pas sans effets secondaires néfastes tels que : cardiomyopathie, athérosclérose, perte de fonction hépatique et des problèmes de comportements (Bhasin, Woodhouse *et al.* 2001, Dawson 2001, Bahrke et Yesalis 2004, Kam et Yarrow 2005, Sjöqvist, Garle *et al.* 2008). Malgré les nombreux effets secondaires qu'apporte la prise de stéroïdes androgènes anabolisants, il est reconnu que des sportifs, tant récréatifs que de hauts niveaux en font abus (Sjöqvist, Garle *et al.* 2008, Shackleton 2009).

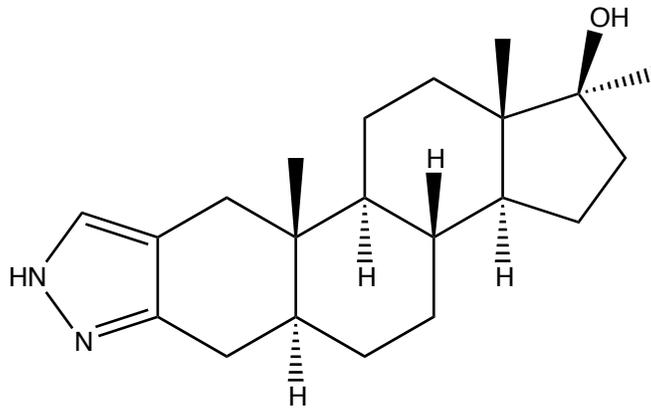


**Figure 2:** Numérotation du noyau androstane, structure de l'androsténone et structure de la testostérone.

### 1.1 Stéroïdes androgènes synthétiques

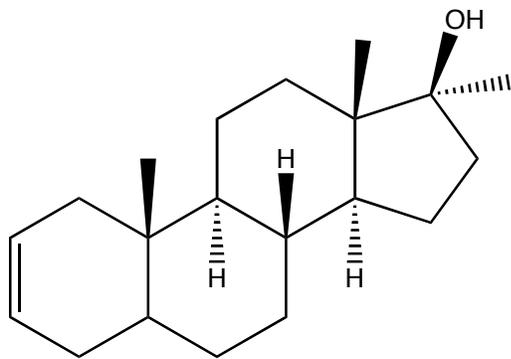
Suite à la découverte et la synthèse des premiers stéroïdes androgènes anabolisants, beaucoup de progrès et d'avancées scientifiques ont été réalisés dans ce domaine. Plusieurs chercheurs se sont lancés dans la modification de stéroïdes connus et la synthèse de différents analogues afin de mieux en étudier les effets physiologiques. Bon nombre de dérivés stéroïdiens ont été synthétisés en vue de découvrir des composés qui seraient plus efficaces que la testostérone dans le traitement de certaines conditions médicales comme l'hypogonadisme (diminution de la sécrétion d'hormones et diminution de gamétogenèse), dénués d'effets secondaires et efficaces lorsqu'administrés par voie orale. Les modifications les plus fréquentes qui sont observées visaient d'abord et avant tout à augmenter le caractère androgénique. La plupart des altérations connues, ainsi que leurs effets sur l'affinité du stéroïde avec le récepteur des androgènes ont été identifiés dans la littérature scientifique (Elks 1976, Fragkaki, Angelis et al. 2009a). Parmi les réactions les plus utilisées on compte : des alkylations en C-17 $\alpha$ , des estérifications de l'alcool en C-17 $\beta$ , l'introduction d'une insaturation en C-1,2 et la réduction de l'insaturation en C-4,5. Les stéroïdes possédant des groupements alkyles en C-17 $\alpha$  demeurent actifs sur une plus longue période de temps et permettent l'utilisation par voie orale en inhibant les voies majeures de biotransformation impliquant l'oxydation du groupement 17 $\beta$ -hydroxyle (effet de premier passage) et leur inactivation. Les stéroïdes estérifiés en position C-17 $\beta$  avec des chaînes alkyles sont beaucoup plus liposolubles et seront libérés dans la circulation sanguine sur une longue période de temps (Kam et Yarrow 2005, Fragkaki, Angelis et al. 2009a, Kazlauskas 2010). Ces deux modifications augmentent l'efficacité des stéroïdes synthétiques en inhibant partiellement le métabolisme lors du premier passage de détoxification au foie et en facilitant le stockage dans

les tissus adipeux, augmentant ainsi leur temps de demi-vie dans l'organisme. Le stanozolol (17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstano[3,2-c]pyrazole; figure 3) est un exemple typique de stéroïde modifié.

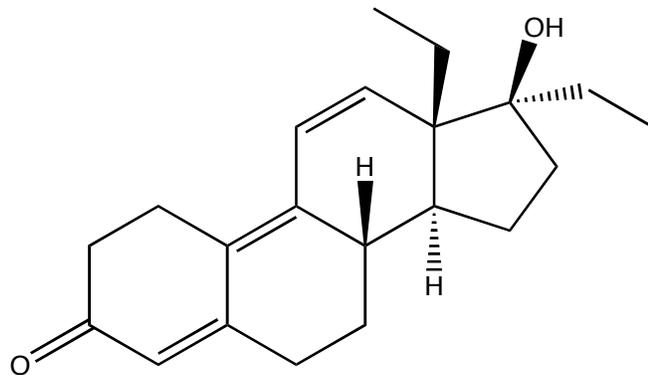


**Figure 3 :** Structure du stanozolol.

Ce stéroïde a d'ailleurs été synthétisé et mis en marché en respectant des normes strictes de pureté et d'hygiène. Ainsi, il a été possible d'avoir recours à des volontaires humains afin d'approfondir les connaissances en lien avec les effets physiologiques et les métabolites excrétés en réponse à l'administration de cette hormone synthétique. Par contre, dans le monde sportif et récréatif, ces substances sont non seulement prises hors du contexte médical, mais en plus, de nouveaux composés dont l'inocuité n'a pas été démontrée ont fait leur apparition. La tétrahydrogestrinone (13,17 $\alpha$ -diéthyl-17 $\beta$ -hydroxy-18,19-norandrost-4,9(10),10-trièn-3-one) et la désoxyméthyltestostérone (17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androst-2-ène) sont deux exemples répertoriés (Catlin, Sekera et al. 2004, Malvey et Armsey 2005, Sekera, Ahrens et al. 2005, Pereira, Padilha et al. 2009, Teale, Scarth et al. 2011) (figure 4). Ces stéroïdes dits *designer* sont la plupart du temps en circulation sans même connaître la teneur et le niveau de pureté des préparations. Une fois administrées, l'étendue des effets physiologiques, la toxicité et le métabolisme de ces hormones synthétiques demeurent inconnus.



Désoxyméthyltestostérone



Tétrahydrogestrinone

**Figure 4 :** Structure de la désoxyméthyltestostérone (isomère principal C-2,3) et de la tétrahydrogestrinone.

## 2 Biotransformation des stéroïdes androgènes anabolisants

Les stéroïdes anabolisants androgènes sont administrés sous diverses formes : percutanée (gels ou timbres), orale ou intramusculaire. L'injection intramusculaire et le transport percutané sont les deux voies d'entrée dans le corps qui permettent une efficacité optimale. Ceux-ci entrent directement dans la circulation sanguine systémique et provoquent un effet physiologique immédiat. La prise de ces hormones par voie orale représente la méthode d'utilisation la plus simple pour ce type de drogue, mais elle implique un premier passage par la veine porte vers le foie avant d'entrer dans la circulation sanguine systémique. Ce premier passage élimine une portion de la dose de stéroïde avant même qu'elle n'ait commencé à exercer ses effets physiologiques. Ultiment, les stéroïdes seront acheminés par la circulation sanguine au foie, où ils seront biotransformés avant d'être éliminés dans l'urine ou la bile.

Le foie est responsable de la biotransformation d'une vaste gamme de composés organiques et inorganiques, d'origine endogène ou exogène. Cette fonction biologique est assurée plus précisément par les hépatocytes qui sont riches en complexes enzymatiques cytochromes P450 (CYP450). Ces macromolécules sont situées dans le réticulum endoplasmique et dans la membrane interne des mitochondries de la cellule. Comportant un groupement hème comme cofacteur, ces complexes protéiques sont capables de lier deux atomes d'oxygène et de catalyser efficacement l'oxydation de xénobiotiques complexes (Isin et Guengerich 2008). Les CYP450

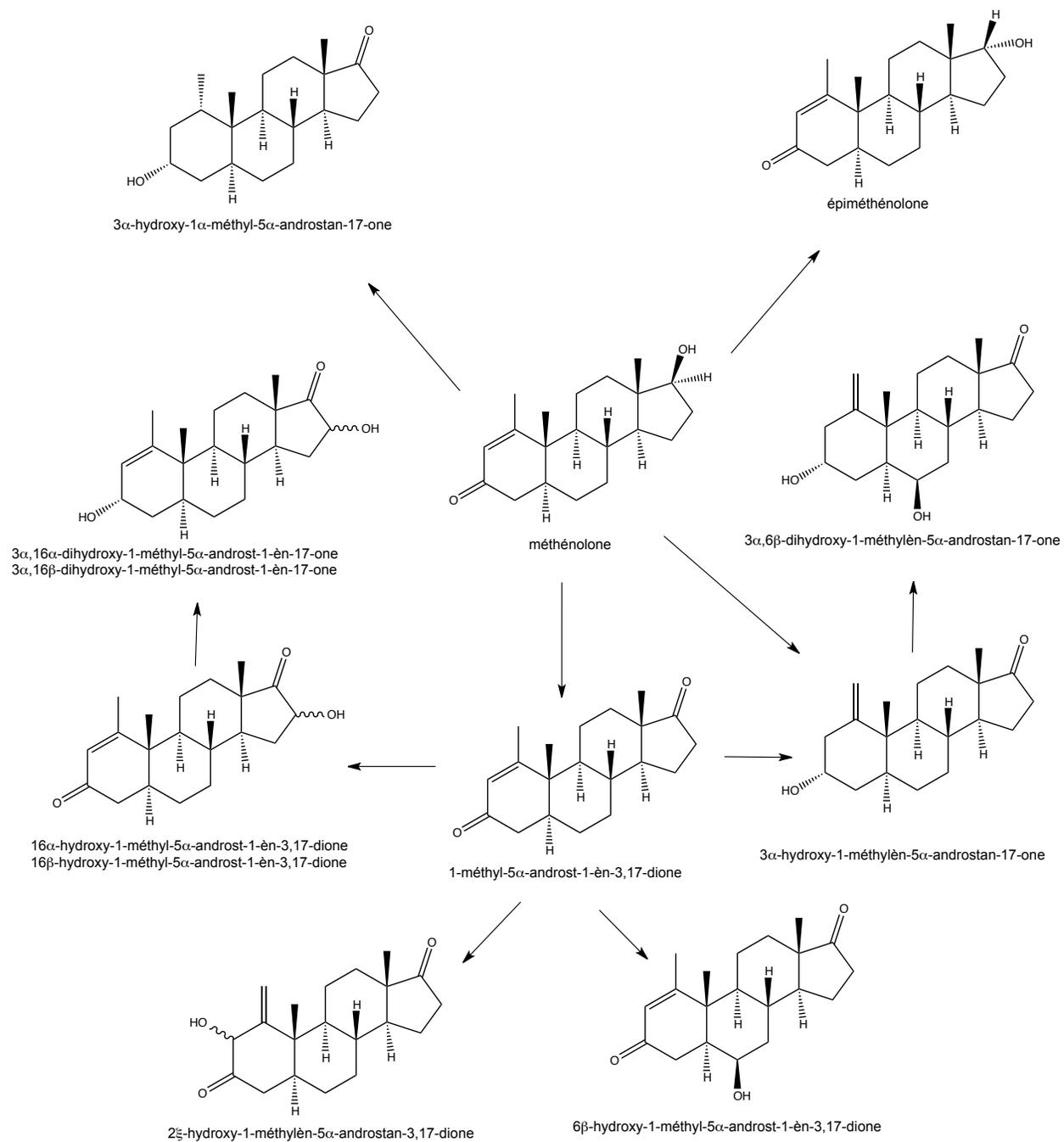
parviennent à détoxifier ces substrats à l'aide de deux types de biotransformations : les réactions de phase I et II. Les premières, sont des réactions d'oxydoréduction par exemple en position C-3 et C-17, de réduction de la double liaison C-4,5 et d'hydroxylation en C-2, C-4, C-6, C-12 ou C-16. Les réactions de phase II sont exclusivement des réactions de conjugaison et sont habituellement précédées de réactions de phase I. Dans un système métabolique complet, les stéroïdes anabolisants et leurs analogues biotransformés sont principalement excrétés comme glucuronides (majoritaires) et sulfates. À l'aide des vastes connaissances sur les biotransformations des stéroïdes chez les humains, il est possible de prévoir et d'anticiper les voies métaboliques possibles pour un stéroïde donné à partir de la structure chimique de celui-ci (Schanzer 1996, Fragkaki, Angelis et al. 2009b).

### **3 Modèles d'études de biotransformation**

#### **3.1 Modèle *in vivo***

La méthode la plus directe de former et d'étudier les métabolites urinaires d'un stéroïde produit selon des normes pharmaceutiques demeure l'étude d'excrétion chez un volontaire humain. Au cours de ces études, le stéroïde est administré en quantité sécuritaire et l'urine du volontaire est recueillie. Celle-ci est purifiée pour être analysée par CG-SM ou par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à de la spectrométrie de masse (CLHP-SM). Les métabolites identifiés et caractérisés par synthèse organique servent de marqueurs biologiques pour démontrer l'utilisation du composé parent. Cependant, l'urine constitue une matrice d'analyse complexe et la purification précédant l'analyse est nécessaire. Des centaines de composés endogènes et propres au volontaire (alimentation, différences interindividuelles) sont présents et représentent des interférences plus ou moins importantes au niveau de l'analyse de l'urine. L'utilisation d'animaux tels que les rats, les chiens ou les porcs sont à cette fin inutile, car il existe des différences interespèces des voies métaboliques, celles-ci étant à l'origine des disparités au niveau du degré d'expression de certains types de CYP450 (Zuber, Anzenbacherová et al. 2002, Martignoni, Groothuis et al. 2006).

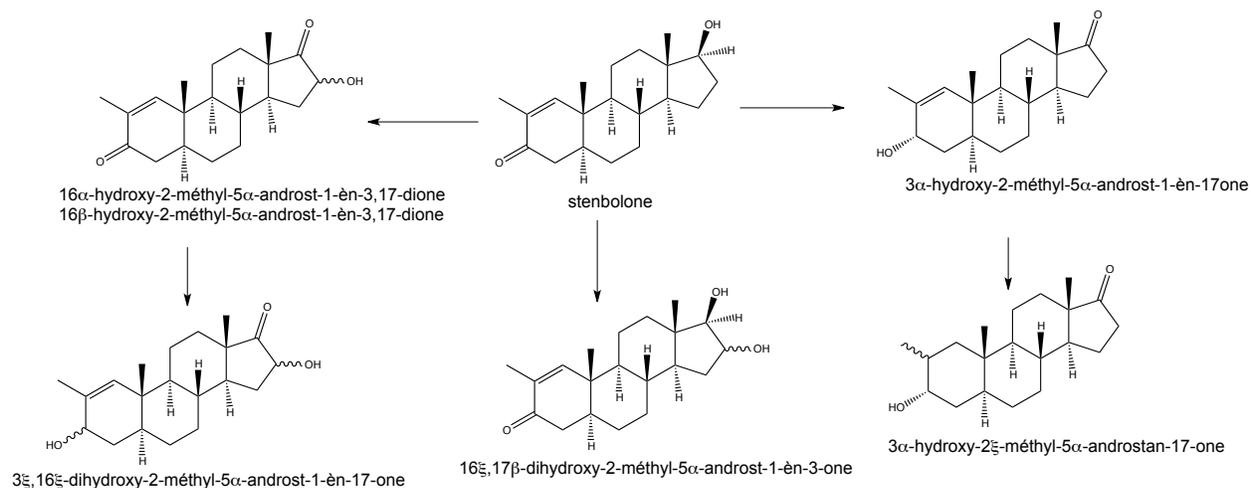
La participation de volontaires humains est presque systématique et a permis d'élucider les voies de biotransformation de l'acétate de méthénolone et de l'acétate de stenbolone, les deux analogues non méthylés des substances faisant l'objet de ce travail. Après avoir administré une seule dose orale de 50 mg d'acétate de méthénolone à deux volontaires humains, l'urine était récoltée, purifiée et analysée par CG-SM. Douze métabolites ont été observés (comprenant la méthénolone et son épimère), tous issus de l'oxydation du groupement hydroxyle en position C-17 $\beta$ , d'hydroxylations du squelette stéroïdien en position C-2, C-6, C-16, de réduction en position C-2,3 et C-3 (figure 5). Il est intéressant de noter qu'à part la méthénolone et l'épiméthénolone, tous les composés présentent une cétone en position C-17, confirmant que l'oxydation du groupement hydroxyle en position C-17 $\beta$  est une voie de métabolisme majoritaire chez les stéroïdes 17 $\beta$ -hydroxylés (Goudreault et Massé 1990).



**Figure 5 :** Voies de biotransformation de la méthénolone observées par Goudreault et Massé (1990).

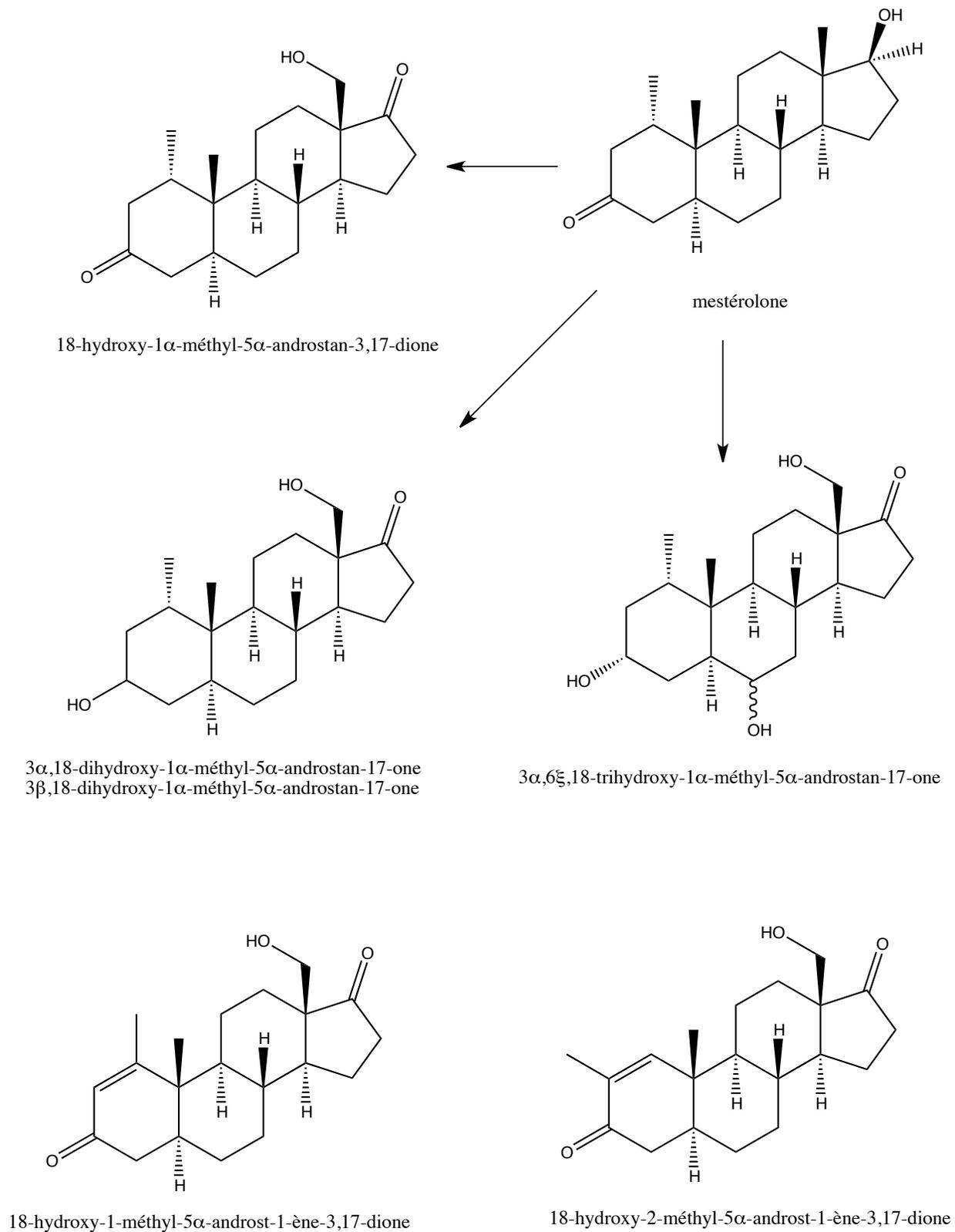
Suite aux résultats obtenus par Goudreault et Massé en 1990 avec la méthénolone, le groupe de recherche reproduit l'expérience avec la stenbolone en 1991. L'étude d'excrétion révèle neuf différents métabolites, soit trois de moins qu'avec la méthénolone. Les composés identifiés (y

compris la stenbolone) sont issus d'hydroxylations en position C-16, d'oxydation de l'hydroxyle en position C-17 $\beta$  ou de réduction en position C-1,2 ou C-3 (figure 6) (Goudreault et Massé 1991).



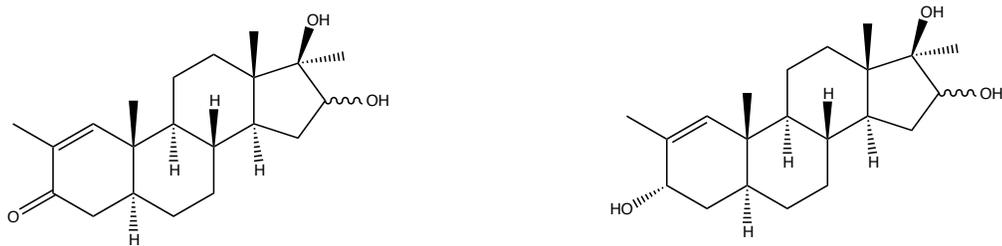
**Figure 6 :** Voies de biotransformation de la stenbolone observées par Goudreault et Massé (1991).

Le groupe de recherche procède au même type d'étude par après avec la mestérolone. Suite à l'ingestion d'une seule dose de 50 mg de mestérolone, 4 métabolites ont pu être détectés dans l'urine. Les composés détectés ont tous subi une oxydation du groupement hydroxyle en position C-17 $\beta$  ainsi qu'une hydroxylation en position C-18. De plus, certains métabolites subissent une hydroxylation en position C-6 ainsi qu'une réduction de la cétone en position C-3. L'obtention de composés hydroxylés en position C-18 pour la mestérolone évoque la possibilité de métabolites similaires pour la méthénolone et la stenbolone. Les extraits urinaires de la méthénolone et de la stenbolone sont réexaminés par le groupe de recherche et un métabolite hydroxylé en position C-18 est identifié dans les deux études d'excrétion (figure 7) (Goudreault et Massé 1992).



**Figure 7 :** Voies de biotransformation de la mestérolone et métabolites hydroxylé en position C-18 de la méthénolone et stenbolone observés par Goudreault et Massé (1992).

