

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier, Santé humaine

Synthèse et caractérisation de métabolites 6 β -hydroxylés de l'androstènedione

Par
Patrick Bhérer
B. Sc. en chimie

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

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr Livain Breau Département de chimie Université du Québec à Montréal
Examineur interne	Dr Alain Fournier INRS-Institut Armand-Frappier
Directrice de recherche	Dr Christiane Ayotte INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Dr Donald Poirier Faculté de Médecine Université Laval

27 Avril 2002

Résumé

L'androstènedione est un stéroïde précurseur de la testostérone disponible en vente libre aux États-Unis ainsi que sur le réseau Internet. La prise de celui-ci entraîne des modifications importantes du profil des stéroïdes endogènes urinaires. Des études ont démontré chez certains individus une augmentation significative de l'excrétion de la testostérone et de tous les métabolites finaux (Lévesque et Ayotte, 1999-a et -b; Uralets et Gillette, 1998). L'analyse par chromatographie en phase gazeuse, couplée à un spectromètre de masse (CG/SM), a permis d'identifier et de proposer des structures pour des métabolites glucuroconjugués et sulfoconjugués caractéristiques de la prise d'androstènedione tels la 6 α -hydroxyandrostènedione et les 6 β -hydroxyandrostérone, 6 β -hydroxyétiocholanolone et 6 β -hydroxyépiandrostérone (Lévesque et Ayotte, 1999-a). Afin de procéder à la caractérisation de ces métabolites ciblés, il était nécessaire de synthétiser ces trois molécules 6 β -hydroxylées. Ces dernières, contrairement à la 6 α -hydroxyandrostènedione, ne sont pas disponibles commercialement.

Les synthèses des composés de référence (métabolites ciblés) ont été effectuées au Centre de recherche en endocrinologie moléculaire et oncologique (CREMO) du CHUQ, Pavillon CHUL à Québec. L'étape clé de la synthèse est l'hydroxylation en position 6 β et celle-ci a été effectuée par une réaction photochimique dans l'éthanol (Schänzer et Donike, 1993; Gardi et Lusignani, 1967). Les produits synthétisés étant aussi hydroxylés en position 3, nous avons utilisé une réduction régio- et stéréosélective avec K-Selectride[®] et procédé à l'inversion de la stéréochimie des groupements 3-hydroxyle avec une méthode adaptée de la réaction de Mitsunobu (Wiebe, Deline et Buckingham, 1985; Dionne, Tchédam Ngatcha et Poirier 1997). De plus, deux méthodes de protection du groupement hydroxyle en 6 β sont présentées, utilisant les groupements *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) et tétrahydropyranyle (THP) (Tremblay et Poirier, 1996; Tremblay et Poirier, 2000). Nous avons ainsi obtenu quatre isomères 6 β -hydroxylés qui ont été caractérisés par RMN ¹H et ¹³C et par spectrométrie de masse. La caractérisation

III

en RMN ^{13}C a permis l'assignation des atomes de carbone en utilisant les données obtenues des expériences RMN 1D et 2D.

L'analyse par CG/SM d'extraits urinaires recueillis suite à l'administration d'androstènedione et rehaussés à l'aide des composés synthétisés a permis de confirmer les structures des métabolites proposées par comparaison des spectres de masse. De plus, la quantification de ces quatre métabolites dans les urines recueillies post-administration a permis de constater que les métabolites 6-hydroxylés sont caractéristiques de l'administration d'androstènedione, les périodes et les niveaux d'excrétion étant cependant variables d'un individu à l'autre.

La confirmation des structures proposées pour ces métabolites caractéristiques permet d'utiliser leur présence dans l'urine comme preuve de l'administration d'androstènedione.



Patrick Bhérier
Étudiant



Christiane Ayotte
Directrice de recherche

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dr Christiane Ayotte, pour l'excellent projet qui a rempli mes attentes pour mes études de 2^e cycle. Je veux aussi exprimer ma reconnaissance pour sa confiance et son encadrement tout au long du projet.

Je tiens aussi à remercier mon co-directeur de recherche, Dr Donald Poirier, pour le temps qu'il m'a consacré et son encadrement.

Je remercie tout spécialement ma famille, plus particulièrement mes parents, pour leurs encouragements et leur support dans la poursuite de mes études.

Je voudrais aussi remercier mes amis qui m'ont encouragé tout au long de mes études graduées et avec qui j'ai eu plusieurs moments de divertissement.

Je remercie également :

Alain Charlebois pour son support technique et ses conseils.

Danielle Goudreault pour ses conseils.

L'ensemble du personnel du Laboratoire de contrôle du dopage et du Centre de recherche en endocrinologie moléculaire et oncologique du Centre hospitalier universitaire de Québec pour leur aide et leurs conseils.

Aussi, l'ensemble des personnes qui ne sont pas mentionnées et qui ont pu contribuer à la réalisation de ce projet.

La Fondation Institut Armand-Frappier pour les bourses d'étude.

Table des matières

Résumé.....	II
Remerciements.....	IV
Table des matières.....	V
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux.....	X
Liste des abréviations.....	XI
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 Le contrôle du dopage sportif	1
1.2 Les stéroïdes : généralité.....	2
1.2.1 Structure et nomenclature des stéroïdes	2
1.3 Les androgènes.....	4
1.3.1 Métabolisme des androgènes.....	5
1.4 L'androstènedione.....	5
1.5 Objectifs du projet.....	10
1.6 Stratégie de synthèse.....	11
Chapitre 2 Matériel et Méthodes.....	13
2.1 Réactifs.....	13
2.2 Analyses de caractérisation	14
2.2.1 Analyse de résonance magnétique nucléaire (RMN)	14
2.2.2 Analyse infrarouge (IRTF)	14
2.2.3 Analyse de pureté par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	14
2.2.4 Analyse de spectrométrie de masse (SM).....	15

2.3	Synthèses.....	15
2.3.1	3-methoxy-3,5-androstadièn-17-one (2).....	17
2.3.2	6 β -hydroxy-4-androstène-3,17-dione (3).....	17
2.3.3	6 β -hydroxy-5 β -androstane-3,17-dione (4) et 6 β -hydroxy-5 α -androstane-3,17-dione (5).....	19
2.3.4	3 β ,6 β -dihydroxy-5 β -androstane-17-one [6 β -hydroxyépitiocolanolone] (6).....	20
2.3.5	3 α ,6 β -dihydroxy-5 α -androstane-17-one [6 β -hydroxyandrostérone] (7).....	21
2.3.6	6 β -(<i>tert</i> -butyldiméthylsilyloxy)-5 β -androstane-3,17-dione (8).....	21
2.3.7	6 β -(<i>tert</i> -butyldiméthylsilyloxy)-3 β -hydroxy-5 β -androstane-17-one (9).....	22
2.3.8	6 β -(<i>tert</i> -butyldiméthylsilyloxy)-3 α -hydroxy-5 β -androstane-17-one (11).....	23
2.3.9	3 α ,6 β -dihydroxy-5 β -androstane-17-one [6 β -hydroxyétiocholanolone] (12).....	24
2.3.10	6 β -[(tétrahydro-2"H-pyran-2"H-yl)-oxy]-5 α -androstane-3,17-dione (13).....	25
2.3.11	6 β -[(tétrahydro-2"H-pyran-2"H-yl)-oxy]-3 α -hydroxy-5 α -androstane-17-one (14).....	26
2.3.12	6 β -[(tétrahydro-2"H-pyran-2"H-yl)-oxy]-3 β -hydroxy-5 α -androstane-17-one (16).....	27
2.3.13	3 β ,6 β -dihydroxy-5 α -androstane-17-one [6 β -hydroxyépiandrosterone] (17).....	28
2.4	Isolement des stéroïdes libres.....	28
2.5	Isolement des stéroïdes glucuroconjugués.....	29
2.6	Isolement des stéroïdes libres et glucuroconjugués.....	29
2.7	Isolement des stéroïdes sulfoconjugués.....	30
2.8	Dérivation chimique des extraits stéroïdiens.....	30
2.8.1	Dérivation triméthylsilyle énon (TMS-énon).....	30
2.8.2	Dérivation triméthylsilyle éther (TMS-éther).....	30
2.8.3	Dérivation triméthylsilyle éther deutéré (TMS-éther-d ₉).....	30
2.9	Étude de rehaussement.....	31
2.10	Analyse par CG/SM.....	31
2.11	Paramètres chromatographiques pour l'analyse CG/SM.....	31
2.12	Quantification des métabolites urinaires caractérisés.....	33

Chapitre 3	Résultats et Discussion.....	34
3.1	Synthèse	34
3.1.1	Synthèse des isomères 5 α - et 5 β -, 6 β -hydroxylés.....	34
3.1.2	Synthèse des dérivés finaux 6 et 7	38
3.1.3	Synthèse des dérivés finaux 12 et 17	39
3.1.4	Analyse des déplacements chimiques en RMN ¹ H des quatre stéréoisomères finaux (6 , 7 , 12 , 17).....	43
3.1.5	Analyse des déplacements chimiques des groupes en RMN du ¹³ C des quatre stéréoisomères finaux (6 , 7 , 12 , 17).....	46
3.2	Spectre de masse et confirmation par rehaussement de pics.....	49
3.3	Quantification.....	51
Chapitre 4	Conclusion.....	53
Appendice A	Noms triviaux et systématiques de stéroïdes	55
Appendice B	Spectres de RMN ¹ H des stéroïdes 6 β -hydroxylés	56
Appendice C	Spectres de RMN ¹³ C des stéroïdes 6 β -hydroxylés	61
Appendice D	Spectres de masse des stéroïdes 6 β -hydroxylés	66
Appendice E	Profils d'excrétion des métabolites 6-hydroxylés excrétés suivant l'administration d'androstènedione	75
Liste des références.....		82

Liste des figures

Figure 1.1 : Structure de l'androstane.....	3
Figure 1.2 : Structure de base des conformations 5 α et 5 β des hormones stéroïdiennes ...	3
Figure 1.3 : Voies de biosynthèse de la testostérone	7
Figure 1.4 : Métabolites excrétés de la testostérone	8
Figure 1.5 : Excrétion des métabolites de l'androstènedione de la prise orale.....	9
Figure 1.6 : Dérivés 6 β -hydroxylés synthétisés.....	11
Figure 2.1 : Plan de synthèse des dérivés 6 β -hydroxylés	16
Figure 3.1 : Optimisation du temps de l'hydroxylation photochimique.....	37
Figure 3.2 : Étude de rehaussement sur la fraction sulfoconjuguée	50
Figure B.1 : Spectre de RMN ^1H de la 6 β -hydroxyépiétiocholanolone	57
Figure B.2 : Spectre de RMN ^1H de la 6 β -hydroxyandrostérone	58
Figure B.3 : Spectre de RMN ^1H de la 6 β -hydroxyétiocolanolone	59
Figure B.4 : Spectre de RMN ^1H de la 6 β -hydroxyépiandrostérone	60
Figure C.1 : Spectre de RMN ^{13}C de la 6 β -hydroxyépiétiocolanolone	62
Figure C.2 : Spectre de RMN ^{13}C de la 6 β -hydroxyandrostérone.....	63
Figure C.3 : Spectre de RMN ^{13}C de la 6 β -hydroxyétiocolanolone.....	64
Figure C.4 : Spectre de RMN ^{13}C de la 6 β -hydroxyépiandrostérone	65
Figure D.1 : Spectre de masse de la 6 β -hydroxyépiétiocolanolone.....	67
Figure D.2 : Spectre de masse du dérivé TMS-énol de la 6 β -hydroxyépiétiocolanolone	67
Figure D.3 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther de la 6 β -hydroxyépiétiocolanolone	68

Figure D.4 : Spectre de masse du dérivé TMS-d ₉ -éther de la 6β-hydroxyépiétiocholanolone	68
Figure D.5 : Spectre de masse de la 6β-hydroxyandrostérone	69
Figure D.6 : Spectre de masse du dérivé TMS-énol de la 6β-hydroxyandrostérone.....	69
Figure D.7 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther de la 6β-hydroxyandrostérone.....	70
Figure D.8 : Spectre de masse du dérivé TMS-d ₉ -éther de la 6β-hydroxyandrostérone ..	70
Figure D.9 : Spectre de masse de la 6β-hydroxyétiocholanolone	71
Figure D.10 : Spectre de masse du dérivé TMS-énol 6β-hydroxyétiocholanolone.....	71
Figure D.11 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther de la 6β-hydroxyétiocholanolone	72
Figure D.12 : Spectre de masse du dérivé TMS-d ₉ -éther de la 6β-hydroxyétiocholanolone	72
Figure D.13 : Spectre de masse de la 6β-hydroxyépiandrostérone	73
Figure D.14 : Spectre de masse du dérivé TMS-énol de la 6β-hydroxyépiandrostérone .	73
Figure D.15 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther de la 6β-hydroxyépiandrostérone	74
Figure D.16 : Spectre de masse du dérivé TMS-d ₉ -éther de la 6β-hydroxyépiandrostérone	74
Figure E.1 : Profils d'excrétion de la 6β-hydroxyandrostérone glucuroconjugée	76
Figure E.2 : Profils d'excrétion de la 6β-hydroxyétiocholanolone glucuroconjugée	77
Figure E.3 : Profils d'excrétion de la 6α-hydroxyandrostènedione glucuroconjugée.....	78
Figure E.4 : Profils d'excrétion de la 6β-hydroxyandrostérone sulfoconjugée.....	79
Figure E.5 : Profils d'excrétion de la 6β-hydroxyétiocholanolone sulfoconjugée.....	80
Figure E.6 : Profils d'excrétion de la 6β-hydroxyépiandrostérone sulfoconjugée.....	81

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Caractéristiques sur les courbes d'étalonnage.....	33
Tableau 3.1 : Données RMN ^1H des quatre stéréoisomères 3 ξ ,6 β -dihydroxy-5 ξ -androstan-17-one.....	44
Tableau 3.2 : Assignation des déplacements chimiques des atomes de carbone en RMN ^{13}C des quatre stéréoisomères 3 ξ ,6 β -dihydroxy-5 ξ -androstan-17-one.....	47
Tableau 3.3 : Écart de concentrations mesurées dans la fraction glucuroconjugée.....	51
Tableau 3.4 : Écart de concentrations mesurées dans la fraction sulfoconjugée.....	52

Liste des abréviations

AcOET : Acétate d'éthyle

amu : Unité de masse atomique (Atomic mass unit)

CIO : Comité International Olympique

CCM : Chromatographie sur couche mince

CG : Chromatographie en phase gazeuse

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CHUL : Centre hospitalier de l'Université Laval

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance

CREMO : Centre de recherche en endocrinologie moléculaire et oncologique

FSH : Hormone folliculostimulante (Follicle stimulating hormone)

Hz : Hertz

IE : Impact électronique

IR : Spectroscopie infrarouge

IRTF : Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR : Fourier Transform InfraRed)

LH : Hormone lutéinisante (Luteinizing hormone)

MHz : Mégahertz

M⁺ : Ion moléculaire

m/z : masse/charge

ppm : Partie par million

RMN : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

SAA : Stéroïde anabolisant androgène

SMBR : Spectrométrie de masse à basse résolution

SMHR : Spectrométrie de masse à haute résolution

TBDMS : *Tert*-butyldiméthylsilyle

TMS : Triméthylsilyle

TMS-énol : Énol triméthylsilylé

TMS-éther : Éther triméthylsilylé

TMS-d₉-éther : Éther triméthylsilylé-d₉

THF : Tétrahydrofurane

THP : Tétrahydropyrane

UV : Ultraviolet

ξ : Indique une configuration α ou β

(L) : Stéroïde libre

(G) : Stéroïde glucuroconjugué

(S) : Stéroïde sulfoconjugué

d : Doublet

dd : Doublet de doublet

m : Multiplet

s : Singulet

t : Triplet

Chapitre 1

Introduction

1.1 Le contrôle du dopage sportif

L'histoire des contrôles du dopage est assez récente et remonte aux Jeux Olympiques de Tokyo en 1964, où quelques tests furent effectués. Par la suite, en 1967, le Comité International Olympique (CIO) instaura la commission médicale afin qu'elle mette en place un service de contrôle médical lors des Jeux Olympiques. Pour ce faire, elle publia une liste de substances bannies et un code antidopage qui fut utilisé pour la première fois aux Jeux Olympiques de Grenoble et de Mexico en 1968 (CIO, 2001).

Les premiers tests effectués pour détecter l'utilisation de stéroïdes anabolisants androgènes (SAA) synthétiques ont eu lieu lors des Jeux Olympiques de Montréal en 1976 (Schänzer et Donike, 1993). Ils étaient basés principalement sur l'utilisation de techniques immunométriques. Par la suite, plusieurs études ont permis l'emploi de la spectrométrie de masse pour l'identification et la caractérisation des SAA. Ainsi, la présence confirmée des stéroïdes ou de leurs métabolites constitue un résultat positif (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). L'amélioration des méthodes de détection des SAA synthétiques a pu pousser les athlètes désirant faire usage d'anabolisants à se tourner vers des substances plus difficiles à détecter, comme la testostérone, la dihydrotestostérone (DHT) ou ses précurseurs, l'androstènedione et la déhydroépiandrostérone (DHEA). Ces produits pouvant être présents normalement dans les fluides biologiques (Frank et Berendonk, 1997), les preuves requises pour en démontrer l'utilisation sont plus complexes et ne peuvent reposer sur la seule présence dans l'urine. Une méthode de dépistage de la testostérone fut utilisée pour la première fois aux Jeux Olympiques de Los Angeles en 1984 (Schänzer et Donike, 1993). Plus récemment en 1998, le CIO inscrivit formellement à la liste des substances prohibées

l'androstènedione et la DHEA (CIO, 1998), qui sont en vente libre aux États-Unis et sur Internet.

1.2 Les stéroïdes : généralité

Les stéroïdes peuvent être d'importants régulateurs physiologiques et ils ont presque toujours des effets notables quand ils sont administrés à des organismes vivants. Les plus importants sont les hormones sexuelles mâles et femelles, les hormones adrénocorticales, les vitamines D, les sels biliaires et certains poisons cardiaques (Solomons, 1996). Le stéroïde présent en plus grande quantité chez l'humain est le cholestérol. Ce dernier est la principale source pour la biosynthèse des hormones stéroïdiennes (Marieb, 1999). Elles sont principalement sécrétées par les glandes adrénales, les gonades et durant la grossesse, le placenta en sécrète aussi. Selon leur action biologique, elles sont divisées en quatre classes : androgènes, estrogènes, progestatifs et corticostéroïdes (Leunissen, 1979).

1.2.1 STRUCTURE ET NOMENCLATURE DES STÉROÏDES

La structure de base des stéroïdes est dérivée du squelette « cyclopentano perhydrophénantrène ». Ce dernier est composé de 4 cycles nommés de A à D et chaque atome de carbone qui le constitue est numéroté. L'ajout de deux groupements méthyle, nommés angulaires, en C10 et C13 au-dessus du plan donne le squelette androstane (figure 1.1). Par convention, les autres groupes qui sont du même côté sont nommés substituants β et ceux du côté opposé, sous le plan, sont nommés substituants α . Les liaisons en α sont représentées par des lignes pointillées et les liaisons en β par des lignes continues.

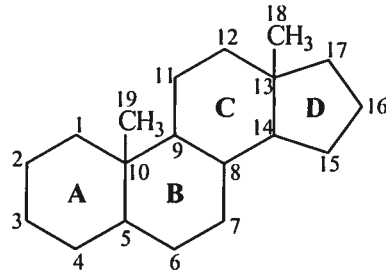
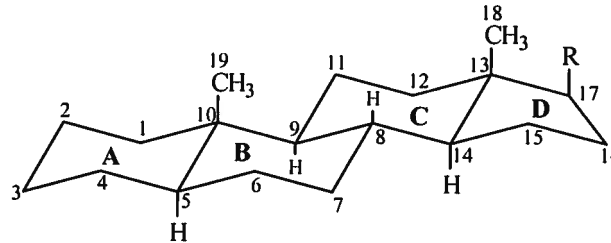
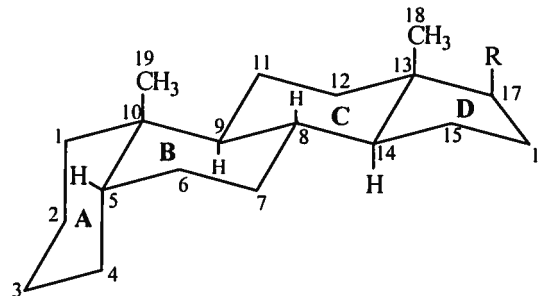


Figure 1.1 : Structure de l'androstane

Les cycles cyclohexanes peuvent exister sous la conformation bateau ou chaise, cette dernière étant la plus stable. Deux types de liaisons C-H peuvent être distinguées : les liaisons équatoriales (e) forment des angles de 30° avec le plan du système de cycle, alors que les liaisons axiales (a) sont perpendiculaires au plan. Dans la plupart des cas, les jonctions des cycles B,C et C,D sont *trans*. La jonction A,B peut être *cis* ou *trans*. Ainsi, si la jonction A,B est *trans*, on a la conformation 5α et si la jonction A,B est *cis*, on a la conformation 5β (figure 1.2) (Solomons, 1996; Gower, 1979).

Conformation 5α
(Toutes les jonctions de cycles sont *trans*)Conformation 5β
(La jonction de cycle A,B est *cis*)Figure 1.2 : Structure de base des conformations 5α et 5β des hormones stéroïdiennes

Les règles finales de nomenclature des stéroïdes sont décrites par IUPAC-IUB (*J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1994). Il existe aussi une multitude de noms triviaux de stéroïdes qui sont reconnus par le même organisme (une liste en est donnée à l'appendice A).

1.3 Les androgènes

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes possédant 19 atomes de carbone (groupe C₁₉ des stéroïdes) (figure 1.1) biosynthétisées par les testicules et les glandes surrénales. Étant des substances lipidiques qui traversent facilement les membranes cellulaires, elles se lient à un récepteur nucléaire spécifique avec des degrés d'affinité variables selon leur structure. La principale réponse biologique est l'induction de la différenciation sexuelle menant au caractère mâle. Il est aussi possible de noter un effet anabolique qui se caractérise par l'augmentation de la biosynthèse de protéines (musculaires et osseuses) et de divers organes qui aident ainsi à la croissance. La testostérone est le stéroïde androgène qui est présent en plus forte concentration et est principalement biosynthétisée par les testicules (Norman et Litwack, 1997; Blanchard et Robaire, 1997; Kopera, 1993). L'androstènedione et la déhydroépiandrostérone (DHEA) sont principalement produites par les glandes surrénales (Blanchard et Robaire, 1997) et ont aussi un effet anabolique, mais environ 80 % moins important. La diminution de cet effet est attribuée au groupement 17-céto remplaçant le groupement 17 β -hydroxyle de la testostérone (Gower, 1979). Dans les organes cibles, la testostérone est transformée en dihydrotestostérone (DHT), celle-ci possédant un pouvoir androgène plus grand (Norman et Litwack, 1997).

Les testicules de l'homme adulte fabriquent entre 2,5 et 11 mg par jour de testostérone. Cette production est régulée par le contrôle de différentes glandes (hypothalamus et hypophyse). Celles-ci produisent la FSH (l'hormone folliculostimulante) et la LH (l'hormone lutéinisante). Lorsque le taux sanguin de testostérone baisse, les taux de FSH et de LH augmentent et stimulent la synthèse de testostérone, et vice-versa. L'effet de la FSH se fait sentir au niveau de la spermatogenèse dans les tubules séminifères, alors que la LH régule la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig. La FSH peut aussi

augmenter l'activité de la LH et rehausser la synthèse de la testostérone (Norman et Litwack, 1997; Wilson, 1995).

1.3.1 MÉTABOLISME DES ANDROGÈNES

Les voies d'excrétion des métabolites finaux des stéroïdes androgènes se produisent en deux phases successives. La phase I comprend des réactions enzymatiques qui transforment la structure de base des stéroïdes pour les rendre inactifs et plus polaires. Ces transformations peuvent être des réductions, des oxydations, des hydroxylations ou des désalkylations. Les réactions de la phase II conduisent à la conjugaison avec l'acide glucuronique ou le sulfate notamment, ayant pour effet de faciliter leur élimination (Schänzer, 1996-a).

Les réactions de conjugaison (phase II) sont sous contrôle enzymatique. La glucuronidation implique l'acide UDP-glucuronique comme substrat et la sulfatation implique la 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate. Les stéroïdes possédant un groupement 3 α -hydroxy sont principalement conjugués avec l'acide glucuronique et les 3 β -hydroxy sont principalement sulfatés, ceci sans tenir compte de l'orientation en 5 α - et 5 β - (Träger, 1977). Des deux réactions de conjugaison, celle de glucuronidation est la plus importante. Par exemple, dans le cas de l'excrétion de la testostérone, la glucuronidation représente environ 65 %, la sulfoconjugaison environ 30 % et moins de 5 % est excrété sous la forme libre (Deslypere *et al.*, 1981).

1.4 L'androstènedione

L'androstènedione est un précurseur des voies biosynthétiques de la testostérone et plusieurs études ont été faites sur son métabolisme *in vivo* et *in vitro* (figure 1.3). Elle est aussi un précurseur des estrogènes (Baulieu et Kelly, 1990). Il a été rapporté qu'à la suite d'une administration intraveineuse d'androstènedione-7- H^3 , les taux plasmatiques de

testostérone étaient augmentés. (Pearlman et Pearlman, 1961). Les mêmes résultats ont été constatés suite à une prise orale (Mahesh et Greenblatt, 1962). L'analyse urinaire a aussi démontré une élévation de l'excrétion de la testostérone (L,G) et de l'épitéstostérone (L,G), ainsi qu'une augmentation du rapport testostérone sur épitéstostérone suite à une injection intraveineuse (Brooks et Giuliani, 1964; Camacho et Migeon, 1964). Tamm et son équipe ont constaté les mêmes résultats dans les fractions libre et glucuroconjuguée, mais ont également remarqué une augmentation de l'excrétion de la testostérone sulfoconjuguée (Tamm et Starcevic, 1966).

D'autres métabolites de l'androstènedione ont également été identifiés : *in vivo*, l'androstérone, l'étiocholanolone, l'androstanedione, la 6 β -hydroxyandrostènedione et les 16 α - et 16 β -hydroxyandrostènediones; *in vitro*, l'androstérone, l'épiandrostérone, le 5 α -androstène-3 α ,17 β -diol et les 6 β ,16 α -dihydroxyandrostènediones et 6 β ,16 β -dihydroxyandrostènediones (Pearlman et Pearlman, 1961; Brooks et Giuliani, 1964; Milewich *et al.*, 1977; Sheets et Estabrook, 1985; Stanczyk *et al.*, 1990).

Les premières mentions de l'utilisation de l'androstènedione chez les sportifs remontent au début des années 1980. Les Allemands de l'Est, afin de déjouer l'efficacité des contrôles effectués pour l'utilisation de la testostérone, développèrent l'utilisation de l'androstènedione (Franke et Berendonk, 1997). Plus récemment, suite à sa mise en vente libre, certains athlètes de sports professionnels ont affirmé utiliser ou avoir déjà utilisé l'androstènedione (Josefson, 1998). La distribution est illégale au Canada, mais elle est en vente libre aux États-Unis et sur le réseau Internet comme supplément hormonal. Les véritables effets de la prise orale de l'androstènedione sont encore très peu étudiés. Des études ont montrées que sa consommation à faible dose avait un effet anabolisant pratiquement nul (Rasmussen *et al.*, 2000; Wolfe *et al.*, 2000). Toutefois, d'autres études ont démontrées que sa consommation à des doses de 300 mg par jour avait pour effet d'augmenter la concentration de testostérone dans le sérum (Leder *et al.*, 2000; King *et al.*, 1999).

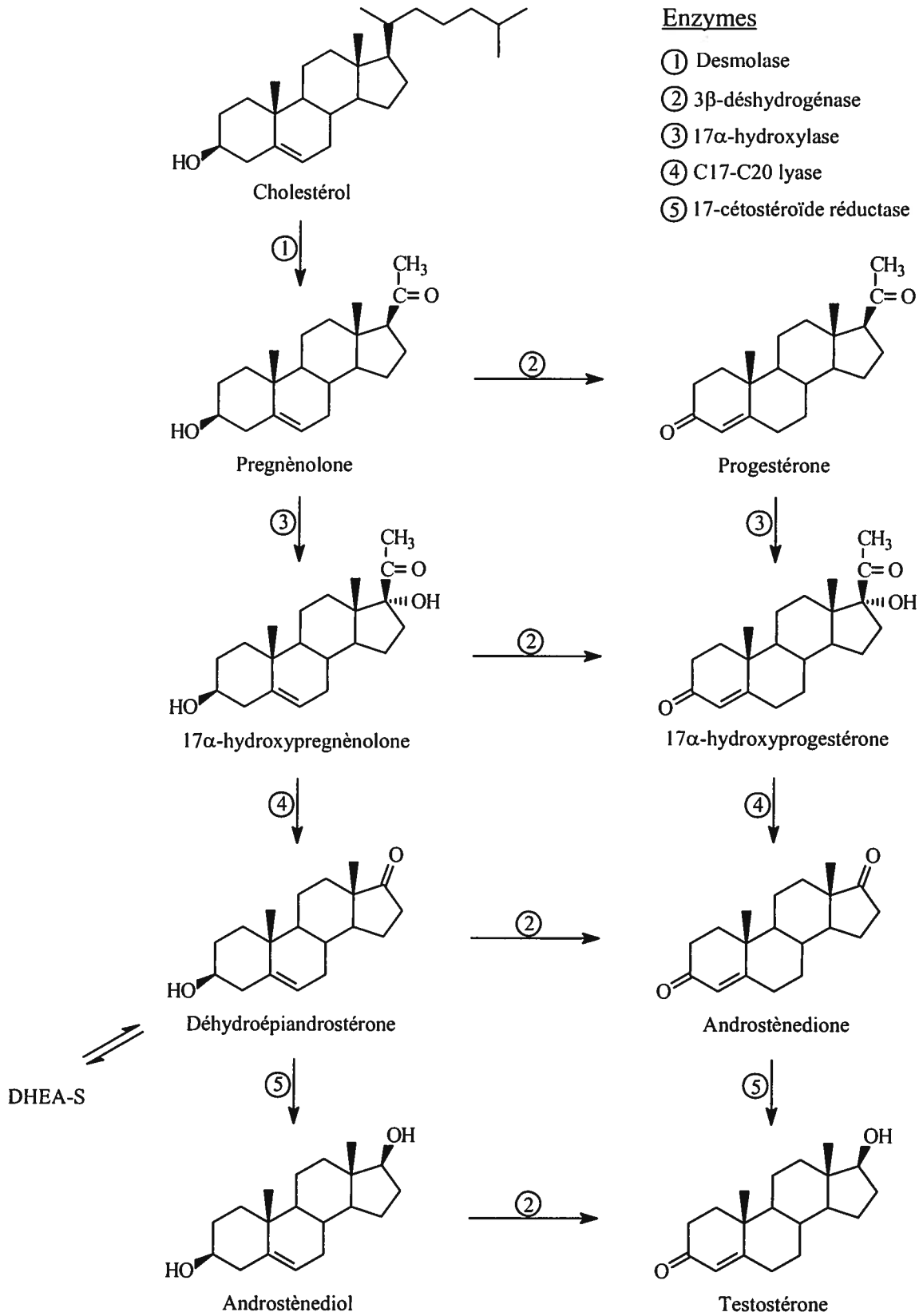


Figure 1.3 : Voies de biosynthèse de la testostérone (Normand et Litwack, 1997)

Des études récentes effectuées en vue de détecter son utilisation chez les sportifs ont montré une modification importante du profil des stéroïdes urinaires. On note principalement une augmentation significative du rapport testostérone sur épitestostérone (T/E)¹ ainsi qu'un accroissement des métabolites finaux de la testostérone, tels les 5 α - et 5 β -androstane-diols, l'androstérone et l'étiocolanolone (figure 1.4) (Lévesque et Ayotte, 1999-a et -b; Uralets et Gillette, 1998; Van Eenoo, Delbeke et De Backer, 1998; Garle et Palonek, 1998).