Le groupe de recherche de Cavalcanti *et al* a publié en 2013 l'identification de deux métabolites de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone issus de l'urine d'un volontaire humain. Un comprimé de supplément alimentaire *Ultradrol* (4 mg de 17 $\alpha$ -méthylstenbolone par cachet selon les indications sur le contenant) acheté auprès des laboratoires Antaeus est donné à quatre volontaires humains. L'urine est récoltée pendant 7 jours pour être ensuite extraite, dérivée et analysée par CG-SM. L'analyse des dérivés TMS de ces deux composés suggère l'obtention d'un métabolite hydroxylé en position C-16 et d'un composé réduit en position C-3 $\beta$  et hydroxylé en position C-16 (figure 8).



16 $\xi$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one

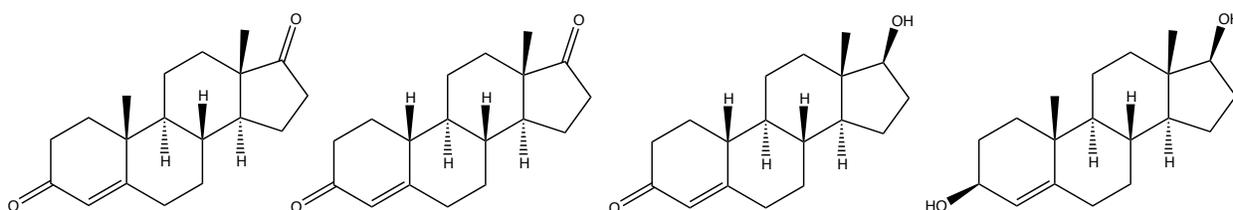
2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3 $\alpha$ ,16 $\xi$ ,17 $\beta$ -triol

**Figure 8:** Structure des métabolites de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone proposés par Cavalcanti et al (2013).

### 3.2 Modèles *in vitro*

Lorsque le stéroïde ne répond pas aux standards d'hygiène requis ou provient d'une source inconnue, le recours aux volontaires humains est difficile et l'utilisation de modèles *in vitro* est une avenue intéressante. De plus, l'utilisation de modèles *in vitro* permet l'obtention d'une matrice d'analyse beaucoup plus simple contenant peu d'interférences comparativement à une matrice urinaire. La quantité de stéroïdes nécessaire à une étude de métabolisme *in vitro* est également inférieure aux besoins d'une étude *in vivo*. Cependant, les systèmes *in vitro* ne peuvent représenter parfaitement un système de biotransformation aussi complet qu'un être vivant, et certains groupes (dont nous) ont rapporté l'absence de réactions de conjugaison. Ceci dit, des études ont démontré que les modèles *in vitro* comme les hépatocytes ou leur fraction

subcellulaire parviennent à bien reproduire le métabolisme de phase I de plusieurs stéroïdes chez l'humain. Le groupe de Lévesque, Gaudreault *et al.* ont démontré ces faits en 2002 en étudiant le métabolisme *in vitro* de l'androstènedione, la norandrostènedione, la nortestostérone et la norandrostènediol à l'aide d'hépatocytes humains frais (figure 9). Les réactions de phase I attendues des études *in vivo* ont été observées, soit de l'oxydoréduction en position C-3 et C-17, de la réduction en position C-4,5 et des hydroxylations en position C-6 $\beta$  et C-16. Cette étude démontre les capacités du modèle *in vitro* à bien reproduire le métabolisme *in vivo* des stéroïdes.

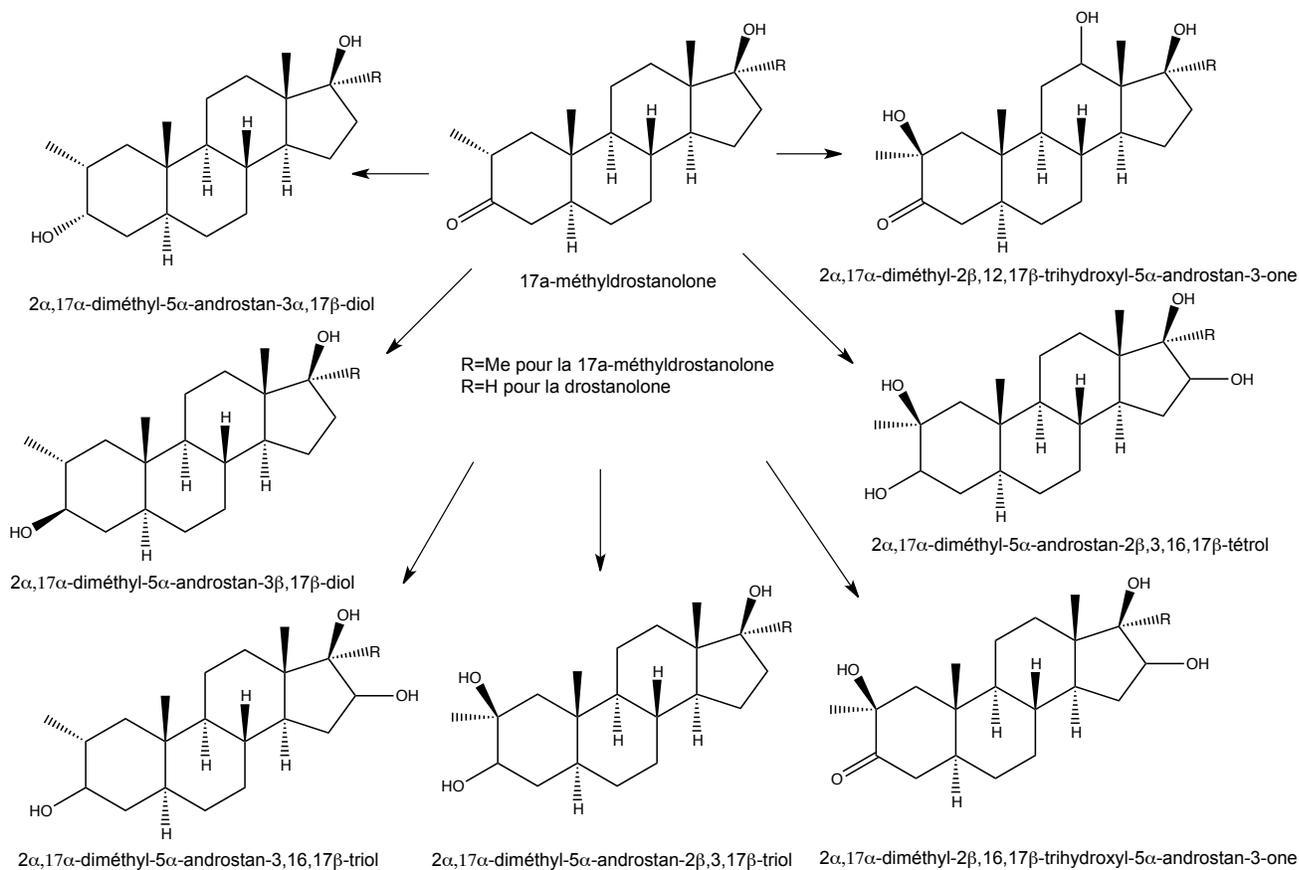


**Figure 9 :** Structure de l'androstènedione, la norandrostènedione, la nortestostérone et la norandrostènediol.

Les hépatocytes utilisés dans les études métaboliques *in vitro* proviennent habituellement d'une résection du foie. Les tissus récupérés sont soumis à une perfusion à la collagénase. Cette procédure permet de séparer et nettoyer les hépatocytes pour en faciliter la mise en suspension. Une fois qu'elles sont isolées, la viabilité des cellules est vérifiée par un compte au bleu Trypan et elles sont ensuite séparées en portions aliquotes en prévision d'une cryopréservation ou d'une utilisation immédiate (Li 2007). Les hépatocytes primaires peuvent être mis en culture afin de maximiser leur temps de vie. Toutefois, cette méthode cause une baisse graduelle des niveaux d'expression des CYP450 (Li 1997, Guillouzo, Rialland *et al.* 1999, Skett, Roberts *et al.* 1999, Brandon, Raap *et al.* 2003, Gomez-Lechon, Donato *et al.* 2003, Gómez-Lechón, Castell *et al.* 2007). À noter, les hépatocytes frais et cryopréservés sont capables de produire du métabolisme de phase II. Cependant, selon la structure du stéroïde étudié, il n'est pas toujours possible avec ces modèles *in vitro* d'identifier des composés issus de conjugaison (Gauthier, Goudreault *et al.* 2009). De plus, l'utilisation d'un groupe de donneurs plutôt que d'un seul est habituellement recommandée, car des variations inter-individuelles et significatives des niveaux d'expression de certaines isoformes des CYP450 sont observées.

Les fractions subcellulaires S9 ou les microsomes d'hépatocytes proviennent des mêmes tissus décrits précédemment qui ont subi une homogénéisation. D'abord, grâce à des centrifugations à faible vitesse, les cellules intactes, noyaux et gros organites sont éliminés par précipitation. Puis, selon la force et la durée de la centrifugation, différentes fractions du surnageant sont obtenues : à 9000 g pendant 20 minutes, les fractions S9 sont obtenues et à plus grande force ( $10^5$  g), les microsomes sont isolés (Wu et McKown 2004). Les fractions S9 conservent les mitochondries (ainsi que leurs enzymes membranaires) et le réticulum endoplasmique, ce qui présente un contenu et une activité catalytique plus similaires que les microsomes par rapport à un hépatocyte humain intact. Les microsomes ne contiennent en effet que les réticulum endoplasmiques et les protéines solubles. À défaut d'avoir un contenu biologique intégral, les concentrations d'enzymes de détoxification seront plus élevées dans les modèles subcellulaires qu'avec les hépatocytes complets. Cependant, les systèmes subcellulaires sont incapables d'effectuer du métabolisme de phase II sans l'ajout de certains cofacteurs comme l'uridine diphosphate acide glucuronique (impliqué dans la formation de conjugués glucuronides), ceux-ci ayant été éliminés lors de la purification du matériel biologique. (Brandon, Raap et al. 2003, Wu et McKown 2004, Gauthier, Poirier et al. 2012).

Gauthier, Goudreault *et al.* ont étudié en 2009 le métabolisme de la drostanolone et de la méthyltestostérone à l'aide de modèles *in vitro* tels que les hépatocytes humains ou leurs fractions subcellulaires. Les métabolites détectés dans les études *in vitro* ont été identifiés et comparés à ceux issus d'études d'excrétion. Suite aux incubations des deux stéroïdes, huit métabolites sont identifiés pour chacun d'eux. Les composés détectés sont issus de réactions de réduction en position C-3 et d'hydroxylation en position C-2 et C-16 (figure 10)



**Figure 10 :** Voies de biotransformation pour la drostanolone et la 17 $\alpha$ -méthyldrostanolone observées par Gauthier et al (2009).

En 2014, le groupe de recherche van Eenoo *et al.* (Geldof, Lootens et al. 2014) parvient à détecter dix différents composés monohydroxylés issus de l'incubation de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone avec des microsomes de foie humain. La même étude, cette fois en gavant des souris chimériques, permet de détecter deux métabolites dihydroxylés contenus dans l'urine des rongeurs. Par contre, les deux métabolites rapportés par Cavalcanti *et al.* ne sont pas détectés parmi ces douze nouveaux composés. Seulement deux structures monohydroxylées issues des incubations avec les microsomes de foie humain sont proposées : la 4,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one et la 17 $\beta$ ,18-dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (figure 11).



4ξ,17β-dihydroxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-1-èn-3-one

17β,19-dihydroxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-1-èn-3-one

**Figure 11** : Structure des métabolites de la 17α-méthylstenbolone proposés par van Eenoo et al (2014).

À la lumière des études de biotransformation *in vivo* et *in vitro* présentées précédemment, quelques hypothèses peuvent être avancées par rapport au métabolisme attendu pour la 17α-méthylméthénolone et la 17α-méthylstenbolone. La similarité qui existe entre la méthénolone, la mestérolone et la 17α-méthylméthénolone suggère l'obtention possible de métabolites hydroxylés en position C-2, C-6, C-16 et C-18 ainsi que la réduction de la cétone en position C-3 pour l'analogue portant un groupement méthyle en position 17α. En considérant donc la similarité entre la stenbolone, la drostanolone, la 17α-méthyldrostanolone et la 17α-méthylstenbolone, il est raisonnable de s'attendre à observer des réactions d'hydroxylation en position C-2, C-4, C-16 et C-18 ainsi que de la réduction en position C-3 suite à l'incubation de la 17α-méthylstenbolone avec un modèle *in vitro*.

#### 4 Détection et analyse des stéroïdes

Dans le contexte du contrôle du dopage, les substances interdites ou leurs métabolites sont détectés et identifiés selon deux critères : leur temps de rétention et leur spectre de masse. Ceux-ci, incluant les ratios relatifs des fragments d'un composé détecté, doivent correspondre avec ceux du composé de référence. Ces critères représentent une exigence de grande précision et spécificité analytique.

Les métabolites produits doivent être extraits de la matrice biologique afin d'en permettre l'analyse par CG-SM (ionisation par impact électronique), le plus souvent par extraction en phase solide et liquide-liquide. L'analyse de l'extrait purifié peut être effectuée directement ou suite à

la dérivation des groupements fonctionnels, plus spécifiquement par la conversion en éther-triméthylsilyles et énol-triméthylsilyles. Une fois séparés par chromatographie, les différents composés sont ionisés avec une énergie de 70 eV et analysés par le quadrupôle du spectromètre de masse. L'emplacement des fonctions chimiques sur la structure du stéroïde influence inévitablement la fragmentation de ce dernier. Par exemple, des ions caractéristiques à  $m/z$  143 et 130 sont observés lors de l'analyse par CG-SM du dérivé pertriméthylsilyle de stéroïdes possédant un groupement méthyle et hydroxyle en position C-17; des ions à  $m/z$  218 et 231 sont caractéristiques d'un stéroïde possédant un groupement méthyle en position C-17 ainsi qu'un hydroxyle en position C-17 et C-16.

À défaut d'obtenir suffisamment d'informations à partir des spectres de masse, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) des noyaux  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  peut se montrer fort utile. Des expériences de corrélation spatiale de l'effet nucléaire Overhauser peuvent permettre d'obtenir une cartographie en deux dimensions des interactions internucléaires (RMN 2D NOESY). Avec ces informations, la stéréochimie complète d'un composé peut être établie. Cependant, une limitation importante existe : le composé analysé doit être pur et en quantité suffisante. Nous avons utilisé la RMN afin d'identifier les stéroïdes provenant de la synthèse organique.

## **5 Objectifs du projet**

Les objectifs visés au cours de ce projet sont en premier lieu d'identifier les métabolites majoritaires de la  $17\alpha$ -méthylméthénolone (1) et de la  $17\alpha$ -méthylstenbolone (2), à partir d'analyses par CG-SM des extraits d'incubations cellulaires ou subcellulaires purifiés et dont les composants stéroïdiens sont dérivés préalablement. La synthèse organique et la caractérisation des deux stéroïdes seront réalisées afin que le laboratoire puisse disposer d'un stock de composés de référence. Ultiment, les métabolites détectés pourront servir de marqueurs biologiques et seront intégrés aux méthodes d'analyses de contrôle du dopage.

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

Une faible quantité de 17 $\alpha$ -méthylméthénolone (1) et de 17 $\alpha$ -méthylstenbolone (2) était disponible, provenant d'une synthèse effectuée il y a quelques années par D. Poirier *et al.* (2006, résultats non publiés). Elle a été utilisée lors des incubations d'hépatocytes cryopréservés ou de fractions subcellulaires S9. Les métabolites produits ont été extraits, purifiés et analysés par CG-SM. Nous avons cependant dû reprendre la synthèse par la suite afin d'obtenir des quantités suffisantes de ces produits.

Les incubations ont été effectuées avec les suspensions cellulaires et les suspensions protéiques selon les protocoles proposés par Celsis In Vitro Technologies (Celsis 2013a, Celsis 2013b). Les hépatocytes ou les fractions subcellulaires hépatiques de Celsis In Vitro Technologies provenaient d'un groupe de donneurs humains afin de minimiser les variations interindividuelles du contenu enzymatique des cellules ou des suspensions protéiques.

Les produits synthétisés ainsi que les intermédiaires de réaction ont été purifiés par chromatographie éclair sur gel de silice. La pureté et l'identité de ces produits ont été évaluées par spectrométrie de masse sur un appareil CLHP-SM en mode d'ionisation ICPA sur un appareil Waters (Waters 2767 – *sample manager*, Waters SFO – *system fluidic organizer*, Waters 2545 – *binary gradient module*, Waters 2998 – *UV detector*, 3100 *mass detector*) et par analyse de spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  300 MHz sur un appareil Bruker AMX 300. Pour les produits finaux et certains intermédiaires, les analyses RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  NOESY 700 MHz ont été réalisées sur un appareil Bruker Avance II 700 et les analyses de spectrométrie de masse à haute résolution sur un appareil LC-MS TOF de la compagnie Agilent Technologies (chromatographe en phase liquide *Series 1100* et spectromètre de masse TOF *Series 6200*).

## **1 Incubation avec des fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains**

Une solution de NADP a été préparée par dilution dans une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> 2% m/V (10 mL) de 17 mg de NADP, 78 mg de glucose-6-phosphate et 60 U d'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase. Cette solution sert à compléter les cycles catalytiques des complexes enzymatiques de détoxification et peut être conservée jusqu'à 8 h à 4°C.

Des solutions stock dans l'éthanol de 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) (0.3mg/mL, 10 mM) et de 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) (0.3mg/mL, 10 mM) ont été préparées permettant une concentration finale dans les milieux d'incubation de 50  $\mu$ M.

Le contenu de la fiole de fractions subcellulaires S9 (30 mg de complexes protéiques dispersés dans 1.6 mL de tampon Krebs-Henseleit) est décongelé à 37 °C. Des portions aliquotes de 100  $\mu$ L de fractions S9 sont transférées dans des tubes de 15 mL. Des volumes de 640  $\mu$ L de tampon phosphate 50 mM à pH 7.4 et 5  $\mu$ L de solution éthanolique du stéroïde sont ajoutés dans les tubes. Les mélanges sont incubés à 37 °C dans un bain agitateur pendant 5 min. Une portion de 250  $\mu$ L de solution de NADP est ajoutée dans chacun des tubes et les portions aliquotes sont incubées à 37°C dans un bain agitateur pendant 3 h. Les réactions sont arrêtées par l'ajout d'un volume équivalent d'acétonitrile froid. Chaque tube est agité vigoureusement pendant trente secondes et centrifugé pendant 5 min à 2500 tours/min. Le surnageant est transféré dans un autre tube de 15 mL et entreposé à -20 °C jusqu'à l'analyse.

## **2 Incubation avec des hépatocytes cryopréservés**

Les solutions stock des stéroïdes (1) ou (2) sont utilisées pour préparer des solutions 100  $\mu$ M dans du tampon Krebs-Henseleit. Ces solutions sont utilisées comme milieu d'incubation avec les cellules. Les solutions In Vitro HT et le tampon Krebs-Henseleit sont préchauffés à 37°C dans un bain thermostaté avant d'être utilisés pour nettoyer les cellules.

Tel que décrit par Gauthier *et al.* selon le protocole fourni par Celsis In Vitro Technologies, la fiole contenant les hépatocytes (entre 5 et 6 x 10<sup>6</sup> cellules dispersées dans un volume de 1 mL) est décongelée en l'agitant délicatement dans un bain thermostaté à 37 °C. Les cellules sont transférées dans un tube conique en plastique de 50 mL contenant 49 mL de milieu HT et le mélange est centrifugé à 50 g pendant 5 min. Le surnageant est retiré du tube et 2 mL de tampon Krebs-Henseleit sont ajoutés. Un compte cellulaire est fait en prélevant 10  $\mu$ L de la suspension

de cellules à laquelle sont ajoutés 10 µL de teinture bleue Trypan. La suspension de cellules est diluée avec du tampon Krebs-Henseleit jusqu'à une concentration d'environ  $1 \times 10^6$  cellules/mL. Des volumes de 250 µL de suspension cellulaire et 250 µL de tampon Krebs-Henseleit contenant les stéroïdes (1) ou (2) sont ajoutés dans chacun des puits de la plaque d'incubation. Les incubations sont effectuées avec agitation délicate à 37 °C pendant 4 h dans un incubateur à atmosphère contrôlée (5% CO<sub>2</sub>). Les milieux d'incubations d'hépatocytes cryopréservés sont par la suite traités comme décrits précédemment dans la section traitant des incubations avec les fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains. Un volume équivalent d'acétonitrile froid est ajouté et le mélange est agité vigoureusement pendant trente secondes pour provoquer la rupture des cellules. Le contenu du tube est centrifugé pendant 5 min à 2500 tours/min et le surnageant est transféré dans un tube et entreposé à -20 °C jusqu'à l'analyse.

Tel que décrit précédemment (Ayotte, Goudreault et al. 1996), le solvant est évaporé sous un jet d'azote à 40 °C, puis 3 mL de tampon acétate 0.1 M pH 5.2 sont ajoutés. L'échantillon est passé sur une cartouche Sep Pak plus C<sub>18</sub>, rincé avec 5 mL d'eau, 5 mL d'hexanes et élué avec 5 mL de méthanol dans un tube de 15 mL. Le solvant est évaporé sous un jet d'azote à 40°C. Des volumes de 1 mL de tampon phosphate 0.1 M pH 6.9 (tampon utilisé pour avoir une matrice constante dans l'éventualité d'extraire les glucuronides par réaction enzymatique), 400 µL de tampon carbonate 1.0 M pH 9.0 et 4 mL d'éther diéthylique sont ajoutés, suivi d'une agitation vigoureuse de 30 s et d'une centrifugation à 2500 tours/min pendant 5 min. La phase organique est transférée dans un tube propre et est évaporée à sec sous un jet d'azote à 40°C. Le culot séché est reconstitué dans 200 µL de méthanol et est transféré dans un vial conique de 250 µL. Le méthanol est évaporé sous un jet d'azote et le vial est bouché sous atmosphère d'azote à l'aide d'un capuchon en aluminium et d'un septum en caoutchouc et en téflon.