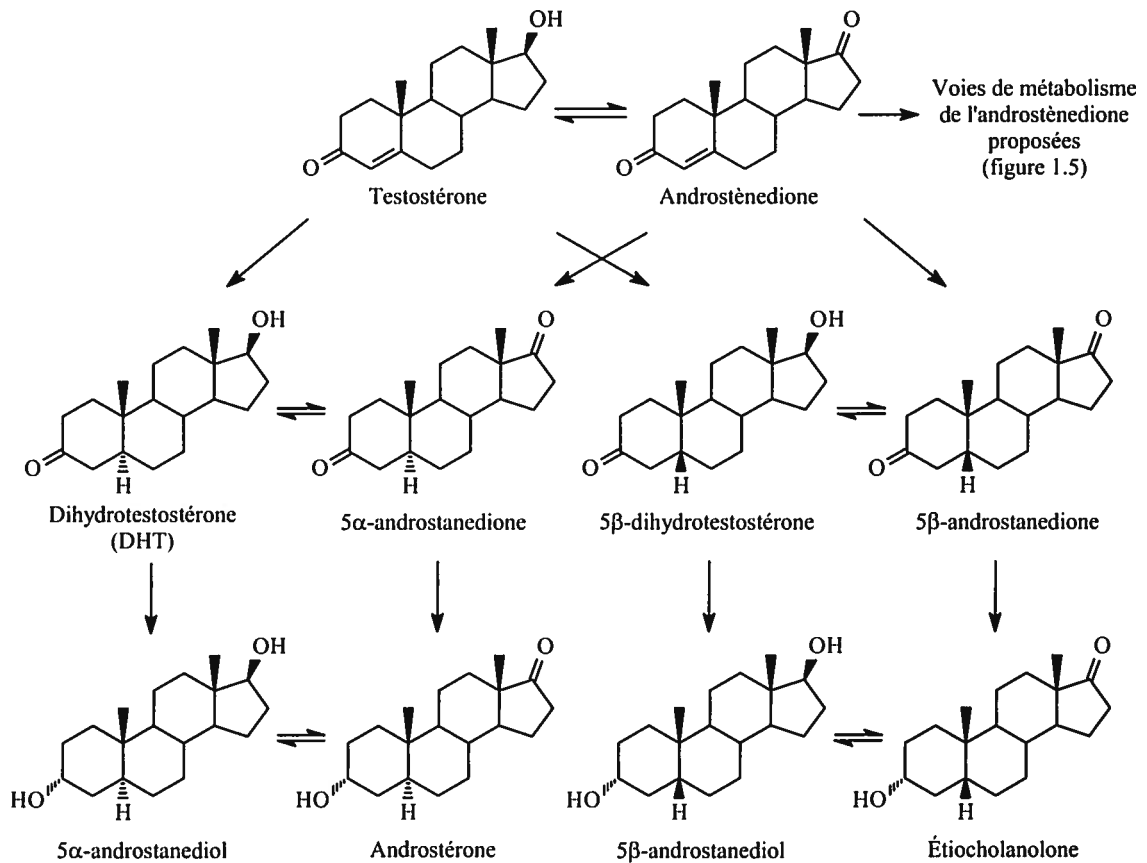


Figure 1.4 : Métabolites excrétés de la testostérone (Schänzer, 1996-b)

La formation de métabolites caractéristiques de l'androstènedione a également été observée. L'équipe de Uralets a rapporté la présence d'un métabolite hydroxylé, sans toutefois l'identifier. Lévesque et ses collaborateurs ont identifié la 6 α -hydroxy-4-

¹ Sonde urinaire de la prise de testostérone. Un rapport supérieur à 6 est considéré comme résultant de l'administration de testostérone (CIO, 2001).

androstène-3,17-dione (6α -hydroxyandrostènedione) dans la fraction glucuroconjuguée et a proposé des structures pour trois autres métabolites spécifiques (Uralets et Gillette, 1998; Lévesque et Ayotte, 1999-a). La 6β -hydroxyandrostérone et la 6β -hydroxyétiocholanolone seraient excrétées dans les fractions glucuroconjuguée et sulfoconjuguée, alors que l'isomère 6β -hydroxyépiandrostérone serait sulfoconjugué. Ces métabolites seraient issus des réactions résumées à la figure 1.5 (Lévesque et Ayotte, 1999-a; Lévesque, Goudreault et Ayotte, 1999).

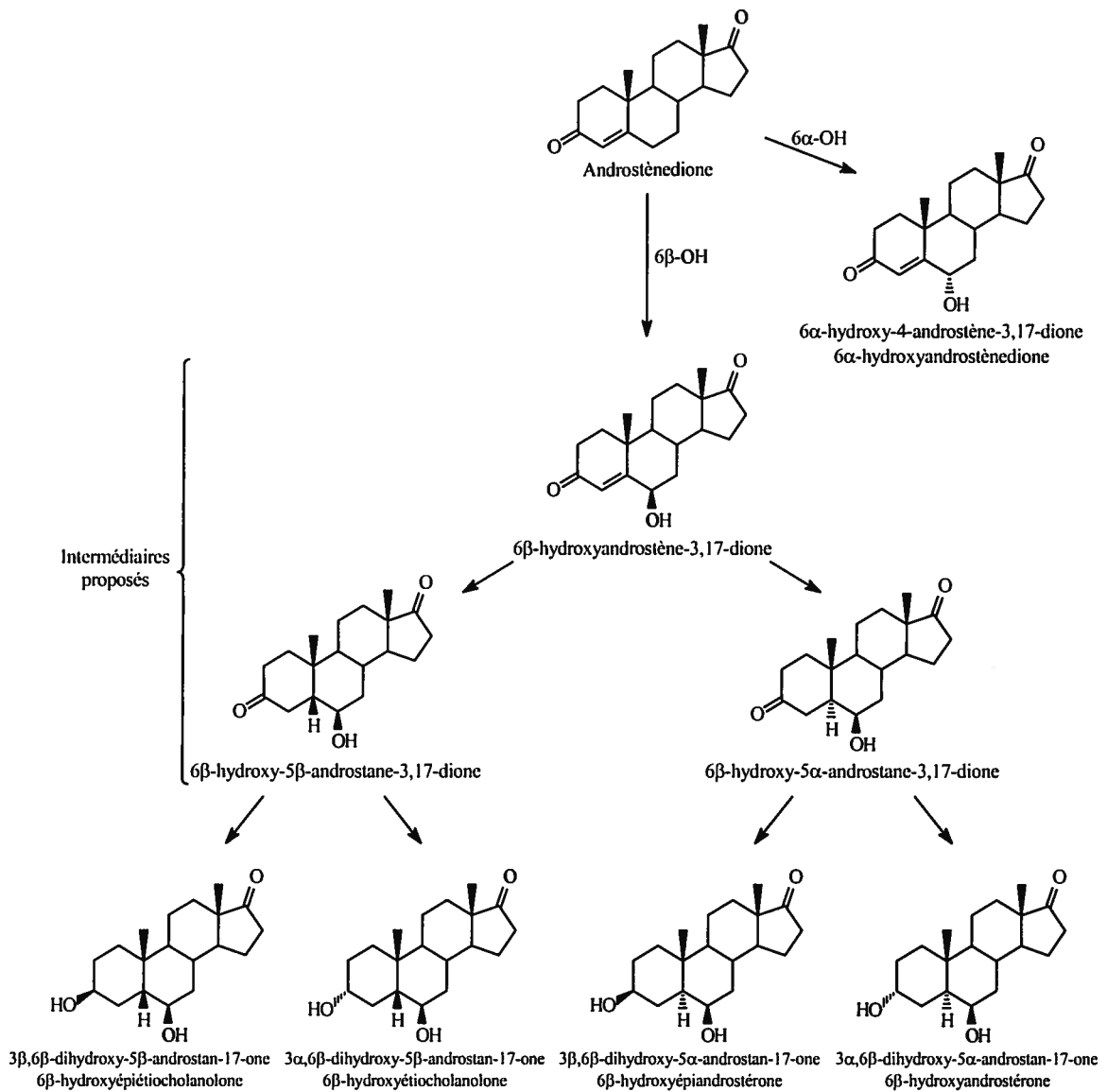
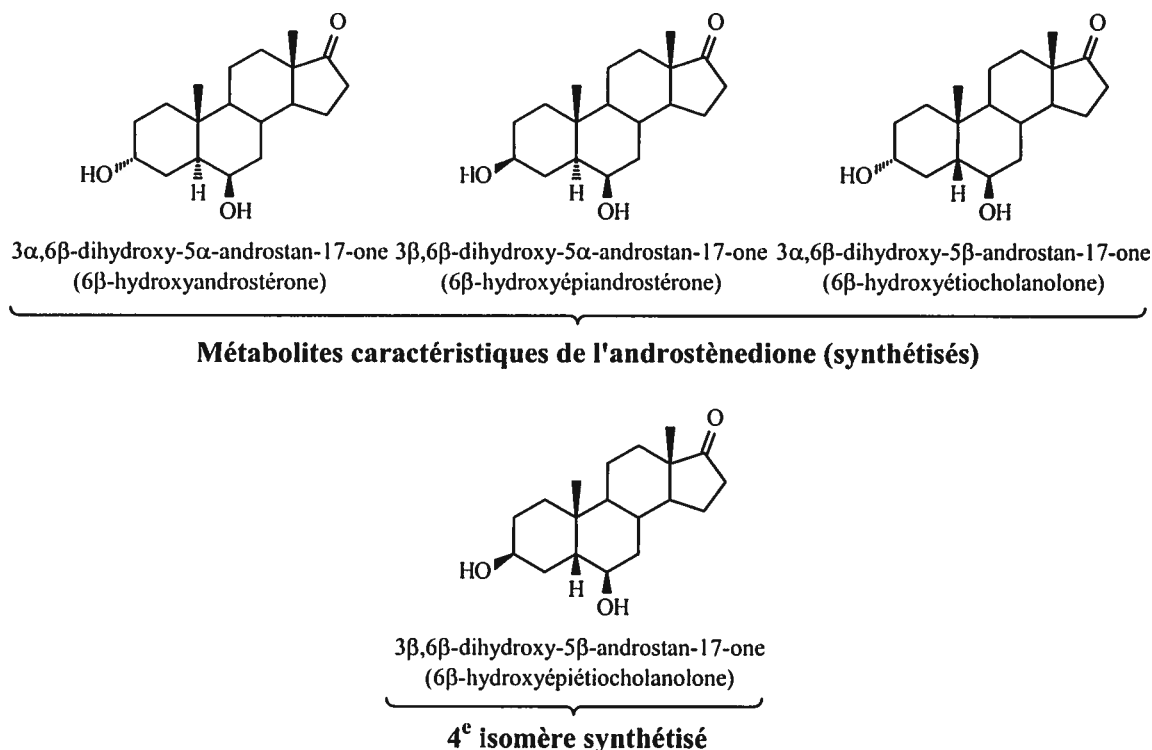


Figure 1.5 : Excrétion des métabolites de l'androstènedione (Lévesque, Goudreault et Ayotte, 1999)

1.5 Objectifs du projet

L'efficacité des contrôles antidopage dépend largement de la durée de la période de détection et de la fiabilité des sondes utilisées pour la détection. Les travaux poursuivis dans ce projet visent la caractérisation finale de métabolites urinaires de l'androstènedione, soit la 6 β -hydroxyandrostérone, la 6 β -hydroxyétiocholanolone et la 6 β -hydroxyépiandrostérone (figure 1.6). À cette fin, il est nécessaire de procéder à la synthèse des composés de référence. Les synthèses ont été effectuées au Centre de recherche en endocrinologie moléculaire et oncologique (CREMO) du Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL) à Québec sous la supervision du professeur Donald Poirier. Elles comprennent aussi celle du dernier isomère possible, soit la 6 β -hydroxyépiétiocholanolone (figure 1.6). La confirmation de la structure des composés synthétisés a été obtenue par la caractérisation en résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (^1H), du carbone 13 (^{13}C) et en spectrométrie de masse. Aussi, une quantification des métabolites urinaires 6 β -hydroxyandrostérone (G,S), 6 β -hydroxyétiocholanolone (G,S), 6 β -hydroxyépiandrostérone (S) et 6 α -hydroxyandrostènedione (G) post-administration d'androstènedione a été effectuée pour en mesurer l'excrétion.

Figure 1.6 : Dérivés 6 β -hydroxylés synthétisés

1.6 Stratégie de synthèse

Une revue de la littérature a conduit à l'élaboration d'un plan de synthèse relativement simple et commun pour les 4 isomères (figure 1.6). Celui-ci est présenté à la figure 2.1. L'étape cruciale est l'hydroxylation en position 6 β . Nous avons utilisé la réaction photochimique décrite par les équipes de Gardi et Schänzer pour obtenir la 6 β -hydroxy-4-androstène-3,17-dione (6 β -hydroxyandrostènedione) (**3**) (Gardi et Lusignani, 1967; Schänzer et Donike, 1993). Cette dernière nécessite l'utilisation d'un dérivé ayant un groupe éther en position 3 et possédant des liens doubles aux positions 3 et 5. Nous l'avons obtenu de l'androstènedione à l'aide d'une réaction présentée par l'équipe de Carruthers (Carruthers et Garshasb, 1992). Les dérivés visés dans la synthèse possèdent les configurations 5 α - et 5 β -. Plusieurs méthodes de réduction sont possibles. Une réduction catalytique avec palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène fut retenue, car elle permet d'obtenir les deux isomères voulus en une seule réaction et ceci

sans affecter les fonctions cétone présentes (Kurtney *et al.*, 1989). La dernière étape est la réduction de la fonction cétone en position 3 pour l'obtention de groupements hydroxyle en 3 α - et 3 β -. La réaction retenue en est une régio et stéréosélective impliquant les réactifs K-Selectride[®] ou L-Selectride[®] (Wiebe, Deline et Buckingham, 1985; Contreras et Mendoza, 1979), préservant la fonction cétone en position 17. De plus, l'isomère est formé en fonction de la conformation du lien C-H en position 5. L'isomère 5 β - conduit à l'obtention de l'hydroxyle 3 β - et inversement. La séquence décrite permet l'obtention de deux produits, soit la 6 β -hydroxyépiétiocholanolone (**6**) et la 6 β -hydroxyandrostérone (**7**). Les deux autres produits voulus possédant des hydroxyles inversés en position 3, nous avons retenu d'effectuer leur inversion à l'aide d'une réaction du type Mitsunobu (Mitsunobu, 1981; Dionne, Tchédam Ngatcha et Poirier, 1997). Elle consiste à former un ester de configuration inverse sur le carbone porteur de l'hydroxyle, suite à une hydrolyse basique de l'ester on obtient un groupement hydroxyle de configuration inverse. Cette réaction nécessite la protection de l'hydroxyle en position 6 β avant la réduction de la fonction cétone en position 3. Plusieurs groupements protecteurs sont disponibles, deux ont été retenus, soit le dérivé *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) et le dérivé tétrahydropyranyle (THP) (Tremblay et Poirier, 1996; Tremblay et Poirier, 2000). Finalement, l'hydrolyse des groupements protecteurs conduit à l'obtention de la 6 β -hydroxyétiocolanolone (**12**) et de la 6 β -hydroxyépiandrostérone (**17**).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

2.1 Réactifs

Les réactifs ont été achetés de Aldrich (Milwaukee, WI, USA), de Sigma (St-Louis, MO, USA) ou de Pierce (Rockford, IL, USA) et certains stéroïdes de Steraloids (Wilton, NH, USA) tels que la 6 α -hydroxyandrostènedione, la 5 α -androstan-17-one et le 3 β ,17 β -dihydroxy-17 α -méthyl-5 α -androstane. Les solvants ont été obtenus de Baker (Montréal, QC, Canada), de Fisher (Montréal, QC, Canada) ou de Caledon (Montréal, QC, Canada). Les solvants deutérés, chloroforme, méthanol, N,O-bis-(triméthyl-d₉-silyl) acétamide (BSA-d₉) et triméthylchlorosilane (TMCS), proviennent de CDN Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada). Les solvants anhydres proviennent de Aldrich dans des « SureSeal bottles » (Milwaukee, WI, USA). Le tétrahydrofurane (THF) utilisé pour les synthèses est distillé en présence de sodium et de benzophénone sous argon. Les réactions requérant des conditions anhydres ont été effectuées sous une pression positive d'argon avec de la vaisselle en verre qui a été séchée à l'étuve. Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été faites sur des plaques de 0,25 mm de gel de silice 60 F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, Germany) et révélées par UV (254 nm) ou par une solution d'ammonium molybdate de cérium. Les colonnes de chromatographie sont faites avec du gel de silice 60 de 230-400 mesh ASTM (E. Merck, Darmstadt, Germany). L'ampoule incandescente de la lampe à photolyse provient de Sylvania GTE (caractéristiques : 300 W, 120 V). L'azote de qualité HP+ et l'hélium de qualité zéro proviennent de Air Liquide Canada (Montréal, QC, Canada). Les extractions en phase solide-liquide sont effectuées sur des cartouches Sep-Pak[®] Plus C₁₈ achetées chez Waters (Milford, MA, USA). L'enzyme β -glucuronidase de *Escherichia coli*, type IX-A, sous forme de poudre lyophilisée, contenant de 1 500 000 à 2 000 000 U/g d'activité β -glucuronidase provient de chez Sigma (St-Louis, MO, USA).

2.2 Analyses de caractérisation

2.2.1 ANALYSE DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont enregistrés à 300 MHz (^1H) et 75,5 MHz (^{13}C) avec un spectromètre Bruker AC/F 300 (Bruker, Billerica, MA, USA). Les déplacements chimiques (δ en ppm) de référence pour les différents solvants sont : 7,26 ppm (RMN ^1H) et 77,00 ppm (RMN ^{13}C) pour le chloroforme-d et 3,30 ppm (RMN ^1H) et 49,00 ppm (RMN ^{13}C) pour le méthanol- d_4 . L'assignation des signaux RMN est effectuée à l'aide de différentes expériences RMN 1D et 2D : NOE (nuclear Overhauser enhancement) effet Overhauser nucléaire; DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer); COSY (homonuclear correlated spectroscopy) spectroscopie de corrélation homonucléaire; HETCOR (heteronuclear correlation) spectroscopie de corrélation hétéronucléaire; COLOC (heteronuclear shift correlation via long-range coupling).

2.2.2 ANALYSE INFRAROUGE (IRTF)

Les spectres infrarouges (IR) sont obtenus à partir de solutions dans le chloroforme sur des pastilles de NaCl à l'aide d'un spectromètre infrarouge Perkin-Elmer 1600 (FT-IR series) (Norwalk, CT, USA). Seules les bandes caractéristiques sont rapportées.

2.2.3 ANALYSE DE PURETÉ PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

La pureté des composés synthétisés est déterminée par CLHP en utilisant un appareil de Waters Associates (Milford, MA, USA) muni d'un détecteur ultraviolet (205 nm) et d'une colonne en phase inverse Nova-Pak C_{18} (150 mm x 3,9 mm de diamètre interne), et

d'une phase mobile constituée d'acétonitrile, d'eau et de méthanol à un débit de 1 mL/min.

2.2.4 ANALYSE DE SPECTROMÉTRIE DE MASSE (SM)

Les spectres de masse à basse résolution (SMBR) ont été obtenus par l'utilisation d'un système constitué d'un détecteur sélectif de masse (SM) HP 5970 (Hewlett-Packard, Mississauga, ON, Canada), impact électronique (IE), couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CG) HP 5890 (Série II) équipé d'un injecteur automatique HP 7673. Les spectres de masse à haute résolution (SMHR) ont été obtenus du Centre Régional de Spectrométrie de Masse (Université de Montréal, Montréal, QC, Canada).

2.3 Synthèses

La synthèse chimique des dérivés 6 β -hydroxylés a permis d'obtenir 4 produits finaux (6,7,12,17), les produits 7, 12 et 17 étant les métabolites caractéristiques de l'androstènedione. Le plan de synthèse qui a été utilisé pour obtenir les produits est présenté à la figure 2.1. La synthèse de chacun des produits requiert 4 à 8 étapes.

Dans cette section, les étapes de synthèse sont décrites une à une et les caractérisations des produits obtenus sont présentées en même temps. Ces dernières comprennent l'obtention des spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (^1H) et du carbone (^{13}C), infrarouges (IR) et de masse (SM). Pour la caractérisation RMN, seuls les signaux spécifiques sont rapportés en RMN ^1H , alors que tous les signaux sont énumérés en RMN ^{13}C . Une duplication des signaux est généralement enregistrée pour les dérivés THP. Les pics additionnels sont indiqués en RMN ^1H alors qu'en RMN ^{13}C , tous les pics sont énumérés. L'assignation des atomes de carbone est aussi faite pour les produits finaux et est présentée au tableau 3.2.

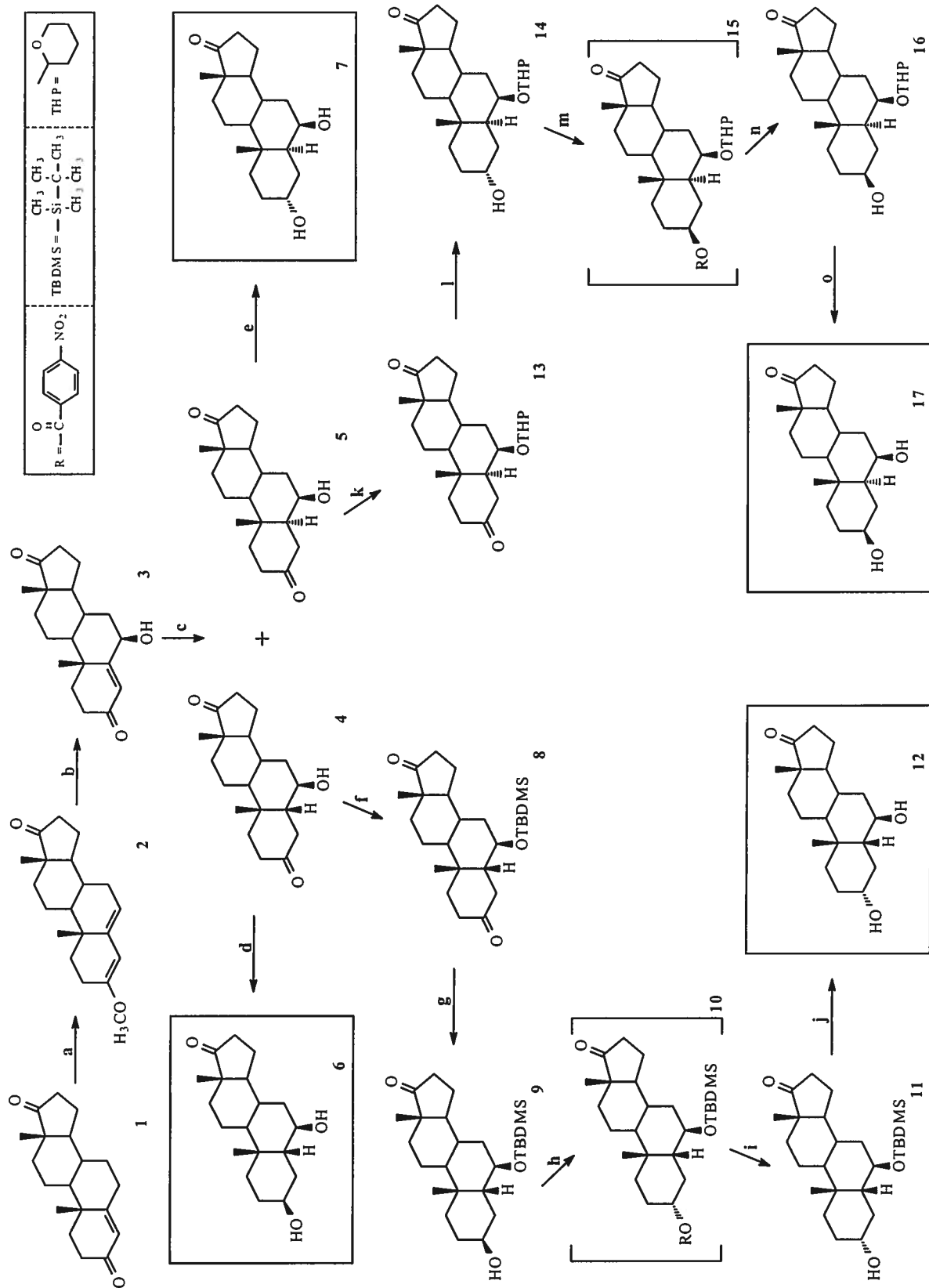
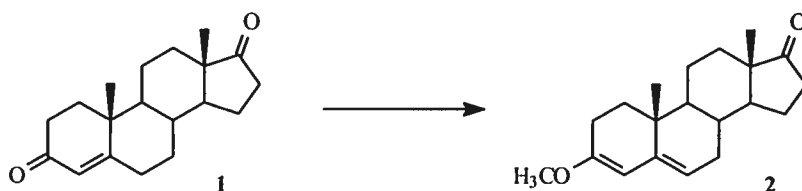
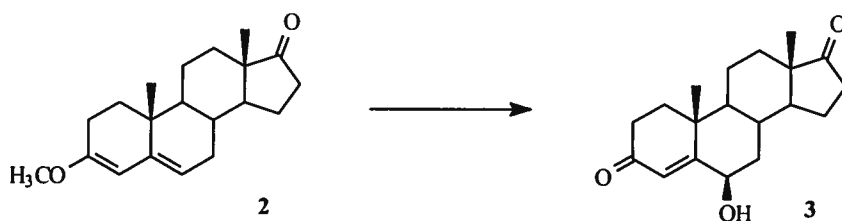


Figure 2.1 : Plan de synthèse des dérivés 6 β -hydroxylés. (a) (MeO)₃CH, *p*-TSA· H₂O, THF, 25 °C, 3,5 h, (97 %); (b) EtOH anhydre, hv, 24 h, (50 %). (c) EtOH anhydre, Pd/CaCO₃, H₂, 25 °C, 3,5 h, (4), 65 %; (4), 65 %; (d) K-Selectride[®], THF, -78 °C, 2 h, (33 %); (e) K-Selectride[®], THF, -78 °C, 1,5 h, (52 %); (f) TBDMS-Cl, imidazole, DMF, 25 °C, 21,5 h, (78 %); (g) K-Selectride[®], THF, -78 °C, 1,5 h, (94 %); (h) acide 4-nitrobenzoïque, PPh₃, DEAD, toluène, 80 °C, 22,5 h; (i) K₂CO₃, MeOH, 25 °C, 4 h, (38 % pour h et i); (j) HCl 4 %, MeOH, 25 °C, 4 h, (88 %); (k) DHP, *p*-TSA· H₂O, CH₂Cl₂, 25 °C, 50 min, (95 %); (l) K-Selectride[®], THF, -78 °C, 1,25 h, (97 %); (m) acide 4-nitrobenzoïque, PPh₃, DEAD, toluène, 80 °C, 4 h; (n) K₂CO₃, MeOH, 25 °C, 16 h, (79 % pour m et n); (o) *p*-TSA· H₂O, MeOH, 40 °C, 2,75 h, (60 %).

2.3.1 3-METHOXY-3,5-ANDROSTADIÈN-17-ONE (2)



À une solution de 4-*androstène-3,17-dione* (**1**) (5,09 g, 17,8 mmoles) dans le THF anhydre (25 mL) sont ajoutés du triméthyle orthoformate anhydre (6,00 mL, 55 mmoles) et de l'acide *p*-toluènesulfonique monohydrate (*p*-TSA·H₂O) (171 mg, 0,99 mmole). La solution est agitée pendant 3,5 h et traitée avec de la triéthyle amine (0,60 mL, 4,3 mmoles) et de l'eau (3 mL). L'évaporation du solvant donne une pâte jaune qui est filtrée sur papier filtre, lavée avec de l'eau et séchée sous le vide d'une pompe mécanique pendant environ 2 jours. Le produit est recueilli (5,17 g, rendement : 97 % brut) et utilisé sans purification additionnelle. Solide jaune pâle. IR ν (film)/cm⁻¹ : 1738 (C=O, cétone en C17), 1654 (C=C), 1232 (CH₃-O-CH, éther), 1169 (CH₃-O-CH-R, éther). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.89 (s, 3H, 18-CH₃), 0.98 (s, 3H, 19-CH₃), 1.0-2.4 (m, 16H du squelette stéroïdien), 2.45 (dd, J₁ = 19.0 Hz et J₂ = 8.7 Hz, 1H, 16 β -CH), 3.56 (s, 3H, CH₃O), 5.12 (s, 1H, 4-CH), 5.23 (s évasé, 1H, 6-CH). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : 13.63, 18.92, 20.45, 21.79, 25.21, 30.68, 31.40, 31.46, 33.70, 35.25, 35.81, 47.64, 48.36, 51.89, 54.23, 98.33, 117.35, 140.95, 155.40, 221.06. SMBR : calculé pour C₂₀H₂₈O₂ (M⁺) : 300.2089, mesuré : 300.

2.3.2 6 β -HYDROXY-4-ANDROSTÈNE-3,17-DIONE (3)

a) Procédure générale

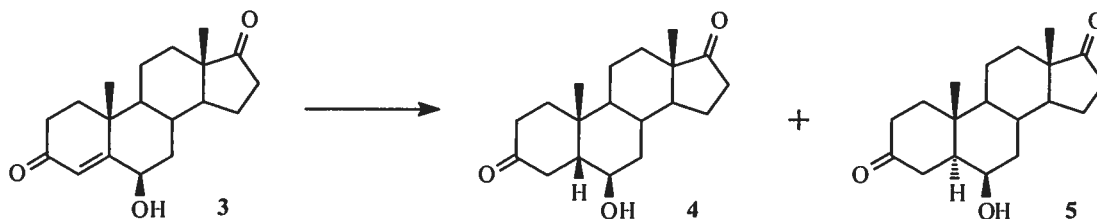
Une solution de 3-*méthoxy-3,5-androstadièn-17-one* (**2**) (303 mg, 1,00 mmole) dans l'éthanol anhydre (22,5 mL) est agitée à l'air ambiant dans un ballon réactionnel en Pyrex

sous l'éclairage d'une lampe incandescente de 300 W durant 12 h. On ajoute 10 mL d'eau, on agite 5 minutes et l'éthanol est évaporé sous pression réduite. Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO_4 anhydre, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (Hexane/AcOEt, 3:7) et donne 145 mg (rendement : 50 %) du produit désiré (**3**). Solide blanc. IR ν (film)/ cm^{-1} : 3418 (OH, hydroxyle), 1734 (C=O, cétone en C17), 1676 (C=O, cétone en C3). RMN ^1H δ (ppm) (CDCl_3) : 0.95 (s, 3H, 18- CH_3), 1.41 (s, 3H, 19- CH_3), 1.0-1.6 (m, 18H du squelette stéroïdien), 4.41 (s évasé, 1H, 6 α -CH), 5.84 (s, 1H, 4-CH). RMN ^{13}C δ (ppm) (CDCl_3) : 13.71, 19.44, 20.18, 21.62, 29.33, 31.19, 34.08, 35.70, 36.95, 37.17, 38.00, 47.56, 50.82, 53.57, 72.55, 126.33, 168.07, 200.32, 220.55. SMHR : calculé pour $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_3$ (M^{*+}) : 302.1882, mesuré : 302.1875.

b) Optimisation du temps d'hydroxylation photochimique

Cette expérience est effectuée afin d'optimiser le temps de la réaction. Quatre solutions contenant 100 mg de *3-méthoxy-3,5-androstadièn-17-one* (**2**) dans l'éthanol anhydre (7,5 mL) sont brassées dans des ballons de Pyrex situés à environ 25 cm de la lampe. Le traitement après réaction est le suivant pour l'ensemble des quatre essais : la solution a été traitée avec de l'eau (8 mL) et agitée pendant 5 minutes. L'éthanol est évaporé sous pression réduite et le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est traitée comme décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (Hexane/AcOEt, 3:7). Les spectres de RMN ^1H confirment qu'il s'agit du bon produit. Les rendements pour les quatre temps sont : T_1 (6 h) = 40 %, T_2 (12 h) = 47 %, T_3 (24 h) = 52 % et T_4 (48 h) = 46 %. Ces résultats sont présentés sous forme graphique à la figure 3.1.