Une solution de 430 µL de DCM, 2 µL de triéthylamine et 70 µL d'iodotriméthylsilane est préparée sous atmosphère d'azote. Cette solution d'iodotriméthylsilane 0.1 M doit être stockée dans un contenant hermétique à -20°C et à l'abri de la lumière. Des portions de 3 mL de N-méthyl-N-(triméthylsilyl)fluoroacétamide, 60 µL d'éthanthiol et 60 µL d'iodotriméthylsilane 0.1 M sont ajoutées dans un vial ambré fermé hermétiquement sous atmosphère d'azote. Cette

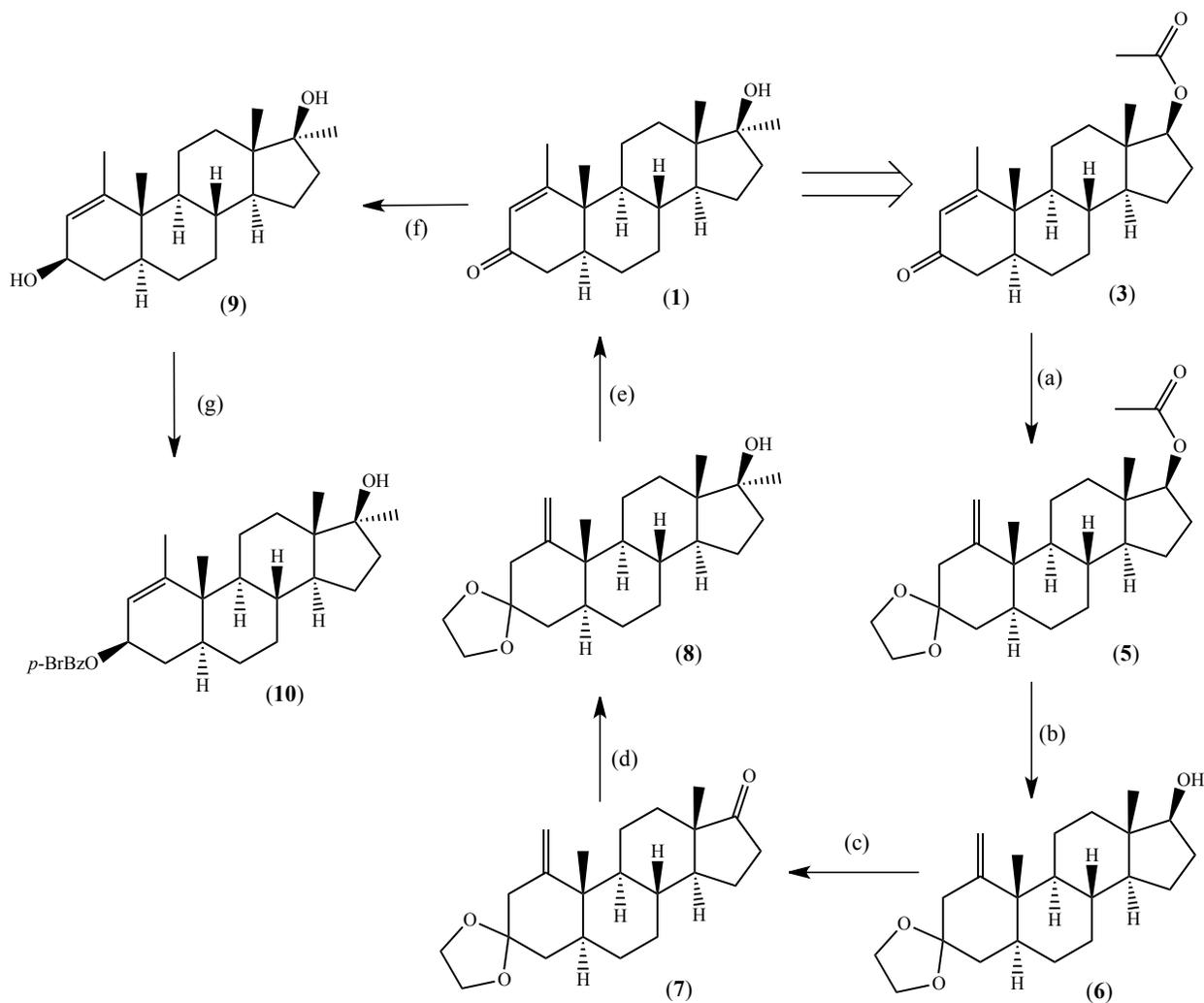
solution sera utilisée pour effectuer les dérivations TMS. Un volume de 50  $\mu\text{L}$  de cette solution est ajouté aux résidus et le mélange réactionnel est chauffé à 70°C pendant 30 min (Ayotte, Goudreault et al. 1996).

### 3 Analyse CG-SM

Les extraits dérivés TMS sont injectés dans un appareil composé d'un injecteur automatique modèle 7683 Series Injector (Agilent Technologies), d'un chromatographe en phase gazeuse 6890N Network GC System (Agilent Technologies) et d'un détecteur de masse 5973 Network Mass Selective Detector (Agilent Technologies). La colonne analytique utilisée est de type DB-5MS (Agilent Technologies) de 25 m de longueur et 0.2 mm de diamètre interne avec une phase stationnaire de 0.33  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Le volume d'injection par échantillon est de 1  $\mu\text{L}$ . L'injecteur est en mode de débit non partagé à une température de 270°C. La programmation de température débute à 100°C pendant 30 s, augmente de 20°C/min jusqu'à 240°C, puis de 6°C/min jusqu'à 278°C, et de 10°C/min jusqu'à 320°C; cette température est maintenue 5 min. Le détecteur de masse balaie sur une gamme de masses allant de 50 à 650 u.m.a. (balayage complet).

### 4 Synthèse de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1)

La synthèse de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) est effectuée à partir de la 17 $\beta$ -acétoxy-1-méthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (3) achetée de la compagnie Schering. La figure 12 illustre la stratégie de synthèse utilisée. Une réaction de réduction de la cétone en C-3 du composé (1) ainsi qu'une *p*-bromobenzoylation du groupement hydroxyle nouvellement formé en C-3 $\beta$ , qui est nécessaire à l'identification par RMN du stéroïde (1), est également présentée.



Conditions de réactions : (a) éthylène glycol, HC(OEt)<sub>3</sub>, acide *p*-toluènesulfonique monohydraté, DCM, 40°C; (b) MeOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 60°C; (c) periodinane de Dess-Martin, DCM, température pièce; (d) MeLi, CeCl<sub>3</sub>, THF, -78°C; (e) HCl<sub>(aq)</sub> 10% (v/v), acétone, température pièce; (f) CeCl<sub>3</sub>, NaBH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O/MeOH (1:2.5), température pièce; (g) chlorure de *p*-bromobenzoyle, diméthylaminopyridine, triéthylamine, température pièce

**Figure 12** : Schéma de la voie de synthèse utilisée pour la 17β-hydroxy-1,17α-diméthyl-5α-androst-1-èn-3-one (1).

#### 4.1 17β-acétoxy-3,3-éthylènedioxy-1-méthylène-5α-androstane (5)

À une solution de 17β-acétoxy-1-méthyl-5α-androst-1-èn-3-one (3) (1.40 g, 4.08 mmol) dans du DCM (5 mL) sont ajoutés à température pièce, l'orthoformiate d'éthyle (2.8 mL, 16.83 mmol) et l'acide *para*-toluènesulfonique monohydraté (4.2 mg, 0.02 mmol). À ce mélange est ajouté du

tamis moléculaire A4 afin de capter les molécules d'eau libérées par l'acide *para*-toluènesulfonique. Finalement, l'éthylène glycol (0.6 mL, 10.76 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. La solution est agitée 12 h à 40°C puis est diluée dans du DCM. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> saturée, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 25% v/v) pour obtenir le 17β-acétoxy-3,3-éthylènedioxy-1-méthylène-5α-androstane (5) (0.990 g, 2.55 mmol, 62.5% de rendement). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO), 3.90 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.60 (t, 1H, CH-17), 4.62 et 4.74 (2s, 2H, C=CH<sub>2</sub>). ICPA SM : (M+H)<sup>+</sup> m/z 389.

#### 4.2 3,3-éthylènedioxy-17β-hydroxy-1-méthylène-5α-androstane (6)

À une solution de 17β-acétoxy-3,3-éthylènedioxy-1-méthylène-5α-androstane (5) (0.903 g, 2.33 mmol) dans du méthanol (15 mL) est ajouté à température pièce du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.495 g, 3.59 mmol). La solution est agitée 12 h à 60°C puis est neutralisée avec l'ajout de résine à échange d'ions faiblement acide (Amberlyte IRC-76). La solution est filtrée et le solvant évaporé sous vide. Le produit obtenu (6) est utilisé directement pour la prochaine étape. ICPA SM : (M+H)<sup>+</sup> m/z 347.

#### 4.3 3,3-éthylènedioxy-1-méthylène-5α-androstan-17-one (7)

À une solution de 3,3-éthylènedioxy-17β-hydroxy-1-méthylène-5α-androstane brut (6) (0.856 g, 2.47 mmol) dans du DCM (25 mL) sont ajoutés sous argon et à 0°C le periodinane de Dess-Martin (1.06 g, 2.50 mmol). La solution est agitée 5 min à 0°C et 1 h à température pièce. Le mélange est dilué dans du DCM et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> saturée, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 30% v/v) pour obtenir la 3,3-éthylènedioxy-1-méthylène-5α-androstan-17-one (7) (0.713 g, 2.07 mmol, 83.8% de rendement). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 0.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 3.92 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.65 et 4.78 (2s, 2H, C=CH<sub>2</sub>). ICPA SM : (M+H)<sup>+</sup> m/z 345.

#### 4.4 **3,3-éthylènedioxy-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-1-méthylène-5 $\alpha$ -androstane (8)**

Une solution de chlorure de cérium (III) anhydre (4.40 g, 17.85 mmol) dans le THF (21 mL) est agitée 1 h sous argon à température pièce. La solution est refroidie à -78°C, le MeLi (9 mL, 1.6 M dans l'éther diéthylique, 14.4 mmol) est ajouté goutte à goutte et le mélange réactionnel est agité à -78°C pendant 2 h. La 3,3-éthylènedioxy-1-méthylène-5 $\alpha$ -androstane-17-one (7) (0.544 g, 1.58 mmol) est dissoute dans le THF (10 mL) et la solution est ajoutée goutte à goutte. Ce mélange est agité pendant 4 h en laissant revenir à température pièce dans un contenant de type Dewar. Le milieu réactionnel est dilué dans de l'éther diéthylique et un volume équivalent d'une solution aqueuse de NH<sub>4</sub>Cl saturée est ajouté au milieu réactionnel sous agitation. La phase organique est lavée avec une autre portion de solution aqueuse de NH<sub>4</sub>Cl saturée et de saumure, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 40% v/v) pour obtenir le 3,3-éthylènedioxy-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-1-méthylène-5 $\alpha$ -androstane (8) (0.538 g, 1.49 mmol, 94.3% de rendement). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 0.96 (s, 3H CH<sub>3</sub>-19), 1.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-20), 3.92 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.65 (s, 1H, CH-1), 4.78 (s, 1H, CH-1). ICPA SM : (M+H)<sup>+</sup> m/z 361.

#### 4.5 **17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1)**

La 3,3-éthylènedioxy-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-1-méthylène-5 $\alpha$ -androstane (8) (0.513 g, 1.42 mmol) est mise en solution dans de l'acétone (25 mL). Une solution de HCl 10% v/v (10 mL) est ajoutée sous agitation à température pièce. Le milieu réactionnel est agité pendant 2.5 h, puis est dilué dans une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub>. La phase aqueuse est extraite avec du DCM et la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 40% v/v) pour obtenir la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) (0.404 g, 1.28 mmol, 90.1% de rendement). RMN (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): voir tableau I. TOF SMHR : (M+H)<sup>+</sup> m/z 317.24752.

**Tableau I:** Déplacements chimiques des signaux RMN de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) dans le benzène deutéré.

Étiquette	$\delta$ 13C (ppm)	$\delta$ 1H (ppm)	Patron	Intégration (H)
1	170.0	N/A	N/A	0
2	129.0	5.82	t 2e ordre (1 Hz)	1
3	197.0	N/A	N/A	0
4	41.5	$\alpha$ 2.15; $\beta$ 2.19	dd(0.8 Hz; 4.50 Hz); d(13.45 Hz)	2
5	44.6	$\alpha$ 1.55	s	1
6	28.5	$\alpha$ 1.02; $\beta$ 0.95	m; d(3.3 Hz)	2
7	30.1	$\alpha$ 0.54; $\beta$ 1.32	dd(3.6 Hz; 6.45 Hz);m	2
8	38.6	$\beta$ 1.09	m(singulet qui épaupe un pic)	1
9	49.7	$\alpha$ 0.65	d(1.77 Hz)	1
10	42.3	N/A	N/A	0
11	25.0	$\alpha$ 1.66; $\beta$ 1.15	td(13 Hz;2.9 Hz ); td(13 Hz; 2 Hz)	2
12	31.9	$\alpha$ 1.11; $\beta$ 1.33	m; m	2
13	45.3	N/A	N/A	0
14	51.1	$\alpha$ 1.00	dd(1.8 Hz; 6.8 Hz)	1
15	23.4	$\alpha$ 1.33; $\beta$ 1.06	m; d(6.6 Hz)	2
16	39.0	$\alpha$ 1.56; $\beta$ 1.73	m; tt (3.2 Hz; 11.3 Hz)	2
17	80.6	N/A	N/A	0
18	14.6	0.80	s	3
19	13.3	0.66	s	3
20	26.0	1.08	s	3
21	24.6	1.57	d(1.2 Hz)	3

#### 4.6 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (9)

La 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) (30.6 mg, 0.097 mmol) est mise en solution avec du CeCl<sub>3</sub> anhydre (33.2 mg, 0.135 mmol), 310  $\mu$ L d'éther diéthylique et 780  $\mu$ L de méthanol. Cette solution est agitée pendant 15 min à 0°C et du NaBH<sub>4</sub> (8.9 mg, 0.235 mmol) est ajouté à la solution. Le mélange est agité 30 min et un volume équivalent d'une solution aqueuse de NH<sub>4</sub>Cl saturée est ajouté. Le milieu réactionnel est dilué dans l'éther diéthylique et la phase organique est lavée avec de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et évaporée. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 40 % v/v) pour obtenir le 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (9) (26.1 mg, 0.082 mmol, 84.5% de rendement).

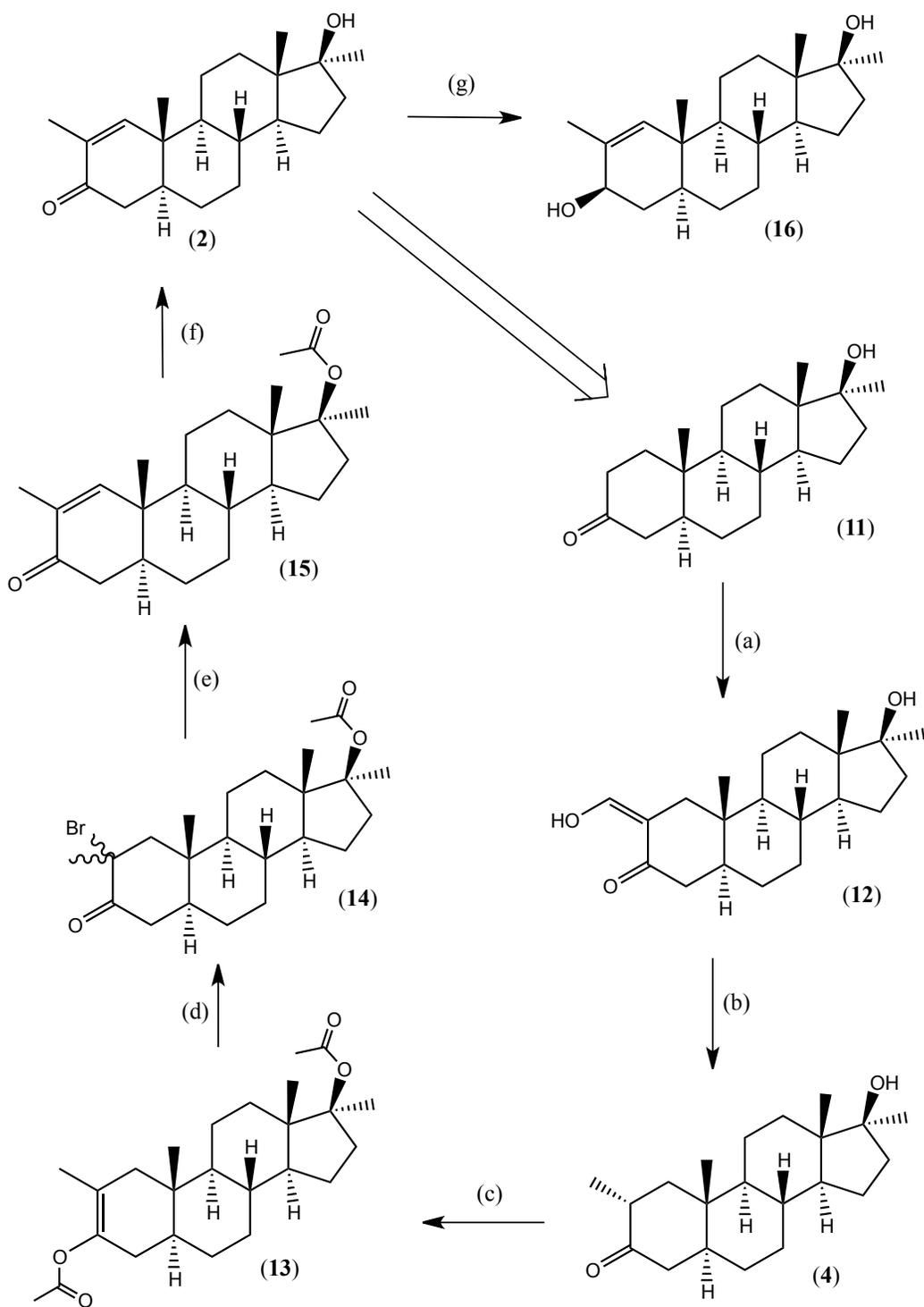
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.85 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 0.98 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 1.17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -17), 1.82 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -1), 4.19 (m, 1H, CH-3 $\alpha$ ), 5.26 (s, 1H, CH-2). TOF SMHR :  $(\text{M}+\text{Na})^+$  m/z 341.24528.

#### 4.7 **3 $\beta$ -(*p*-bromobenzoyloxy)-17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (10)**

Le 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (9) (30.4 mg, 0.096 mmol) est mis en solution avec 300  $\mu\text{L}$  de DCM, 55  $\mu\text{L}$  de triéthylamine (0.394 mmol), le chlorure de *p*-bromobenzoyle (23.5 mg, 0.107 mmol) et le N,N-diméthylaminopyridine (0.47 mg, 0.004 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 3 h. Un volume équivalent d'une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  saturée est ajouté et le milieu réactionnel est dilué dans l'éther diéthylique. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, filtrée et évaporée. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'éluion d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 40 % v/v) pour obtenir le 3 $\beta$ -(*p*-bromobenzoyloxy)-17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (10) (16.5 mg, 0.033 mmol, 34.3% de rendement). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ): 0.84 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 0.89 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 1.10 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -17), 1.69 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -1), 5.40 (s, 1H, CH-2), 5.70 (t,  $J=1\text{Hz}$ , 1H, CH-3 $\alpha$ ), 7.18 (d,  $J=7\text{Hz}$ , 2H, *p*-BrPh), 7.85 (d,  $J=7\text{Hz}$ , 2H, *p*-BrPh). TOF SMHR :  $(\text{M}+\text{Li})^+$  m/z 507.20806.

### 5 **Synthèse de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2)**

La synthèse de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) est effectuée à partir de la 17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstane-3-one (11) achetée de la compagnie Steraloids. La figure 13 illustre la stratégie de synthèse utilisée. La réduction du composé (2) en dérivé 3 $\beta$ -hydroxyle (16), nécessaire à l'identification spectrale RMN du composé (2), est également présentée.



Conditions de réactions : (a) MeONa/MeOH 25% w/w, formate d'éthyle, toluène, température pièce; HCl 10%(v/v), température pièce; (b) Pd/C 10%, H<sub>2</sub>, MeOH, température pièce; (c) DMAP, Et<sub>3</sub>N, anhydride acétique, toluène, température pièce; (d) Br<sub>2</sub> 1.0M AcOH, pyridine/AcOH (1:10), température pièce; (e) LiCl, DMF, 130°C, micro-ondes; (f) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 100°C, micro-ondes; (g) CeCl<sub>3</sub>, NaBH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O/MeOH (1:2.5), température pièce.

**Figure 13** : Schéma de la voie de synthèse utilisée pour l'obtention de la 17β-hydroxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-1-èn-3-one (2).

### 5.1 17β-hydroxy-2-hydroxyméthylène-17α-méthyl-5α-androstan-3-one (12)

À une solution de 17β-hydroxy-17α-méthyl-5α-androstan-3-one (11) (0.600 g, 1.97 mmol) dans le toluène (24 mL) est ajouté le formate d'éthyle (1 mL, 12.39 mmol) à température pièce sous argon. Une solution de MeONa dans le méthanol (1.64 mL, 25% m/v, 5.59 mmol) est ajoutée à la solution de toluène sous argon et est agitée 12 h à température pièce. Un volume équivalent d'une solution aqueuse de NH<sub>4</sub>Cl saturée est ajouté au milieu réactionnel et est agité pendant 30 min. Le milieu réactionnel est dilué dans de l'éther diéthylique et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de NH<sub>4</sub>Cl et avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 28% v/v) pour obtenir la 17β-hydroxy-2-hydroxyméthylène-17α-méthyl-5α-androstan-3-one (12) (0.606 g, 1.82 mmol, 92.4% de rendement). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 0.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-17), 8.60 (s, 1H, C=CH<sub>2</sub>OH), 14.34 (large s, 1H, CHOH). ICPA SM : (M+H)<sup>+</sup> m/z 333.

### 5.2 17β-hydroxy-2α,17α-diméthyl-5α-androstan-3-one (4)

À une solution de 17β-hydroxy-2-hydroxyméthylène-17α-méthyl-5α-androstan-3-one (12) (0.586 g, 1.76 mmol) dans le méthanol (20 mL) est ajouté du palladium sur charbon activé 10% m/m (81 mg). Cette suspension est mise sous atmosphère d'hydrogène et est agitée à température pièce pendant 12 h. Le milieu réactionnel est filtré et le méthanol est évaporé sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 30% v/v) pour obtenir la 17β-hydroxy-2α,17α-diméthyl-5α-androstan-3-one (4) (0.446 g, 1.40 mmol, 79.5% de rendement). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 0.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1.01 (d, J=6.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-2), 1.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-17). ICPA SM : (M+H)<sup>+</sup> m/z 319.

### 5.3 3,17β-diacétoxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-2-ène (13)

À une solution de 17β-hydroxy-2α,17α-diméthyl-5α-androstan-3-one (4) (0.421 g, 1.32 mmol) dans le toluène (8 mL) sont ajoutés la triéthylamine (1.5 mL, 10.75 mmol), la N,N-diméthylaminopyridine (0.116 g, 0.95 mmol) et l'anhydride acétique (0.86 mL, 9.11 mmol) à

température pièce. Le mélange réactionnel est agité et chauffé dans un appareil à micro-ondes à 170°C pendant 2 h. Un volume équivalent d'une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> saturée est ajouté et le mélange est agité pendant 30 min à température pièce. Le milieu réactionnel est dilué dans de l'éther diéthylique et la phase organique est lavée jusqu'à neutralisation avec une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> saturée. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 12 % v/v) pour obtenir le 3,17β-diacétoxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-2-ène (13) (0.249 g, 0.62 mmol, 47.0% de rendement). RMN H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>): 0.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 0.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-17), 1.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-2), 1.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-17-acétoxy), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3-acétoxy). TOF SMHR : (M+Na)<sup>+</sup> m/z 425.26606.

#### 5.4 17β-acétoxy-2ξ-bromo-2ξ,17α-diméthyl-5α-androstan-3-one (14)

Une solution de pyridine et d'acide acétique 10% v/v (30 mL) est utilisée pour dissoudre le 3,17β-diacétoxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-2-ène (13) (0.166 g, 0.41 mmol) à température pièce. Dans cette solution est ajoutée sous agitation une solution 1.0 M de brome moléculaire dans l'acide acétique (0.42 mL, 0.42 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 12 h à température pièce et dilué dans une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> saturée et d'éther diéthylique. La phase étherée est lavée avec une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> saturée jusqu'à neutralisation puis avec une solution aqueuse saturée de NH<sub>4</sub>Cl. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 12 % v/v) pour obtenir la 17β-acétoxy-2ξ-bromo-2ξ,17α-diméthyl-5α-androstan-3-one (14) (0.150 g, 0.34 mmol). Le produit obtenu est utilisé directement pour la prochaine étape.