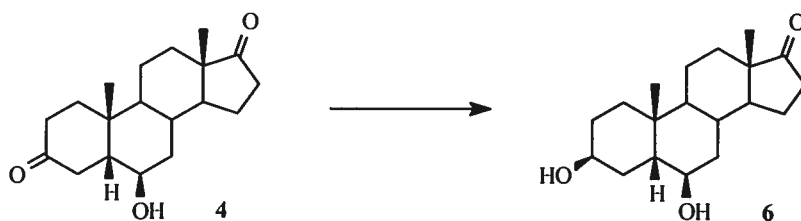
2.3.3 6 β -HYDROXY-5 β -ANDROSTANE-3,17-DIONE (**4**) ET 6 β -HYDROXY-5 α -ANDROSTANE-3,17-DIONE (**5**)



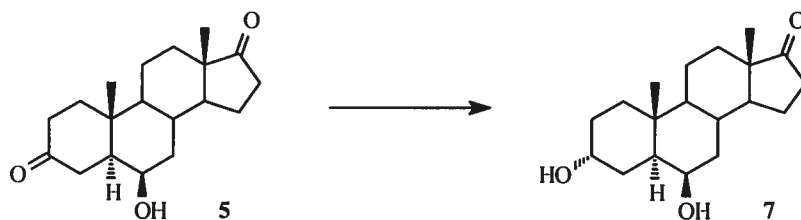
Une solution de 6 β -hydroxy-4-androstène-3,17-dione (**3**) (207 mg, 0,69 mmole) dans l'éthanol anhydre (17,5 mL) contenant du Pd/CaCO₃ 5 % (35,4 mg) est agitée en présence d'une atmosphère d'hydrogène (101,3 kPa) pendant 3,5 h. Le catalyseur est enlevé par filtration sur Celite et lavé avec de l'éthanol anhydre. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (Hexane/AcOEt, 2:8) afin de séparer les deux isomères. On obtient 137 mg (rendement : 65 %) de 6 β -hydroxy-5 β -androstane-3,17-dione (**4**) et 49 mg (rendement : 21 %) de 6 β -hydroxy-5 α -androstane-3,17-dione (**5**).

4 (solide jaune) : IR ν (film)/cm⁻¹ : 3446 (OH, hydroxyle), 1734 (C=O, cétone en C17), 1706 (C=O, cétone en C3). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.83 (s, 3H, 18-CH₃), 1.17 (s, 3H, 19-CH₃), 1.2-2.3 (m, 19H du squelette stéroïdien), 2.39 (dd, J₁ = 18.9 Hz et J₂ = 8.7 Hz, 1H, 16 β -CH), 2.59 (s large 1H, 4-CH), 3.68 (s, 1H, 6-CH α). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : 13.79 (C18), 20.20, 21.72, 24.48 (C19), 30.15, 31.54, 32.88, 34.78, 35.81, 36.37, 37.24, 41.87, 41.96, 47.81, 49.99, 51.21, 71.25, 211.49, 220.76. SMHR : Calculé pour C₁₉H₂₈O₃ (M⁺) : 304.2039, mesuré : 304.2044.

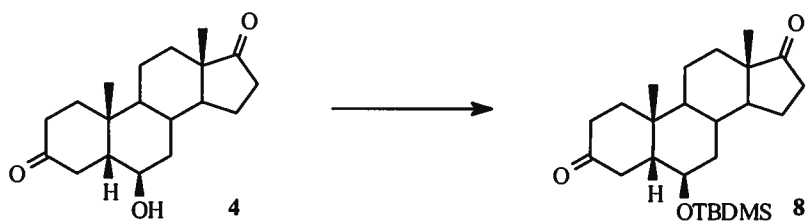
5 (solide blanc) : IR ν (film)/cm⁻¹ : 3456 (OH, hydroxyle), 1734 (C=O, cétone en C17), 1707 (C=O, cétone en C3). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.85 (m, 1H), 0.93 (s, 3H, 18-CH₃), 1.24 (s, 3H, 19-CH₃), 1.3-2.4 (m, 18H du squelette stéroïdien), 2.48 (dd, J₁ = 19.3 Hz et J₂ = 8.7 Hz, 1H, 16 β -CH), 2.81 (t, J = 14.7 Hz, 1H, 4-CH), 3.84 (s évasé, 1H, 6 α -CH). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : 13.78 (C18), 14.79 (C19), 20.44, 21.72, 29.84, 31.34, 35.75 (2C), 37.99, 38.51, 39.61, 41.91, 47.73, 48.81, 50.93, 53.77, 70.13, 212.33, 220.89. SMHR : calculé pour C₁₉H₂₈O₃ (M⁺) : 304.2039, mesuré : 304.2028.

2.3.4 3 β ,6 β -DIHYDROXY-5 β -ANDROSTAN-17-ONE [6 β -HYDROXYÉPIÉTIOLANOLONE] (**6**)

À une solution de 6 β -hydroxy-5 β -androstane-3,17-dione (**4**) (109 mg, 0,69 mmole) dans le THF anhydre (0,65 mL) maintenue à -78 °C est ajouté doucement 0,358 mL de K-Selectride[®] (tri-*sec*-butylborohydride de potassium) 1 M dans le THF. La solution est agitée à -78 °C pendant 2 h sous argon puis ramenée à la température de la pièce. On ajoute 0,5 mL de NaOH 6 N, 0,5 mL de H₂O₂ 30 % et un peu de K₂CO₃. La solution est diluée avec de l'eau et le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est traitée tel que décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (6 % MeOH dans CH₂Cl₂) et donne 36,2 mg (rendement : 33 %) du produit désiré (**6**). Solide blanc. IR ν (film)/cm⁻¹ : 3380 (OH, hydroxyle), 1729 (C=O, cétone en C17). RMN ¹H δ (ppm) (CD₃OD) : 0.89 (s, 3H, 18-CH₃), 1.15 (s, 3H, 19-CH₃), 1.2-2.2 (m, 21H du squelette stéroïdien), 2.40 (dd, J₁ = 18.9 Hz et J₂ = 8.8 Hz, 1H, 16 β -CH), 3.67 (d, J = 1.9 Hz, 1H, 6 α -CH), 4.01 (s, 1H, 3 α -CH). RMN ¹³C δ (ppm) (CD₃OD) : 14.19 (C18), 21.22, 22.78, 26.48 (C19), 28.04, 31.42, 31.67, 32.89, 34.01, 34.44, 36.12, 36.77, 41.60, 44.15, 48.14, 52.58, 66.90, 73.76, 224.06. SMHR : calculé pour C₁₉H₃₀O₃ (M⁺) : 306.2195, mesuré : 306.2185.

2.3.5 3 α ,6 β -DIHYDROXY-5 α -ANDROSTAN-17-ONE [6 β -HYDROXYANDROSTÉRONE] (7)

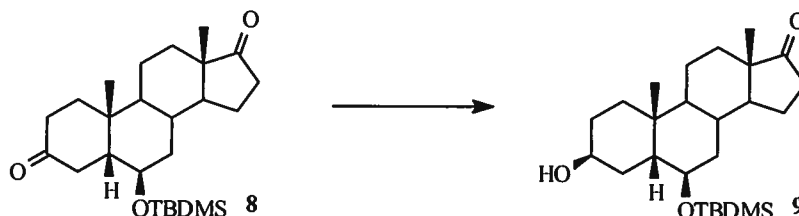
À une solution de 6 β -hydroxy-5 α -androstane-3,17-dione (5) (87,5 mg, 0,29 mmole) dans du THF anhydre (1,5 mL) maintenue à -78 °C est ajouté doucement 0,29 mL de K-Selectride[®] (tri-*sec*-butylborohydride de potassium) 1 M dans le THF. La solution est agitée à -78 °C pendant 1,5 h sous argon puis ramenée à la température de la pièce. On ajoute 0,8 mL de NaOH 3 N et 0,85 mL de H₂O₂ 30 %. La solution est diluée avec 4 mL d'eau et le produit est extrait avec de l'éther diéthylique. La phase organique est traitée tel que décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (5 % MeOH dans CH₂Cl₂) et donne 45,8 mg (rendement : 52 %) du produit désiré (7). Solide blanc. IR ν (film)/cm⁻¹ : 3386 (OH, hydroxyle), 1732 (C=O, cétone en C17). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.85 (m, 1H), 0.87 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.2-2.2 (m, 20H du squelette stéroïdien), 2.43 (dd, J₁ = 19.0 Hz et J₂ = 8.8 Hz, 1H, 16 β -CH), 3.78 (d, J = 2.4 Hz, 1H, 6 α -CH), 4.16 (t, J = 2.6 Hz, 1H, 3 β -CH). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : 13.83 (C18), 14.73 (C19), 19.83, 21.70, 29.04, 29.97, 31.46, 32.92, 33.83, 35.79, 36.22, 38.44, 41.70, 47.82, 51.21, 54.27, 66.39, 71.71, 221.30. SMHR : calculé pour C₁₉H₃₀O₃ (M⁺) : 306.2195, mesuré : 306.2185. CLHP pureté : 96.2 %.

2.3.6 6 β -(*TERT*-BUTYLDIMÉTHYLSILYLOXY)-5 β -ANDROSTANE-3,17-DIONE (8)

À une solution de 6 β -hydroxy-5 β -androstane-3,17-dione (4) (307 mg, 1,00 mmole) dans le N,N-diméthylformamide (DMF) anhydre (7,5 mL) sont ajoutés de l'imidazole (1,02 g,

15 mmoles) et du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS-Cl) (1,14 g, 7,59 mmoles). La solution est agitée pendant 21 h à la température de la pièce. Le mélange réactionnel est dilué avec de l'eau et le produit est extrait avec de l'éther diéthylique. La phase organique est traitée tel que décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (Hexane/AcOEt, 8:2) et donne 329 mg (rendement : 78 %) du produit désiré (**8**). Solide blanc. IR ν (film)/ cm^{-1} : 1740 (C=O, cétone en C17), 1717 (C=O, cétone en C3), 1254 (Si-CH₃), 1056 (CH₂-O-Si). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.034-0.039 (2s, 6H, Si-(CH₃)₂), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃) 0.92 (s, 3H, 18-CH₃), 1.21 (s, 3H, 19-CH₃), 1.3-2.4 (m, 19H du squelette stéroïdien), 2.48 (dd, J₁ = 19.0 Hz et J₂ = 8.6 Hz, 1H, 16 β -CH), 3.64 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 6 α -CH). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : -4.98 (2C), 13.71 (C18), 17.96, 20.24, 21.79, 24.80 (C19), 25.76 (3C), 30.25, 31.62, 33.71, 35.04, 35.77, 36.51, 37.44, 42.07 (2C), 47.79, 50.19, 51.06, 71.74, 211.75, 220.71. SMBR : calculé pour C₂₅H₄₂O₃Si (M⁺) : 418.2903, mesuré : 418.

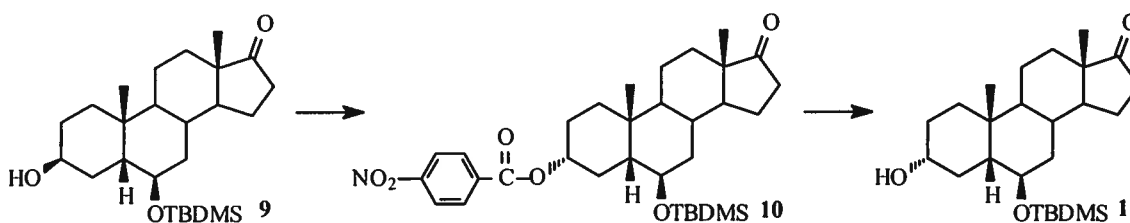
2.3.7 6 β -(*tert*-BUTYLDIMÉTHYLSILOXY)-3 β -HYDROXY-5 β -ANDROSTAN-17-ONE (**9**)



À une solution de 6 β -(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-5 β -androstane-3,17-dione (**8**) (78,6 mg, 0,19 mmole) dans du THF anhydre (2,0 mL) maintenue à -78 °C est ajouté doucement 0,24 mL de K-Selectride[®] (tri-*sec*-butylborohydride de potassium) 1 M dans le THF. La solution est agitée à -78 °C pendant 1,5 h sous argon puis ramenée à la température de la pièce. On ajoute 0,5 mL de NaOH 0,5 N et 0,1 mL de H₂O₂ 30 %. La solution est diluée avec 10 mL d'eau et le produit est extrait avec de l'éther diéthylique. La phase organique est traitée tel que décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (3 % MeOH dans CH₂Cl₂) et donne 74,3 mg (rendement : 94 %) du produit désiré (**9**). Solide blanc. IR ν (film)/ cm^{-1} : 3434 (OH, hydroxyle), 1740 (C=O, cétone en

C17), 1254 (Si-CH₃) 1052 (CH₂-O-Si). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.021-0.025 (2s, 6H, Si-(CH₃)₂), 0.87 (s, 3H, 18-CH₃), 0.88 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 1.12 (s, 3H, 19-CH₃), 1.2-2.2 (m, 18H du squelette stéroïdien), 2.44 (dd, J₁ = 19.1 Hz et J₂ = 8.7 Hz, 1H, 16β-CH), 3.63 (d, J = 2.1 Hz, 1H, 6α-CH), 4.07 (s, 1H, 3α-CH). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : -4.86 (2C), 13.69 (C18), 17.95, 20.07, 21.79, 25.79 (3C), 26.29 (C19), 27.48, 30.20, 30.34, 31.68, 33.58, 34.22, 35.24, 35.83, 40.40, 43.48, 47.88, 51.23, 66.16, 73.10, 221.36. SMBR : calculé pour C₂₅H₄₂O₃Si (M⁺) : 420.3060, mesuré : 420.

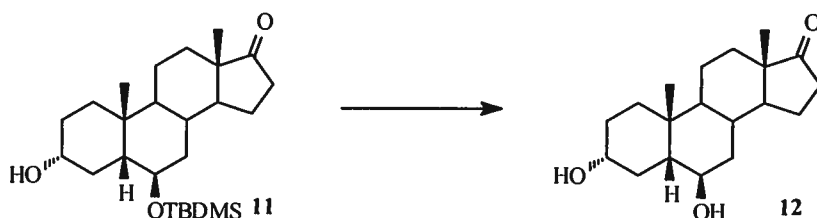
2.3.8 6β-(*TERT*-BUTYLDIMÉTHYLSILYLOXY)-3α-HYDROXY-5β-ANDROSTAN-17-ONE (**11**)



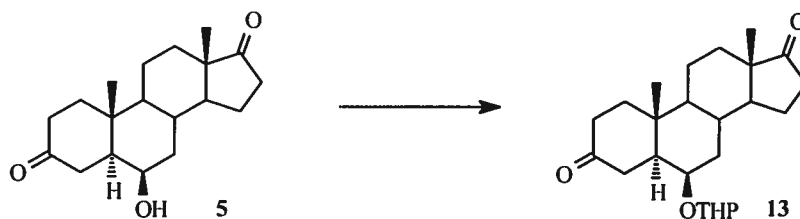
À une solution de 6β-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-3β-hydroxy-5β-androstan-17-one (**9**) (56,5 mg, 0,13 mmole) dans le toluène (5,0 mL) sont ajoutés successivement de l'acide 4-nitrobenzoïque (33,5 mg, 0,20 mmole), de la triphénylphosphine (PPh₃) (46,7 mg, 0,20 mmole) et du diéthylazodicarboxylate (DEAD) (0,031 mL, 0,20 mmole). La solution est chauffée à 80 °C sous argon pendant 22 h puis traitée avec une solution de NaHCO₃ 2 % (25 mL). Le produit est extrait avec de l'éther diéthylique. La phase organique est traitée tel que décrit précédemment. L'huile jaune subit une purification par chromatographie « flash » (2 % MeOH dans CH₂Cl₂). Ensuite, l'ester ainsi obtenu (**10**) est hydrolysé par traitement avec K₂CO₃ (1,3 équivalent) dans le méthanol durant 4 h. Après l'ajout d'eau, le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle, la phase organique est traitée comme décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (2 % MeOH dans CH₂Cl₂) et donne 21,2 mg (rendement : 38 %) du produit désiré (**11**). Solide jaune. IR ν (film)/cm⁻¹ : 3316 (OH, hydroxyle), 1734 (C=O, cétone en C17), 1251 (Si-CH₃), 1056 (CH₂-O-Si). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.030 (s, 6H, Si-(CH₃)₂), 0.87 (s, 3H, 18-CH₃), 0.88 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃),

1.09 (s, 3H, 19-CH₃), 1.2-2.2 (m, 18H du squelette stéroïden), 2.45 (dd, J₁ = 19.1 Hz et J₂ = 8.6 Hz, 1H, 16β-CH), 3.60 (m, 1H, 3β-CH), 3.69 (d, J = 1.8 Hz, 1H, 6α-CH). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : -4.93 (2C), 13.70 (C18), 17.99, 19.84, 21.82, 25.80 (C19 et 3C), 30.22, 30.52, 31.65, 34.29, 34.73, 35.84, 36.41, 41.01, 47.85, 48.67, 51.15, 62.26, 71.25, 72.98, 221.27. SMBR : calculé pour C₂₅H₄₂O₃Si (M⁺) : 420.3060, mesuré : 420.

2.3.9 3α,6β-DIHYDROXY-5β-ANDROSTAN-17-ONE [6β-HYDROXYÉTIOCHOLANOLONE] (12)

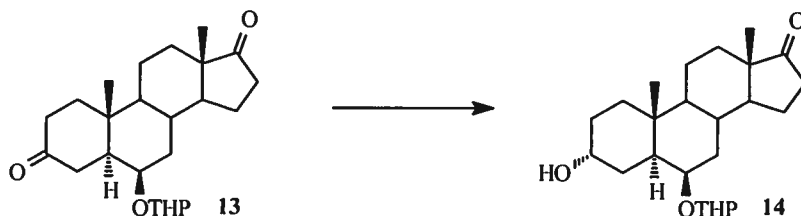


La 6β-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-3α-hydroxy-5β-androstan-17-one (**11**) (25,0 mg, 0,059 mmole) est solubilisée dans une solution de HCl 2 % (v/v) dans le MeOH (20 mL). La solution est agitée pendant 30 minutes puis on ajoute 0,4 mL de HCl concentré. La réaction est complète après 4 h d'agitation. Après l'ajout d'eau, le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est traitée tel que décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (3 % MeOH dans CH₂Cl₂) et donne 22,3 mg (rendement : 88 %) du produit désiré (**12**). Solide jaune pâle. IR ν (film)/cm⁻¹ : 3410 (OH, hydroxyle), 1734 (C=O, cétone en C17). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.88 (s, 3H, 18-CH₃), 1.06 (m, 1H), 1.14 (s, 3H, 19-CH₃), 1.2-2.2 (m, 20H du squelette stéroïdien), 2.46 (dd, J₁ = 19.1 Hz et J₂ = 8.8 Hz, 1H, 16β-CH), 3.63 (m, 1H, 3β-CH), 3.83 (d, J = 1.5 Hz, 1H, 6α-CH). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : 13.83 (C18), 19.86, 21.82, 25.47 (C19), 30.10, 30.45, 31.65, 33.48, 34.54, 35.79, 35.91, 36.29, 41.04, 47.88, 48.79, 51.37, 71.06, 72.77, 221.11. SMHR : calculé pour C₁₉H₃₀O₃ (M⁺) : 306.2195, mesuré : 306.2191. CLHP pureté : 99,8 %.

2.3.10 6 β -[(TÉTRAHYDRO-2''H-PYRAN-2''H-YL)-OXY]-5 α -ANDROSTANE-3,17-DIONE (**13**)

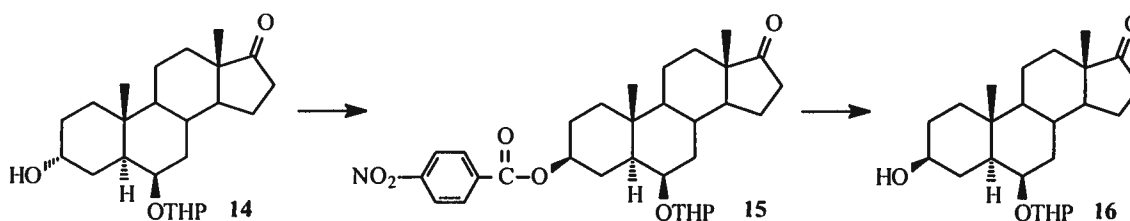
À une solution de 6 β -hydroxy-5 α -androstane-3,17-dione (**5**) (338 mg, 0,11 mmole) dans du dichlorométhane anhydre (20 mL) sont ajoutés de l'acide *p*-toluènesulfonique (*p*-TSA· H₂O) (21 mg, 0,12 mmole) et du 3,4-dihydro-2*H*-pyrane (1,11 mL, 12,2 mmoles). Le mélange réactionnel est agité à la température ambiante pendant 50 minutes sous argon. Après l'ajout d'une solution saturée de NaHCO₃, le produit est extrait avec CH₂Cl₂. La phase organique est traitée tel que décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (Hexane/AcOEt, 6:4) et donne 409 mg (rendement : 95 %) du produit désiré (**13**). Huile transparente. IR ν (film)/cm⁻¹ : 1738 (C=O, cétone en C17), 1710 (C=O, cétone en C3). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.85 (m, 1H), 0.91 et 0.93 (2s, 3H, 18-CH₃ pour 2 isomères THP), 1.0-2.4 (m, 23H du squelette stéroïdien), 1.21 (s, 3H, 19-CH₃), 2.47 (m, J₁ = 18.9 Hz J₂ = 8.7 Hz, 1H, 16 β -CH), 2.73 et 2.95 (2t, J = 14.7 Hz, 1H, 4-CH pour 2 isomères THP), 3.50 et 3.85 (2m, 2H, OCH₂ du THP), 3.58 et 3.75 (2m, 1H, 6 α -CH pour 2 isomères THP), 4.54 et 4.69 (2s évasé, 1H, OCH du THP pour 2 isomères THP). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : 13.84 (C18), 14.63, 14.73, 19.30, 19.55, 20.51, 21.82, 21.88, 25.49 25.55, 30.25, 30.81, 30.99, 31.30, 31.48, 33.20, 35.77, 35.95, 36.97, 37.99, 39.42, 39.61, 42.04, 42.47, 47.76, 48.63, 49.00, 50.89, 51.00, 53.80, 54.08, 61.99, 62.35, 72.33, 79.34, 94.32, 101.61, 212.34, 212.60, 220.70, 220.90. SMBR : calculé pour C₂₄H₃₆O₄ (M⁺) : 388.2614, mesuré : 388.

2.3.11 6 β -[(TÉTRAHYDRO-2''H-PYRAN-2''H-YL)-OXY]-3 α -HYDROXY-5 α -ANDROSTAN-17-ONE (14)

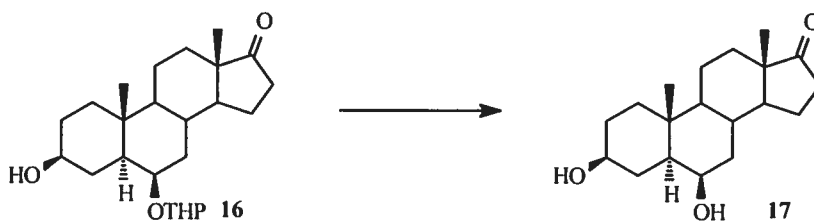


À une solution de 6 β -[(*tétrahydro-2''H-pyran-2''H-yl*)-oxy]-5 α -androstane-3,17-dione (13) (398 mg, 1,02 mmoles) dans du THF (4,5 mL) maintenue à -78 °C est ajouté doucement 1,5 mL de K-Selectride[®] (potassium tri-*sec*-butylborohydride) 1 M (1 mol/L) dans le THF. La solution est brassée à -78 °C pendant 1,25 h sous argon et ramenée à la température de la pièce. La solution est traitée avec 0,8 mL de NaOH 2,0 N et 0,6 mL de H₂O₂ 30 %. La solution est diluée avec 10 mL d'eau et le produit est extrait avec de l'éther diéthylique. La phase organique est traitée tel que décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (Hexane/AcOEt, 4:6) et donne 385 mg (rendement : 97 %) du produit désiré (14). Huile transparente. IR ν (film)/cm⁻¹ : 3414 (OH, hydroxyle), 1734 (C=O, cétone en C17). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.88 et 0.90 (2s, 3H, 18-CH₃ pour 2 isomères THP), 0.99 (s, 3H, 19-CH₃), 1.0-2.4 (m, 24H du squelette stéroïdien), 2.44 (m, J₁ = 19.0 Hz J₂ = 8.8 Hz, 1H, 16 β -CH), 3.50 et 3.87 (2m, 2H, OCH₂ pour 2 isomères du THP), 3.56 et 3.70 (2d, J₁ = 2.6, 1H, 6 α -CH pour 2 isomères THP), 4.15 (m, 1H, 3 β -CH), 4.57 et 4.67 (2s évasé, 1H, OCH du THP pour 2 isomères THP). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : 13.87, 14.51, 14.57, 14.76, 15.01, 19.30, 19.58, 19.86, 20.33, 21.77, 25.54, 25.67, 27.73, 29.10, 30.03, 30.36, 30.94, 31.07, 31.51, 32.96, 33.24, 33.33, 33.72, 33.89, 33.97, 35.82, 36.28, 37.25, 38.49, 41.72, 42.26, 47.84, 51.12, 51.27, 54.23, 54.32, 54.58, 61.79, 62.13, 66.46, 66.60, 66.68, 71.81, 73.74, 80.51, 94.30, 101.30, 221.20. SMBR : calculé pour C₂₄H₃₆O₄, (M⁺) : 390.2770, mesuré : 390.

2.3.12 6β-[(TÉTRAHYDRO-2''H-PYRAN-2''H-YL)-OXY]-3β-HYDROXY-5α-ANDROSTAN-17-ONE (16)



À une solution de 6β-[(*tétrahydro-2''H-pyran-2''H-yl*)-oxy]-3α-hydroxy-5α-androstan-17-one (**14**) (373 mg, 0,95 mmole) dans le toluène (30,0 mL) sont ajoutés successivement de l'acide 4-nitrobenzoïque (405 mg, 2,4 mmoles), de la triphénylphosphine (PPh₃) (550 mg, 2,4 mmoles) et du diéthylazodicarboxylate (DEAD) (0,38 mL, 2,4 mmoles). La solution est chauffée à 80 °C sous argon pendant 4 h. La solution est traitée avec une solution de NaHCO₃ 2 % (25 mL) et le produit est extrait avec de l'éther diéthylique. La phase organique est traitée tel que décrit précédemment. L'huile jaune subit une purification par chromatographie « flash » (2 % MeOH dans CH₂Cl₂). Ensuite, l'ester ainsi obtenu (**15**) est hydrolysé par traitement avec K₂CO₃ (1,2 équivalent) dans le méthanol durant 16 h. Le mélange réactionnel est dilué avec de l'eau et le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle et traité tel que décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (3 % MeOH dans CH₂Cl₂) et donne 296 mg (rendement : 79 %) du produit désiré (**16**). Huile transparente. IR ν (film)/cm⁻¹ : 3283 (OH, hydroxyle), 1734 (C=O, cétone en C17). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.68 (m, 1H), 0.82 et 0.84 (2s, 3H, 18-CH₃ pour 2 isomères THP), 0.97 (s, 3H, 19-CH₃), 1.0-2.2 (m, 23H du squelette stéroïdien), 2.39 (dd, J₁ = 19.0 Hz et J₂ = 8.8 Hz, 1H, 16β-CH), 3.44 et 3.83 (2m, 2H, OCH₂ pour 2 isomères THP), 3.57 (s, 1H, 3α-CH), 3.57 et 3.75 (2m, 1H, 6α-CH pour deux isomères THP) 4.53 et 4.66 (2s évasés, 1H, OCH pour 2 isomères THP). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : 13.77, 13.82, 15.41, 15.50, 18.80, 19.51, 20.24, 21.76, 21.81, 25.56, 30.34, 30.95, 31.25, 31.40, 31.46, 33.14, 35.35, 35.75, 35.81, 37.27, 38.27, 38.49, 47.28, 47.70, 47.78, 50.99, 51.15, 54.30, 54.60, 61.29, 62.16, 71.37, 71.62, 73.15, 79.98, 93.61, 101.26, 221.18, 221.39. SMBR : calculé pour C₂₄H₃₆O₄ (M⁺) : 390.2770, mesuré : 390.

2.3.13 3 β ,6 β -DIHYDROXY-5 α -ANDROSTAN-17-ONE [6 β -HYDROXYÉPIANDROSTERONE] (17)

À une solution de 6 β -[(*tétrahydro-2''H-pyran-2''H-yl*)-oxy]-3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one (16) (247 mg, 0,64 mmole) dans le méthanol (30,0 mL) est ajouté de l'acide *p*-toluènesulfonique monohydrate (*p*-TSA· H₂O) (13,5 mg, 0,078 mmole). La solution est agitée pendant 1 h avant l'ajout d'une quantité additionnelle d'acide *p*-toluènesulfonique monohydrate (*p*-TSA· H₂O) (13,5 mg, 0,078 mmole). Après 2 h de réaction, la solution est chauffée à 40 °C pendant 0,75 h. Après, on ajoute de l'eau et le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle et la phase organique est traitée tel que décrit précédemment. Le produit brut est purifié par chromatographie « flash » (5 % MeOH dans CH₂Cl₂) et donne 117,7 mg (rendement : 60 %) du produit désiré (17). Solide jaune pâle. IR ν (film)/cm⁻¹ : 3419 (OH, hydroxyle), 1734 (C=O, cétone en C17). RMN ¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 0.72 (m, 1H), 0.88 (s, 3H, 18-CH₃), 1.00 (m, 1H), 1.05 (s, 3H, 19-CH₃), 1.1-2.2 (m, 19H du squelette stéroïdien), 2.45 (dd, J₁ = 19.1 Hz, J₂ = 8.8 Hz, 1H, 16 β -CH), 3.65 (septuplet, J = 5.3 Hz, 1H, 3 α -CH), 3.85 (d, J = 2.3, 1H, 6 α -CH). RMN ¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : 13.84 (C18), 15.69 (C19), 20.29, 21.76, 30.07, 31.41, 31.47, 35.21, 35.56, 35.80, 32.32, 38.38, 47.40, 47.82, 51.19, 54.31, 71.47, 71.54, 221.16. SMHR : calculé pour C₁₉H₃₀O₃ (M⁺) : 306.2195, mesuré : 306.2198. CLHP pureté : 95,1 %.

2.4 Isolement des stéroïdes libres

Des aliquots variant de 1,5 à 10 mL d'urine selon leur gravité spécifique sont prélevés selon la procédure générale utilisée pour le dépistage des agents anabolisants (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). Ensuite, un volume équivalent de tampon acétate (pH 5,2) est ajouté pour les volumes inférieurs à 10,0 mL et 25 μ L d'un mélange de standard

interne contenant de la 6 β -hydroxyépiétiocholanolone et de la 3 β ,17 β -dihydroxy-17 α -méthyl-5 α -androstane à des concentrations d'environ 10 ng/ μ L sont ajoutés. Les stéroïdes libres et conjugués sont isolés par extraction en phase solide sur cartouche Sep-Pak[®] Plus C₁₈, préalablement rincées avec 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau déionisée. Les cartouches sont rincées avec 5 mL d'eau déionisée et 5 mL d'hexane. Les stéroïdes sont recueillis par élution avec 5 mL de méthanol et le solvant est évaporé à sec sous jet d'azote. Le culot est repris dans 1 mL de tampon phosphate (pH 6,9) et une double extraction liquide-liquide avec 5 mL d'éther diéthylique est faite. La phase aqueuse est conservée pour les extractions des stéroïdes glucuroconjugués et sulfoconjugués. Ensuite, la phase organique est traitée comme décrit Ayotte et ces collaborateurs (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996).

2.5 Isolement des stéroïdes glucuroconjugués

Suite à l'extraction des stéroïdes libres avec l'éther diéthylique, la phase aqueuse contient des traces de solvant organique. Afin de les éliminer, un jet d'azote est passé dans celle-ci pendant environ 5 minutes. Ensuite, 25 μ L de mélange de standard interne (section 2.4) est ajouté et celle-ci est traitée comme décrit Ayotte et ces collaborateurs (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). La phase aqueuse est conservée pour l'extraction des stéroïdes sulfoconjugués.

2.6 Isolement des stéroïdes libres et glucuroconjugués

Cette procédure d'extraction des stéroïdes libres et glucuroconjugués jumelés est décrite Ayotte et ces collaborateurs (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). La phase aqueuse peut être conservée pour l'extraction des stéroïdes sulfoconjugués.

2.7 Isolement des stéroïdes sulfoconjugués

Suite à l'extraction des stéroïdes glucuroconjugués avec l'éther diéthylique, le pH de la phase aqueuse est basique et des traces de solvant sont présentes. Afin de les éliminer, un jet d'azote est passé dans celle-ci pendant environ 5 minutes. Ensuite, le pH est réajusté à environ 5 avec 25 µL d'acide acétique glacial et 2,5 mL de tampon acétate (pH 5.2) et 25 µL de solution standard interne (section 2.4) sont ajoutés. Ensuite, la solution est traitée comme décrit par Lévesque (Lévesque, 1998).

2.8 Dérivation chimique des extraits stéroïdiens

2.8.1 DÉRIVATION TRIMÉTHYLSILYLE ÉNOL (TMS-ÉNOL)

Les dérivés TMS-énol sont préparés par traitement avec du N-méthyl-N-(triméthylsilyl)-trifluoacétamide (MSTFA) et du triméthyliodosilane (TMIS) tel que décrit Ayotte ces collaborateurs (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). Le mélange réactionnel est chauffé pendant 30 minutes à 70 °C et analysé tel quel par la suite.

2.8.2 DÉRIVATION TRIMÉTHYLSILYLE ÉTHER (TMS-ÉTHER)

Les dérivés TMS-éther sont préparés par traitement avec MSTFA, pyridine et TMIS tel que décrit par Ayotte (Ayotte, Goudreault et Charlebois, 1996). Le mélange réactionnel est chauffé pendant 30 minutes à 70 °C et analysé tel quel par la suite.

2.8.3 DÉRIVATION TRIMÉTHYLSILYLE ÉTHER DEUTÉRÉ (TMS-ÉTHER-d₉)

Les dérivés TMS-d₉-éther sont obtenus par la même procédure que décrite précédemment pour les dérivés TMS-éther (section 2.8.2). Le MSTFA est cependant remplacé par du

N,O-*bis*-(triméthyl-d₉-silyl) acétamide (BSA-d₉) et le TMSI est remplacé par du triméthyl-d₉-chlorosilane TMCS-d₉.

2.9 Étude de rehaussement

Les stéroïdes synthétisés sont ajoutés à des concentrations finales d'environ 3 ng/μL aux extraits urinaires recueillis post-administration d'androstènedione et préparés tel que décrit précédemment (section 2.6 et 2.7).

2.10 Analyse par CG/SM

Les analyses CG/SM sont effectuées à l'aide d'un système constitué d'un détecteur sélectif de masse (SM) HP 5970 (Hewlett-Packard, Mississauga, ON, Canada) couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CG) HP 5890 (Série II) et équipé d'un injecteur automatique HP 7673. Le gaz vecteur est l'hélium. Le contrôle des instruments et le traitement des données sont effectués à l'aide d'un ordinateur opérant le logiciel MS ChemStation de Hewlett-Packard. Un volume de 1 μL du mélange est injecté en mode débit non-partagé (30 secondes de délai) dans un port d'injection contenant un manchon de verre et de la laine de verre silanisés dont la température est à 270 °C. Diverses colonnes et programmations de température sont utilisées selon les analyses effectuées.

2.11 Paramètres chromatographiques pour l'analyse CG/SM

a) Stéroïdes non dérivés

L'analyse est effectuée sur une colonne capillaire HP-5 ayant une phase 5 % de phényl polyméthyle siloxane (25 m x 0,2 mm de diamètre interne et une épaisseur de phase de 0,33 μm). La programmation de température du chromatographe est la suivante : 150 °C

(1,0 minute), 250 °C à un gradient de 25,0 °C par minute, 290 °C à un gradient de 2,0 °C par minute et finalement 310 °C à 25,0 °C par minute. La température finale de 310 °C est maintenue 4,0 minutes. La température du détecteur SM est conservée à 310 °C. L'analyse est en mode balayage continu de m/z 50 à 650 amu.

b) Dérivés triméthyle silyle

L'analyse des divers dérivés TMS est effectuée sur une colonne capillaire HP-5 ayant une phase de 5 % de phényl polyméthyle siloxane (25 m x 0,2 mm de diamètre interne et une épaisseur de phase de 0,33 µm). La programmation de température du chromatographe est la suivante : 100 °C (1,0 minute), 220 °C à un gradient de 20,0 °C par minute, 278 °C à un gradient de 4,4 °C par minute et finalement 320 °C à 10,0 °C par minute. La température finale de 320 °C est maintenue pendant 5,6 minutes. La température du détecteur SM est constante à 315 °C. L'analyse est en mode balayage continu de m/z 50 à 650 amu.

c) Quantification des métabolites urinaires caractérisés

Les analyses sont effectuées sur une colonne capillaire HP-1 ayant une phase de 1 % de phényl polyméthyle siloxane (12,5 m x 0,2 mm de diamètre interne et une épaisseur de phase de 0,33 µm). La programmation de température du chromatographe est la suivante : 150 °C (0,5 minute), 200 °C à un gradient de 20,0 °C par minute, 220 °C à un gradient de 2,0 °C par minute et finalement 310 °C à 15,0 °C par minute. La température finale de 310 °C est maintenue pendant 5,0 minutes. La température du détecteur SM est constante à 320 °C. L'analyse est en mode balayage d'ion sélectifs.

2.12 Quantification des métabolites urinaires caractérisés

Les métabolites caractérisés sont quantifiés dans les fractions de stéroïdes libres, glucuroconjugués et sulfoconjugués des études d'excrétion en utilisant la 6 β -hydroxyépiétiocholanolone comme standard interne. Les procédures d'extraction sont décrites aux sections 2.4, 2.5 et 2.7. La méthode d'analyse CG/SM des extraits urinaires est présentée à la section 2.11 c).

Les courbes d'étalonnage (tableau 2.1) sont préparées en ajoutant à de l'urine d'un garçon prépubère des concentrations variant entre 25 et 550 ng/mL du stéroïde d'intérêt. Les échantillons urinaires sont préparés tel que décrit à la section 2.6.

Quatre solutions utilisées comme contrôles de qualité, préparées également par addition dans la même urine, sont analysées pour vérifier la précision des courbes d'étalonnage.

Tableau 2.1 : Caractéristiques sur les courbes d'étalonnage

Analyte	Concentration (ng/mL)	Courbe d'étalonnage $Y = aX + b$
6 β -hydroxyandrostérone	27,1 à 542,5	$C = 1,10 \times R$ ($r^2 = 1,000$)
6 β -hydroxyétiocholanolone	26,8 à 537,0	$C = 1,31 \times R$ ($r^2 = 0,993$)
6 β -hydroxyépiandrostérone	25,5 à 510,5	$C = 1,09 \times R$ ($r^2 = 1,000$)
6 α -hydroxyandrostènedione	25,8 à 516,0	$C = 4,05 \times R$ ($r^2 = 0,997$)
Androstènedione	25,1 à 502,5	$C = 5,83 \times R$ ($r^2 = 0,995$)

Chapitre 3

Résultats et Discussion

Le chapitre est divisé en trois parties : la première discute des synthèses, la deuxième présente les spectres de masse des produits synthétisés et l'étude de rehaussement pour la confirmation des structures et la troisième traite des résultats de quantification des métabolites caractérisés dans des urines recueillies après l'administration d'androstènedione.

3.1 Synthèse

Quatre isomères ont été préparés selon des voies similaires (figure 2.1). Ces derniers sont la 6 β -hydroxyépiétiocholanolone (**6**), la 6 β -hydroxyandrostérone (**7**), la 6 β -hydroxyétiocholanolone (**12**) et la 6 β -hydroxyandrostérone (**17**). Dans cette section, les quatre produits sont caractérisés de manière équivalente. Par la suite, dans les sections subséquentes, l'accent sera mis sur les métabolites (produits) caractéristiques de l'androstènedione, figure 1.6.

3.1.1 SYNTHÈSE DES ISOMÈRES 5 α - ET 5 β -, 6 β -HYDROXYLÉS

L'étape cruciale de la synthèse des produits est l'hydroxylation en position 6 β . Celle-ci a été effectuée par une réaction photochimique adaptée des méthodes des équipes de Gardi et Schänzer (Gardi et Lusignani, 1967; Schänzer et Donike, 1993). La première effectuée la réaction avec la 3-éthoxy-3,5-androstadiène-17-one dans le propanol sous le rayonnement solaire, alors que l'équipe de Schänzer propose l'utilisation d'un dérivé 3-éther-3,5-diène dans l'éthanol sous le rayonnement solaire. Nous avons utilisé la 3-

méthoxy-3,5-androstadièn-17-one (**2**) pour effectuer l'hydroxylation. Cette dernière a été obtenue de l'androstènedione (**1**) par une réaction décrite par l'équipe de Carruthers (Carruthers et Garshasb, 1992). La réaction consiste à faire réagir le produit (**1**) dans du tétrahydrofurane anhydre (THF) en présence de triméthyle orthoformate anhydre et d'acide *p*-toluènesulfonique monohydrate (*p*-TSA· H₂O). La réaction est assez rapide et le rendement est très bon (97 %). Le produit obtenu est de couleur jaune clair. L'analyse infrarouge donne une bande caractéristique de cétone (C=O) à $\nu = 1738 \text{ cm}^{-1}$ et deux bandes caractéristiques d'éther (CH₃-O-CH) à $\nu = 1232$ et 1169 cm^{-1} . Ces signaux peuvent s'expliquer par la présence de la fonction cétone en position 17 et l'éther formé en position 3. L'analyse RMN ¹H donne deux singulets de trois protons chacun à $\delta = 0.89$ et 0.98 ppm. Il s'agit des groupes méthyle angulaire C18 et C19 respectivement. La comparaison des déplacements chimiques du produit obtenu avec ceux de la littérature montre une bonne similitude (Carruthers et Garshasb, 1992). Les déplacements chimiques des groupements méthyle sont de 0.82 et 1.00 ppm respectivement pour la 9 α -hydroxy-3-méthoxy-3,5-androstadièn-17-one. Le groupe méthyle de la fonction éther en position 3 du composé **2** a un $\delta = 3.56$ ppm et celui de la littérature est de 3.50 ppm. Les protons en position 4 et 6 donnent respectivement un singulet à $\delta = 5.12$ ppm et un singulet évasé à $\delta = 5.23$ ppm. Dans l'article de référence, il est fait mention d'un multiplet à $\delta = 5.18$ - 5.20 ppm. Les différences obtenues sont assez faibles et peuvent très bien s'expliquer par la présence d'un groupement hydroxyle en position 9 pour le produit présenté dans l'article (Carruthers et Garshasb, 1992).

L'étape suivante est l'hydroxylation en position 6 β . La 3-méthoxy-3,5-androstadièn-17-one (**2**) était mélangée à de l'éthanol anhydre dans un ballon de pyrex. Le mélange a été agité pendant environ 24 heures sous une lampe incandescente de 300 W placée à environ 20 - 25 cm du ballon. La température de la solution à l'équilibre se situait à environ 65 - 70 °C. Le ballon était fermé avec un bouchon de caoutchouc percé de quelques aiguilles permettant une circulation d'air sans que le solvant ne s'évapore trop.

Il faut mentionner que la 3-méthoxy-3,5-androstadièn-17-one (**2**) n'était pas complètement soluble dans l'éthanol au départ, mais qu'elle se solubilisait avec la progression de la réaction. Cette dernière est arrêtée avec l'ajout d'eau et le retrait de la lumière. Après purification par chromatographie « flash », on a obtenu la 6 β -hydroxyandrostènedione (**3**). Ce solide jaune a été obtenu avec un rendement approximatif de 50 % variant quelque peu en fonction de la quantité de produit de départ (**2**) utilisé pour la réaction. Le spectre infrarouge montre l'apparition d'une bande attribuable au groupement hydroxyle à $\nu = 3418 \text{ cm}^{-1}$ et la disparition des bandes attribuables à la fonction éther. Il est aussi possible de constater une bande cétonique supplémentaire à $\nu = 1676 \text{ cm}^{-1}$, attribuable à la cétone conjuguée formée en C3. La position et la stéréochimie du groupement hydroxyle viennent de la comparaison des résultats de l'analyse RMN ^1H avec ceux rapportés par l'équipe de Kolek pour un produit identique (Kolek et Swizdor, 1998). Le signal du proton en 6 α -H apparaît sous la forme d'un singulet évasé à $\delta = 4.41 \text{ ppm}$, tandis que les auteurs rapportent un triplet à 4.42 ppm. Pour ce qui est des autres déplacements chimiques, les mêmes résultats que ceux présentés dans l'article ont été observés.

Étant donné la particularité de la réaction, le temps optimal de la photolyse a été déterminé dans les mêmes conditions que celles précédemment utilisées. Quatre échantillons ont été préparés avec environ 100 mg de 3-méthoxy-3,5-androstadièn-17-one (**2**). Les essais ont tous été démarrés en même temps sous la même lampe et ils ont été arrêtés aux temps de 6, 12, 24 et 48 heures. L'analyse RMN ^1H a été utilisée pour confirmer la structure du produit obtenu. Il est possible de constater que le rendement maximum est obtenu à 24 h de réaction (figure 3.1).

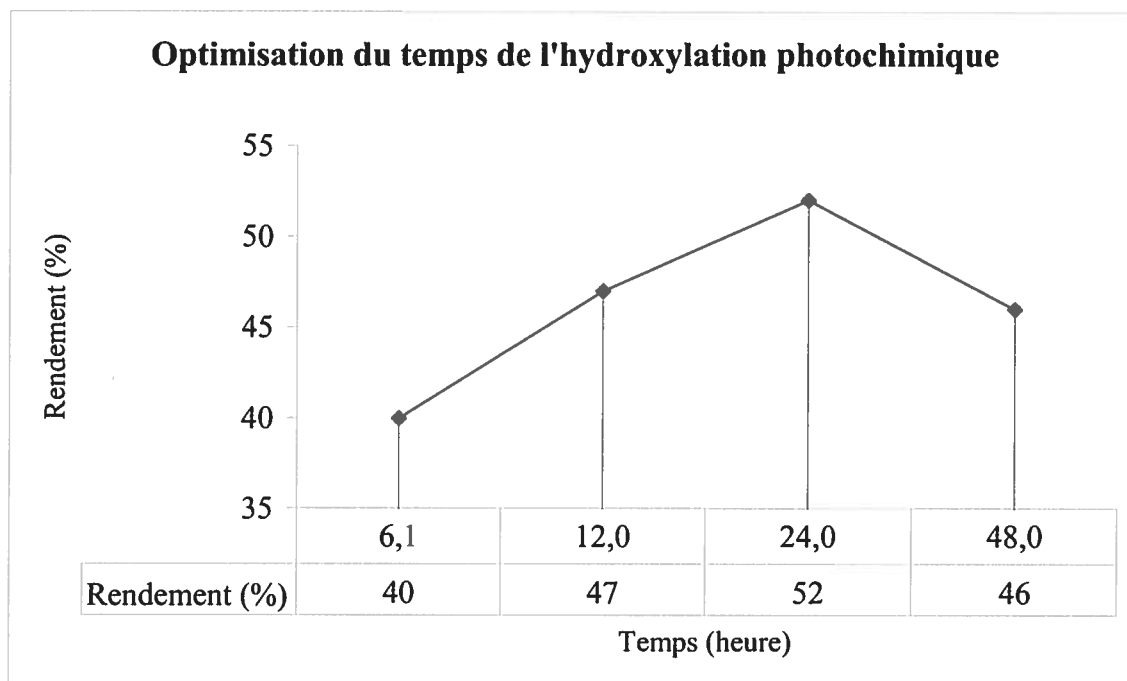


Figure 3.1 : Optimisation du temps de l'hydroxylation photochimique

Les stéroïdes réduits en position 5α et 5β ont été obtenus par une hydrogénation catalytique classique sur Pd/CaCO₃ 5 % dans l'éthanol anhydre sous atmosphère de H₂, conditions adaptées de celles décrites par Kutney (Kutney *et al.*, 1989). La réaction a permis d'obtenir les deux isomères 5α et 5β nécessaires pour les étapes suivantes. Les rendements obtenus sont respectivement de 65 % de 6 β -hydroxy-5 β -androstane-3,17-dione (**4**) (solide jaune) et de 21 % de 6 β -hydroxy-5 α -androstane-3,17-dione (**5**) (solide blanc). L'analyse en RMN ¹³C du groupe méthyle C₁₉ des produits **4** et **5** a permis de confirmer l'orientation de l'hydrogène en position 5. En effet, il est connu que l'orientation 5 β -H d'un stéroïde C₁₉ provoque un déblindage important du groupe méthyle C₁₉ à environ 22 ppm comparativement à environ 12 ppm pour l'orientation 5 α -H (Bunt et Stothers, 1977).

3.1.2 SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS FINAUX 6 ET 7

L'étape suivante a été la réduction régio et stéréosélective de la fonction cétone en C3, avec K-Selectride® (potassium tri-*sec*-butylborohydrure) dans le THF à -78 °C (Contreras et Mendoza, 1979). La particularité de cette réaction est que l'isomère formé en position 3 l'est en fonction de l'orientation du proton en position 5. Ainsi, l'hydroxyle formé est en position axial pour l'isomère 5 β - et équatorial pour l'isomère 5 α - (Contreras et Mendoza, 1979). Le premier produit final synthétisé à l'aide de cette réaction est la 3 β ,6 β -dihydroxy-5 β -androstane-17-one, [6 β -hydroxyépiétiocholanolone] (**6**), et il a été obtenu à partir de la 6 β -hydroxy-5 β -androstane-3,17-dione (**4**). Le produit de la réaction est un solide blanc (rendement : 33 %). Le rendement faible est attribuable à deux éléments. Le premier est l'utilisation de 0,52 équivalent de K-Selectride®. Ce dernier, qui contient un seul H réducteur, a été utilisé comme réactif limitant, donc le rendement est en fait 33 % / 0,52 = 63 %. Le deuxième élément est un arrêt de réaction trop puissant (workup), causé par une trop forte concentration de NaOH et de H₂O₂ ajoutés. Ceci a été corrigé pour l'obtention du produit **9**. Le spectre infrarouge montre la disparition d'une bande cétonique (C=O), soit celle de plus forte énergie à $\nu = 1706 \text{ cm}^{-1}$. L'orientation des groupes hydroxyles en position 3 est déterminée par la concordance des données RMN ¹H avec celles de la littérature de produits similaires (Iida *et al.*, 1988). Pour le produit **6**, le proton 6 α -CH apparaît comme un doublet à 3.67 ppm, le proton 3 α -CH en position équatoriale comme un singulet à 4.01 ppm et les protons du groupe méthyle C19 comme un singulet à 1.15 ppm. Ces valeurs sont en accord avec celles rapportées dans la littérature (3.64, 4.02 et 1.13 ppm, respectivement) pour un composé similaire, soit l'acide 3 β ,6 β -dihydroxy-5 β -cholanique (Iida *et al.*, 1988). Les détails de l'analyse RMN ¹³C sont présentés plus loin en même temps que l'ensemble des produits finaux (section 3.1.5).

Le deuxième produit final qui a été obtenu est la 3 α ,6 β -dihydroxy-5 α -androstane-17-one, [6 β -hydroxyandrostérone] (**7**), à partir de la 6 β -hydroxy-5 α -androstane-3,17-dione (**5**). Le produit est un solide blanc (rendement : 52 %). Le faible rendement s'explique par les

mêmes raisons que celles mentionnées précédemment. Le spectre infrarouge montre la disparition d'une bande cétonique (C=O), soit celle de plus forte énergie à $\nu = 1707 \text{ cm}^{-1}$. Pour la bande du groupement hydroxyle, son énergie est augmentée à $\nu = 3386 \text{ cm}^{-1}$. La structure est confirmée en RMN ^1H et par comparaison avec des données de la littérature (Iida *et al.*, 1993). Pour le produit **7**, le proton $6\alpha\text{-CH}$ apparaît comme un doublet à 3.78 ppm, le proton $3\beta\text{-CH}$ en position axiale comme un triplet à 4.16 ppm et les protons du méthyle C19 comme un singulet à 1.01 ppm. Ces valeurs sont sensiblement les mêmes que celles rapportées par l'équipe de Iida (3.72, 4.16 et 1.00 ppm, respectivement) pour un composé similaire, soit le méthyl $3\alpha,6\beta\text{-dihydroxy-5}\alpha\text{-cholanoate}$ (Iida *et al.*, 1993). L'analyse RMN ^{13}C est présentée à la section 3.1.5.

3.1.3 SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS FINAUX **12** ET **17**

Pour la synthèse des deux autres produits ciblés, soit **12** et **17**, il a été nécessaire de procéder à une inversion du groupement hydroxyle en position 3. Avant de procéder à la réduction de la cétone en position 3, il fallait protéger le groupement hydroxyle en position 6 pour ensuite pouvoir inverser la stéréochimie de celui en position 3. Deux méthodes de protection du groupement hydroxyle en position 6 ont été utilisées. La première est la protection avec le TBDMS-Cl (chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle) de la $6\beta\text{-hydroxy-5}\beta\text{-androstane-3,17-dione}$ (**4**) dans le DMF (N,N-diméthylformamide) anhydre avec de l'imidazole (Tremblay et Poirier, 1996). La réaction donne la $6\beta\text{-(tert-butylméthylsilyloxy)-5}\beta\text{-androstane-3,17-dione}$ (**8**), un solide blanc (rendement : 78 %). Le spectre infrarouge montre la disparition de l'hydroxyle à $\nu = 3446 \text{ cm}^{-1}$ et l'apparition de deux bandes caractéristiques pour le groupement protecteur, soit $\nu = 1254 \text{ cm}^{-1}$ pour (Si-CH₃) et $\nu = 1056 \text{ cm}^{-1}$ pour (CH₂-O-Si). Sur les spectres RMN ^1H , on note l'apparition de deux signaux caractéristiques. À $\delta = 0.037 \text{ ppm}$, on a deux singulets de 6 protons pour Si-(CH₃)₂ et à $\delta = 0.89 \text{ ppm}$, on a un singulet de 9 protons pour le groupement *tert*-butyle (Si-C(CH₃)₃). Pour les autres déplacements chimiques, il y a très peu de changement.

Après la protection du 6 β -OH, la cétone en position 3 a été réduite avec K-Selectride[®] tel que décrit précédemment. Suite à la réduction de cette dernière, on a obtenu la 6 β -(*tert*-butylméthylsilyloxy)-3 β -hydroxy-5 β -androstane-17-one (**9**) (solide blanc), avec un rendement de 94 %. Le spectre infrarouge est similaire à celui de l'isomère **8**, différant par l'apparition d'une bande attribuée au groupement hydroxyle à $\nu = 3434 \text{ cm}^{-1}$. Sur le spectre RMN ^1H du produit **9**, on note plusieurs petits changements par rapport au produit **8**. Le déplacement chimique des 6 protons Si-(CH₃)₂ est un singulet à $\delta = 0.023$ ppm, soit -0.014 ppm par rapport au composé **8** et le déplacement du singulet des 9 protons (Si-C(CH₃)₃) est le même. Les groupements méthyle angulaires C18 et C19 produisent des singulets à $\delta = 0.87$ ppm et $\delta = 1.12$ ppm, soit seulement quelques petites variations au niveau des déplacements chimiques. Le proton 3 α -CH du nouveau groupement hydroxyle donne un singulet évasé à $\delta = 4.07$ ppm et le signal du proton 6 α -CH ne subit aucun changement.

La configuration du groupement hydroxyle 3 β a été inversée par la formation d'un ester avec l'utilisation d'acide 4-nitrobenzoïque, de triphénylphosphine et de diéthylazocarboxylate dans le toluène sous pression positive d'argon à 80 °C. Les conditions ont été adaptées selon une procédure de type Mitsunobu (Mitsunobu, 1981). L'hydrolyse de l'ester avec K₂CO₃ dans le méthanol donne le dérivé hydroxyle en position 3 (Dionne, Tchédam Ngatcha et Poirier, 1997). Ainsi, on a obtenu la 6 β -(*tert*-butylméthylsilyloxy)-3 α -hydroxy-5 β -androstane-17-one (**11**), un solide jaune, avec un rendement de 38 %. Ce dernier est moyen, mais il s'explique par la formation d'une quantité non négligeable de produit déprotégé. Le spectre infrarouge n'est que très peu affecté, seule l'énergie de la bande attribuée au groupement hydroxyle est augmentée à $\nu = 3316 \text{ cm}^{-1}$. Au niveau du spectre de RMN ^1H , le proton 3 β -CH est un multiplet à $\delta = 3.60$ ppm, soit $\delta = -0.47$ ppm par rapport à son homologue singulet 3 α -CH. Les autres déplacements chimiques sont similaires.

On a obtenu la 3 α ,6 β -dihydroxy-5 β -androstane-17-one, [6 β -hydroxyétiocholanolone] (**12**), solide blanc, avec un rendement réactionnel de 88 % par l'hydrolyse du groupement

TBDMS. Le spectre infrarouge montre deux bandes caractéristiques : une bande attribuée au groupement hydroxyle à $\nu = 3410 \text{ cm}^{-1}$ et une bande cétonique à $\nu = 1734 \text{ cm}^{-1}$. Les données RMN ^1H montrent bien qu'il y a eu inversion du groupement hydroxyle en position 3. En effet, le déplacement chimique du 3-CH passe de 4.07 ppm pour le produit **9** à 3.63 ppm pour le composé **12** (après inversion). L'allure évasée de ce dernier signal est également caractéristique d'un proton axial et conséquemment d'un groupement hydroxyle équatorial (Jackman et Sterndell, 1969). Les comparaisons avec les données de la littérature le confirment aussi (Iida *et al.*, 1988). Le proton 6 α -CH apparaît comme un doublet à 3.83 ppm, le proton 3 β -CH en position axiale comme un multiplet à 3.63 ppm et les protons du méthyle angulaire C19 comme un singulet à 1.14 ppm. Ces valeurs sont en accord avec celles rapportées dans la littérature (3.74, 3.57 et 1.11 ppm, valeurs obtenues dans le CDCl_3 avec 30 % de DMSO-d_6) pour un composé similaire, soit le 3 α ,6 β -dihydroxy-5 β -cholanoate (Iida *et al.*, 1988). Les détails de l'analyse RMN ^{13}C seront abordés plus loin avec l'ensemble des produits finaux.

Le dernier produit synthétisé est la 3 β ,6 β -dihydroxy-5 α -androstan-17-one, [6 β -hydroxyépiandrostérone] (**17**). Il a été obtenu par la même série de réactions que pour l'isomère **12**, procédure décrite antérieurement. Cependant, dans ce cas, la protection du groupement hydroxyle en position 6 a été effectuée par un groupement tétrahydropyranyle (THP). La raison de l'utilisation du THP est que la protection avec TBDMS n'a pas été possible. Ceci serait dû à l'encombrement stérique formé par la conformation 5 α du squelette stéroïdien. Un réactif plus puissant que le TBDMS-Cl a été utilisé, soit le *tert*-butyldiméthylsilyle trifluorométhanesulfonate (TBDMS-OTf). Son utilisation avait eu pour effet de former des TBDMS-énols sur les cétones du 6 β -hydroxy-5 α -androstane-3,17-dione (**5**). L'un des inconvénients de l'utilisation du THP est que ce dernier provoque la formation de diastéréoisomères, donc il y a des dédoublements des déplacements chimiques en RMN. De plus, les dérivés sont des huiles et non pas des solides. La formation du dérivé THP a été effectuée sur le produit **5** avec du dichlorométhane anhydre, auquel sont ajoutés de l'acide *p*-toluènesulfonique monohydrate (*p*-TSA·H₂O) et du 3,4-dihydro-2*H*-pyrane sous atmosphère d'argon

(Tremblay et Poirier, 2000). Le produit obtenu est la 6 β -[(tétrahydro-2''H-pyran-2''H-yl)-oxy]-5 α -androstane-3,17-dione (**13**), huile transparente, avec un rendement de 95 %. Le spectre infrarouge montre la disparition de la bande attribuée au groupement hydroxyle à $\nu = 3456 \text{ cm}^{-1}$ qui est présente pour le produit **5**. Les bandes cétoniques sont toujours à $\nu = 1738 \text{ (C17)}$ et $1710 \text{ cm}^{-1} \text{ (C3)}$ sur le spectre du produit **13**. De l'analyse RMN ^1H , on note qu'en général la moyenne des déplacements chimiques des pics dédoublés est la même que pour les pics simples du produit de départ. La seule exception est le proton 6 α -CH, qui contient deux doublets à $\delta = 3.58$ et 3.75 ppm , produit **13**, alors qu'auparavant, ce signal était un singulet évasé à $\delta = 3.84 \text{ ppm}$. Il est aussi possible de remarquer la présence de deux singulets évasés à $\delta = 4.54$ et 4.69 ppm , attribuables au lien C-O du groupement THP.

Après la protection avec le THP, la fonction cétone en position 3 a été réduite avec le K-Selectride[®] dans les mêmes conditions que celles décrites plus tôt. On a ainsi obtenu la 6 β -[(tétrahydro-2''H-pyran-2''H-yl)-oxy]-3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one (**14**), huile transparente, avec un rendement de 97 %. Le spectre infrarouge montre l'apparition d'une bande attribuée au groupement hydroxyle à $\nu = 3414 \text{ cm}^{-1}$ et la disparition de la bande cétonique à $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$. L'analyse RMN révèle une fois de plus la présence de dédoublements. Les déplacements chimiques et l'allure des pics sont pratiquement identiques à ceux du produit précédent (**13**), sauf qu'il y a apparition du proton du groupement hydroxyle formé en position 3 β -CH, un multiplet à $\delta = 4.15 \text{ ppm}$.

L'inversion du groupement hydroxyle 3 α - du composé **14** en 3 β - a été effectuée dans les conditions décrites précédemment. Le produit obtenu est la 6 β -[(tétrahydro-2''H-pyran-2''H-yl)-oxy]-3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one (**16**), huile transparente, avec un rendement de 79%. Le spectre infrarouge montre une augmentation de l'énergie de la bande attribuée au groupement hydroxyle dont la fréquence est de $\nu = 3283 \text{ cm}^{-1}$. Sur le spectre de RMN ^1H , il y a plusieurs petits changements au niveau des déplacements chimiques. Le signal du groupement méthyle angulaire C18 est constitué de deux singulets à $\delta = 0.82$ et 0.84 ppm , tandis qu'avant l'inversion, ils étaient à $\delta = 0.91$ et 0.93

ppm. Le groupement méthyle C19 produit un singulet à $\delta = 0.97$ ppm au lieu de 1.21 ppm. Le signal du proton 3 β -CH est un singulet évasé à $\delta = 3.63$ ppm, alors qu'il donnait un multiplet à $\delta = 4.15$ ppm pour le produit **14**. Le signal du proton 6 α -CH est en deux portions soit un singulet et un multiplet à $\delta = 3.75$ ppm et 3.85 ppm. Avant l'inversion, il donnait deux doublets à $\delta = 3.56$ et 3.70 ppm. Pour les protons du groupement THP, les déplacements chimiques ne subissent que très peu de changements, soit environ une variation de ± 0.02 ppm.

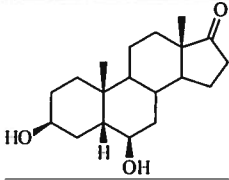
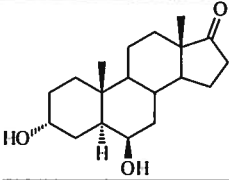
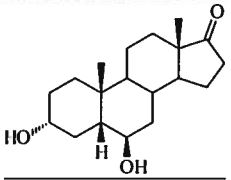
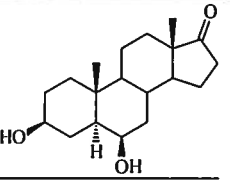
La dernière étape a été la déprotection de l'hydroxyle 6 β -OTHP par une hydrolyse. Celle-ci a été effectuée dans une solution de méthanol contenant de l'acide *p*-toluènesulfonique monohydrate (Tremblay et Poirier, 2000). Ainsi, on a obtenu la 3 β ,6 β -dihydroxy-5 α -androstane-17-one, [6 β -hydroxyépiandrostérone] (**17**), solide jaune très pâle, avec un rendement de 60%. Le spectre infrarouge montre une bande attribuée aux groupements hydroxyle à $\nu = 3419$ cm⁻¹ (C3 et C6) et une bande cétonique à $\nu = 1734$ cm⁻¹ (C17). L'analyse RMN démontre la disparition du dédoublement des pics attribuable à la présence du groupement THP. Les données RMN ¹H et ¹³C obtenues concordent avec celles de la littérature pour un produit similaire (Iida *et al.*, 1993). De la même façon que pour le produit **12**, le déplacement chimique du 3-CH passe de 4.16 ppm pour le composé **14** à 3.65 ppm pour le produit **17** (après inversion). De plus, l'allure évasée du signal 3 α -CH est caractéristique d'un proton axial confirmant ainsi l'orientation 3 β - de l'hydroxyle (Jackman et Sterndell, 1969). L'analyse RMN ¹³C est abordée plus loin par comparaison avec les quatre produits finaux.