#### 5.5 17β-acétoxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-1-èn-3-one (15)

À une solution de LiCl (0.923 g, 21.8 mmol) dans le DMF (10.2 mL) est ajoutée la 17β-acétoxy-2ξ-bromo-2ξ,17α-diméthyl-5α-androstan-3-one (14) (0.118 g, 0.27 mmol). Le mélange est agité et chauffé à 130°C dans un appareil à micro-ondes pendant 30 min. La solution est diluée dans de l'éther diéthylique et une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> saturée. La phase étherée est lavée avec

une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  saturée et avec de la saumure. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'éluion d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 14 % v/v) pour obtenir la  $17\beta$ -acétoxy- $2,17\alpha$ -diméthyl- $5\alpha$ -androst-1-èn-3-one (15) (74.3 mg, 0.21 mmol, 77.8% de rendement). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.86 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 0.96 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 1.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -17), 1.72 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -2), 1.96 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -17-acétoxy), 6.87 (s, 1H, CH-1). TOF SMHR :  $(\text{M}+\text{H})^+$  m/z 359.25705.

### 5.6 $17\beta$ -hydroxy- $2,17\alpha$ -diméthyl- $5\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2)

À une solution de  $17\beta$ -acétoxy- $2,17\alpha$ -diméthyl- $5\alpha$ -androst-1-èn-3-one (15) (74.3 mg, 0.21 mmol) dans le méthanol (1.9 mL) est ajouté du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (39.9 mg, 0.29 mmol). Le mélange est agité et chauffé à  $120^\circ\text{C}$  pendant 2 h. Le milieu réactionnel est neutralisé avec un ajout de résine à échange d'ions faiblement acide (Amberlyte IRC-76). Le milieu réactionnel est évaporé sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'éluion d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 30% v/v) pour obtenir la  $17\beta$ -hydroxy- $2,17\alpha$ -diméthyl- $5\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) (46.0 mg, 0.15 mmol, 71.4% de rendement). RMN ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ): voir tableau II. TOF SMHR :  $(\text{M}+\text{H})^+$  m/z 317.24703.

**Tableau II** : Déplacements chimiques des signaux RMN de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) dans le benzène deutéré.

Étiquette	$\delta$ 13C (ppm)	$\delta$ 1H (ppm)	Patron	Intégration (H)
1	152.0	6.54	s	1
2	133.0	N/A	N/A	0
3	198.0	N/A	N/A	0
4	40.9	$\alpha$ 2.18; $\beta$ 2.17	d(2.51 Hz); s	2
5	44.4	$\alpha$ 1.52	m	1
6	27.1	$\alpha$ 1.01; $\beta$ 0.97	m; m	2
7	30.9	$\alpha$ 0.58; $\beta$ 1.41	s; s	2
8	36.1	$\beta$ 1.14	t (3.16 Hz)	1
9	50.1	$\alpha$ 0.50	dt(3.56 Hz; 11.9 Hz)	1
10	38.4	N/A	N/A	0
11	20.7	$\alpha$ 1.40; $\beta$ 1.12	t(3.45 Hz); d(3.75 Hz)	2
12	31.3	$\alpha$ 1.04; $\beta$ 1.38	s; t(3.16 Hz)	2
13	45.6	N/A	N/A	0
14	50.6	$\alpha$ 0.93	dd(1.88 Hz; 7.12 Hz)	1
15	23.1	$\alpha$ 1.37; $\beta$ 1.04	s: s	2
16	39.0	$\alpha$ 1.56; $\beta$ 1.73	s; dt(3.35 Hz; 12.9 Hz)	2
17	80.8	N/A	N/A	0
18	14.0	0.78	s	3
19	12.6	0.65	s	3
20	25.9	1.06	s	3
21	16.3	1.88	d (1.35 Hz)	3

### 5.7 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (16)

La 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) (46.0 mg, 0.145 mmol) est mise en solution avec du CeCl<sub>3</sub> anhydre (49.8 mg, 0.202 mmol) dans de l'éther diéthylique (0.45 mL) et du méthanol (1.15 mL). Le milieu réactionnel est agité 15 min à 0°C. Le NaBH<sub>4</sub> (12.11 mg, 0.320 mmol) est ajouté à la solution et la solution est agitée 30 min. Le milieu de réaction est dilué avec une solution aqueuse de NH<sub>4</sub>Cl saturée et de l'éther diéthylique. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et évaporée. Le produit obtenu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle : hexanes (0 à 40% v/v) pour obtenir le 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (16) (34.6 mg, 0.109 mmol, 75.1% de rendement). RMN <sup>1</sup>H (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): 0.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18),

0.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 1.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-17), 1.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-2), 4.01 (t, J=2.5Hz, 1H, CH-3 $\alpha$ ), 5.64 (s, 1H, CH-1). TOF SMHR : (M+Na)<sup>+</sup> m/z 341.24538.

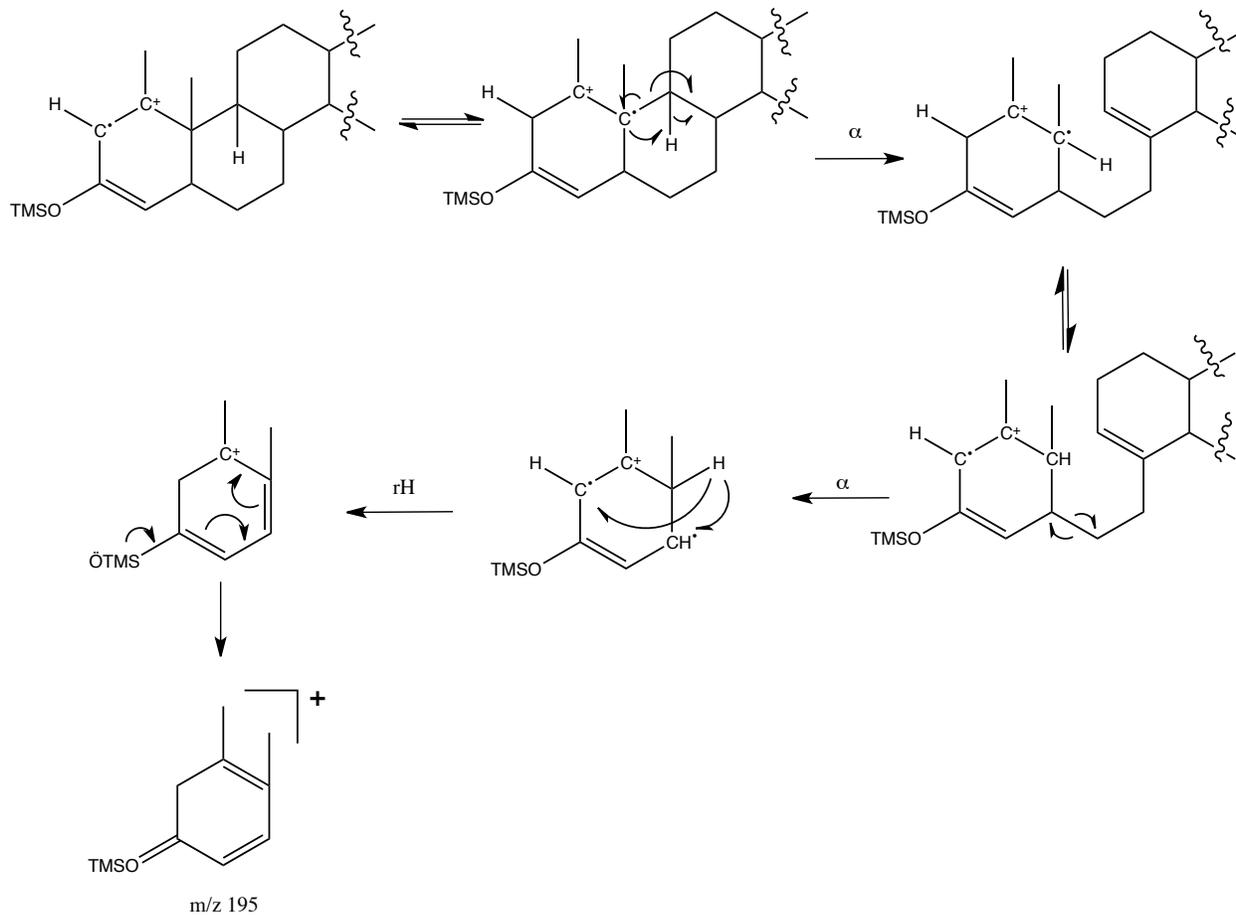
### **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

## 1 Synthèse de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1)

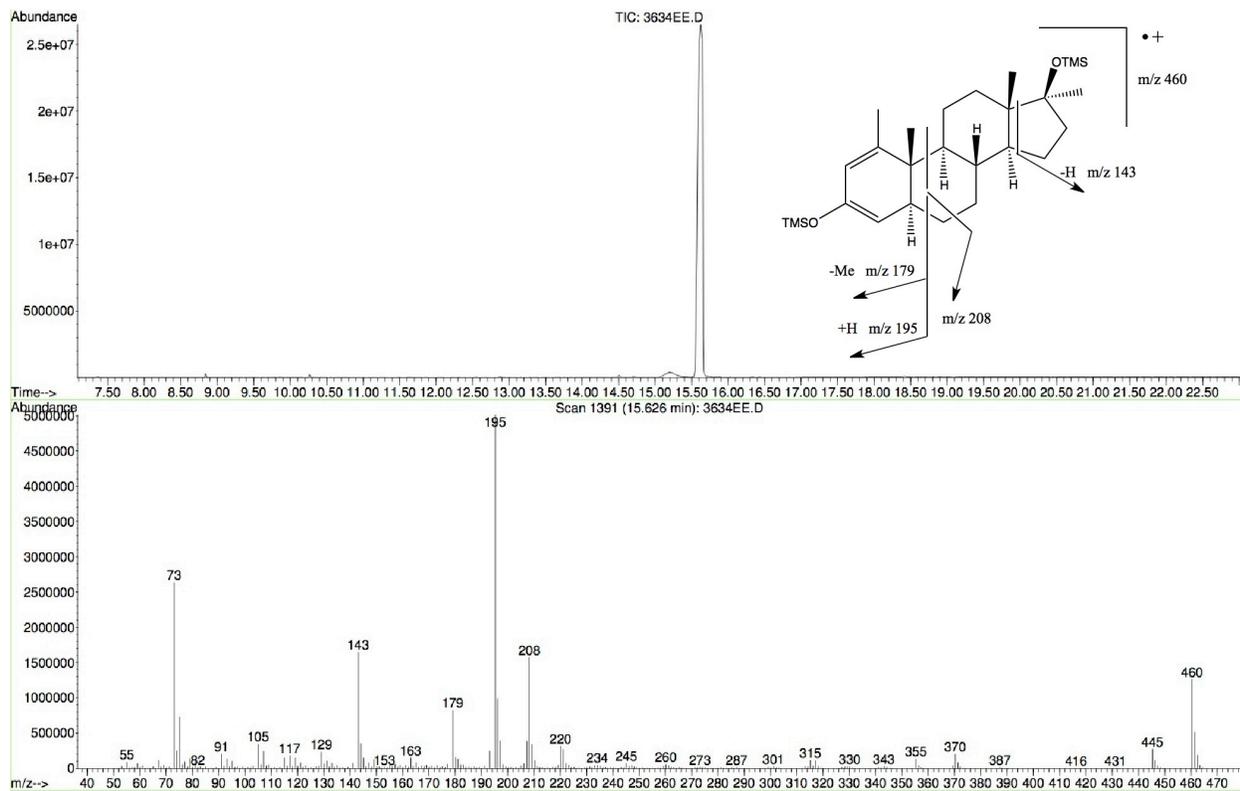
La synthèse de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) à partir de la 17 $\beta$ -acétoxy-1-méthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (3) semblait être la voie la plus efficace et directe. Ainsi, nous avons opté pour la protection de la cétone en C-3 avec un groupement éthylènedioxy en milieu acide anhydre, puis procédé l'hydrolyse du groupement C-17 $\beta$ -OAc en milieu basique. La protection de la cétone en C-3 doit être la première étape pendant qu'il n'y a qu'un seul groupement cétone sur la molécule (Sterzycki 1979), précédant la méthanolyse en milieu alcalin (Plattner, Gless et al. 1974) et l'oxydation de l'hydroxyle par le periodinane de Dess-Martin (Wavrin et Viala 2002). Lors de l'alkylation avec du MeLi, le chlorure de cérium (III) anhydre forme un complexe avec le groupement cétone en C-17 et atténue le caractère alcalin du MeLi pour promouvoir son caractère nucléophile. Ceci assure exclusivement une méthylation aux dépens d'une élimination de proton légèrement acide en C-16 (Ball, Gaunt et al. 2005). De plus, l'encombrement stérique provenant de la présence du groupement C-18-méthyle sur la face  $\beta$  du stéroïde assure une attaque nucléophile sur la face  $\alpha$  de la cétone en C-17. Finalement, l'hydrolyse en milieu aqueux légèrement acide du groupement 3,3-éthylènedioxy permet de régénérer la cétone en C-3 (Gauthier, Goudreault et al. 2009) et d'obtenir la 17 $\alpha$ -méthylméthénolone (1).

Le temps de rétention et le spectre de masse obtenus de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de la 17 $\alpha$ -méthylméthénolone (1) sont identiques à ceux du standard disponible (Poirier et al. en 2006) (figure 15). La comparaison de ce spectre avec celui du dérivé TMS de la méthénolone permet de constater un gain de masse de 14 u.m.a., l'apparition de l'ion à  $m/z$  143 (ion caractéristique des dérivés TMS 17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyle) et la conservation du groupe d'ions à  $m/z$  179-195-208, tous indicateurs de la similarité entre le cycle A et B de la méthénolone et de son analogue méthylé (figure 16). La fragmentation caractéristique du cycle A pour produire le groupe d'ions à  $m/z$  179-195-208 provient du bris des liens en position C-6,7 et C-9,10 (ion à  $m/z$  208) ainsi que d'un réarrangement du cycle A lors de la fragmentation (figure 14) pour produire les ions à  $m/z$  195 et 179 par perte d'un méthyle. L'ion 195 sera absent de la fragmentation de la molécule si le cycle A de celle-ci se retrouve modifié. Les spectres de masse non-dérivés de la 17 $\alpha$ -

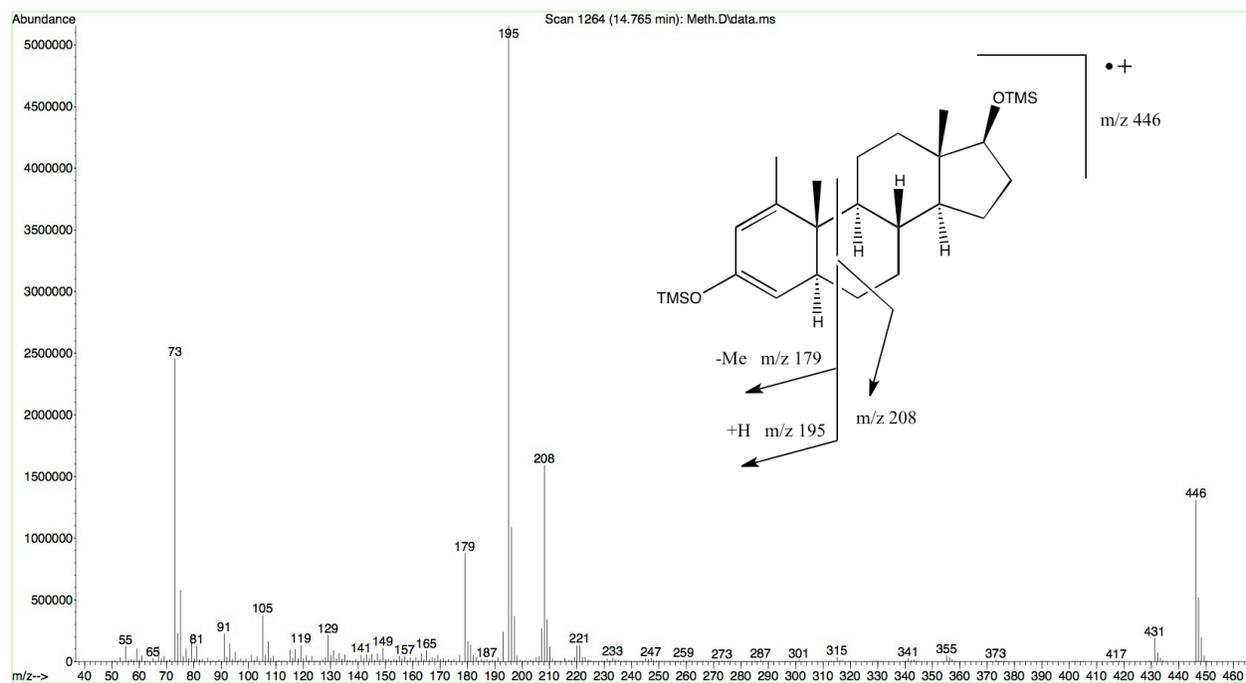
méthylméthénolone (1) (figure 17) et de la méthénolone (figure 18) sont également ajoutés à titre comparatif.



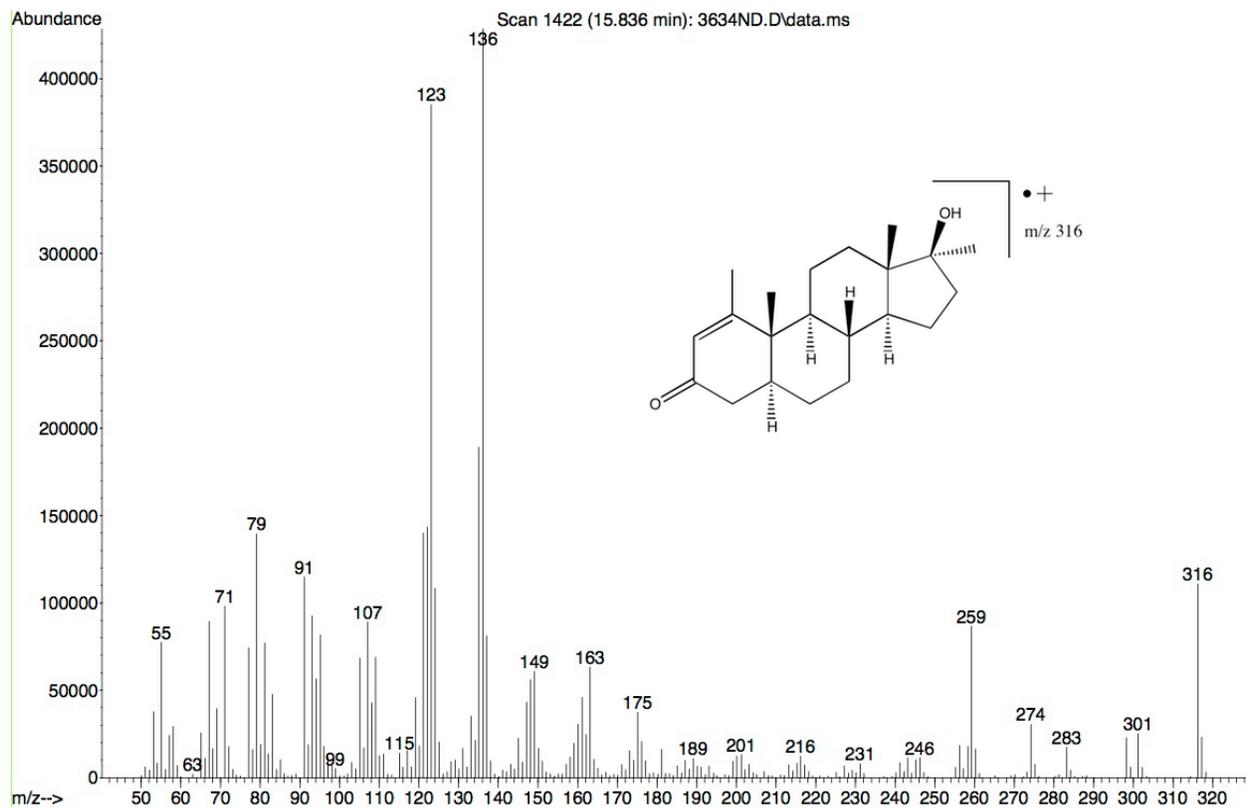
**Figure 14 :** Mécanisme de fragmentation du cycle A et B de la méthénolone pour produire l'ion à m/z 195.



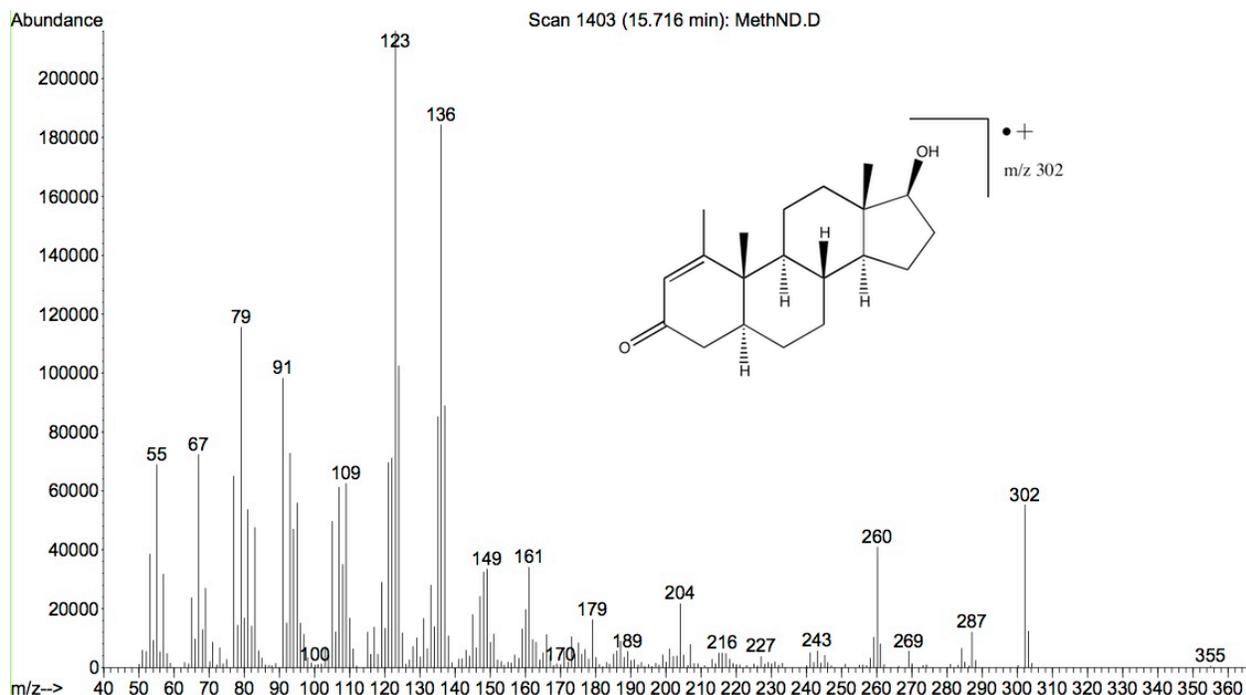
**Figure 15 :** Chromatogramme ionique total, spectre de masse, fragmentation et structure proposée pour le dérivé triméthylsilyle de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) de synthèse préparée au laboratoire Lavallée.