3.1.4 ANALYSE DES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES EN RMN ¹H DES QUATRE STÉRÉOISOMÈRES FINAUX (**6**, **7**, **12**, **17**)

Les synthèses chimiques ont permis l'obtention de quatre stéréoisomères possédant un groupement 6 β -hydroxyle, produits **6**, **7**, **12** et **17**, avec des configurations variables du groupement hydroxyle en position 3 et du proton en position 5. Dans cette section, il sera

question de l'influence de ces variations sur les déplacements chimiques en RMN ^1H des divers groupements caractéristiques. Le tableau 3.1 présente les déplacements chimiques des groupements caractéristiques des quatre stéréoisomères dont les spectres RMN ^1H sont reproduits à l'appendice B. L'assignation des déplacements chimiques est faite par la compilation des résultats obtenus des différentes expériences en RMN ^1H 1D et 2D. Les expériences effectuées sont : l'analyse NOE (nuclear overhauser enhancement), effet Overhauser nucléaire et COSY (homonuclear correlated spectroscopy), spectroscopie de corrélation homonucléaire.

Tableau 3.1 : Données RMN ^1H des quatre stéréoisomères 3 ξ^a ,6 β -dihydroxy-5 ξ -androstan-17-one^b

Proton				
	6	7	12	17
18-CH ₃	0.89 (s) ^c	0.87 (s)	0.88 (s)	0.88 (s)
19-CH ₃	1.15 (s)	1.01 (s)	1.14 (s)	1.05 (s)
16-CH	2.40 (dd, 18.9, 8.8)	2.43 (dd, 19.0, 8.8)	2.46 (dd, 19.1, 8.8)	2.45 (dd, 19.1, 8.8)
6-CH	3.67 (d, 1.9)	3.78 (d, 2.4)	3.83 (d, 1.5)	3.85 (d, 2.3)
3-CH	4.01 (s)	4.16 (t, 2.6)	3.63 (m, 5.1)	3.65 (m, 5.3)

^a ξ Indique une configuration α ou β .

^b Le spectre du produit **6** est obtenu dans le méthanol- d_4 et les spectres des produits **7**, **12** et **17** sont obtenus dans le chloroforme- d . Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm.

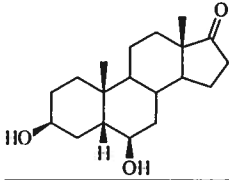
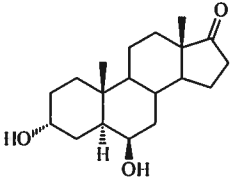
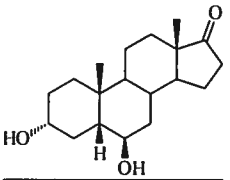
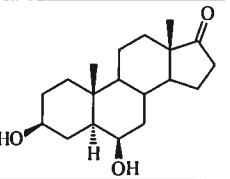
^c Les valeurs entre parenthèses réfèrent à la multiplicité du signal et aux constantes de couplage (J en Hz) : s, singulet; d, doublet; m, multiplet; dd, doublet de doublet.

Le déplacement chimique des protons du méthyle angulaire C18 n'est pas affecté dans les quatre stéréoisomères, il en va de même pour le proton 16 β -CH. Ce dernier forme un doublet de doublet à environ $\delta = 2.40-2.46$ ppm, caractéristique de la présence d'une cétone en position 17 (Maltais, Luu-The et Poirier, 2001). L'un des effets les plus importants dû au changement de configuration est présent sur les protons du groupement méthyle C19. Dans la configuration 5 β -, les déplacements chimiques sont de 1.15 et 1.14 ppm chez les isomères **6** et **12**, alors que pour la configuration 5 α - (isomères **7** et **17**), ils sont de 1.01 et 1.05 ppm. Il est donc possible de remarquer l'influence de la stéréochimie en position 5 sur les protons du groupement méthyle C19 (Bunt et Stothers, 1977) et ce, quelle que soit la configuration du proton en position 3. L'orientation du proton en position 5 affecte aussi l'allure et le déplacement chimique du lien C-H en position 3. Pour les composés possédant une stéréochimie 5 β -, on a un singulet un peu large à 4.01 ppm pour l'isomère **6**, alors que pour l'isomère **12**, on a un multiplet à 3.63 ppm. Pour les composés possédant une stéréochimie 5 α -, on a un triplet à 4.16 ppm pour l'isomère **7** et un multiplet à 3.65 ppm pour l'isomère **17**. On peut observer une certaine tendance dans l'effet, car sur le spectre RMN ^1H du composé **6**, on a un singulet quelque peu large qui a tendance à vouloir se subdiviser, mais la résolution du spectromètre ne permet pas d'obtenir le signal dédoublé. Quand les protons en position 3 et 5 ont une orientation opposée (α,β ou β,α), les déplacements chimiques ont la forme d'un singulet évasé et d'un triplet à $\delta = 4.01$ ppm pour le composé **6** et 4.16 ppm pour le composé **7** respectivement. À l'opposé, quand les protons ont la même orientation (β,β ou α,α), ils apparaissent comme des multiplets à $\delta = 3.63$ ppm pour le produit **12** et 3.65 ppm pour le composé **17**. On note une tendance semblable pour les déplacements chimiques du proton du groupement 6 β -hydroxyle. Quant aux protons en position 3 et 5 de même orientation (β,β ou α,α), les signaux du 6 α -CH sont des doublets à $\delta = 3.83$ ppm pour le composé **12** et 3.85 ppm pour le composé **17**. Dans le cas d'orientation opposée entre les protons en position 3 et 5, les signaux du 6 α -CH sont des doublets à $\delta = 3.67$ ppm pour le composé **6** et 3.78 ppm pour le composé **7**. Dans le cas où l'orientation est opposée (α,β ou β,α) entre les protons en position 3 et 5, ceux des groupements hydroxyle ont des déplacements différents.

3.1.5 ANALYSE DES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DES GROUPES EN RMN DU ^{13}C DES QUATRE STÉRÉOISOMÈRES FINAUX (**6, 7, 12, 17**)

Le tableau 3.2 présente les déplacements chimiques en RMN ^{13}C des hydroxystéroïdes **6**, **7**, **12** et **17** dont les spectres sont reproduits à l'appendice C. L'assignation des déplacements chimiques a été faite selon la procédure suivante : 1) assignation des signaux évidents des spectres RMN ^1H et ^{13}C ; 2) caractérisation plus approfondie des signaux RMN ^1H par une expérience 2D COSY (homonuclear correlated spectroscopy), spectroscopie de corrélation homonucléaire et association au déplacement chimique en RMN ^{13}C par une expérience 2D HETCOR (heteronuclear correlation); 3) assignation des autres signaux RMN ^{13}C par les résultats des expériences de DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer) et de 2D COLOC (heteronuclear shift correlation via long-range coupling).

Tableau 3.2 : Assignment des déplacements chimiques des atomes de carbone en RMN ^{13}C des quatre stéréoisomères $3\xi^a,6\beta$ -dihydroxy- $5\xi^a$ -androstane-17-one^b

Carbone				
	6	7	12	17
1	31.42	33.92	35.91	38.32
2	28.04	29.04	30.10	31.47
3	66.90	66.39	71.06	71.47
4	34.44	33.38	36.29	35.21
5	44.15	41.70	48.79	47.40
6	73.76	71.71	72.77	71.54
7	34.01	38.44	33.48	38.38
8	31.67	29.97	30.45	30.07
9	41.60	54.27	41.04	54.31
10	36.12	36.22	34.54	35.56
11	21.22	19.83	19.86	20.29
12	32.89	31.46	31.65	31.41
13	49.28	47.82	47.88	47.82
14	52.58	51.21	51.37	51.19
15	22.78	21.70	21.82	21.76
16	36.77	35.79	35.78	35.80
17	224.06	221.30	221.11	221.16
18	14.19	13.83	13.83	13.84
19	26.48	14.73	25.47	15.69

^a ξ Indique une configuration α ou β .

^b Le spectre du produit **6** est obtenu dans le méthanol- d_4 et les spectres des produits **7**, **12** et **17** sont obtenus dans le chloroforme- d . Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm.

Comparaison des spectres RMN des isomères 5β - (6,12**) et 5α - (**7,17**).** Il est possible de constater que les atomes de carbone en C19, C9 et C7 sont des marqueurs de la configuration 5β - ou 5α -. En effet, pour la configuration 5β - (**6,12**), les déplacements chimiques du C19 sont 26.48 et 25.47 ppm, alors que pour la configuration 5α - (**7,17**), ils sont de 14.73 et 15.69 ppm. Pour le C9 des produits **6** et **12**, les déplacements chimiques sont 41.60 et 41.04 ppm, alors que pour les produits **7** et **17**, ils sont 54.27 et 54.31 ppm. Finalement, pour le C7, les déplacements chimiques des produits **6** et **12** sont 34.01 et 33.48 ppm et pour les produits **7** et **17**, ils sont 38.44 et 38.38 ppm respectivement. En

comparaison, il est possible de constater que le changement de configuration affecte significativement les déplacements chimiques des trois carbones (C19, C9 et C7) et ceci, indépendamment de la configuration de l'hydroxyle en position 3.

Comparaison des spectres de RMN des isomères de configurations 3 β -OH (6) et 3 α -OH (12) avec 5 β -H invariable. Elle permet de constater que les atomes de carbone en C1, C3 et C5 sont des marqueurs du changement de configuration du groupement hydroxyle en position C3. On observe pour l'isomère 6, dont l'hydroxyle 3 β -OH est en position axiale, que les déplacements chimiques des atomes de carbone C1, C3 et C5 sont de 31.42, 66.90 et 44.15 ppm, alors que l'isomère 12, dont l'hydroxyle 3 α -OH est en position équatoriale, produit des déplacements chimiques des atomes de carbone en C1, C3 et C5 qui sont de 35.91, 71.06 et 48.79 ppm respectivement.

Comparaison des spectres de RMN des isomères de configurations 3 α -OH (7) et 3 β -OH (17) avec 5 α -H invariable. Elle permet de constater que les atomes de carbone en C1, C3 et C5 sont des marqueurs du changement de configuration du groupement hydroxyle en position C3. On observe pour l'isomère 7, dont l'hydroxyle 3 α -OH est en position axiale, que les déplacements chimiques des atomes de carbone en C1, C3 et C5 sont de 33.92, 66.39 et 41.70 ppm, alors que l'isomère 17, dont l'hydroxyle 3 α -OH est en position équatoriale produit des déplacements chimiques des atomes de carbone en C1, C3 et C5 qui sont de 38.32, 71.47 et 47.40 ppm respectivement.

La comparaison entre les groupements hydroxyle 3 β et 3 α permet de constater que lorsqu'ils sont en position axiale (6,7), les déplacements chimiques des atomes de carbone en position C1, C3 et C5 sont similaires et de même lorsqu'ils sont en position équatoriale (12,17).

3.2 Spectre de masse et confirmation par rehaussement de pics

Les spectres de masse des quatre isomères **6**, **7**, **12** et **17** ont été obtenus ainsi que ceux de leurs dérivés TMS-énol, TMS-éther et TMS-d₉-éther qui sont présentés à l'appendice D. Ces derniers sont identiques à ceux décrits par Lévesque et ces collaborateurs et sont caractérisés par une fragmentation similaire d'un produit à l'autre (Lévesque, Goudreault et Ayotte, 1999), à l'exception de l'isomère 6β-hydroxyétiocholanolone qui possède une fragmentation qui diffère par la présence d'un ion à m/z 377 du dérivé TMS-énol. Les auteurs ont observé la présence des ions caractéristiques à m/z 522 (M⁺), 507 (-CH₃[•]), 417 (-TMSOH), 327 (-TMSOH), 295, 147 et 129. Les ions à m/z 295 et 129 sont dus à la présence d'un groupement 6-hydroxyle (Harvey et Vouros, 1979; Brooks, Henderson et Steel, 1973; Ahmad et Ansari, 1972) et l'ion à m/z 147 est caractéristique de la proximité de deux groupements OTMS (Sloan, Harvey et Vouros, 1971). L'isomère 6β-hydroxyétiocholanolone a un ion spécifique à m/z 377 dont le mécanisme de formation a été proposé par Harvey. Il explique qu'en présence d'un noyau 5β-androstane ayant des groupements hydroxyles en position 3α et 6β, les positions 3 et 6 peuvent s'approcher de façon à générer une perte de TMSOH en C3. Par la suite, l'ion à m/z 377 est formé par un réarrangement (Lévesque, Goudreault et Ayotte, 1999; Harvey et Vouros, 1979).

Les ions caractéristiques des dérivés TMS-éther sont à m/z 450 (M⁺), 360 (-TMSOH), 345 (-CH₃[•]), 305, 270 (-TMSOH), 223 et 129. Les ions à m/z 223 et 129 sont dus à la présence d'un groupement 6-hydroxyle (Harvey et Vouros, 1979; Brooks, Henderson et Steel, 1973; Ahmad et Ansari, 1972). À m/z 305, on a l'ion caractéristique de la 6β-hydroxyétiocholanolone, pic parent, mais il est possible de l'observer avec une certaine abondance dans l'ensemble des spectres en dérivé TMS-éther.

Quant aux dérivés TMS-d₉-éther, les spectres de masse possèdent des ions caractéristiques à m/z 468 (M⁺), 368 (-TMS-d₉-OH), 354 (-CH₃[•]), 314, 270 (-TMS-d₉-OH), 232 et 138. Les ions à m/z 232 et 138 sont les ions caractéristiques de la présence d'un groupement 6-hydroxyle (Harvey et Vouros, 1979; Brooks, Henderson et Steel, 1973; Ahmad et Ansari, 1972).

L'ajout des standards synthétisés à des échantillons urinaires recueillis suite à l'administration d'androstènedione et préparés tel que décrit aux sections 2.6 et 2.7, a permis de confirmer les structures proposées par Lévesque (Lévesque et Ayotte, 1999-a). La figure 3.2 présente les résultats de l'étude de rehaussement effectuée sur un extrait de la fraction sulfoconjuguée recueillie 8 heures après l'administration.

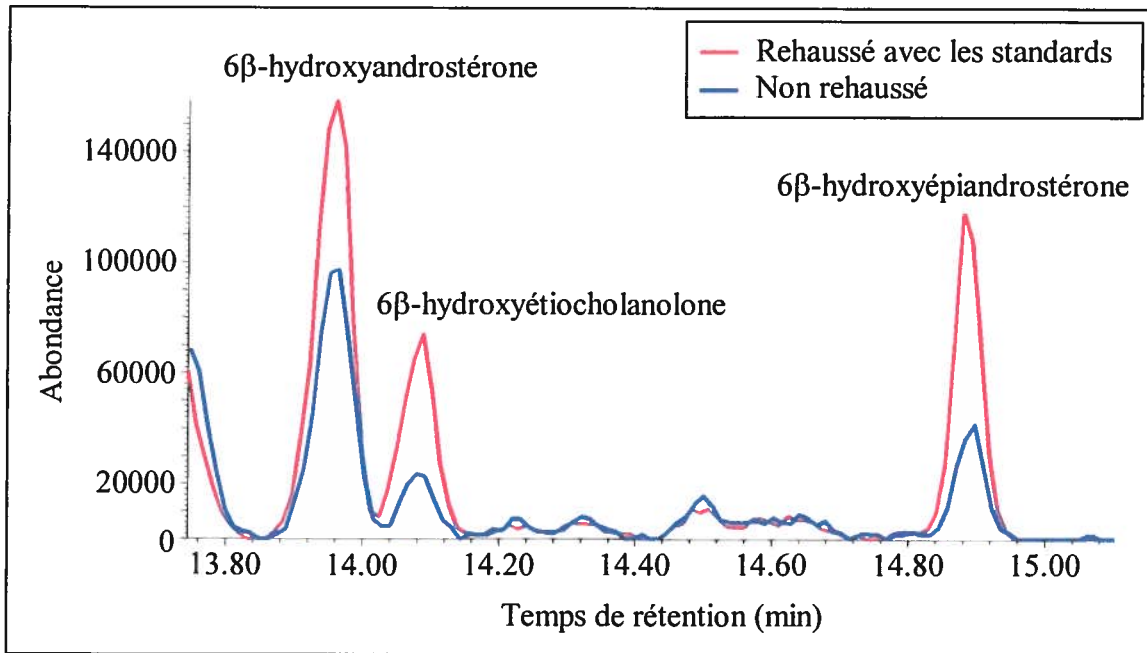


Figure 3.2 : Étude de rehaussement sur la fraction sulfoconjuguée

Il est possible de constater qu'il y a une parfaite superposition des chromatogrammes pour les trois produits aux temps de rétention respectifs, la 6 β -hydroxyandrostérone à 13,96 minutes, la 6 β -hydroxyétiocholanolone à 14,08 minutes et la 6 β -hydroxyépiandrostérone à 14,89 minutes. De plus, les spectres de masse sont identiques avant et après rehaussement.

3.3 Quantification

La quantification des métabolites urinaires caractéristiques de la prise orale d'androstènedione, telles la 6 β -hydroxyandrostérone, la 6 β -hydroxyétiocholanolone, la 6 β -hydroxyépiandrostérone et la 6 α -hydroxyandrostènedione, a été effectuée sur les extraits de stéroïdes libres, glucuroconjugés et sulfoconjugés. Le protocole utilisé est décrit à la section 2.12. Six études d'excrétion ont été analysées, cinq provenant de sujets masculins (sujet #1 à #5) et une de sujet féminin (sujet #6). Deux doses ont été administrées; la première pour les sujets 1 et 2, était de 50 mg et la deuxième pour les sujets 3 à 6, était de 100 mg. Dans les deux cas, il s'agissait de gélule d'androstènedione de provenance commerciale. Le consentement informé des volontaires a été obtenu.

Tel que démontré par Lévesque et Ayotte, l'analyse des urines recueillies suite à l'administration a permis d'établir que les métabolites caractérisés sont spécifiques à la prise par voie orale (Lévesque et Ayotte, 1999-a). Nous avons résumé les profils d'excrétion de ces derniers dans les fractions glucuroconjugées et sulfoconjugées des six études; ils sont présentés sous forme de graphique à l'appendice E. Aucun des métabolites n'a été retrouvé dans la fraction libre des stéroïdes. Les tableaux 3.3. et 3.4 présentent les écarts de concentrations excrétées pour chaque métabolite par les différents sujets.

Tableau 3.3 : Écart de concentrations mesurées dans la fraction glucuroconjugée^a

Sujet	6 β -hydroxyandrostérone	6 β -hydroxyétiocholanolone	6 α -hydroxyandrostènedione
#1	3,61 – 9,50	4,86 – 6,08	88,82 – 127,97
#2	30,29 – 62,43	Non déterminé	6,71 – 221,10
#3	0,93 – 11,04	Non déterminé	1,62 – 35,80
#4	16,56 – 55,19	Non déterminé	4,78 – 41,80
#5	20,97 – 507,38	10,18 – 163,55	19,25 – 54,21
#6	0,72 – 87,21	6,28 – 25,78	2,75 – 13,41

^a Concentration normalisée à gravité spécifique de 1,020 et exprimée en ng/mL.

Tableau 3.4 : Écart de concentrations mesurées dans la fraction sulfoconjuguée^a

Sujet	6 β -hydroxyandrostérone	6 β -hydroxyétiocholanolone	6 β -hydroxyépiandrostérone
#1	68,34 – 342,38	24,64 – 24,64	33,24 – 130,33
#2	30,97 – 243,53	6,93 – 18,85	12,47 – 76,12
#3	6,49 – 337,27	6,52 – 58,30	7,66 – 145,00
#4	7,58 – 285,50	9,78 – 22,99	18,41 – 140,02
#5	22,84 – 1813,20	22,81 – 274,37	27,13 – 633,65
#6	11,28 – 89,28	9,22 – 18,72	11,28 – 45,44

^a Concentration normalisée à gravité spécifique de 1,020 et exprimée en ng/mL.

La 6 β -hydroxyandrostérone et la 6 β -hydroxyétiocholanolone sont excrétées sous forme glucuroconjuguée et sulfoconjuguée. Alors que, la 6 α -hydroxyandrostènedione l'est uniquement sous forme glucuroconjuguée. Quant à la 6 β -hydroxyépiandrostérone, elle l'est exclusivement sous forme sulfoconjuguée. Ces métabolites ne sont pas présents normalement dans les urines recueillies avant l'administration. Cependant, quelques heures après la prise (environ 2 à 5 h), on note leur présence, sauf pour le sujet #5 chez qui le début de l'excrétion se fait plus tard, environ 11 à 25 h. Après un certain temps (environ 12 à 15 h), il y a retour à la normale, des temps plus longs étant observés pour le sujet #5, puisque son retour à la normale n'a pu être évalué dans la fraction sulfoconjuguée et il est d'environ 28 à 34 h dans la fraction glucuroconjuguée. Deux des métabolites identifiés sont excrétés à la fois dans les deux fractions; la 6 β -hydroxyandrostérone l'est en moyenne à 17 % dans la fraction glucuroconjuguée et la 6 β -hydroxyétiocholanolone à 53 % dans cette dernière fraction.

Le métabolite persistant le plus longtemps dans les urines est la 6 β -hydroxyépiandrostérone sulfoconjuguée. Quant aux concentrations, celles-ci varient beaucoup d'un métabolite et d'un sujet à l'autre (tableaux 3.3 et 3.4).

Chapitre 4

Conclusion

L'androstènedione est un stéroïde en vente libre aux États-Unis et sur Internet dont l'administration par voie orale entraîne des modifications importantes du profil urinaire. Les travaux effectués au cours de ce projet ont permis de caractériser des métabolites spécifiques à cette prise à partir de composés de référence synthétisés à cet effet. La synthèse des trois métabolites caractéristiques et du quatrième isomère possédant des liens C-H de stéréochimie 5β ou 5α et hydroxylés en position 3α ou 3β et 6β (composés **6**, **7**, **12** et **17**) a été effectuée selon un plan de synthèse comportant de 4 à 8 étapes. Les réactions utilisées étaient relativement simples et communes. Nous en avons retenu trois. La première consistait en une hydroxylation photochimique qui a permis d'introduire rapidement un groupement hydroxyle en 6β . Une étude a permis de déterminer le temps optimum pour l'obtention d'un rendement maximal dans nos conditions expérimentales. La deuxième était une réaction de réduction régio- et stéréosélective de la cétone en position 3 utilisant le réactif K-Selectride[®] qui permet d'obtenir les isomères 3β -OH / 5β -H et 3α -OH / 5α -H. La dernière était une réaction de type Mitsunobu permettant d'inverser la stéréochimie du groupement hydroxyle en position 3. La structure des composés obtenus lors des synthèses a été confirmée par l'obtention des spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C en 1D et 2D. Les spectres, recueillis à partir des expériences de RMN, ont été comparés avec ceux décrits dans la littérature pour des produits identiques ou similaires, ce qui a permis de confirmer les structures des produits synthétisés. En RMN ^{13}C , les signaux des atomes de carbone en position C1, C3, C5, C7, C9 et C19 ont été identifiés comme de bons marqueurs pour l'identification des différents hydroxystéroïdes.

La caractérisation finale des métabolites, soit la 6β -hydroxyandrostérone (**7**), la 6β -hydroxyétiocholanolone (**12**) et la 6β -hydroxyépiandrostérone (**17**), a été effectuée par le

rehaussement des pics chromatographiques d'extraits urinaires recueillis après l'administration d'un seul comprimé d'androstènedione. Cette analyse a permis de noter une très bonne superposition des pics chromatographiques et des spectres de masse identiques.

La quantification de la 6 β -hydroxyandrostérone (G,S), 6 β -hydroxyétiocholanolone (G,S) 6 β -hydroxyépiandrostérone (S) et 6 α -hydroxyandrostènedione (G) a été effectuée sur des échantillons urinaires recueillis après l'administration d'androstènedione. Cette quantification a permis de noter la spécificité des métabolites, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas présents avant la prise orale et excrétés en général seulement durant quelques heures. Les concentrations mesurées et les temps d'excrétion varient selon les métabolites, l'origine de la conjugaison et les sujets. Il est possible de constater une plus grande persistance des métabolites excrétés ou présents dans la fraction sulfoconjuguée.

Ainsi, la synthèse a permis de caractériser des métabolites spécifiques à la prise orale d'androstènedione et de confirmer les voies métaboliques proposées par Lévesque (Lévesque, Goudreault et Ayotte, 1999). Ces résultats nous permettent d'obtenir une meilleure détection de l'utilisation d'androstènedione lors de contrôles antidopage.

Appendice A

Noms triviaux et systématiques de stéroïdes

Nom trivial et abréviation	Nom systématique
Androstérone	3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one
Étiocholanolone	3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one
Androstènedione	4-androstène-3,17-dione
Cholestérol	5-cholestèn-3 β -ol
Déhydroépiandrostérone	3 β -hydroxy-5-androstèn-17-one
5 α -dihydrotestostérone	17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one
Épiétiocholanolone	3 β -hydroxy-5 β -androstan-17-one
Épitestostérone	17 α -hydroxy-4-androstèn-3-one
Pregnénolone	3 β -hydroxy-5-pregnèn-20-one
Progestérone	4-pregnène-3,20-dione
Testostérone	17 β -hydroxy-4-androstèn-3-one
6 α -hydroxyandrostènedione	6 α -hydroxy-4-androstène-3,17-dione
6 β -hydroxyandrostérone	3 α ,6 β -dihydroxy-5 α -androstan-17-one
6 β -hydroxyépiandrostérone	3 β ,6 β -dihydroxy-5 α -androstan-17-one
6 β -hydroxyétiocholanolone	3 α ,6 β -dihydroxy-5 β -androstan-17-one
6 β -hydroxyépiétiocholanolone	3 β ,6 β -dihydroxy-5 β -androstan-17-one