**Figure 16 :** Spectre de masse, fragmentation et structure du dérivé TMS de la méthénolone.



**Figure 17** : Spectre de masse, fragmentation et structure de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1).

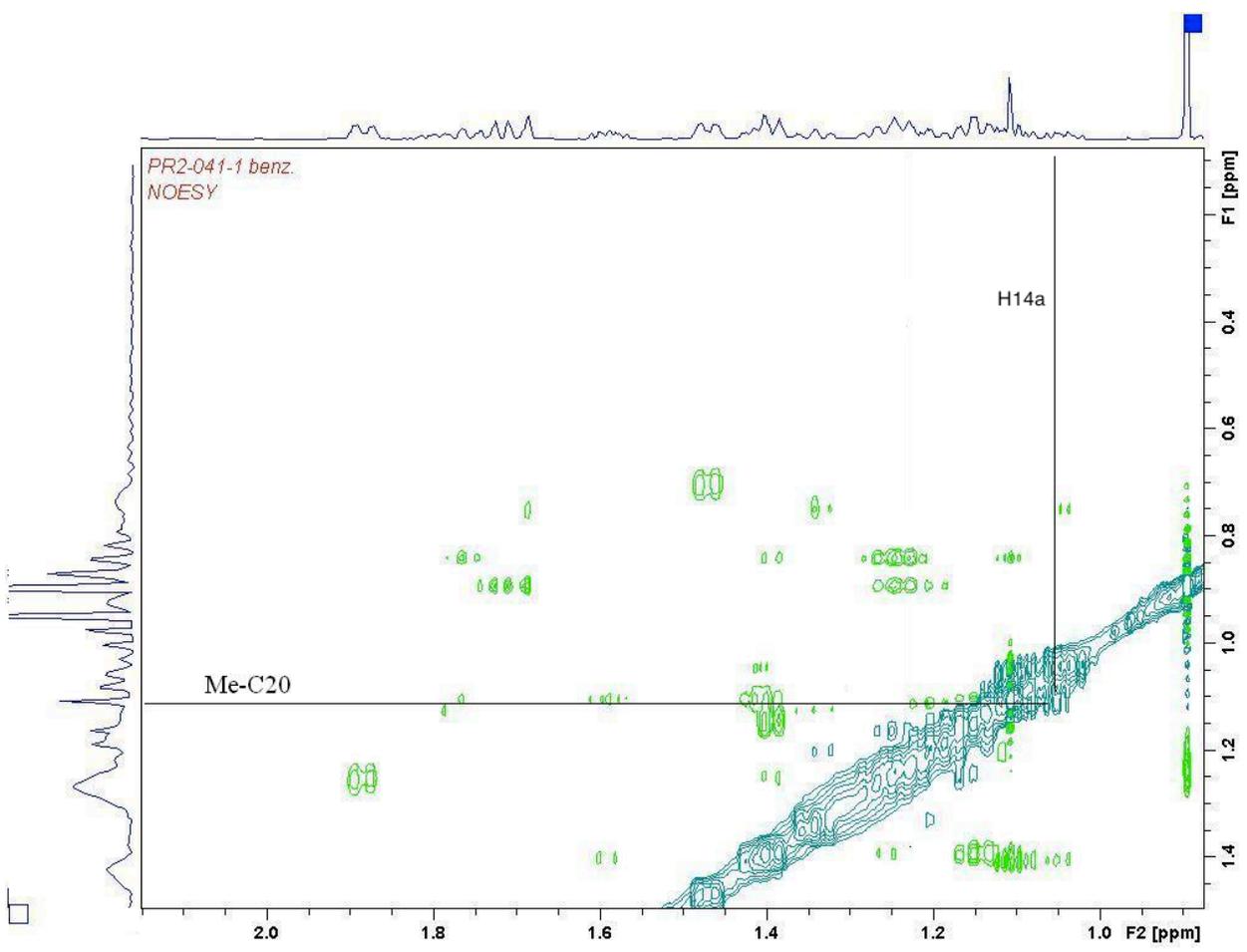
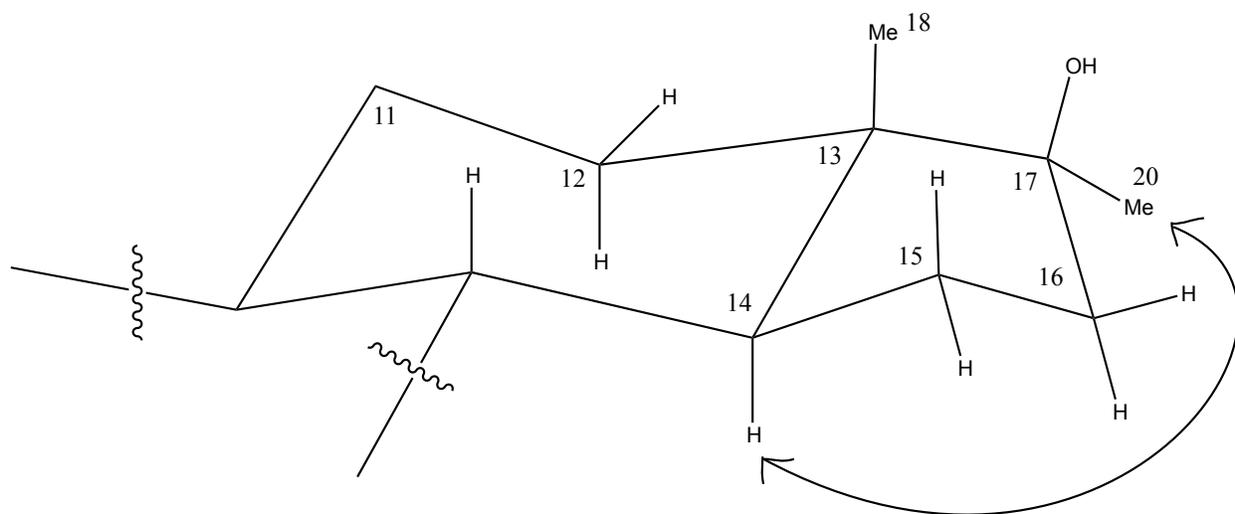


**Figure 18** : Spectre de masse, fragmentation et structure de la méthénolone.

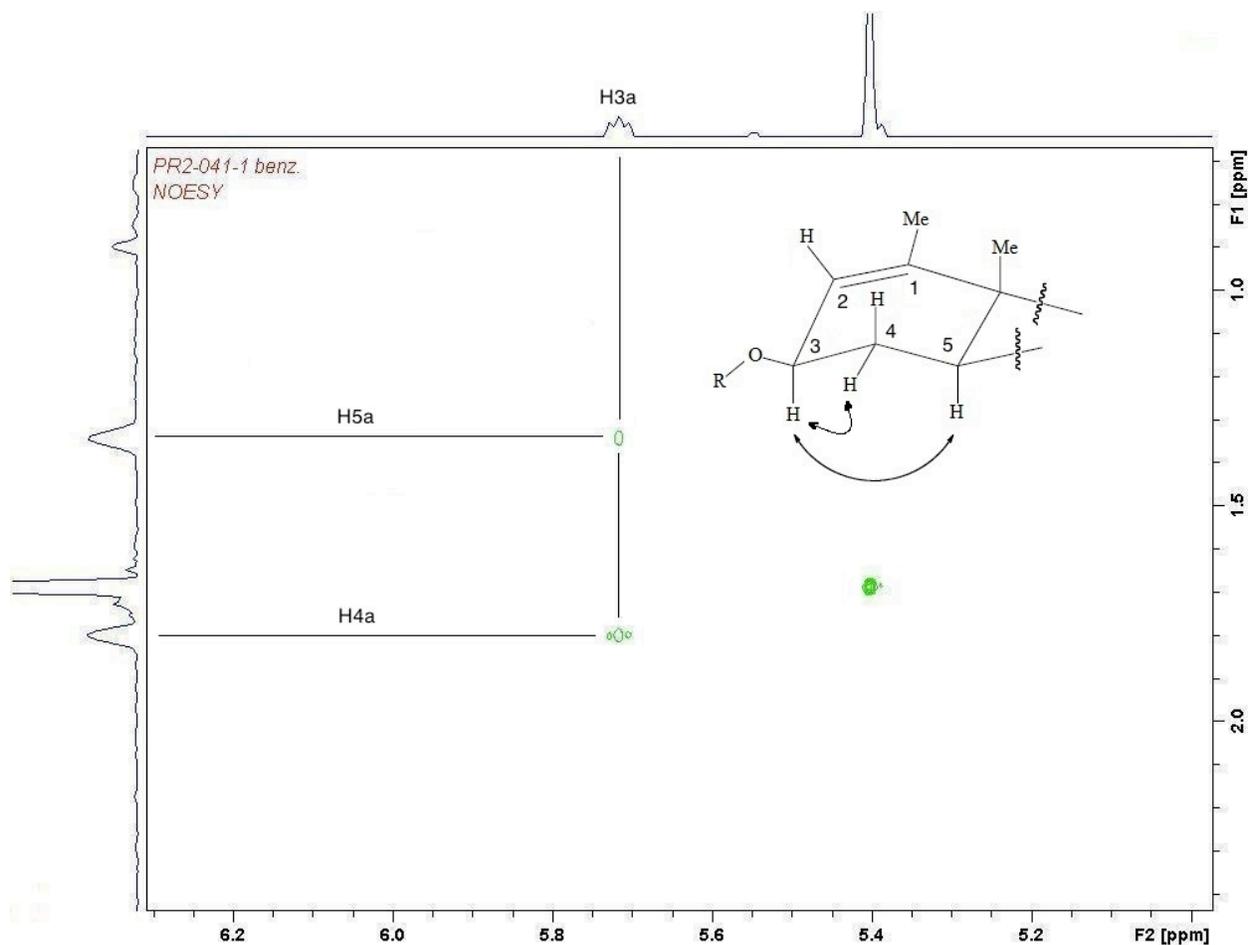
La stéréochimie des groupements  $17\alpha$ -méthyle et  $3\beta$ -hydroxyle est confirmée par l'analyse du spectre de RMN 2D NOESY du dérivé  $3\beta$ -(*p*-bromobenzoyloxy)- $17\beta$ -hydroxy- $1,17\alpha$ -diméthyl- $5\alpha$ -androst-1-ène (10) (figures 19 et 20). Une réduction du groupement cétone en C-3 de la  $17\beta$ -hydroxy- $1,17\alpha$ -diméthyl- $5\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) avec un mélange de  $\text{NaBH}_4$  et de  $\text{CeCl}_3$  anhydre est nécessaire (Menberu, Nguyen Phuoc et al. 1992). La présence de chlorure de cérium dirige la réactivité du  $\text{NaBH}_4$  sur la cétone plutôt que sur l'insaturation en C-1,2. L'analogue  $3\beta$ -hydroxyle (9) est ensuite mis à réagir avec du chlorure de *p*-bromobenzoyle pour obtenir un dérivé  $3\beta$ -(*p*-bromobenzoyloxy) (10).

La synthèse de ce dérivé nous a permis d'obtenir une dispersion suffisante des nombreux signaux RMN  $^1\text{H}$  afin de bien discerner les signaux des protons en position C- $14\alpha$  (1.05 ppm) et en C-20 (méthyle en position C- $17\alpha$ , 1.1 ppm). Après avoir identifié les déplacements chimiques des hydrogènes et des carbones à l'aide des spectre RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HMBC et HSQC, une expérience de RMN 2D NOESY permet de constater une interaction internucléaire entre l'hydrogène et le groupement méthyle, démontrant une proximité dans l'espace (figure 19). La

distance entre l'hydrogène en position C-14 $\alpha$  et un méthyle en position C-17 $\beta$  aurait été trop grande pour mesurer une corrélation spatiale. De la même manière, l'interaction internucléaire entre l'hydrogène axial 3 $\alpha$  (5.7 ppm) et l'hydrogène 5 $\alpha$  (1.34 ppm) est explicable par leur proximité spatiale alors qu'un hydrogène équatorial en position C-3 aurait été trop distant de l'hydrogène en 5 $\alpha$  pour produire une interaction internucléaire (figure 20). Ce signal NOESY signifie donc l'obtention d'un hydroxyle en 3 $\beta$  lors de la réduction de la cétone par NaBH<sub>4</sub> en présence de chlorure de cérium (III).



**Figure 19** : Spectre NOESY entre le proton 14 $\alpha$  (1.05 ppm) et les protons 17 $\alpha$ -méthyle (1.1 ppm) du 3 $\beta$ -(*p*-bromobenzoyloxy)-17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (10) dans le benzène deutéré.



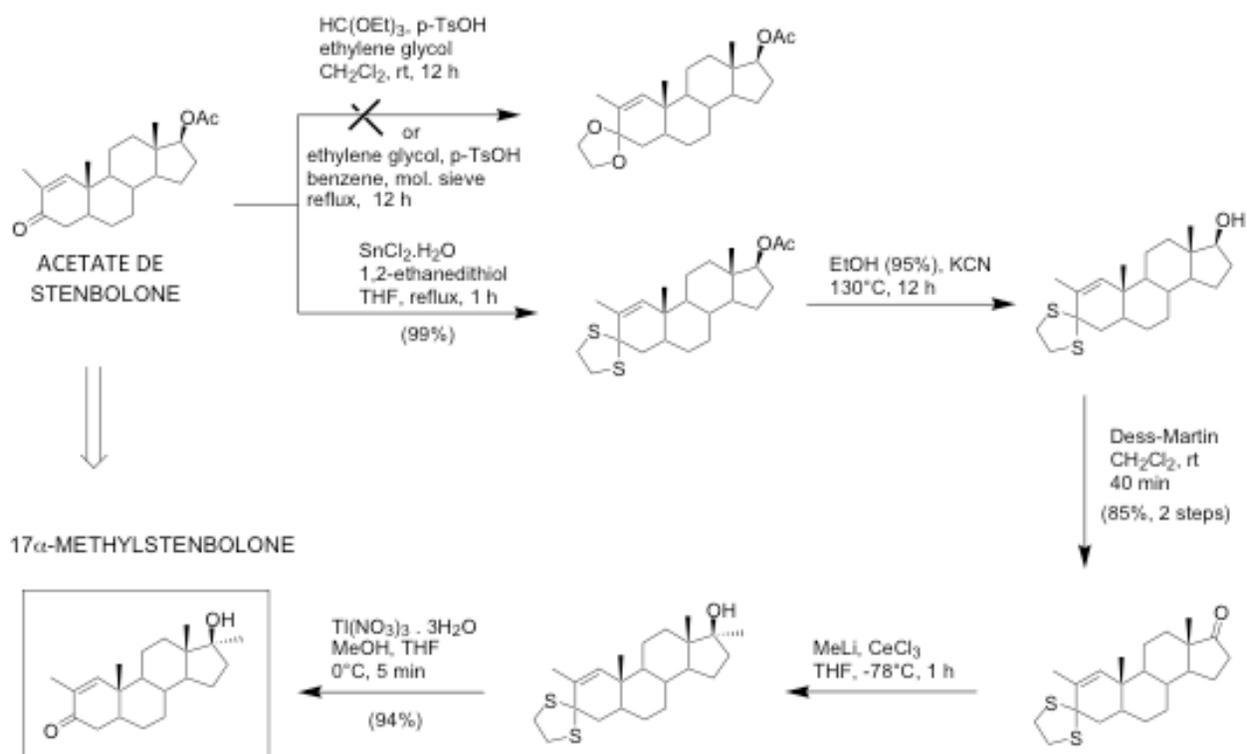
**Figure 20** : Spectre NOESY entre le proton 3 $\alpha$  et les protons 4 $\alpha$  et 5 $\alpha$  du 3 $\beta$ -(*p*-bromobenzoyloxy)-17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (10) dans le benzène deutéré.

## 2 Synthèse de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2)

La synthèse de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) est amorcée avec la 17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androstan-3-one (11). Présentant déjà un groupement méthyle en position C-17 $\alpha$ , il ne manque qu'un méthyle en position C-2 et une insaturation en C-1,2. Le traitement de la 17 $\alpha$ -méthyl-dihydrotestostérone (11) dans un milieu anhydre contenant du MeONa permet d'énoliser la fonction cétone en C-3. Le nouveau sel sodique formé via l'énolate du stéroïde réagit ensuite avec du formate d'éthyle. L'attaque nucléophile sur le carbonyle du formate d'éthyle suivie de l'élimination d'un anion éthanoate permet d'ajouter le groupement formyle en C-2. Le sel sodique du stéroïde est acidifié pour générer sa forme libre portant un

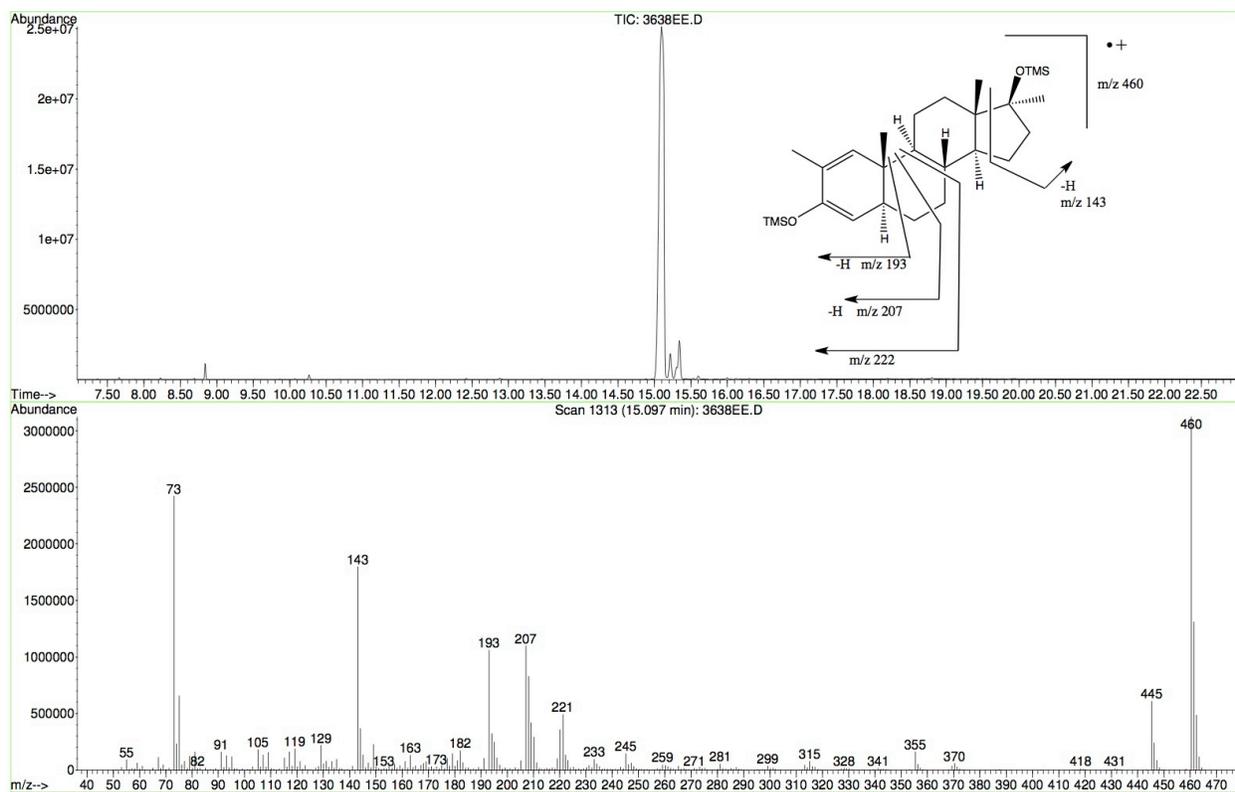
groupement cétone en C-3 et un groupement hydroxyméthylène en C-2 (Djerassi, Finch et al. 1960). Ce groupement est réduit dans une suspension de catalyseur de palladium sur charbon activé (10% m/V) sous une atmosphère d'hydrogène pour générer un groupement méthyle en C-2 $\alpha$  (Djerassi, Finch et al. 1960). L'acétylation de l'alcool en C-17 $\beta$  et de la cétone en C-3 est essentielle, car elle permet de protéger un groupement hydroxyle tertiaire labile en condition acide (dans les réactions subséquentes) et permet d'introduire une double liaison en C-2,3. Celle-ci permet d'obtenir une grande sélectivité lors de la réaction de bromation car en son absence, l'halogénéation aurait lieu en C-2 et en C-4 de manière aléatoire. L'acétylation est effectuée avec de l'anhydride acétique et de la triéthylamine pour capter l'acide formé lors de la réaction et une quantité catalytique de N,N-diméthylaminopyridine (Höfle, Steglich et al. 1978). Le stéroïde acétylé est bromé dans une solution de pyridine : acide acétique (10% v/v) avec une quantité stoechiométrique de brome moléculaire. La bromation en C-2 $\xi$  est effectuée en même temps que la perte du groupement acétyle en C-3 pour régénérer la cétone correspondante (Mazur et Sondheimer 1958). La déhydrobromation de l'intermédiaire 14 dans une solution de LiCl et de diméthylformamide permet d'introduire une insaturation en C-1,2 (Mazur et Sondheimer 1958). La méthanolyse en milieu alcalin de l'acétate en C-17 $\beta$  (Plattner, Gless et al. 1974) permet d'obtenir la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone (2).

Dans le cas de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone (2), la stratégie de synthèse utilisée par Poirier *et al.* débutait avec l'acétate de stenbolone. Les étapes de synthèse étaient similaires à celles décrites précédemment pour la 17 $\alpha$ -méthylméthénolone (1) avec de légères différences de réactifs (protection de la cétone, désacétylation en C-17 $\beta$ , oxydation de l'alcool en C-17 $\beta$ , alkylation avec du méthyllithium et déprotection de la cétone) (figure 21). Cette approche n'était pas possible dans notre cas, le laboratoire ne disposant plus d'acétate de stenbolone en quantité suffisante.