Appendice B

Spectres de RMN ^1H des stéroïdes 6β -hydroxylés

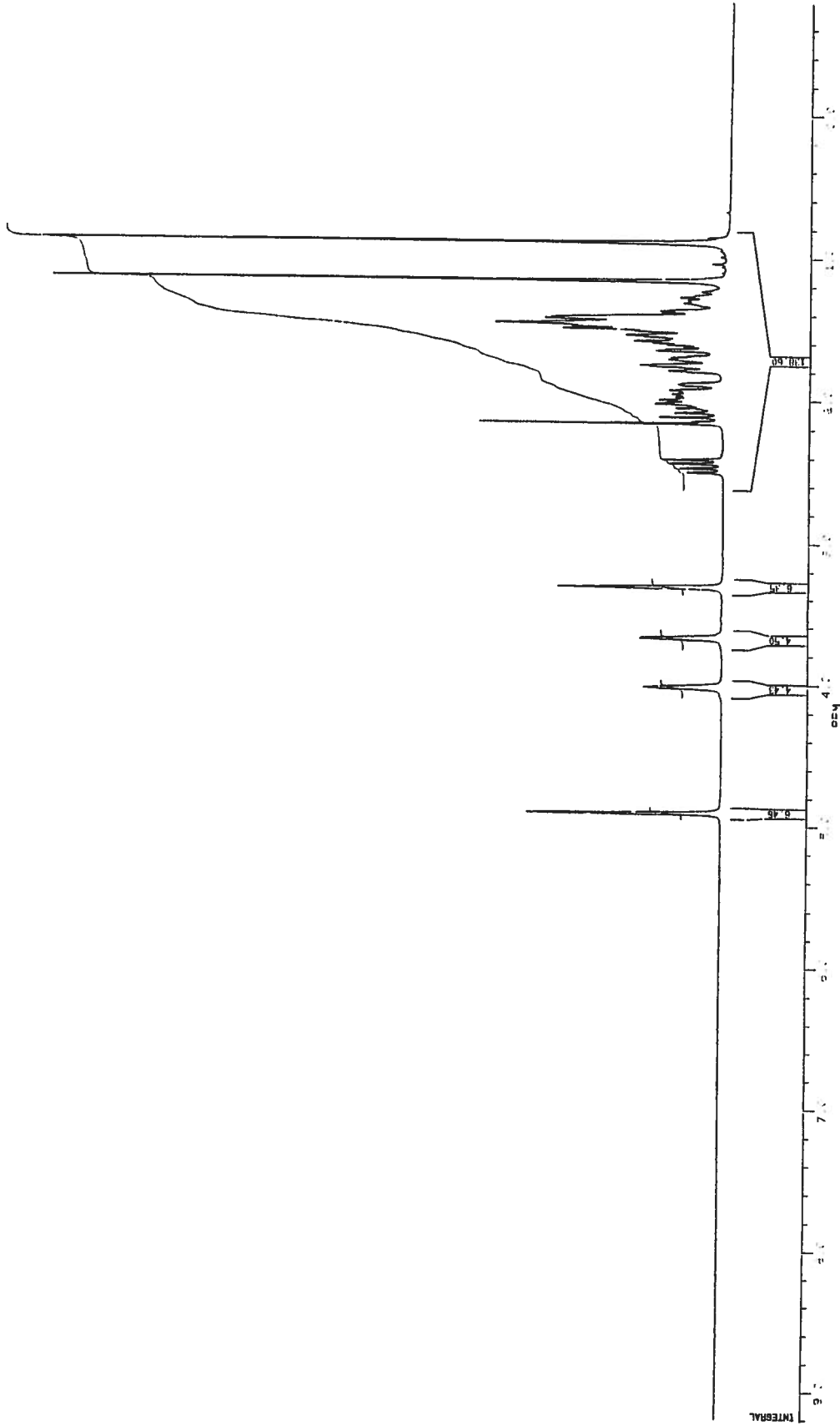


Figure B.1 : Spectre de RMN ^1H de la 6β -hydroxyépiétiocholanolone

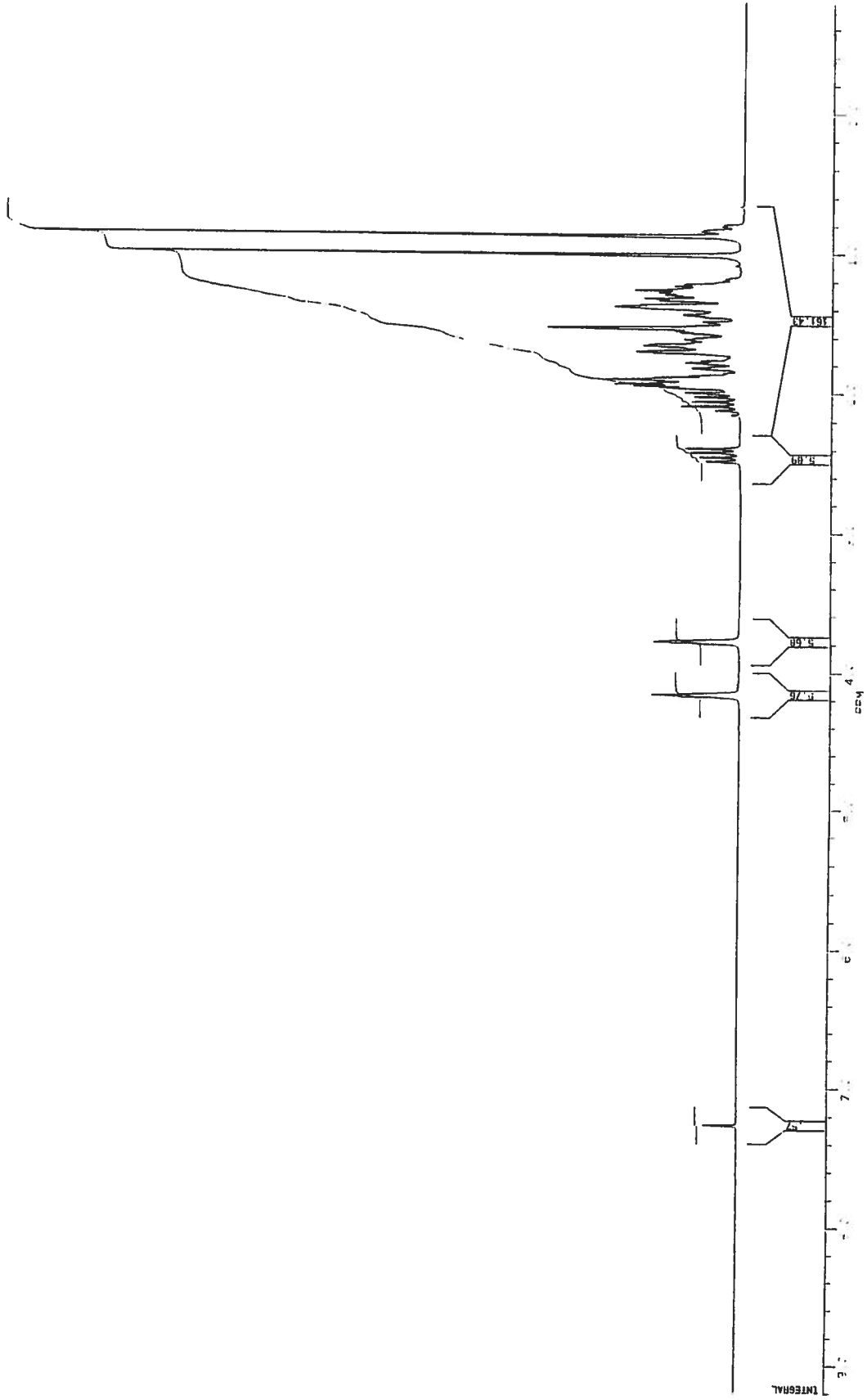


Figure B.2 : Spectre de RMN ^1H de la 6 β -hydroxyandrosténone

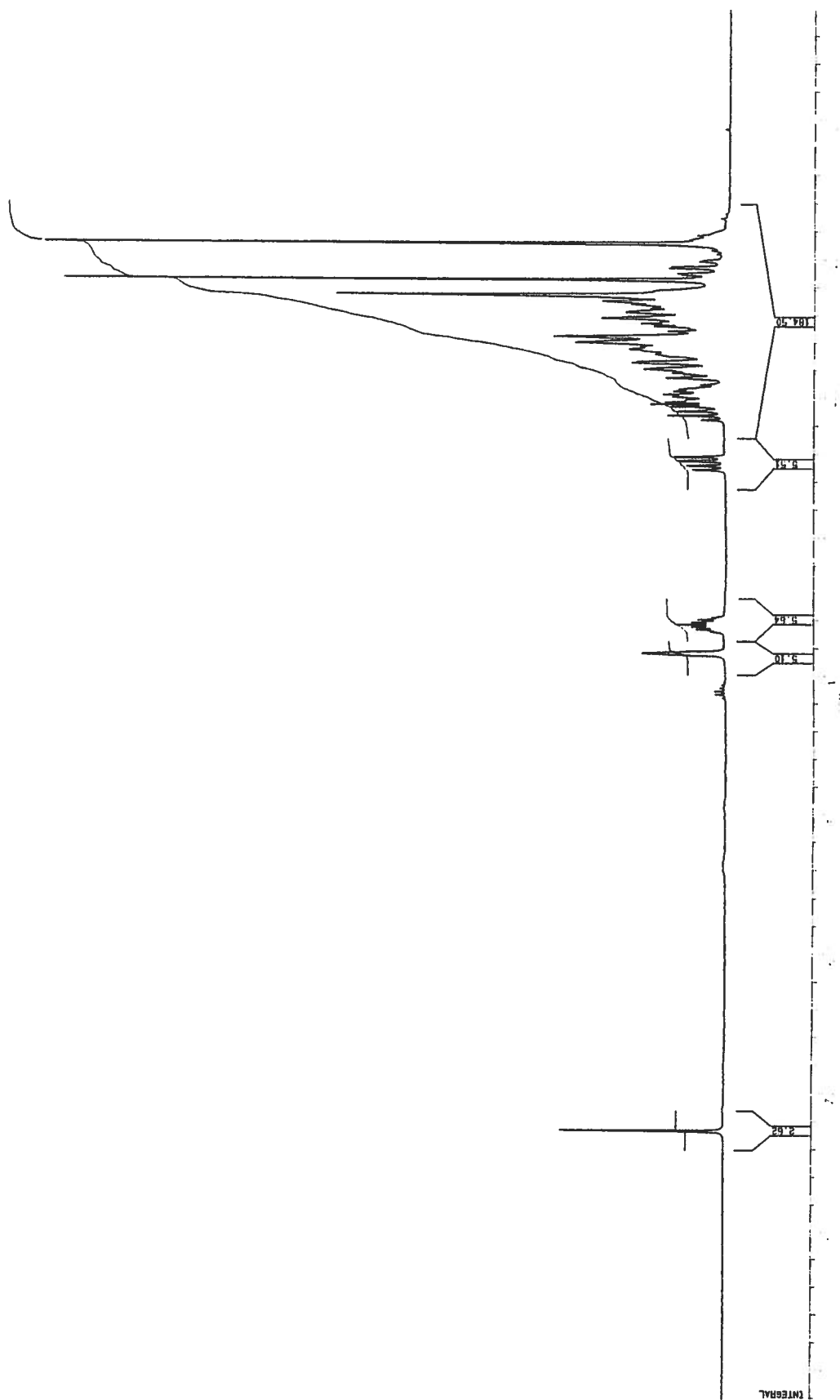


Figure B.3 : Spectre de RMN ^1H de la 6 β -hydroxyéthiocholanolone

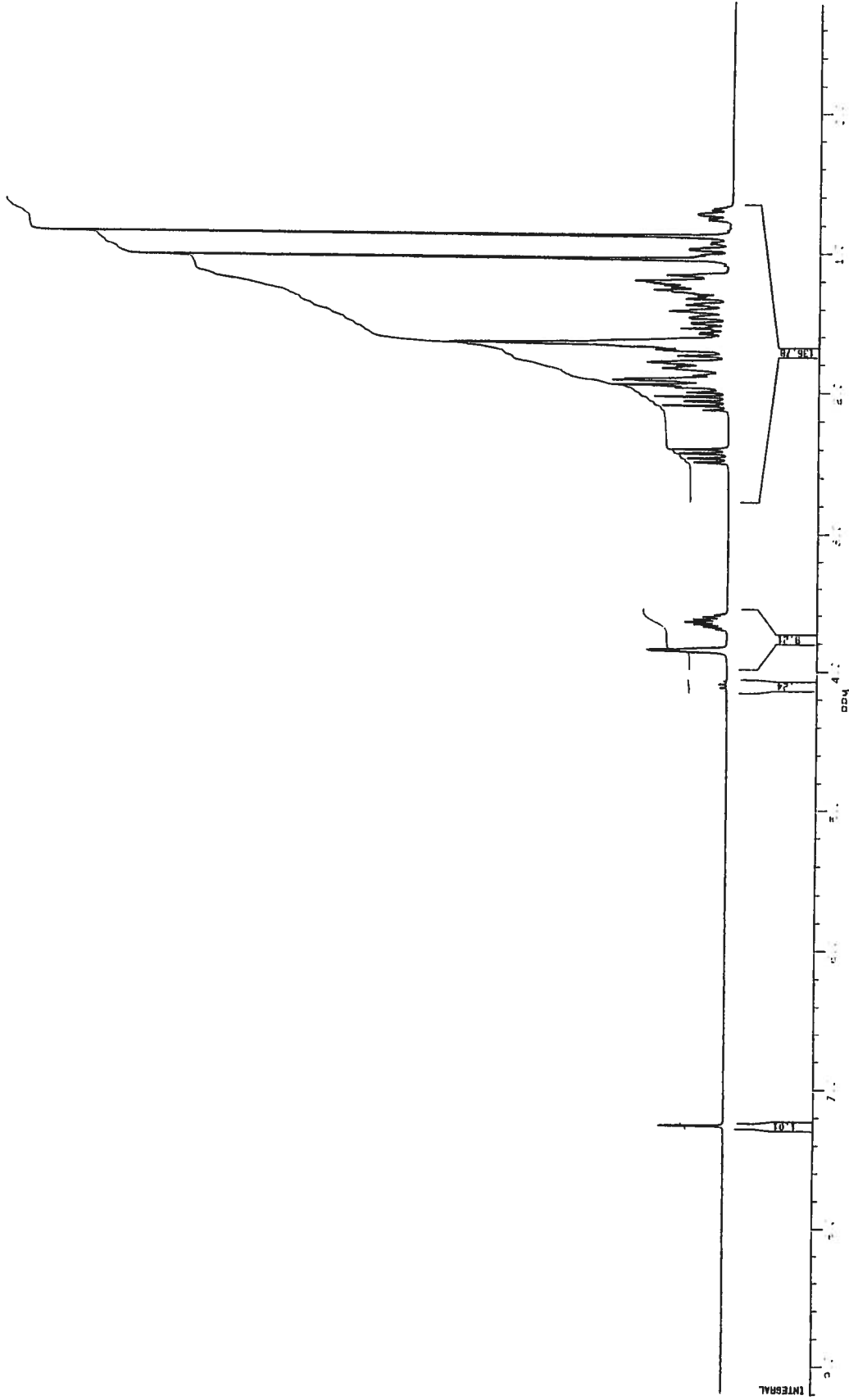


Figure B.4 : Spectre de RMN ¹H de la 6β-hydroxyépiandrosterone

Appendice C

Spectres de RMN ^{13}C des stéroïdes 6 β -hydroxylés

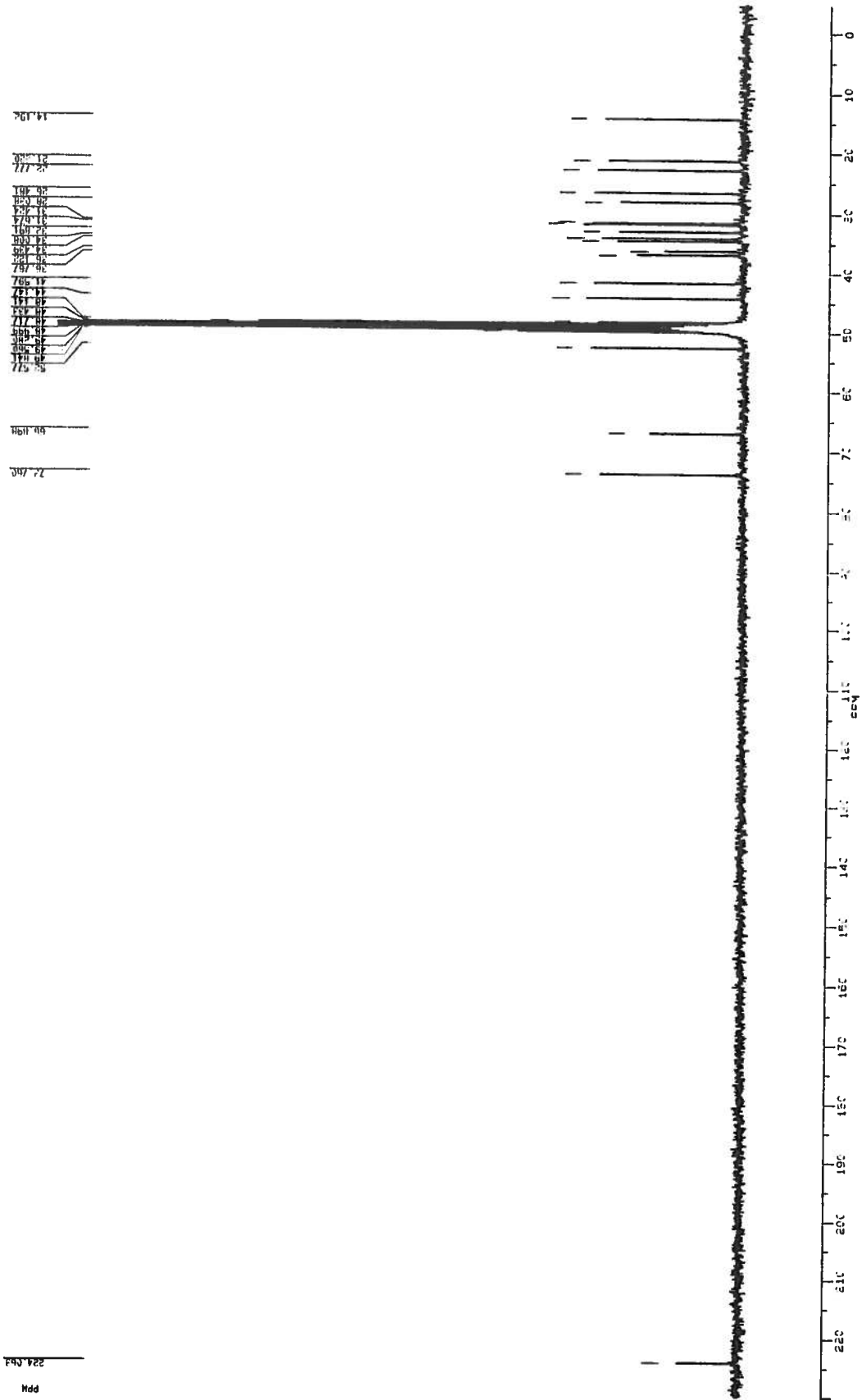


Figure C.1 : Spectre de RMN ^{13}C de la 6 β -hydroxyépiétiocolanone

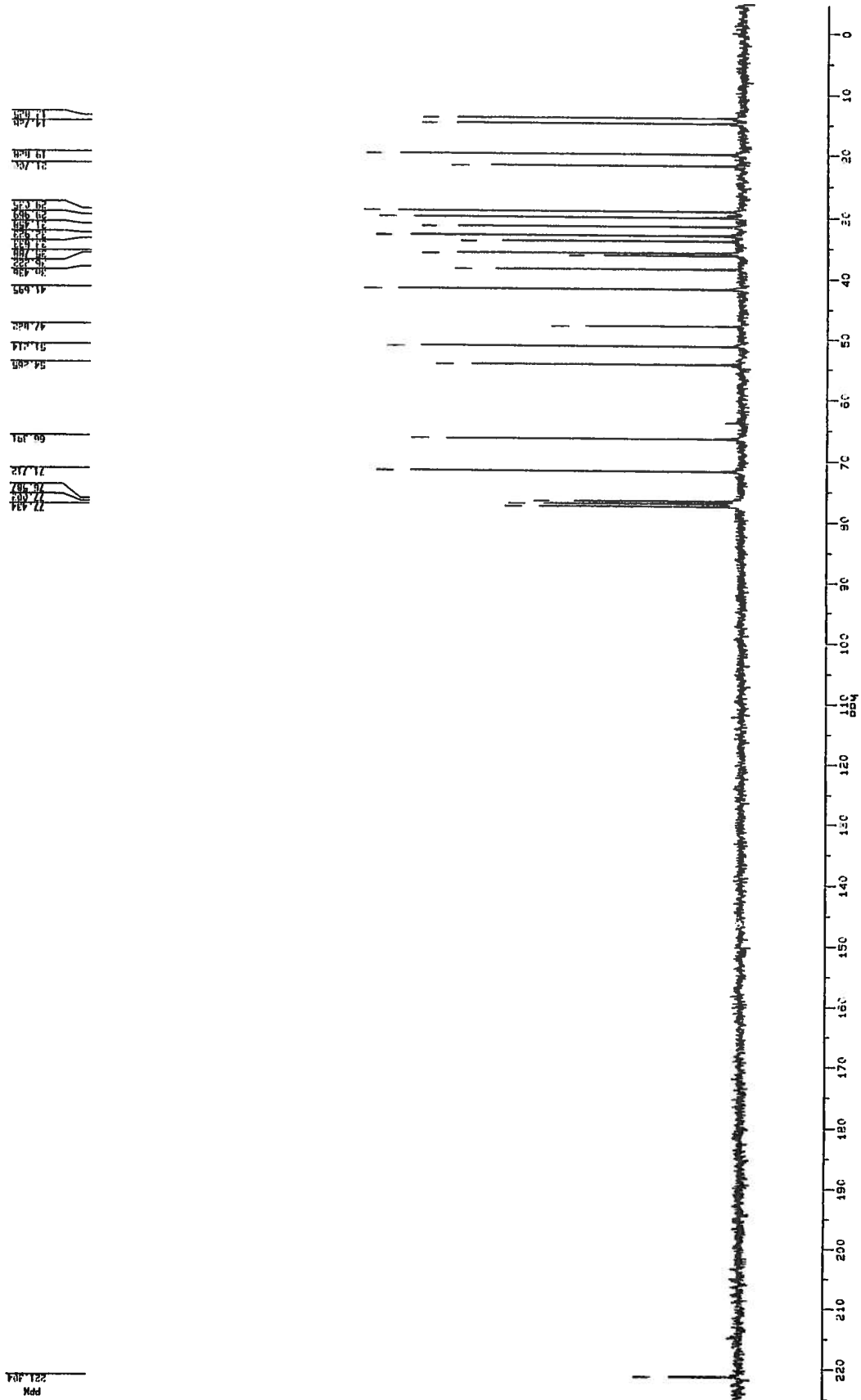
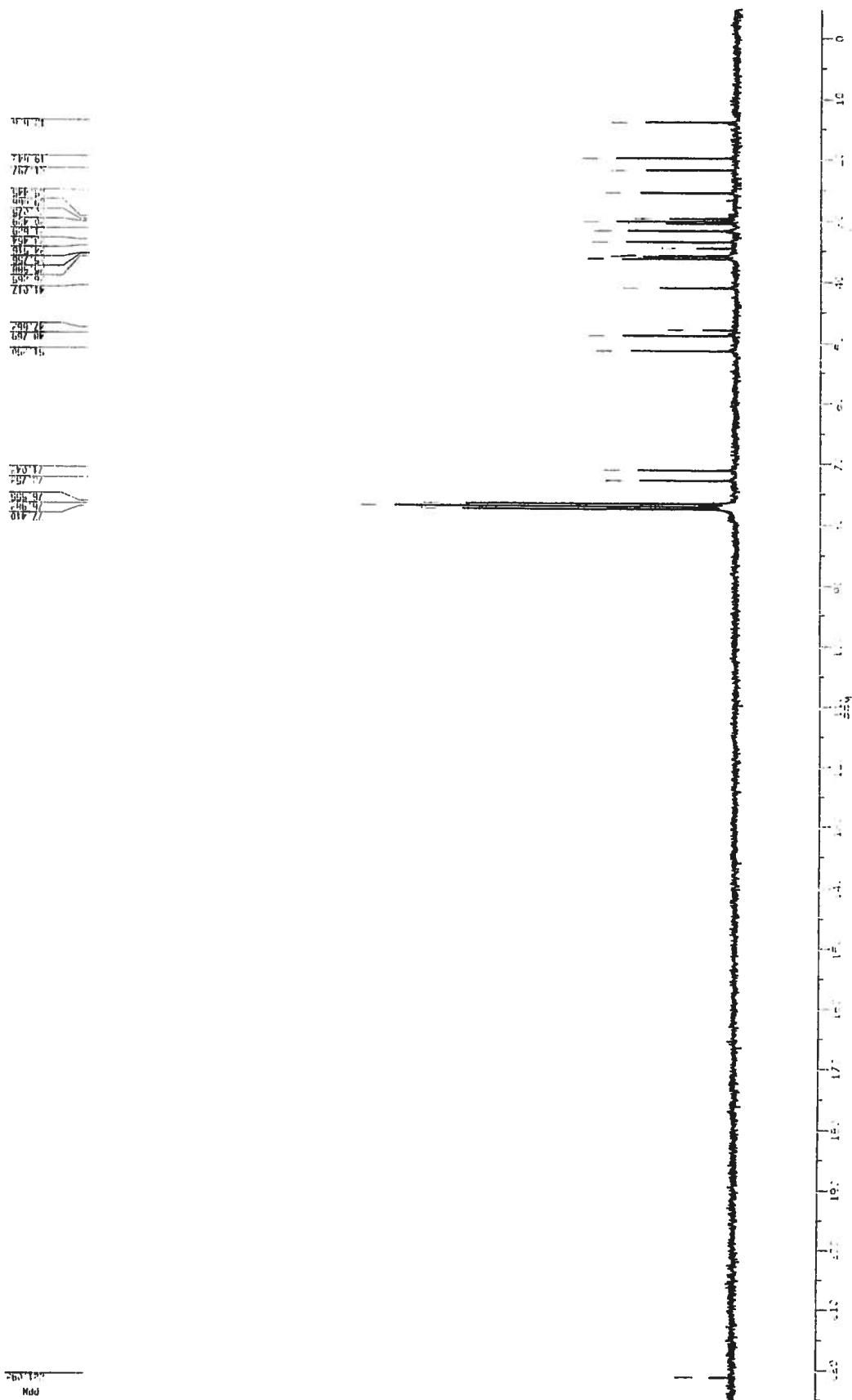
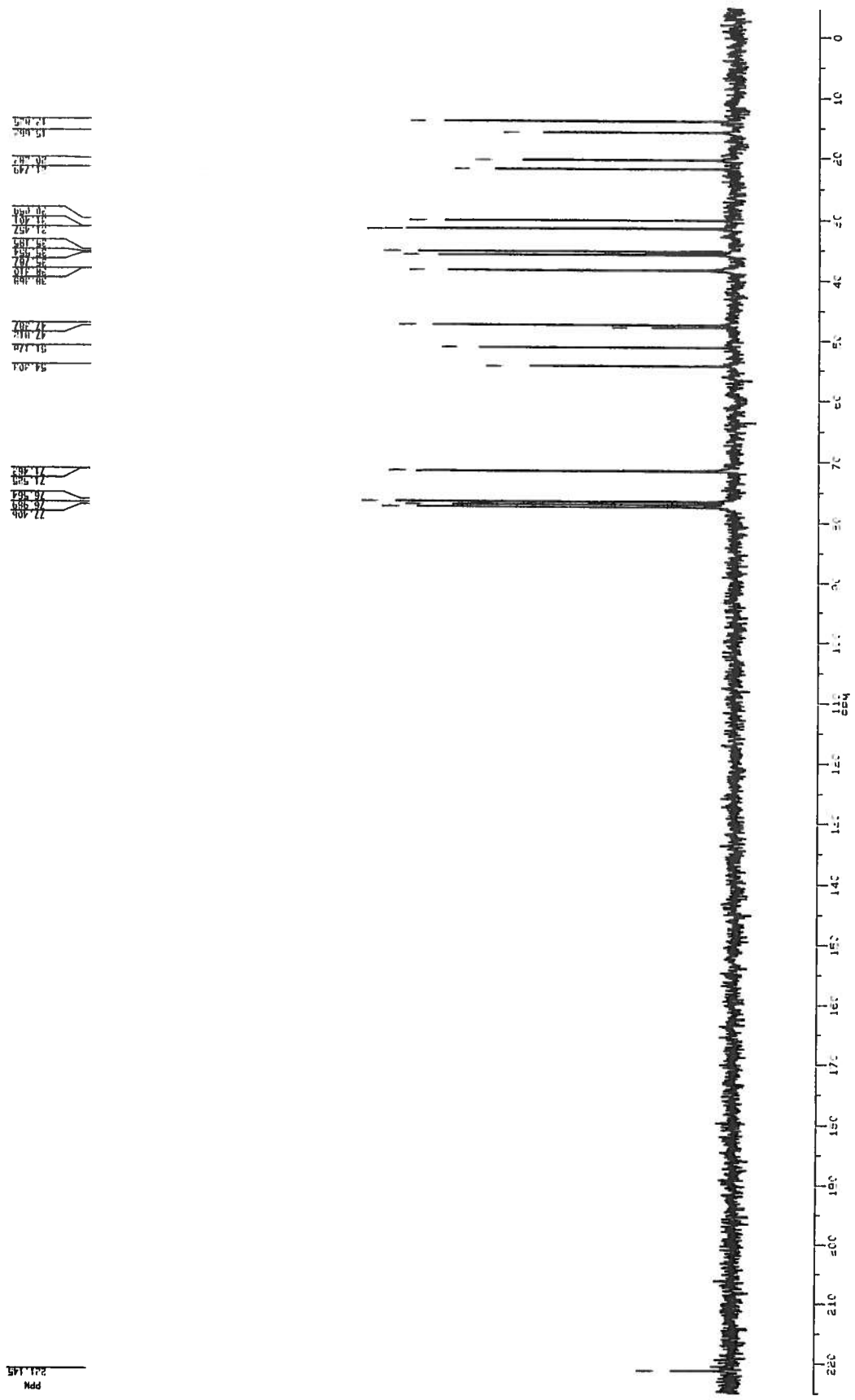


Figure C.2 : Spectre de RMN ^{13}C de la 6β -hydroxyandrosténone

Figure C.3 : Spectre de RMN ^{13}C de la 6 β -hydroxyétiocloholone

Figure C.4 : Spectre de RMN ¹³C de la 6β-hydroxyépandrostérone

Appendice D

Spectres de masse des stéroïdes 6 β -hydroxylés

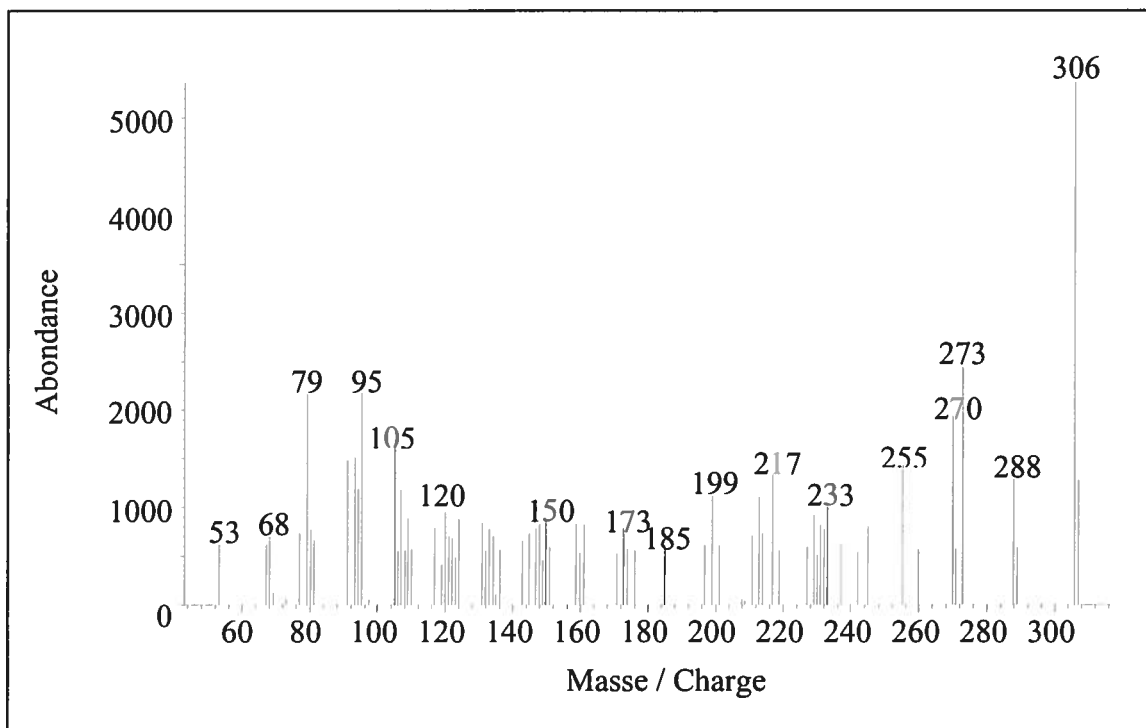


Figure D.1 : Spectre de masse de la 6β-hydroxyépiétiocholanolone (M^+ 306)

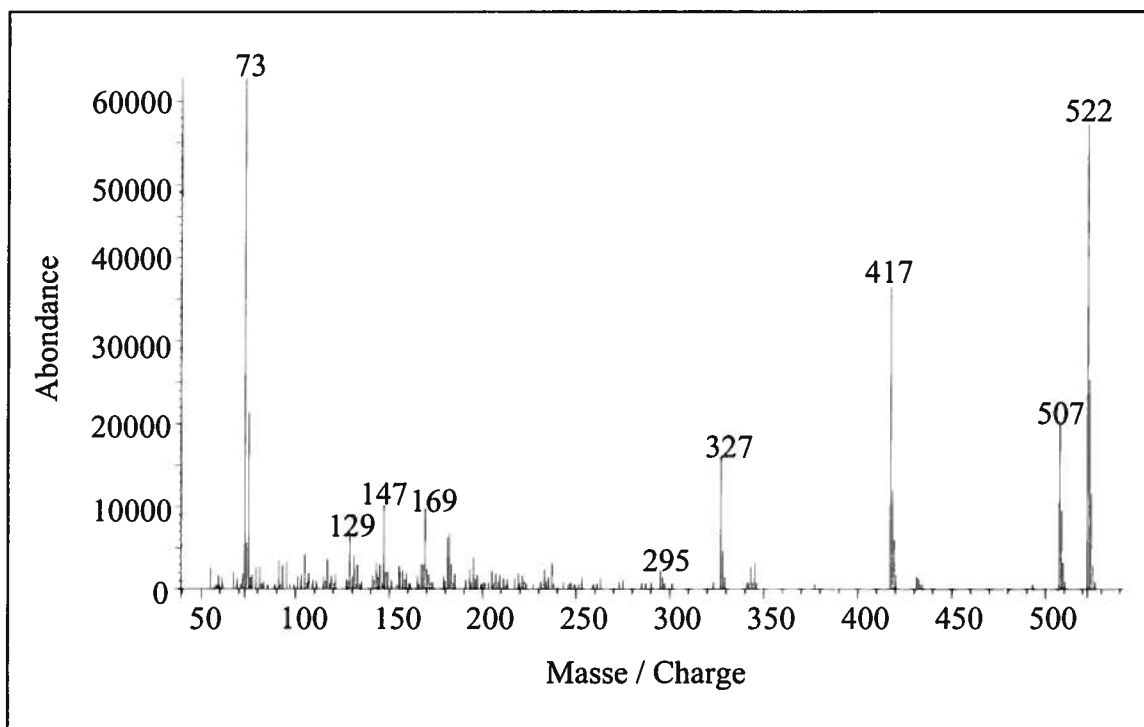


Figure D.2 : Spectre de masse du dérivé TMS-énol de la 6β-hydroxyépiétiocholanolone (M^+ 522)

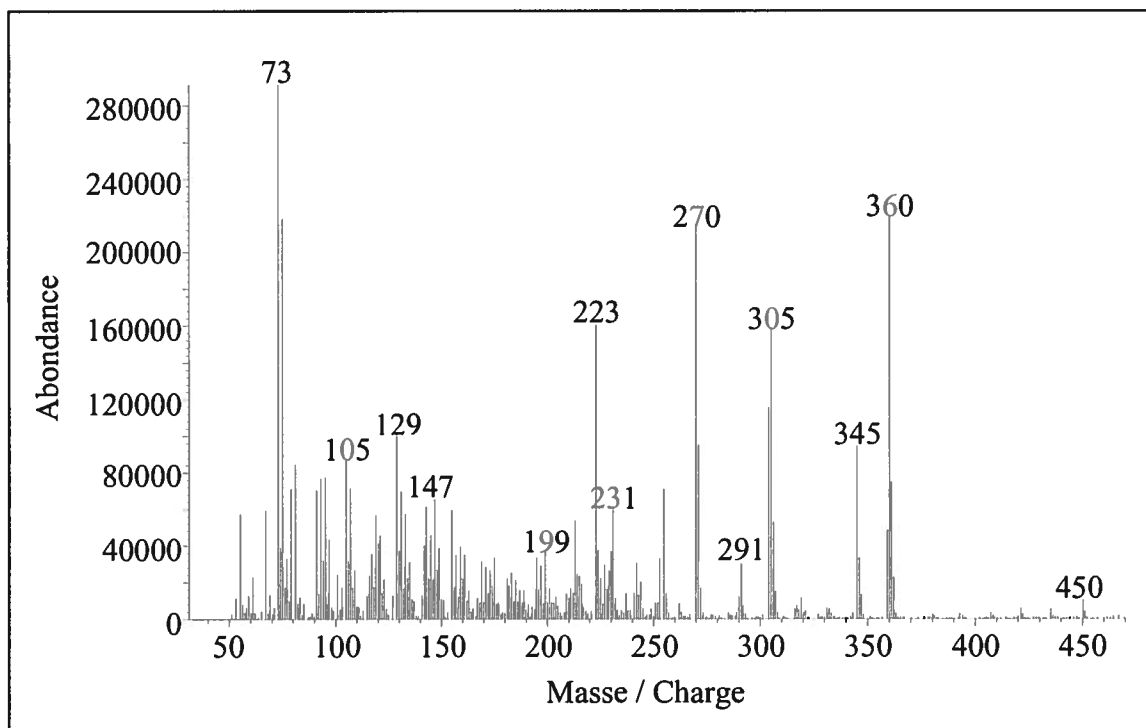


Figure D.3 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther de la 6 β -hydroxyépiétiocholanolone (M^+ 450)