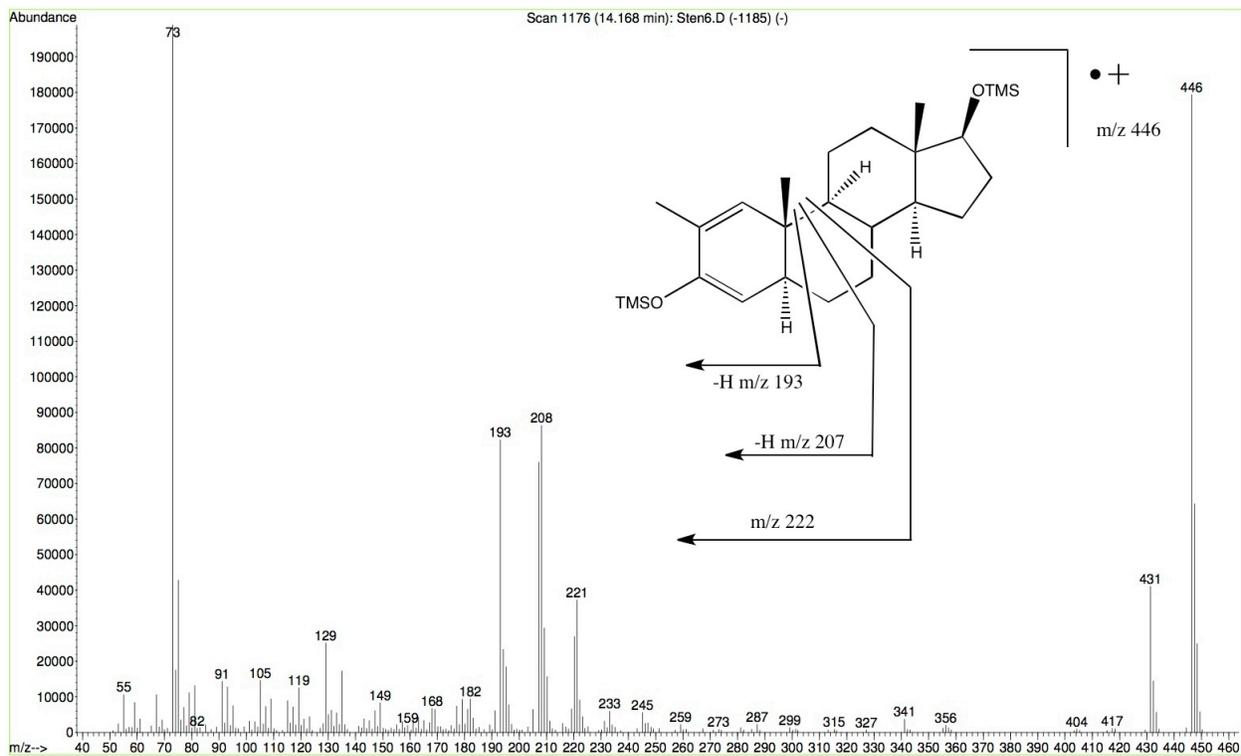


**Figure 21** : Schéma de la voie de synthèse utilisée par Poirier et al. pour l'obtention de la 17β-hydroxy-2,17α-diméthyl-5α-androst-1-èn-3-one (2).

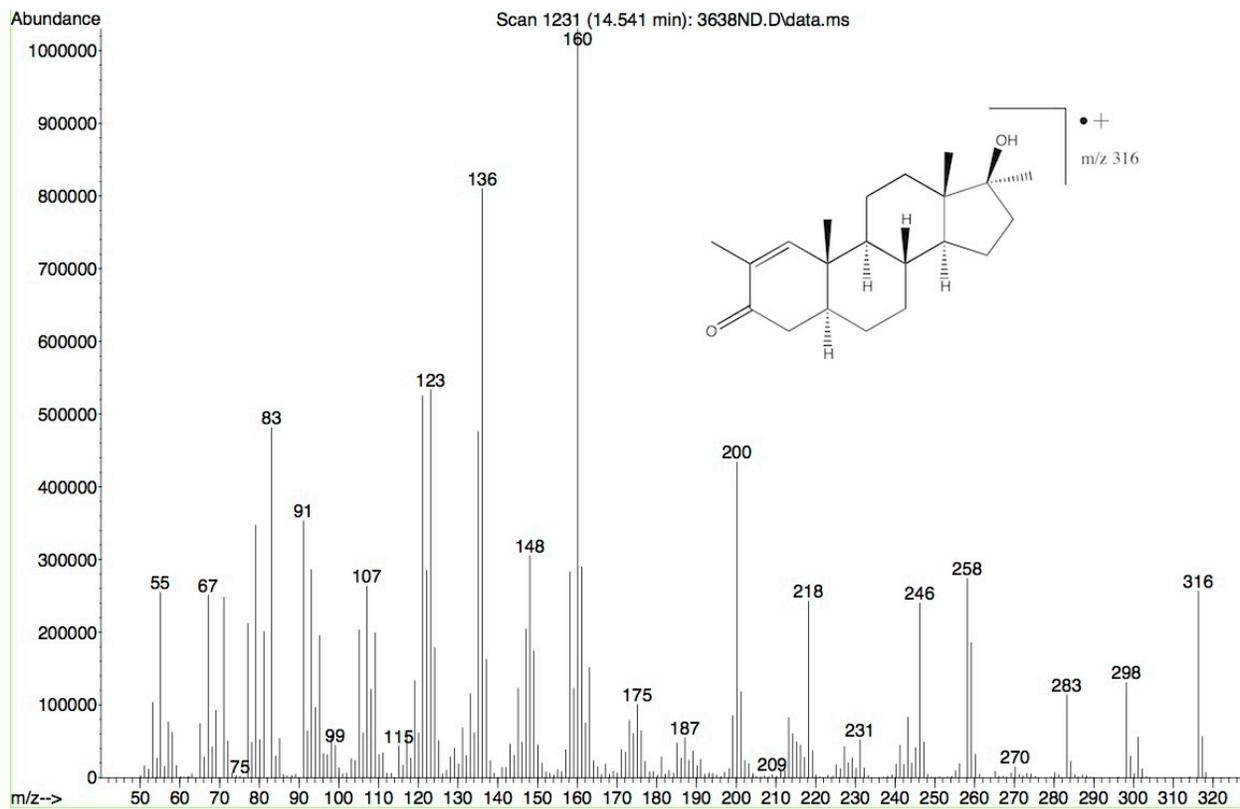
Les temps de rétention et les spectres de masse obtenus de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de la 17α-méthylstenbolone (2) sont identiques à ceux du produit préparé par Poirier *et al.* en 2006 (figure 22). La comparaison du spectre de masse obtenu avec celui de la stenbolone (figure 23) permet de constater un gain de masse de 14 u.m.a. et la conservation du groupement d'ions issu de la fragmentation du cycle B (ions à m/z 193, 207 et 222). L'ion à m/z 143 vient confirmer que le cycle D est 17β-hydroxy-17α-méthylé. Les spectres de masse non-dérivés de la 17α-méthylstenbolone (2) (figure 24) et de la stenbolone (figure 25) sont présentés à des fins de comparaison.



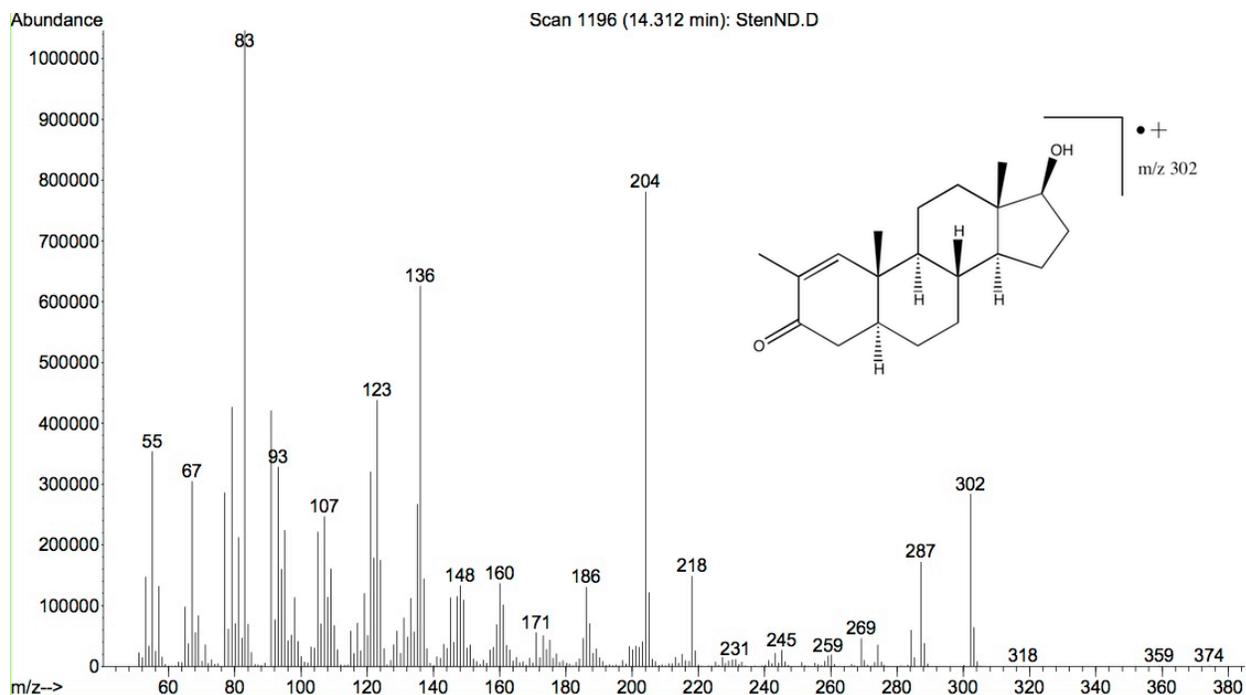
**Figure 22** : Chromatogramme ionique total, spectre de masse, fragmentation et structure proposées pour le dérivé triméthylsilyle de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) de synthèse.



**Figure 23** : Spectre de masse, fragmentation et structure du dérivé TMS de la stenbolone.



**Figure 24** : Spectre de masse, fragmentation et structure de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2).

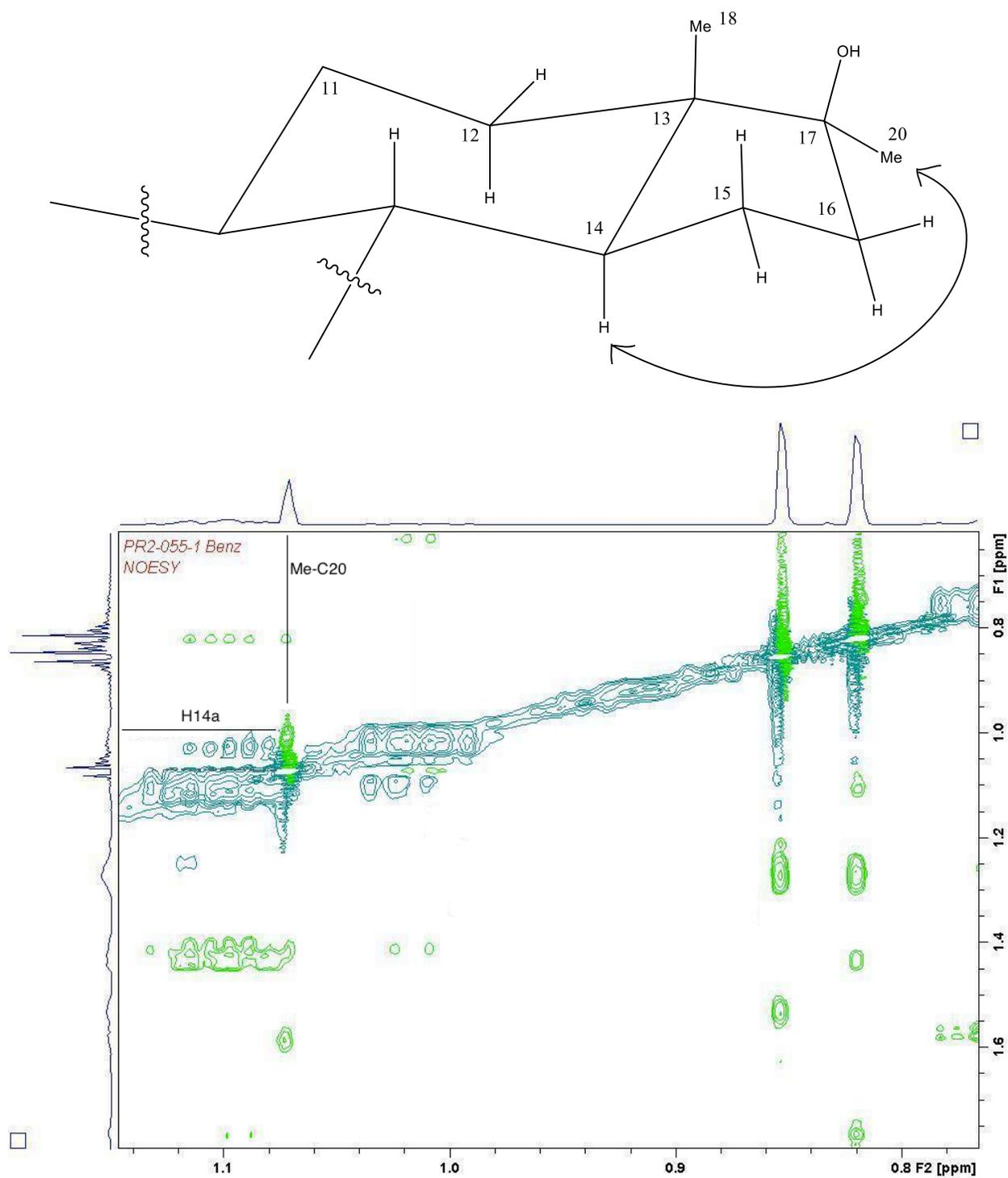


**Figure 25** : Spectre de masse, fragmentation et structure de la stenbolone.

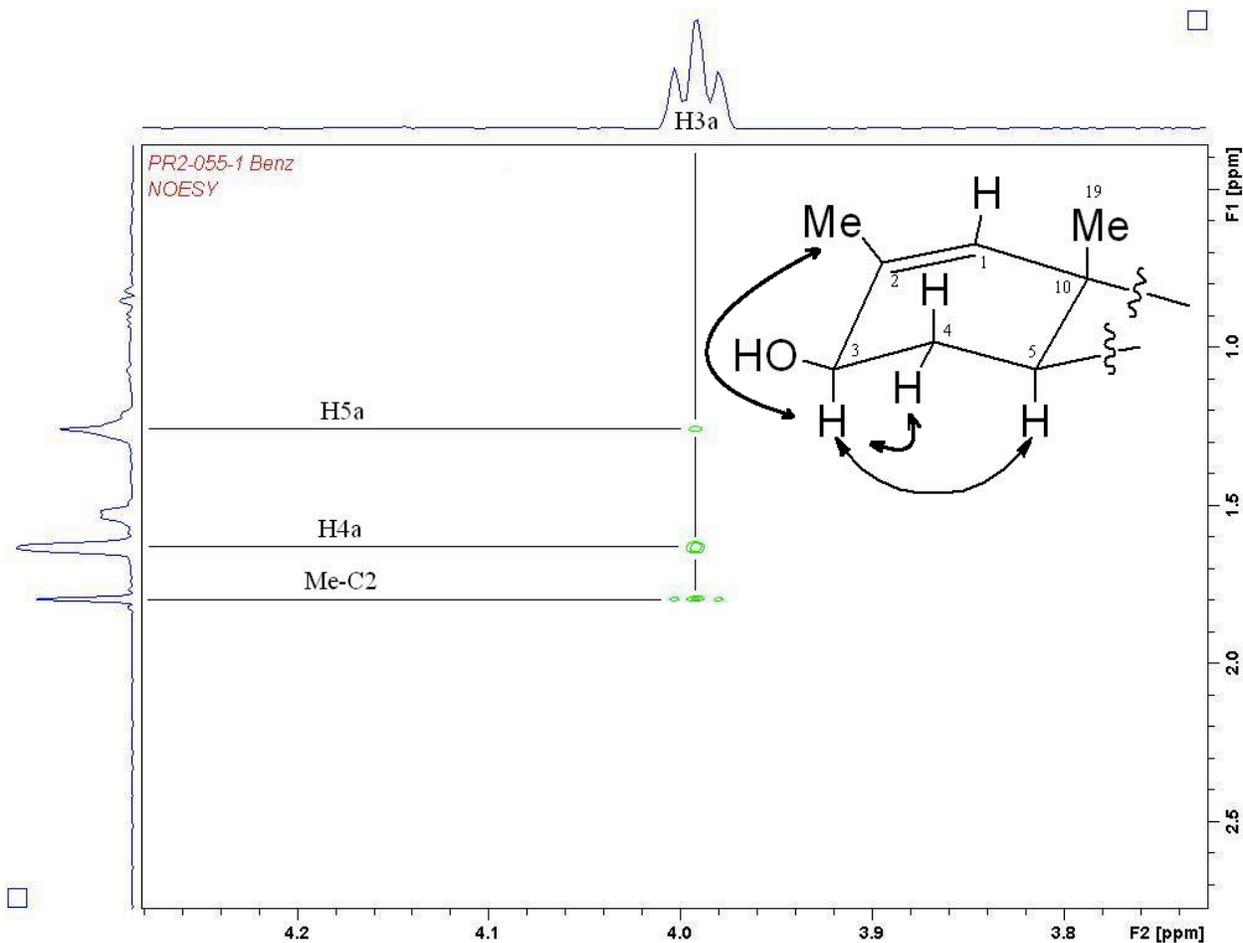
La stéréochimie du groupement  $17\alpha$ -méthyle est confirmée par l'analyse du spectre de RMN 2D NOESY d'un dérivé de la  $17\alpha$ -méthylstenbolone (2), le  $3\beta,17\beta$ -dihydroxy-2, $17\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (16) (figures 26 et 27). La réduction de la cétone en C-3 est obtenue dans les mêmes conditions de réduction décrites précédemment pour l'obtention du  $3\beta,17\beta$ -dihydroxy-1, $17\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (9) (Menberu, Nguyen Phuoc et al. 1992).

Similairement au  $3\beta$ -(*p*-bromobenzoyloxy)- $17\beta$ -hydroxy-1, $17\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (10), la synthèse du  $3\beta,17\beta$ -dihydroxy-2, $17\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (16) nous permet d'obtenir une dispersion suffisante des nombreux signaux RMN  $^1\text{H}$  afin de bien discerner les signaux des protons en C- $14\alpha$  (1.01 ppm) et en C-20 (méthyle en position C- $17\alpha$ , 1.07 ppm) (figure 26). Après avoir identifié les déplacements chimiques des hydrogènes et des carbones à l'aide des spectres RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HMBC et HSQC, une expérience de RMN 2D NOESY permet de constater une interaction internucléaire, démontrant une proximité dans l'espace du proton en position C- $14\alpha$  et du méthyle en position C- $17\alpha$ . La même expérience de RMN 2D NOESY

permet également de démontrer l'obtention d'un hydroxyle en C-3 $\beta$  en observant une interaction internucléaire entre l'hydrogène C-3 $\alpha$  (3.98 ppm) et l'hydrogène C-5 $\alpha$  (1.26 ppm) (figure 27).



**Figure 26 :** Spectre NOESY entre le proton 14 $\alpha$  et les protons 17 $\alpha$ -méthyle de la 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (16) dans le benzène deutéré.

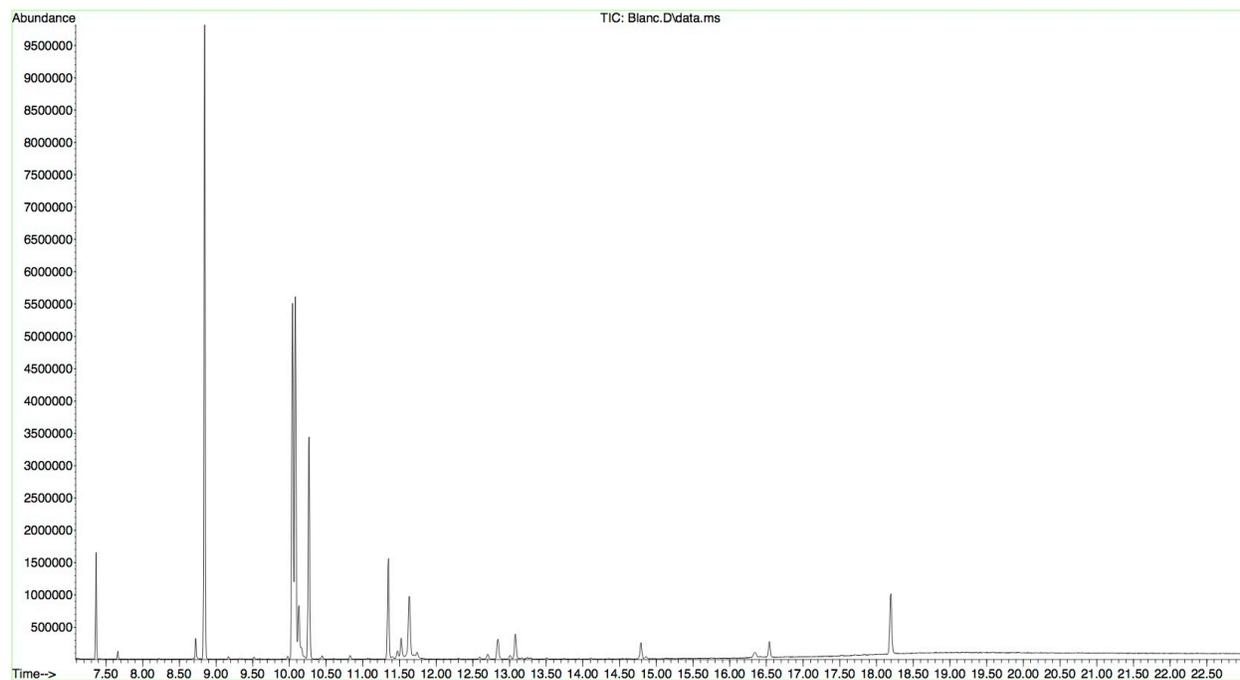


**Figure 27** : Spectre NOESY entre le proton 3 $\alpha$  et les protons 4 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , du méthyle en C2 de la 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-ène (16) dans le benzène deutéré.

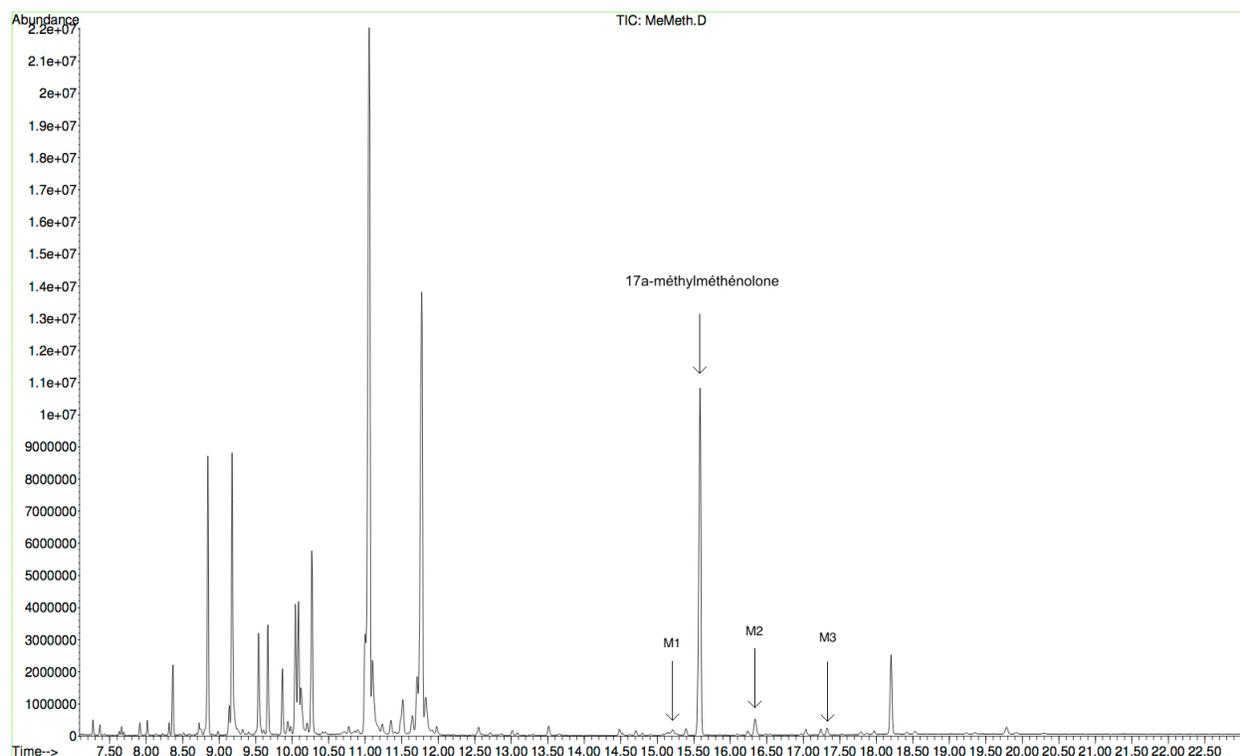
### 3 Incubation avec les fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains

#### 3.1 Incubation avec la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1)

Le chromatogramme de la figure 28 provient de l'analyse par CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant d'un contrôle négatif d'incubation de fractions subcellulaires S9. L'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) avec les fractions subcellulaires S9 a permis d'obtenir trois métabolites dont l'analyse a été effectuée par CG-SM (figure 29).

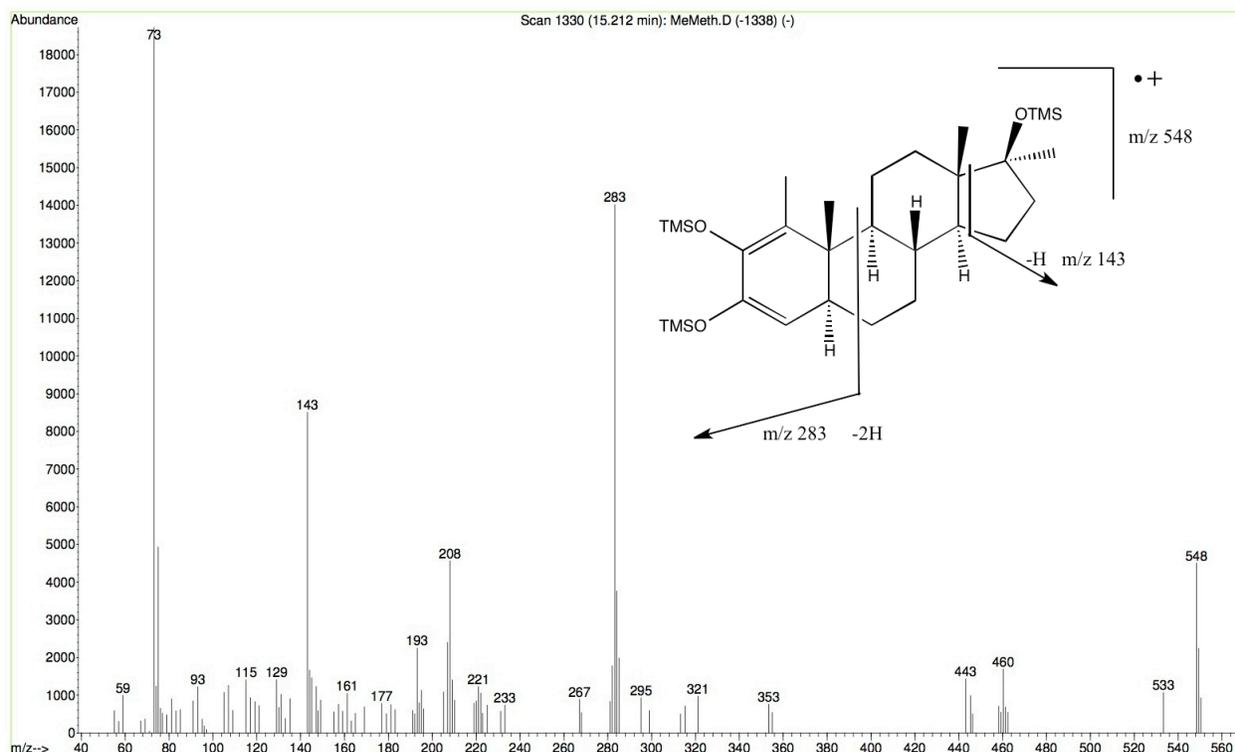


**Figure 28 :** Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant du contrôle négatif de l'incubation fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains.



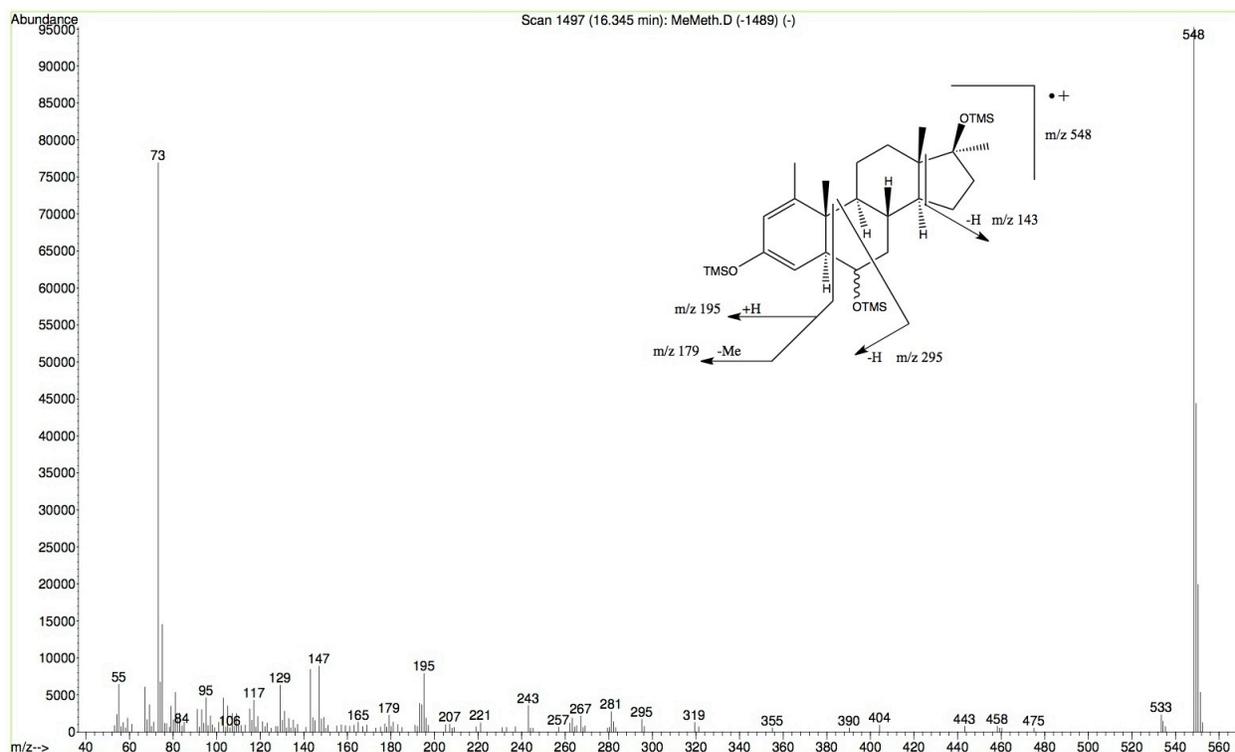
**Figure 29** : Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) avec des fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains.

Le spectre du premier métabolite (M1) présenté à la figure 30 possède un ion moléculaire à  $m/z$  548, indiquant l'ajout d'un groupement hydroxyle. L'ion à  $m/z$  143 suggère que le cycle D 17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthylé est intact (Brooks, Thawley et al. 1971, Middleditch, Vouros et al. 1973) et la modification du groupe d'ions à  $m/z$  179-195-208 pour devenir 193-208-221 informe d'un changement de la structure sur le cycle A. L'ion majoritaire à  $m/z$  283 ( $m/z$  193 + 90 provenant de l'ajout d'un hydroxyle et d'un TMS) suggère également la présence du groupement hydroxyle sur le cycle A. Goudreault *et al.* ont rapporté la formation d'un métabolite hydroxylé en C-2 suite à l'administration de méthénolone chez un volontaire. Ce métabolite présentait un ion majoritaire à  $m/z$  283, correspondant au bris des liens C9-C10 et C5-C6 du cycle B (Goudreault et Massé 1990). La fragmentation similaire nous permet de postuler la présence de la fonction hydroxyle en C-2 de la 17 $\alpha$ -méthylméthénolone. La caractérisation complète par synthèse chimique sera effectuée dans des travaux futurs.



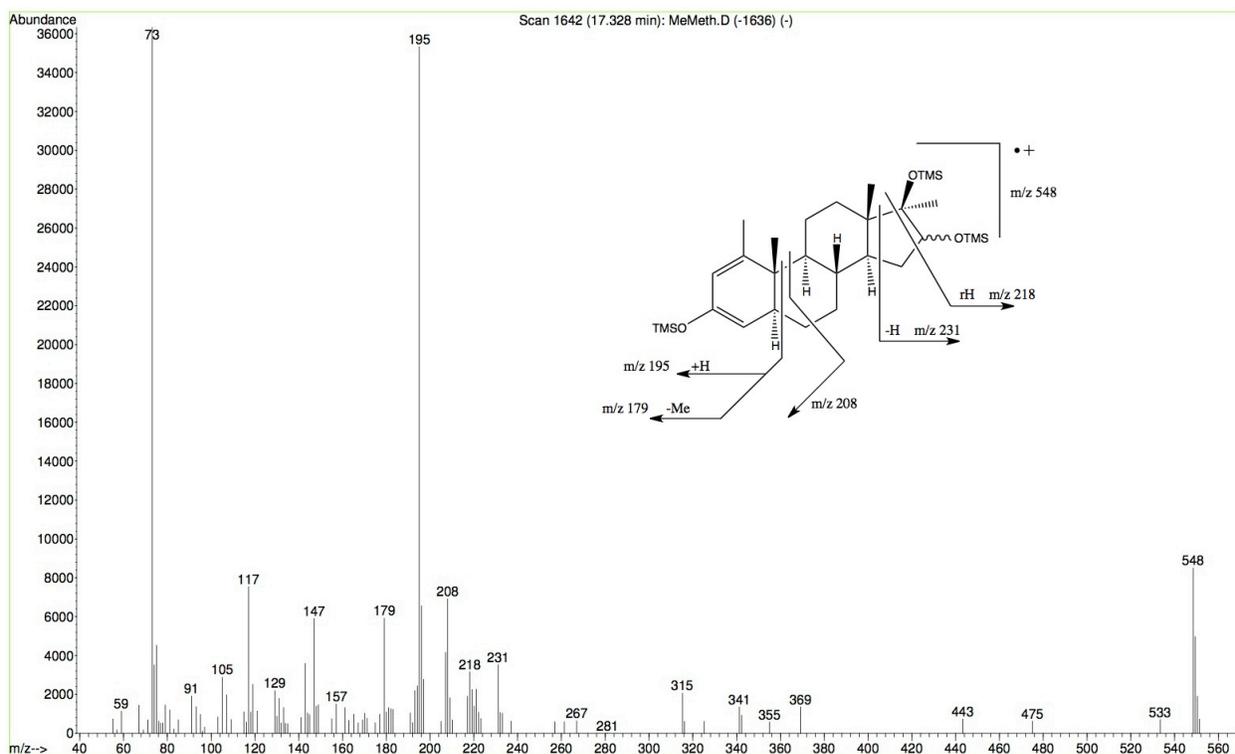
**Figure 30 :** Spectre de masse, fragmentation et structure proposée pour le dérivé triméthylsilyle du métabolite (M1) provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) en présence de fractions S9 d'hépatocytes humains.

Le spectre de masse du dérivé TMS du deuxième métabolite détecté (M2) (figure 31) possède un ion moléculaire à m/z 548, ce qui suggère encore une fois l'ajout d'un groupement hydroxyle (+ 88 u.m.a.). Les ions caractéristiques à m/z 143 et 179-195-208 sont toujours présents, ce qui indique des cycles A et D intacts. Le spectre de masse présente un ion à m/z 295, similaire à celui observé dans le spectre de masse du métabolite 6-hydroxyle de la méthénolone (TMS) rapporté par Goudreault et Massé (1990). Les informations obtenues de l'analyse du spectre de masse ne nous permettent pas de déterminer l'orientation  $\alpha$  ou  $\beta$  du groupement 6-hydroxyle.



**Figure 31 :** Spectre de masse, fragmentation et structure proposée pour le dérivé triméthylsilyle du métabolite (M2) provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) en présence de fractions S9 d'hépatocytes humains.

Le spectre de masse du dérivé TMS du troisième métabolite détecté (M3) (figure 32) possède un ion moléculaire à m/z 548, indiquant un métabolite hydroxylé. L'ensemble d'ions à m/z 179-195-208 est conservé, indiquant des cycles A et B intacts. La paire d'ions à m/z 218 et 231 suggère la présence du groupe C-16 $\xi$ -hydroxyle, ces fragments ayant déjà été caractérisés dans le passé pour des stéroïdes similaires synthétisés au laboratoire (dérivés TMS d'androstanes à cycle D 17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthylé) (Schanzer, Geyer et al. 1991). L'orientation  $\alpha$  ou  $\beta$  du groupement 16-hydroxyle n'a pas été déterminée.

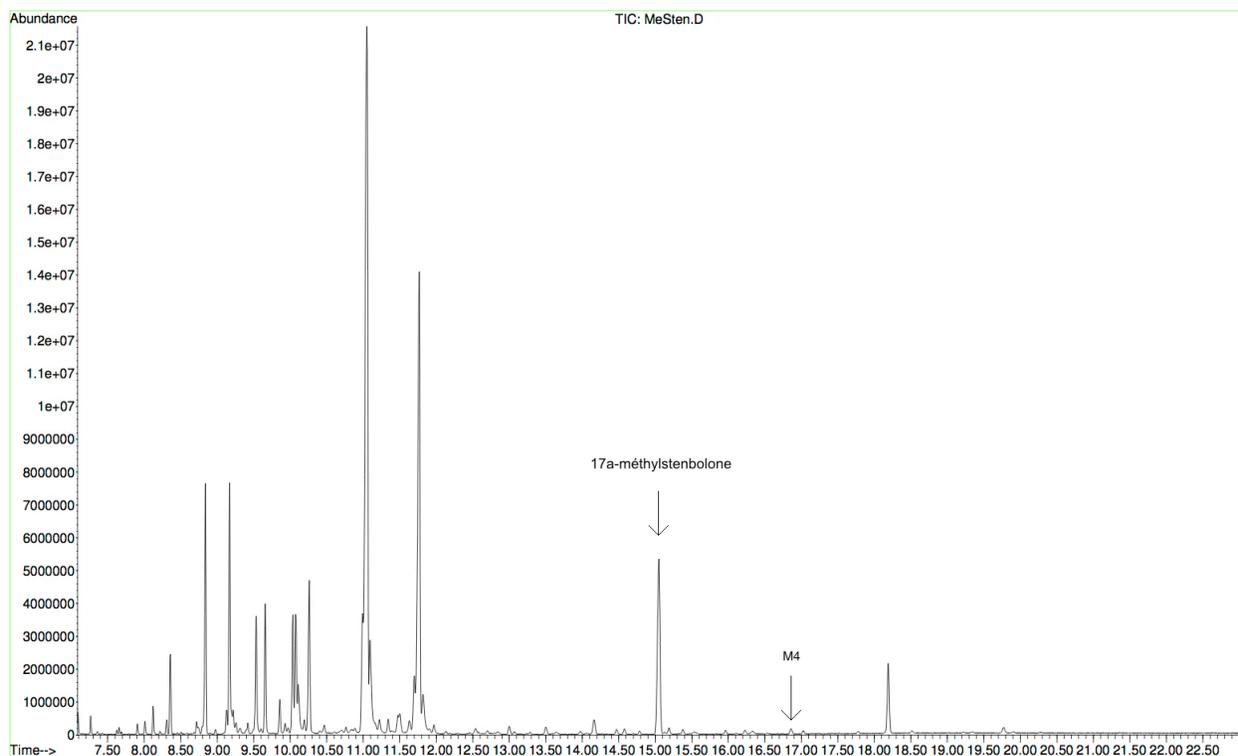


**Figure 32 :** Spectre de masse, fragmentation et structure proposée pour le dérivé triméthylsilyle du métabolite (M3) provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) en présence de fractions S9 d'hépatocytes humains.

Les métabolites serviront de marqueurs permettant de déceler la prise de 17 $\alpha$ -méthylméthénolone (1) une fois intégrés aux analyses de routine de contrôle du dopage.

### 3.2 Incubation avec la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2)

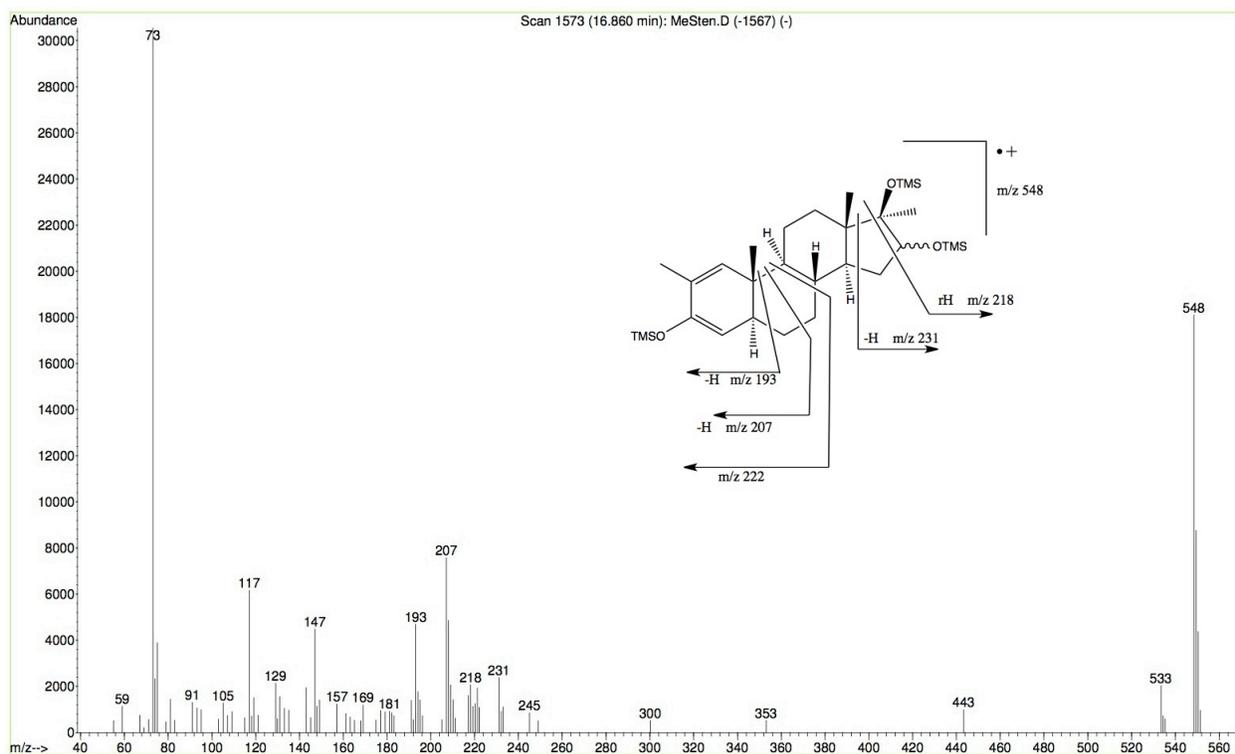
L'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) avec les fractions subcellulaires S9 a permis d'obtenir un métabolite dont l'analyse a été effectuée par CG-SM (figure 33).



**Figure 33 :** Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) avec des fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains.

Le métabolite unique (M4) (figure 34) présente un ion moléculaire à  $m/z$  548, ce qui correspond encore ici à l'ajout d'un groupement hydroxyle. Le groupe d'ions à  $m/z$  193-207-222 est conservé, indiquant la structure intacte des cycles A et B. La présence des deux ions à  $m/z$  218 et  $m/z$  231 suggère de nouveau la position de l'hydroxylation en C-16 $\xi$ , comme le confirment d'autres auteurs ayant travaillé sur des stéroïdes à cycle D similaire (Gauthier, Goudreault et al. 2009, Lootens, van Eenoo et al. 2009). Récemment, un article par Cavalcanti *et al.* (2013) rapporte l'identification d'un métabolite de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) isolé à partir de l'urine d'un volontaire humain similaire à celui observé avec notre modèle *in vitro*. La 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) ayant été consommée par le volontaire lors de cette étude a été achetée auprès d'un commerçant de supplément alimentaire. Le spectre de masse du dérivé TMS de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone contenue dans les capsules semble correspondre au spectre de masse que nous avons obtenu avec le stéroïde synthétisé en laboratoire, mis à part une légère disparité au niveau des intensités relatives des ions du cycle B ( $m/z$  193-207-222). Cependant, les spectres de masse des mêmes

stéroïdes non dérivés (figure 24) diffèrent significativement notamment par la présence majoritaire de l'ion à  $m/z$  160 observé avec la  $17\alpha$ -méthylstenbolone de synthèse, absente du spectre décrit par Cavalcanti *et al.*. Il serait intéressant d'obtenir la  $17\alpha$ -méthylstenbolone provenant de ces suppléments afin de confirmer la structure moléculaire par RMN. Il n'est pas rare que les produits contenus dans les suppléments diffèrent de l'indication sur l'étiquette apposée sur le contenant.

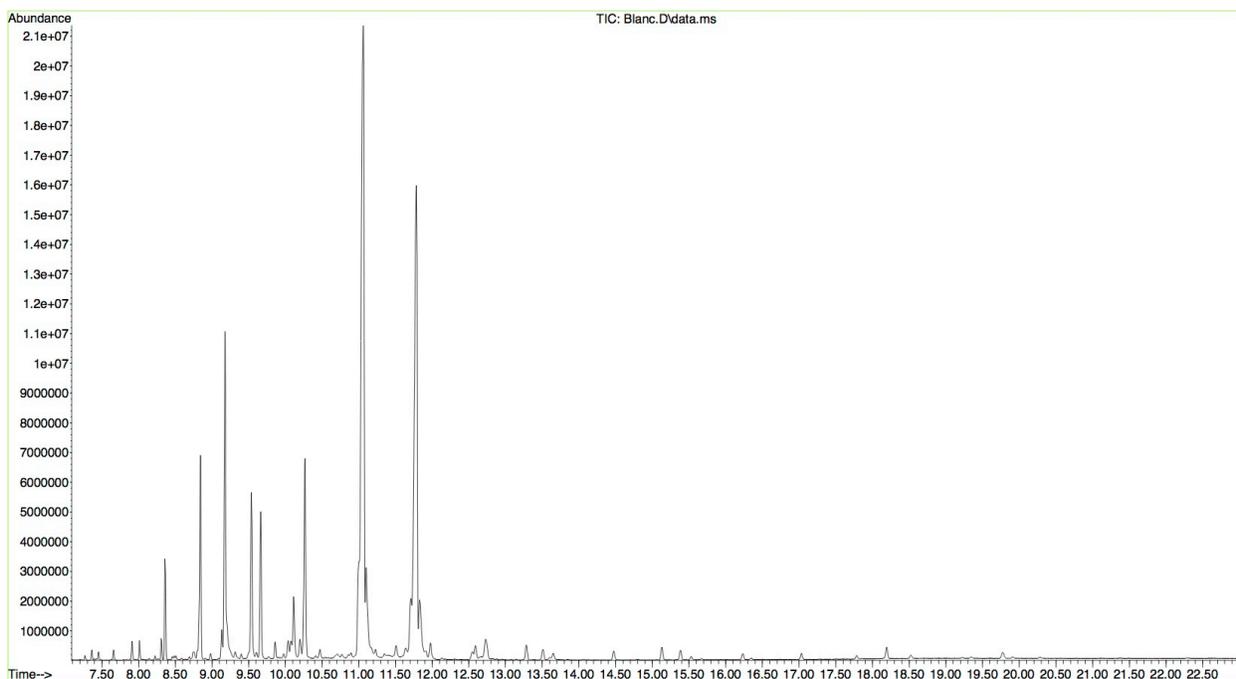


**Figure 34 :** Spectre de masse, fragmentation et structure proposée pour le dérivé triméthylsilyle du métabolite (M4) provenant de l'incubation de la  $17\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) en présence de fractions S9 d'hépatocytes humains.