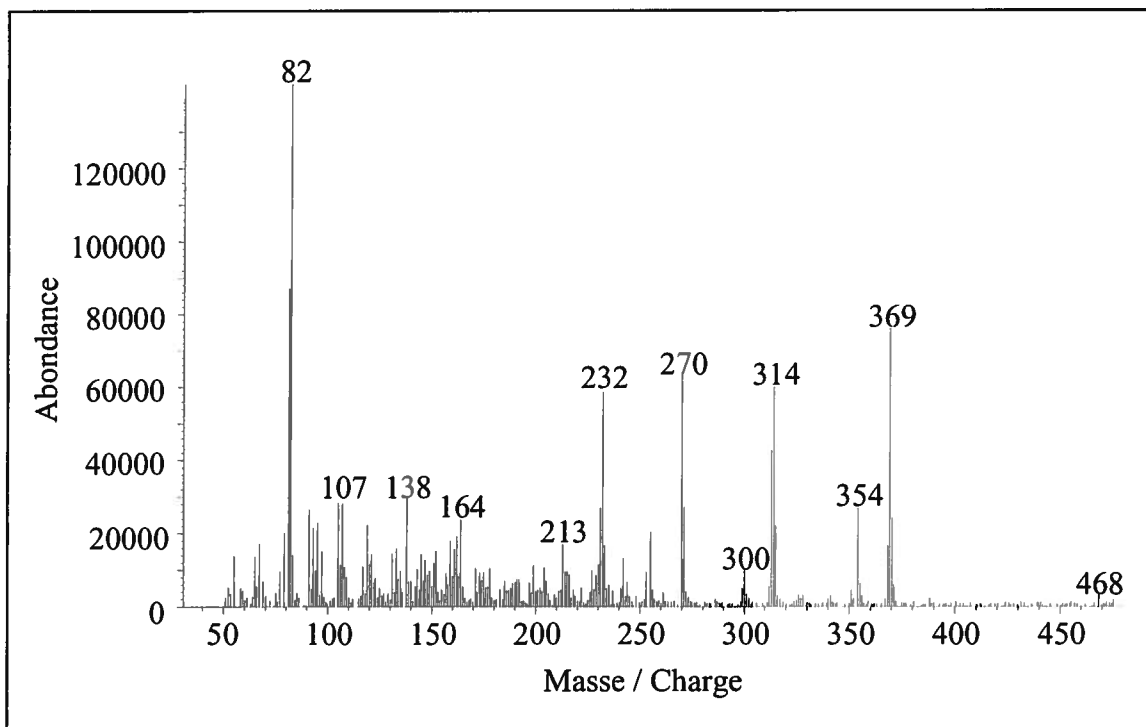


Figure D.4 : Spectre de masse du dérivé TMS- d_9 -éther de la 6 β -hydroxyépiétiocholanolone (M^+ 468)

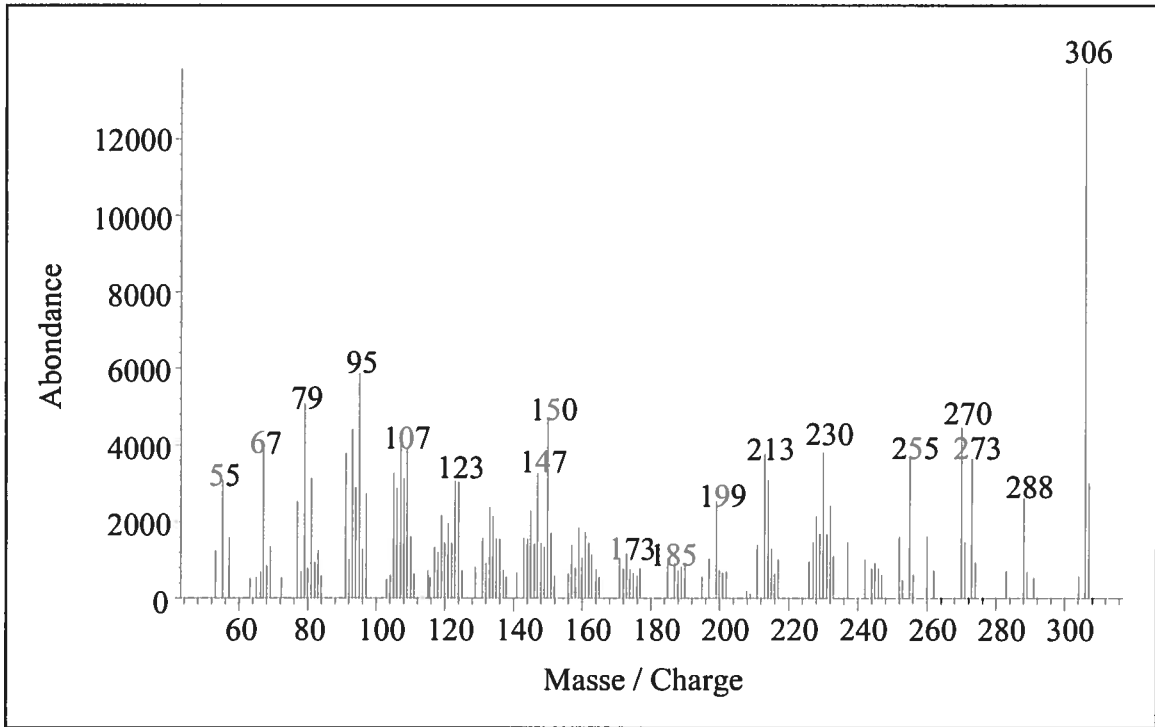


Figure D.5 : Spectre de masse de la 6β-hydroxyandrosténone (M⁺ 306)

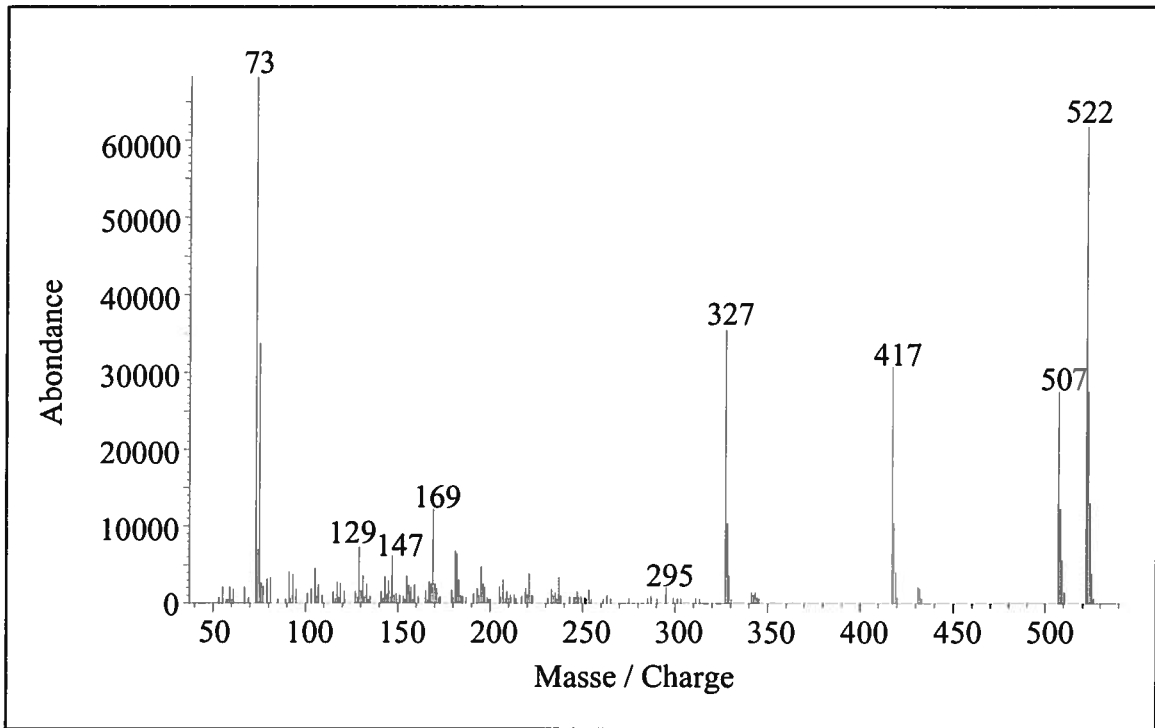


Figure D.6 : Spectre de masse du dérivé TMS-énol de la 6β-hydroxyandrosténone (M⁺ 522)

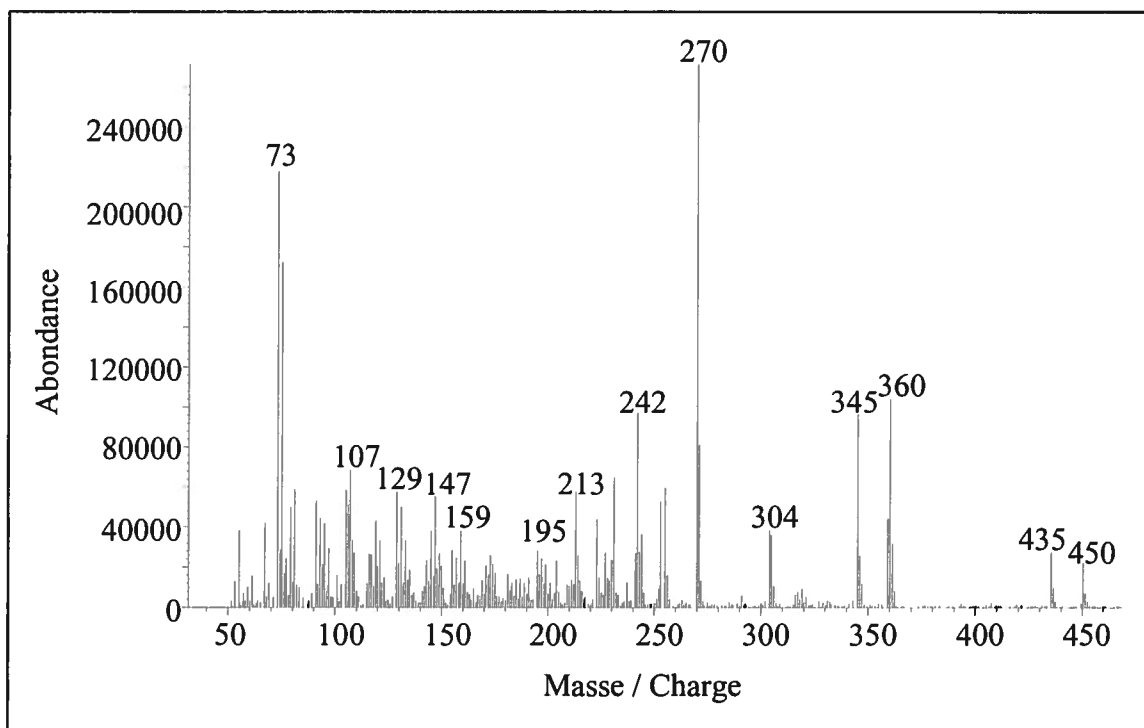


Figure D.7 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther de la 6 β -hydroxyandrosténone (M^{++} 450)

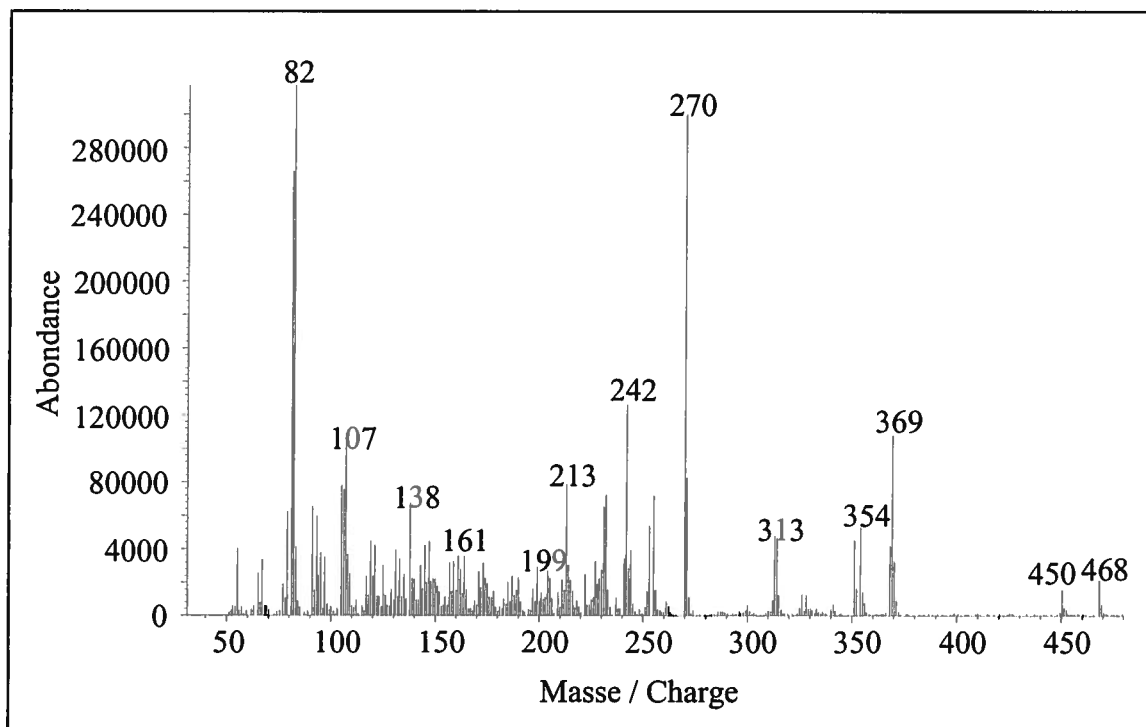
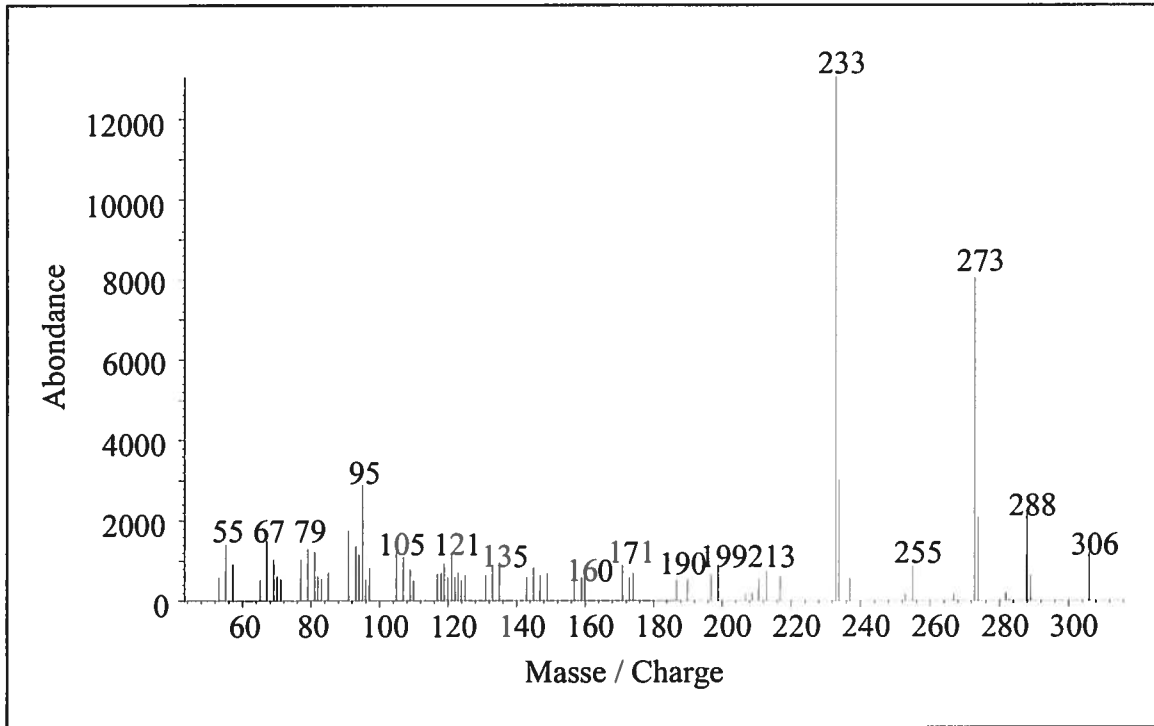
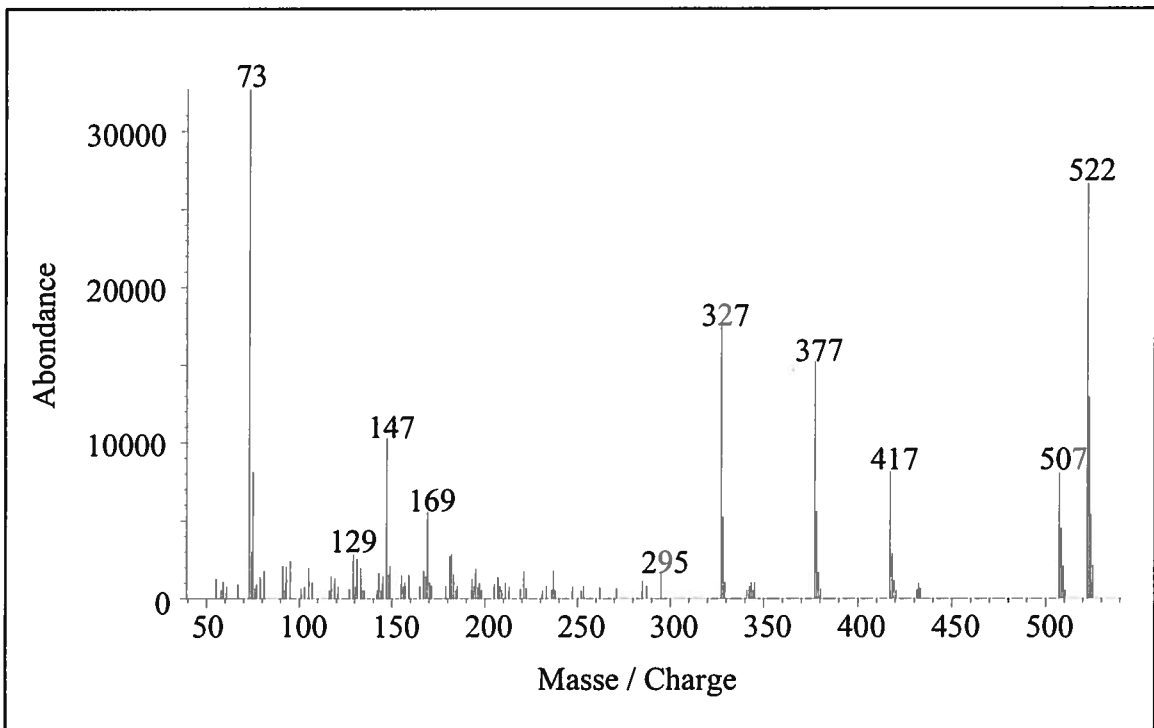


Figure D.8 : Spectre de masse du dérivé TMS-d₉-éther de la 6 β -hydroxyandrosténone (M^{++} 468)

Figure D.9 : Spectre de masse de la 6β-hydroxyétiocholanolone (M^+ 306)Figure D.10 : Spectre de masse du dérivé TMS-énol 6β-hydroxyétiocholanolone (M^+ 522)

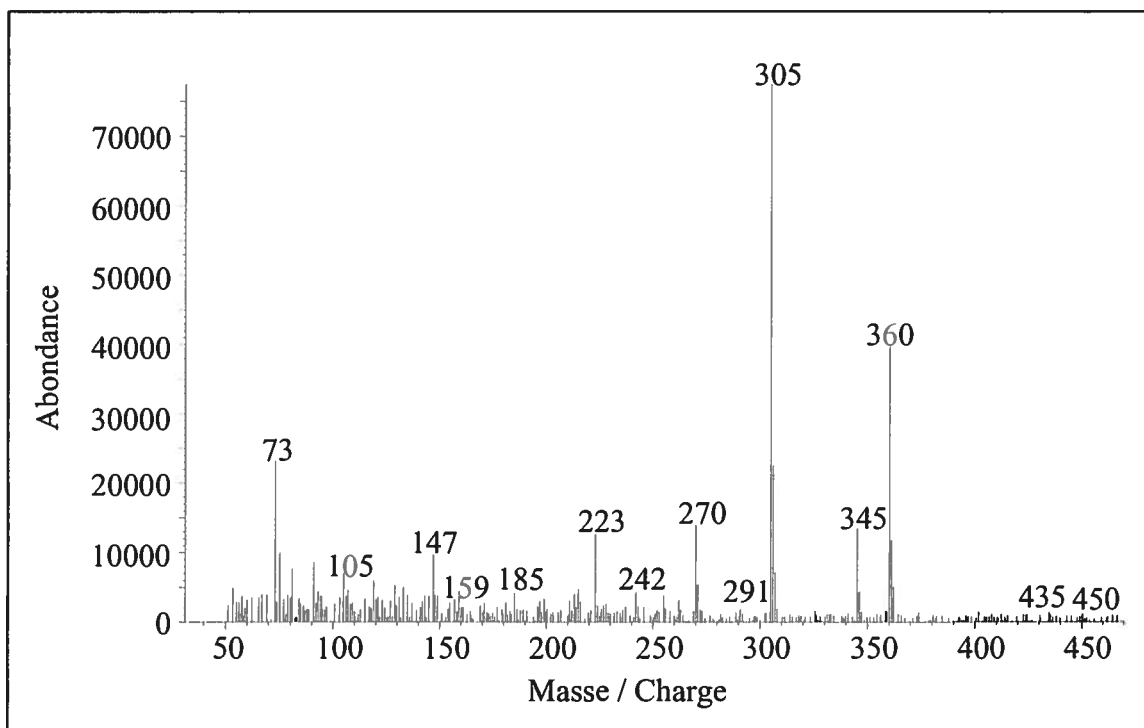


Figure D.11 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther de la 6 β -hydroxyétiocholanolone (M^+ 450)

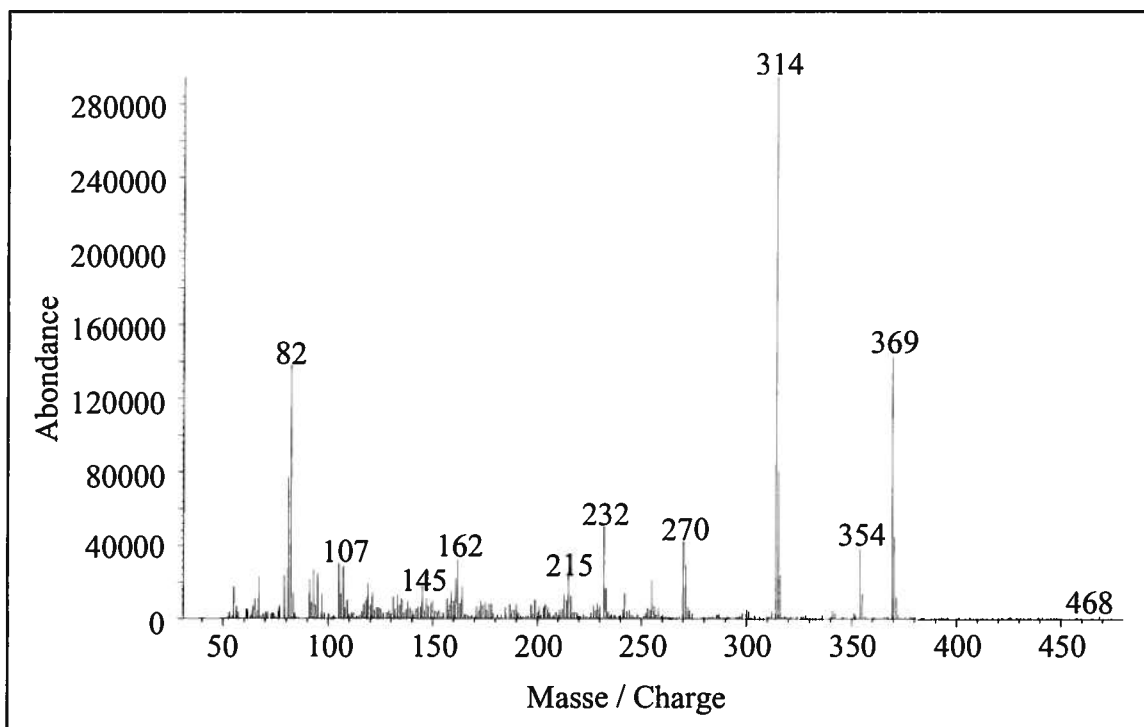


Figure D. 12 : Spectre de masse du dérivé TMS- d_9 -éther de la 6 β -hydroxyétiocholanolone (M^+ 468)

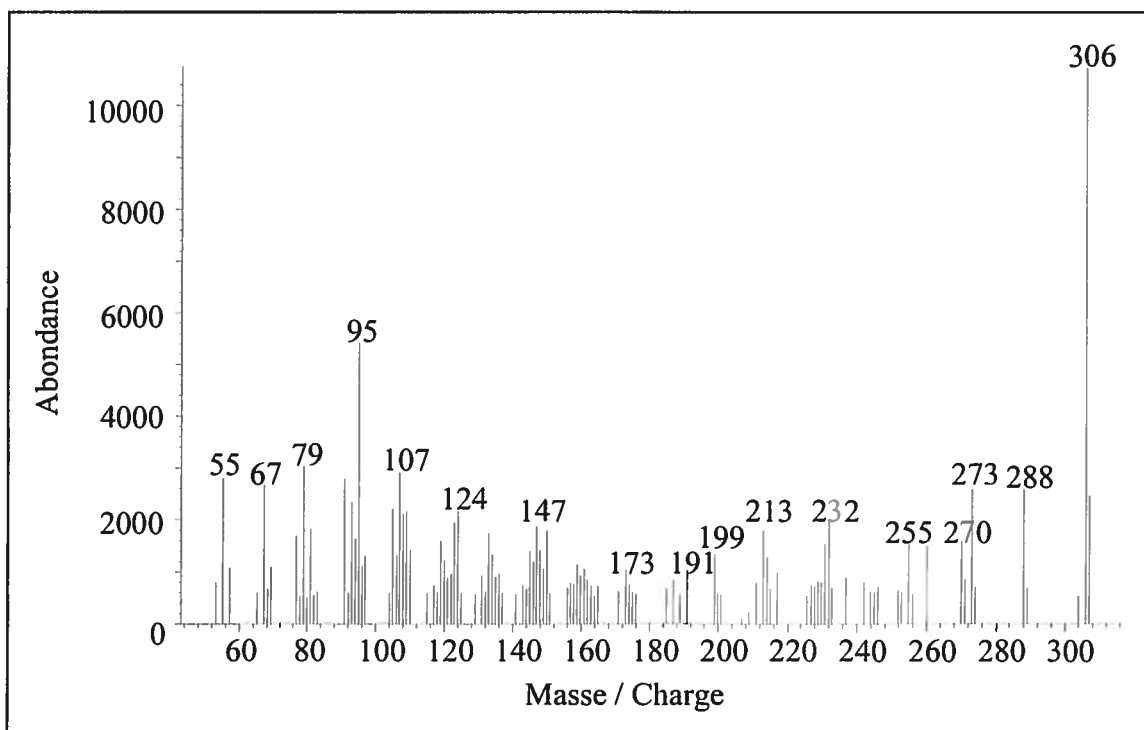


Figure D.13 : Spectre de masse de la 6β-hydroxyépiandrosterone (M^+ 306)

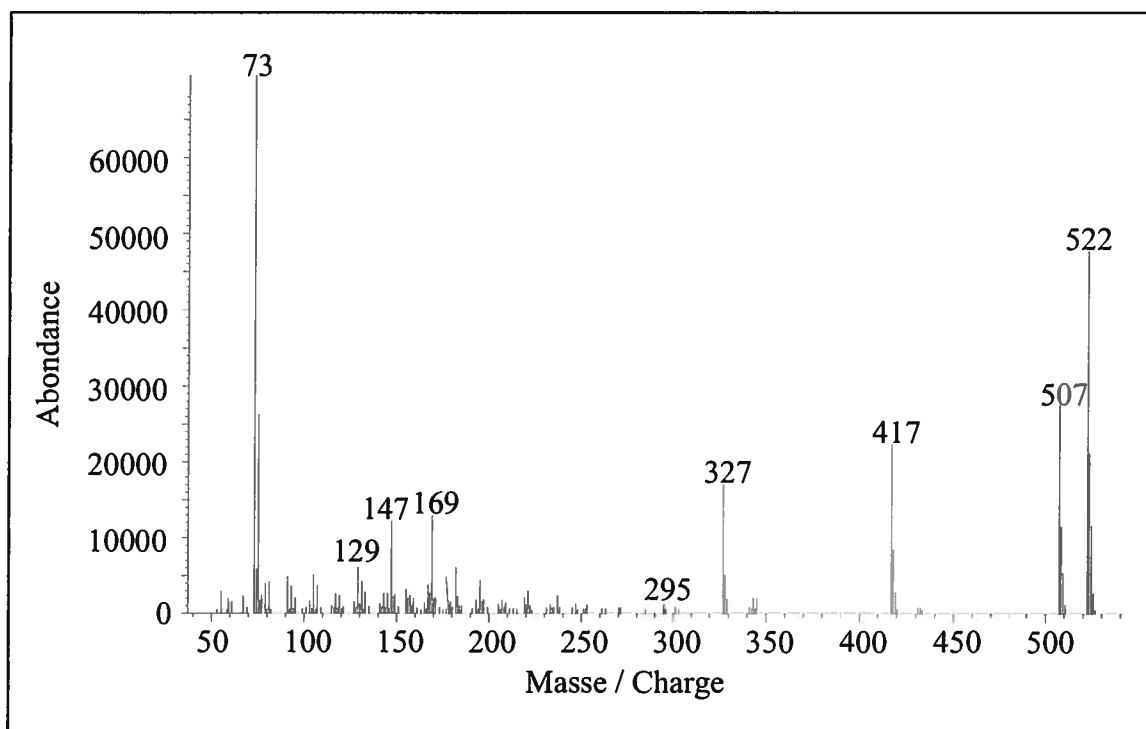


Figure D.14 : Spectre de masse du dérivé TMS-énol de la 6β-hydroxyépiandrosterone (M^+ 522)

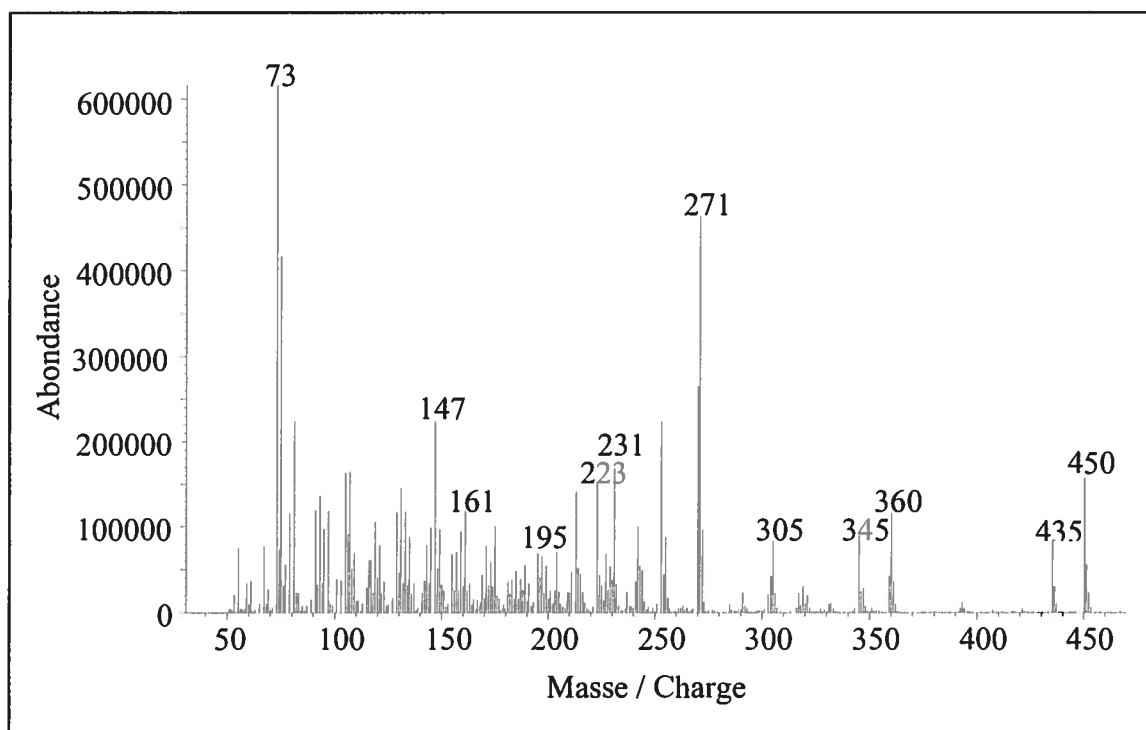


Figure D.15 : Spectre de masse du dérivé TMS-éther de la 6 β -hydroxyépiandrostérone (M^{+} 450)