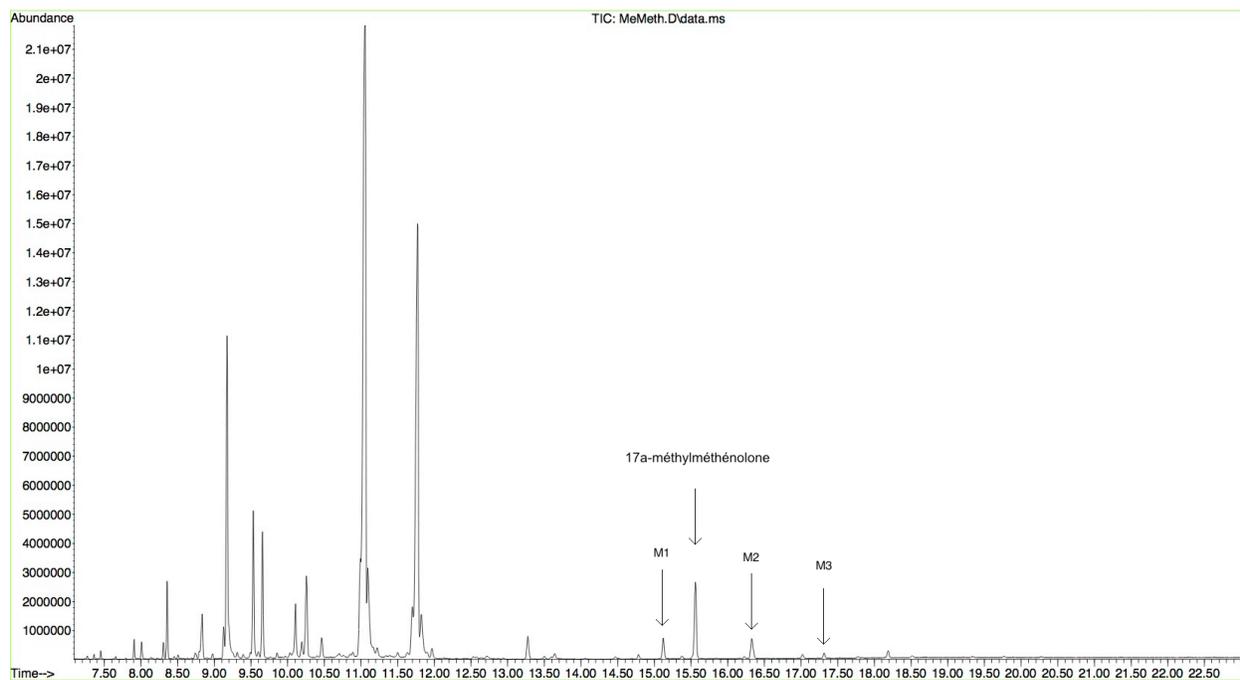
La structure du métabolite (M4) reste à être confirmée, notamment en ce qui concerne l'orientation du groupement 16-hydroxyle. Le métabolite (M4) pourra être utilisé comme marqueur biologique démontrant la prise de  $17\alpha$ -méthylstenbolone (2) et sera intégré aux analyses de routine du contrôle du dopage.

## 4 Incubation avec les hépatocytes humains cryopréservés

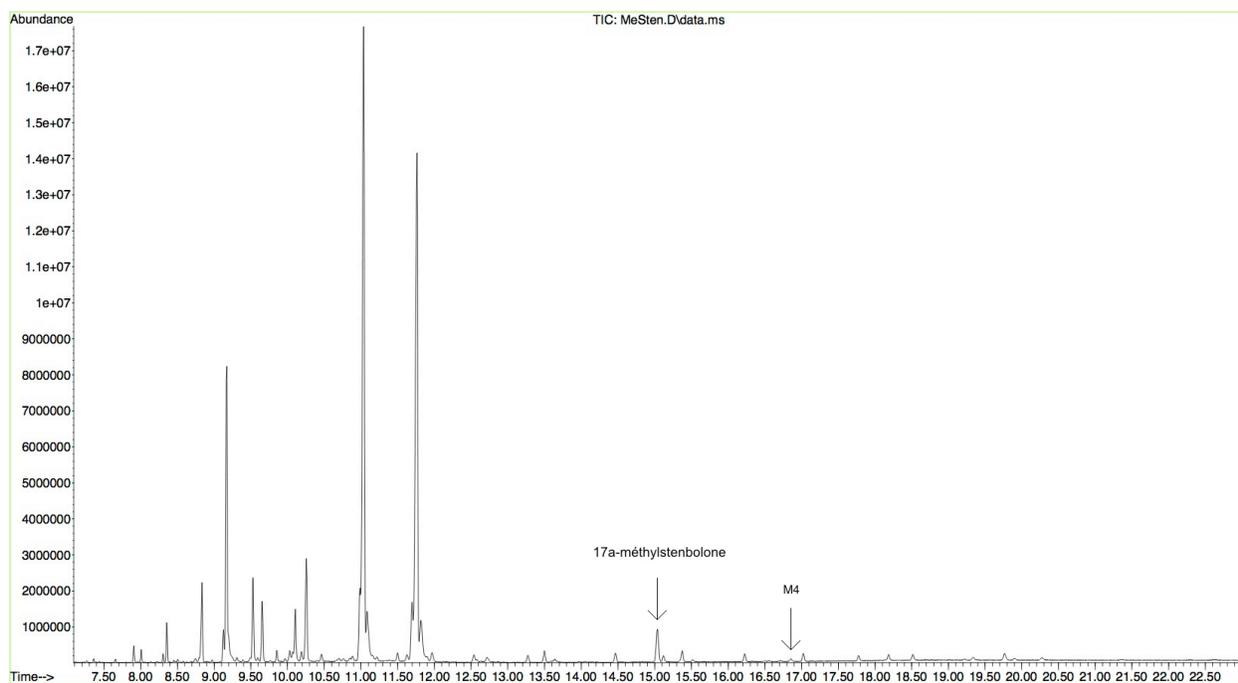
Les incubations des stéroïdes 1 et 2 avec les cellules cryopréservées ont permis de détecter les mêmes métabolites (M1, M2, M3 et M4) qu'avec le modèle de fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains. Les chromatogrammes obtenus des analyses en CG-SM des dérivés TMS des extraits du contrôle négatif, de l'incubation de cellules avec la 17 $\alpha$ -méthylméthénolone et de l'incubation de cellules avec la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone sont présentés aux figures 33 à 35. En comparaison avec les incubations de S9, les incubations cellulaires ont démontré l'obtention des mêmes composés (temps de rétention et spectres de masse identiques) en quantité moindre. La diminution de quantité de métabolites récupérés pourrait être causée par la concentration moins élevée des enzymes de biotransformation dans les hépatocytes cryopréservés. Il a déjà été établi dans la littérature scientifique que le rendement de métabolisme des modèles plus simples (microsomes de foie ou fractions subcellulaires S9) est plus élevé qu'avec les modèles plus complexes (hépatocytes ou tranches de foie) (Sidelmann, Cornett et al. 1996, Brandon, Raap et al. 2003).



**Figure 35 :** Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant du contrôle négatif de l'incubation avec des hépatocytes humains.



**Figure 36 :** Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant de l'incubation de la  $17\alpha$ - $17\beta$ -hydroxy-1, $17\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) avec des hépatocytes humains.



**Figure 37** : Chromatogramme de l'analyse CG-SM du dérivé TMS de l'extrait provenant de l'incubation de la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2) avec des hépatocytes humains.

## Conclusion

La synthèse de la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1) à partir de l'acétate de méthénolone (3) a été réussie en cinq étapes avec un rendement global de 44.5%. La confirmation de l'identité du stéroïde final a été effectuée par spectroscopie RMN à haute résolution et par comparaison de temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse et du spectre de masse obtenus avec un standard de référence préparé par le laboratoire Poirier.

La synthèse de la 2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-17 $\beta$ -ol-3-one (2) à partir de la 17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -androst-3-one (11) a été réussie en six étapes avec un rendement global de 19.2%. L'identité du stéroïde final a été confirmée avec la même méthodologie employée pour la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1).

Quelques métabolites de phase I ont été détectés par CG-SM suite à l'incubation de fractions subcellulaires S9 d'hépatocytes humains et d'hépatocytes humains cryopréservés avec les stéroïdes 1 et 2. En incubant avec la 17 $\beta$ -hydroxy-1,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (1), trois composés hydroxylés en position C-2, C-6 ou C-16 ont été détectés (M1, M2 et M3) et un seul métabolite hydroxylé en position C-16 (M4) avec la 17 $\beta$ -hydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (2). Les biotransformations observées correspondent avec le métabolisme rapporté dans la littérature par Goudreault *et al.* pour les analogues non-méthylés.

Par ailleurs, dans une récente étude par Cavalcanti, Leal *et al.* (2013) , deux métabolites hydroxylés ont été caractérisés suite à une étude d'excrétion de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone (2) par des volontaires humains. Les métabolites détectés rapportés, soit la 16 $\xi$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one (M4) et le 2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3 $\alpha$ ,16 $\xi$ ,17 $\beta$ -triol, permettent de constater l'obtention d'un métabolite qui semble être commun entre nos travaux et ceux de Cavalcanti malgré quelques disparités dans les fragmentations observées. Comme il a été mentionné précédemment, l'identité des composés contenus dans les suppléments diffère malheureusement quelquefois de l'information figurant sur l'étiquette apposée sur le contenant. Il serait intéressant de comparer les données RMN obtenues de la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone (2) synthétisée avec celles qui pourraient être produites avec la 17 $\alpha$ -méthylstenbolone vendue dans les capsules afin de confirmer l'identité du stéroïde qu'elles contiennent. Une année plus tard, en 2014, le groupe de recherche de van Eenoo (Geldof, Lootens et al. 2014) parvient à identifier dix métabolites monohydroxylés à partir d'incubation de 17 $\alpha$ -méthylstenbolone (2) avec des microsomes de foie humain et deux composés dihydroxylés issus d'une étude d'excrétion de souris chimériques. Malheureusement, seulement deux structures sont proposées : la 4,17 $\beta$ -dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one et la 17 $\beta$ ,18-dihydroxy-2,17 $\alpha$ -diméthyl-5 $\alpha$ -androst-1-èn-3-one. Parmi les métabolites rapportés par van Eenoo, aucun d'entre eux n'a été détecté au cours de nos travaux ni de ceux effectués par Cavalcanti *et al.* La 17 $\alpha$ -méthylméthénolone (1) n'est pas encore disponible sur le marché, nos résultats demeurent donc inédits en ce qui concerne le métabolisme de ce stéroïde.

## Références

- Ayotte, C., D. Goudreault et A. Charlebois (1996). "Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine." J Chromatogr B Biomed Appl **687**(1): 3-25.
- Bahrke, M. S. et C. E. Yesalis (2004). "Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise." Current Opinion in Pharmacology **4**(6): 614-620.
- Ball, M., M. J. Gaunt, D. F. Hook, A. S. Jessiman, S. Kawahara, P. Orsini, A. Scolaro, A. C. Talbot, H. R. Tanner, S. Yamanoi et S. V. Ley (2005). "Total Synthesis of Spongistatin 1: A Synthetic Strategy Exploiting Its Latent Pseudo-Symmetry." Angewandte Chemie International Edition **44**(34): 5433-5438.
- Bhasin, S., L. Woodhouse et T. W. Storer (2001). "Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle." J Endocrinol **170**(1): 27-38.
- Brandon, E. F., C. D. Raap, I. Meijerman, J. H. Beijnen et J. H. Schellens (2003). "An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons." Toxicol Appl Pharmacol **189**(3): 233-246.
- Brooks, C. J. W., A. R. Thawley, P. Rocher, B. S. Middleditch, G. M. Anthony et W. G. Stillwell (1971). "Characterization of Steroidal Drug Metabolites by Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry." Journal of Chromatographic Science **9**(1): 35-43.
- Catlin, D. H., M. H. Sekera, B. D. Ahrens, B. Starcevic, Y. C. Chang et C. K. Hatton (2004). "Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine." Rapid Commun Mass Spectrom **18**(12): 1245-1049.
- Cavalcanti, G. d. A., F. D. Leal, B. C. Garrido, M. C. Padilha et F. R. d. A. Neto (2013). "Detection of designer steroid methylstenbolone in nutritional supplement using gas chromatography and tandem mass spectrometry: Elucidation of its urinary metabolites." Steroids **78**(2): 228-233.
- Celsis, I. V. T. (2013a). "Instructions Cryopreserved Hepatocytes." Retrieved 27/09/2014, 2014, from <http://www.bioreclamationivt.com/human-biologicals-hepatocytes/cryopreserved/male-human-cryopreserved-hepatocytes>.
- Celsis, I. V. T. (2013b). "Instructions Human Animal Liver S9." Retrieved 28/09/2014, 2014, from <http://www.bioreclamationivt.com/human-biologicals-subcellular-fractions/s9-cytosol/human-liver-s9-pooled-male-30-mg>.
- Dawson, R. T. (2001). "Drugs in sport - the role of the physician." J Endocrinol **170**(1): 55-61.
- Djerassi, C., N. Finch, R. C. Cookson et C. W. Bird (1960). "Optical Rotatory Dispersion Studies. XXXVI.1  $\alpha$ -Haloketones (Part 7).2 Demonstration of Boat Form in the Bromination of 2 $\alpha$ -Methylcholestan-3-one3,4." Journal of the American Chemical Society **82**(20): 5488-5493.
- Elks, J. (1976). "Steroid structure and steroid activity." British Journal of Dermatology **94**: 3-13.
- Fragkaki, A. G., Y. S. Angelis, M. Koupparis, A. Tsantili-Kakoulidou, G. Kokotos et C. Georgakopoulos (2009a). "Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing

to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities: Applied modifications in the steroidal structure." Steroids **74**(2): 172-197.

Fragkaki, A. G., Y. S. Angelis, A. Tsantili-Kakoulidou, M. Koupparis et C. Georgakopoulos (2009b). "Schemes of metabolic patterns of anabolic androgenic steroids for the estimation of metabolites of designer steroids in human urine." J Steroid Biochem Mol Biol **115**(1-2): 44-61.

Freeman, E. R., D. A. Bloom et E. J. McGuire (2001). "A brief history of testosterone." The Journal of Urology **165**(2): 371-373.

Gauthier, J., D. Goudreault, D. Poirier et C. Ayotte (2009). "Identification of drostanolone and 17-methyldrostanolone metabolites produced by cryopreserved human hepatocytes." Steroids **74**(3): 306-314.

Gauthier, J., D. Poirier et C. Ayotte (2012). "Characterization of desoxymethyltestosterone main urinary metabolite produced from cultures of human fresh hepatocytes." Steroids **77**(6): 635-643.

Geldof, L., L. Lootens, M. Polet, D. Eichner, T. Campbell, V. Nair, F. Botre, P. Meuleman, G. Leroux-Roels, K. Deventer et P. V. Eenoo (2014). "Metabolism of methylstenbolone studied with human liver microsomes and the uPA(+)/(+)-SCID chimeric mouse model." Biomed Chromatogr **28**(7): 974-985.

Gómez-Lechón, M. J., J. V. Castell et M. T. Donato (2007). "Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo." Chemico-Biological Interactions **168**(1): 30-50.

Gomez-Lechon, M. J., T. Donato, X. Ponsoda et J. V. Castell (2003). "Human hepatic cell cultures: in vitro and in vivo drug metabolism." Altern Lab Anim **31**(3): 257-265.

Goudreault, D. et R. Massé (1990). "Studies on anabolic steroids--4. Identification of new urinary metabolites of methenolone acetate (Primobolan) in human by gas chromatography/mass spectrometry." J Steroid Biochem Mol Biol **37**(1): 137-154.

Goudreault, D. et R. Massé (1991). "Studies on anabolic steroids--6. Identification of urinary metabolites of stenbolone acetate (17 beta-acetoxy-2-methyl-5 alpha-androst-1-en-3-one) in human by gas chromatography/mass spectrometry." J Steroid Biochem Mol Biol **38**(5): 639-655.

Goudreault, D. et R. Massé (1992). "Studies on anabolic steroids--11. 18-hydroxylated metabolites of mesterolone, methenolone and stenbolone: new steroids isolated from human urine." J Steroid Biochem Mol Biol **42**(3-4): 399-410.

Guillouzo, A., L. Riolland, A. Fautrel et C. Guyomard (1999). "Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation." Chem Biol Interact **121**(1): 7-16.

Höfle, G., W. Steglich et H. Vorbrüggen (1978). "4-Dialkylaminopyridines as Highly Active Acylation Catalysts. [New synthetic method (25)]." Angewandte Chemie International Edition in English **17**(8): 569-583.

Isin, E. et F. Guengerich (2008). "Substrate binding to cytochromes P450." Analytical and Bioanalytical Chemistry **392**(6): 1019-1030.

Kam, P. C. A. et M. Yarrow (2005). "Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations." Anaesthesia **60**(7): 685-692.

- Kazlauskas, R. (2010). Doping in Sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis. D. Thieme et P. Hemmersbach, Springer Berlin Heidelberg. **195**: 155-185.
- Lévesque, J.-F., M. Gaudreault, Y. Aubin et N. Chauret (2005). "Discovery, biosynthesis, and structure elucidation of new metabolites of norandrostenedione using in vitro systems." Steroids **70**(4): 305-317.
- Lévesque, J.-F., M. Gaudreault, R. Houle et N. Chauret (2002). "Evaluation of human hepatocyte incubation as a new tool for metabolism study of androstenedione and norandrostenedione in a doping control perspective." Journal of Chromatography B **780**(1): 145-153.
- Lévesque, J.-F., E. Templeton, L. Trimble, C. Berthelette et N. Chauret (2005). "Discovery, Biosynthesis, and Structure Elucidation of Metabolites of a Doping Agent and a Direct Analogue, Tetrahydrogestrinone and Gestrinone, Using Human Hepatocytes." Anal Chem **77**(10): 3164-3172.
- Li, A. P. (1997). Primary Hepatocyte Cultures as an in Vitro Experimental Model for the Evaluation of Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions. Advances in Pharmacology. P. L. Albert, Academic Press. **Volume 43**: 103-130.
- Li, A. P. (2007). "Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development." Chem Biol Interact **168**(1): 16-29.
- Lootens, L., P. van Eenoo, P. Meuleman, O. J. Pozo, P. Van Renterghem, G. Leroux-Roels et F. T. Delbeke (2009). "Steroid metabolism in chimeric mice with humanized liver." Drug Test Anal **1**(11-12): 531-537.
- Malvey, T. C. et T. D. Armsey, 2nd (2005). "Tetrahydrogestrinone: the discovery of a designer steroid." Curr Sports Med Rep **4**(4): 227-230.
- Martignoni, M., G. M. Groothuis et R. de Kanter (2006). "Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction." Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology **2**(6): 875-894.
- Mazur, Y. et F. Sondheimer (1958). "Synthesis and Reactions of Ring A Methylated Saturated Steroids I." Journal of the American Chemical Society **80**(19): 5220-5229.
- Menberu, D., V. Nguyen Phuoc, K. D. Onan et P. W. Le Quesne (1992). "Convenient syntheses of stereoisomeric 1,2-epoxyestr-4-en-3-ones, putative intermediates in estradiol metabolism." The Journal of organic chemistry **57**(7): 2100-2104.
- Middleditch, B. S., P. Vouros et C. J. W. Brooks (1973). "Mass spectrometry in the analysis of steroid drugs and their metabolites: electron-impact-induced fragmentation of ring D." Journal of Pharmacy and Pharmacology **25**(2): 143-149.
- Pereira, H. M., M. C. Padilha et F. R. Neto (2009). "Tetrahydrogestrinone analysis and designer steroids revisited." Bioanalysis **1**(8): 1475-1489.
- Plattner, J. J., R. D. Gless, G. K. Cooper et H. Rapoport (1974). "Synthesis of some DE and CDE ring analogs of camptothecin." The Journal of organic chemistry **39**(3): 303-311.
- Poirier, D. (2006). "Communications personnelles."
- Schanzer, W. (1996). "Metabolism of anabolic androgenic steroids." Clin Chem **42**(7): 1001-1020.

- Schanzer, W., H. Geyer et M. Donike (1991). "Metabolism of metandienone in man: identification and synthesis of conjugated excreted urinary metabolites, determination of excretion rates and gas chromatographic-mass spectrometric identification of bis-hydroxylated metabolites." J Steroid Biochem Mol Biol **38**(4): 441-464.
- Sekera, M. H., B. D. Ahrens, Y.-C. Chang, B. Starcevic, C. Georgakopoulos et D. H. Catlin (2005). "Another designer steroid: discovery, synthesis, and detection of 'madol' in urine." Rapid Communications in Mass Spectrometry **19**(6): 781-784.
- Shackleton, C. (2009). "Steroid analysis and doping control 1960-1980: scientific developments and personal anecdotes." Steroids **74**(3): 288-295.
- Sidelmann, U. G., C. Cornett, J. Tjornelund et S. H. Hansen (1996). "A comparative study of precision cut liver slices, hepatocytes, and liver microsomes from the Wistar rat using metronidazole as a model substance." Xenobiotica **26**(7): 709-722.
- Sjöqvist, F., M. Garle et A. Rane (2008). "Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society." The Lancet **371**(9627): 1872-1882.
- Skett, P., P. Roberts et S. Khan (1999). "Maintenance of steroid metabolism and hormone responsiveness in cryopreserved dog, monkey and human hepatocytes." Chem Biol Interact **121**(1): 65-76.
- Sterzycki, R. (1979). "Pyridinium Tosylate, A Mild Catalyst for Formation and Cleavage of Dioxolane-Type Acetals." Synthesis **1979**(09): 724-725.
- Teale, P., J. Scarth et S. Hudson (2011). "Impact of the emergence of designer drugs upon sports doping testing." Bioanalysis **4**(1): 71-88.
- Wavrin, L. et J. Viala (2002). "Clean and Efficient Oxidation of Homoallylic and Homopropargylic Alcohols into  $\beta,\gamma$ -Unsaturated Aldehydes by The Dess-Martin Periodinane." Synthesis **2002**(03): 0326-0330.
- Wu, W.-N. et L. A. McKown (2004). *Optimization in Drug Discovery*, Humana Press: 163-184.
- Zuber, R., E. Anzenbacherová et P. Anzenbacher (2002). "Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism." Journal of Cellular and Molecular Medicine **6**(2): 189-198.