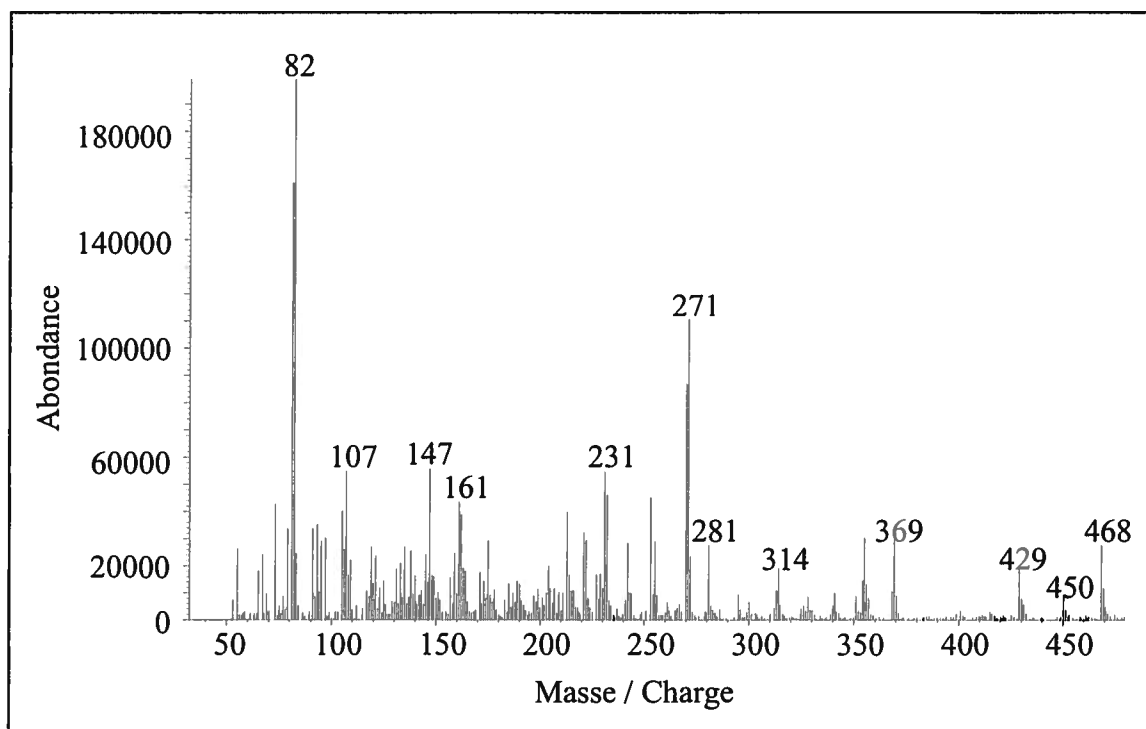


Figure D.16 : Spectre de masse du dérivé TMS-d₉-éther de la 6 β -hydroxyépiandrostérone (M^{+} 468)

Appendice E

**Profils d'excrétion des métabolites 6-hydroxylés
excrétés suivant l'administration d'androstènedione**

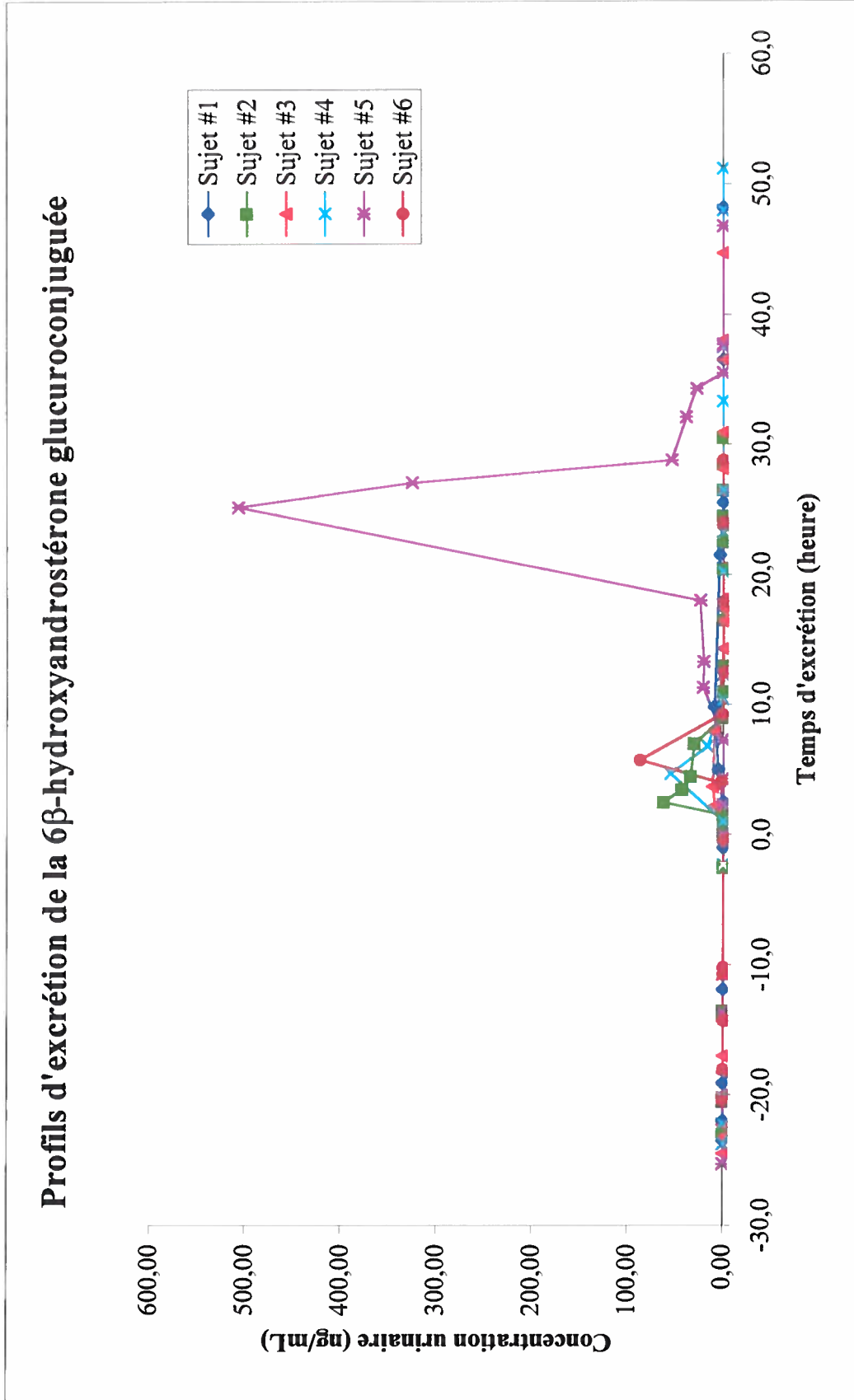


Figure E.1 : Profils d'excrétion de la 6 β -hydroxyandrostérone glucuroconjugée

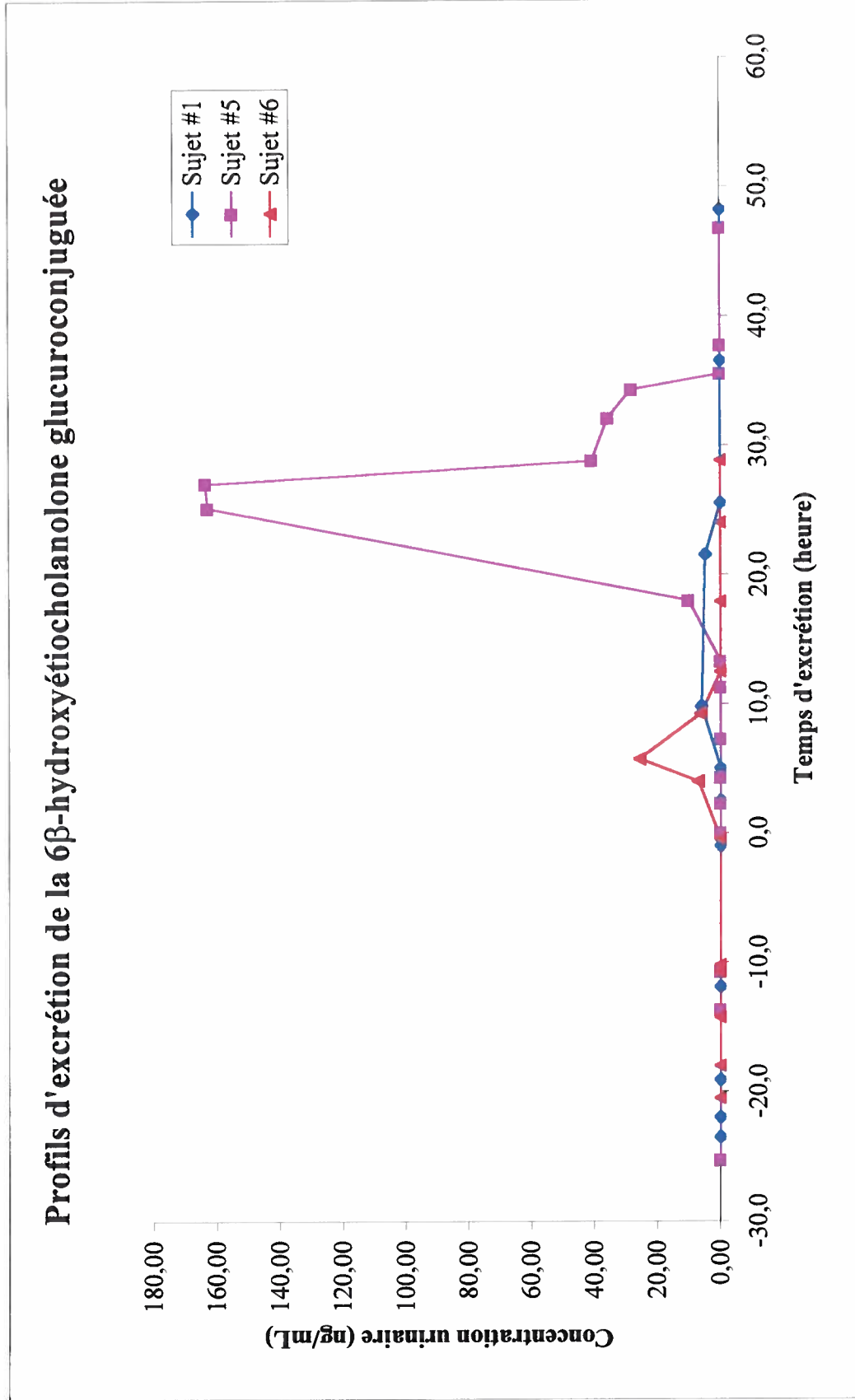


Figure E.2 : Profils d'excrétion de la 6 β -hydroxyétiocholanolone glucuroconjuguée

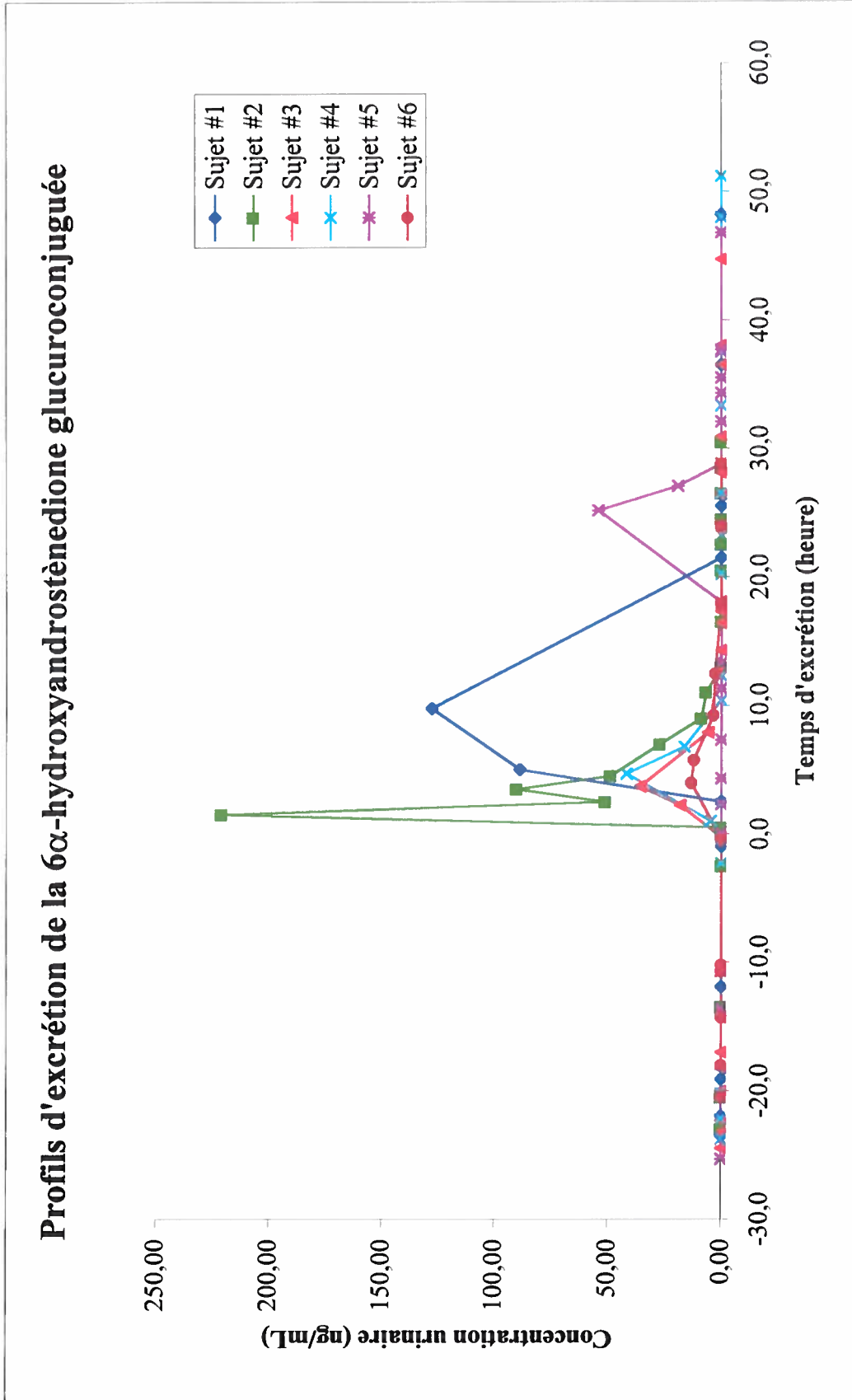


Figure E.3 : Profils d'excrétion de la 6 α -hydroxyandrostènedione glucuroconjuguée

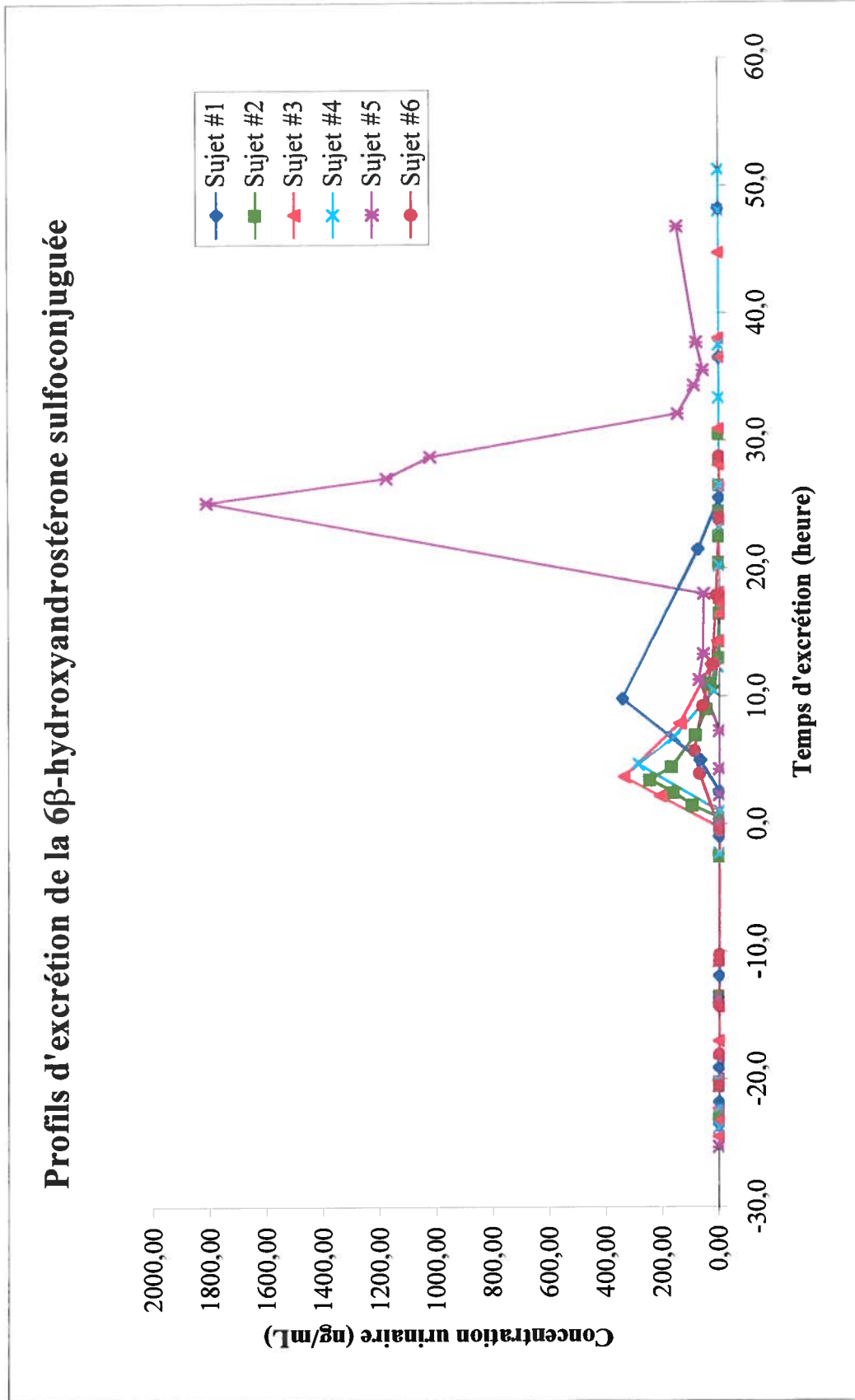
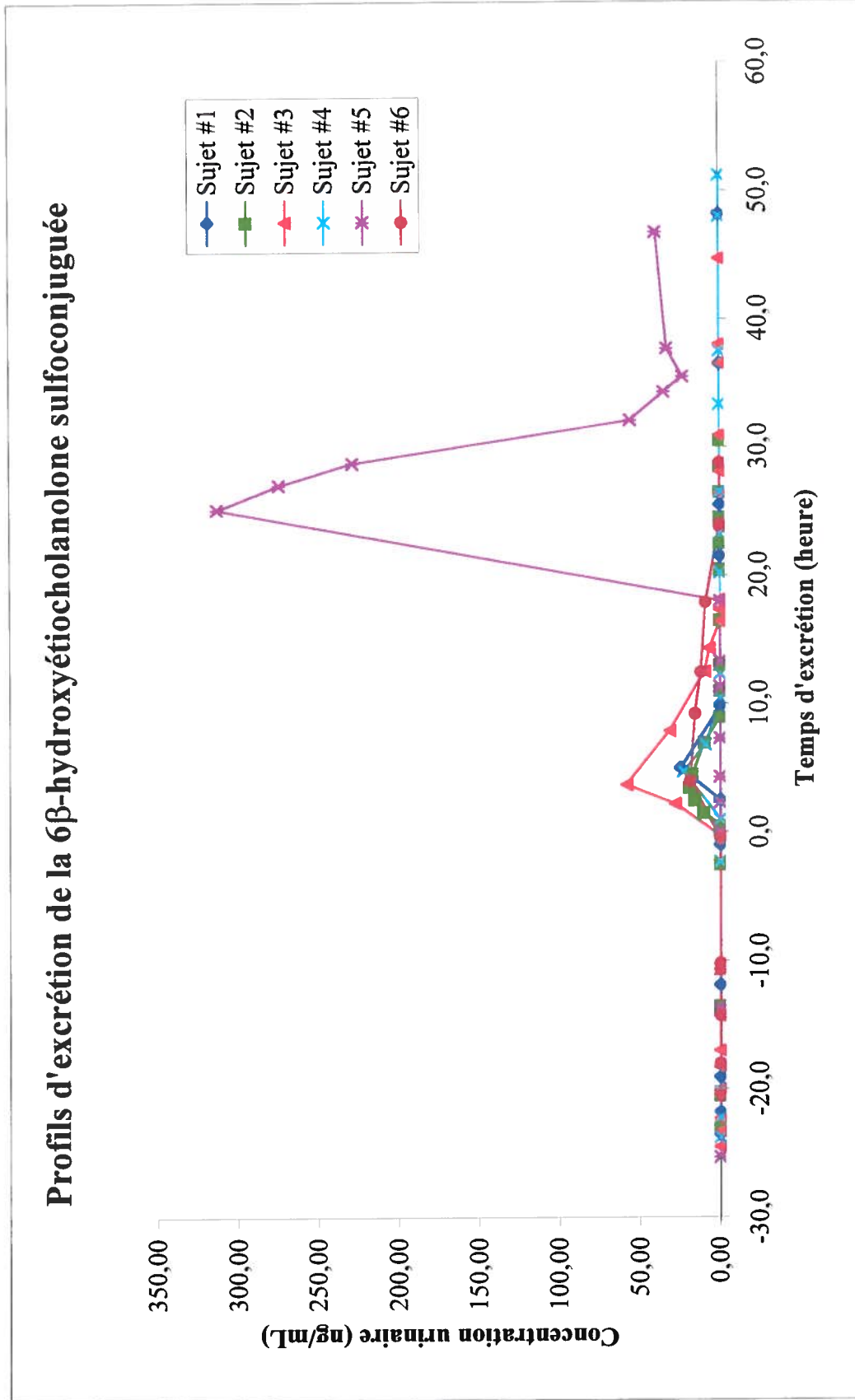
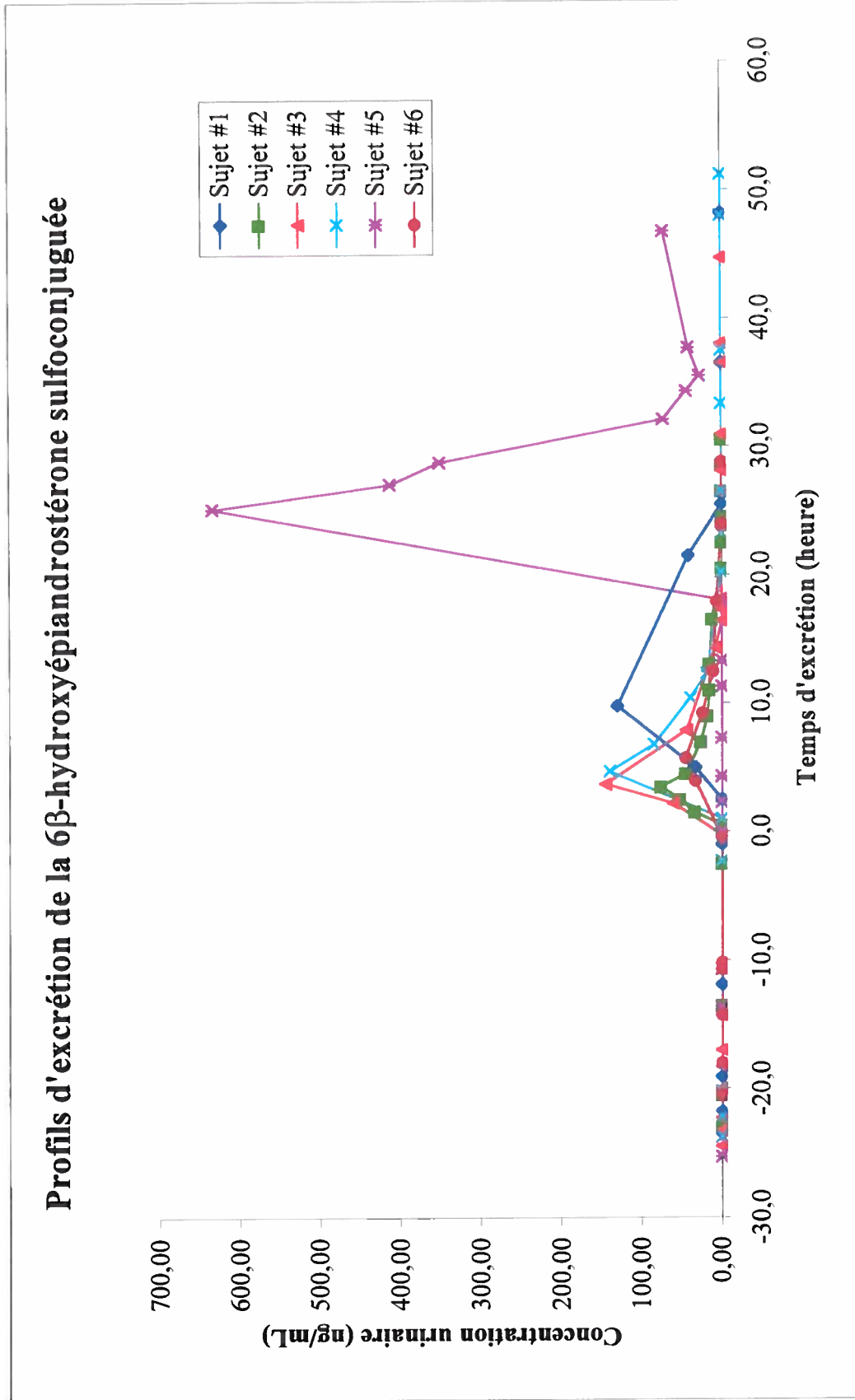


Figure E.4 : Profils d'excrétion de la 6 β -hydroxyandrostérone sulfoconjuguée

Figure E.5 : Profils d'excrétion de la 6 β -hydroxyétiocholanolone sulfoconjuguée

Figure E.6 : Profils d'excrétion de la 6 β -hydroxyépiandrostérone sulfoconjuguée

Liste des références

AHMAD, M. S. et A. S. Ansari. 1972. «Mass spectral studies on steroidal compounds-I : steroidal 6-one ethylene acetals». Organic Mass Spectrometry, vol. 6, p. 1095-1108.

AYOTTE, C., D. Goudreault et A. Charlebois. 1996. «Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine». Journal of Chromatography, vol. 687, p. 3-25.

BAULIEU, E.-E., P. A. Kelly. 1990. Hormones. 1^{re} édition. Paris : Hermann, publishers in arts and science, 697 p.

BLANCHARD, Y. et B. Robaire. 1997. «Le mode d'action des androgènes et la 5 α -réductase». Médecine / Sciences, vol. 13, p. 467-473.

BROOKS, C. J. W., W. Henderson et G. Steel. 1973. «The use of trimethylsilyl ethers in the characterization of natural sterols and steroid diols by gas chromatography-mass spectrometry». Biochimica Biophysica Acta, vol. 296, p. 431-445.

BROOKS, R. V. et G. Giuliani. 1964. «Epitestosterone : Isolation from human urine and experiments on possible precursors». Steroids, vol. 4, no. 1, p. 101-116.

BUNT, T. W. et J. B. Stothers. 1977. «¹³C NMR spectra of steroids. A survey and commentary». Organic Magnetic Resonance, vol. 9, no. 8, p. 439-464.

CAMACHO, A. M. et C. J. Migeon. 1964. «Studies on the origin of testosterone in the urine of normal adult subjects and patients with various endocrine disorders». Journal of Clinical Investigation, vol 43, no. 6, p. 1083-1089.

CARRUTHERS, N. I. et S. Garshasb. 1992. «Synthesis of corticoids from 9 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione». Journal of Organic Chemistry, vol. 57, p. 961-965.

CIO. Comité International Olympique. 1998. Document de la commission médicale.

CIO. Comité International Olympique. 2001. Document de la commission médicale.

CONTRERAS, R. et L. Mendoza. 1979. «The reduction of 5α -cholestan-3-one and 5β -cholestane-3-one by some boranes and hydroborates». Steroids, vol. 34, no. 2, p. 121-124.

DESLYPERE, J. P., P. W. Wiers, A. Sayed et A. Vermeulen. 1981. «Urinary excretion of androgen metabolites, comparaison with excretion of radioactive metabolites after injection of $[4-^{14}\text{C}]$ testosterone. Influence of age». Acta Endocrinologica, vol. 96, p. 265-272.

DIONNE, P., B. Tchédam Ngatcha et D. Poirier. 1997. «D-ring allyl derivatives of 17β - and 17α -estradiols : Chemical synthesis and ^{13}C NMR data». Steroids, vol. 62, p. 674-681.

FRANKE, W. W. et B. Berendonk. 1997. «Hormonal doping androgenization of athletes : a secret program of the German Democratic Republic government». Clinical Chemistry, vol. 43, p. 1262-1279.

GARDI, R. et A. Lusignani. 1967. «Autoxidation of steroid $\Delta^{3,5}$ -diene-3-ol ethers. A simple route to 6β -hydroxy Δ^4 -3-ketones». Journal of Organic Chemistry, vol. 32, p. 2647-2649.

GARLE, M. et E. Palonek. 1998. «Excretion studies with 4-androstene-3,17-dione». Dans : W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke, Recent Advances In Doping Analysis (6) –Proceedings of the 16th Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 181-184.

GOWER, D. B. 1979. Steroid Hormones. London : Croom Helm Ltd Publishers, 115 p.

HARVEY, J. D. et P. Vouros. 1979. «Influence of the 6-trimethylsilyl group on the fragmentation of the trimethylsilyl derivatives of some 6-hydroxy- and 3,6-dihydroxy-steroids and related compounds». Biomedical Mass Spectrometry, vol. 6, no. 4, p. 135-142.

IIDA, T., T. Momose, T. Tamura, F. C. Chang, T. Niwa, J. Goto et T. Nambara. 1993. «Potential bile acid metabolites. 20. A new synthetic route to stereoisomeric 3,6-dihydroxy- and 6-hydroxy-5 α -cholanoic acids». Steroids, vol. 58, p. 362-369.

IIDA, T., T. Momose, T. Tamura, T. Matsumoto, F. C. Chang, T. Niwa, J. Goto et T. Nambara. 1988. «Potential bile acid metabolites. 13. Improved routes to 3 β ,6 β - and 3 β ,6 α -dihydroxy-5 β -cholanoic acids». Journal of Lipid Reseach, vol. 29, p. 165-171.

JACKMAN, L. M. et S. Sterndell. 1969. Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopie in Organic Chemistry. 2^e edition. Pergamon Press, 456 p.

JOSEFSON, D. 1998. «Concern raised about performance enhancing drugs in the US». BMJ, vol. 317, no. 7160, p. 702.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1994. «Steroid nomenclature». Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 50, no.1/2, p. ix-xi.

KING, D. S., R. L. Sharp, M. D. Vukovich, G. A. Brown, T. A. Reifenrath, N. L. Uhl et K. A. Parsons. 1999. «Effect of oral androstenedione on serum testosterone and adaptations to resistance training in young men: a randomized controlled trial». JAMA, vol. 281, no. 21, p. 2020-2028.

KOLEK, T. et A. Swizdor. 1998. «Biotransformations of 4-ene-3-oxo steroids in *Fusarium Culmorum* Culture». The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 67, no. 1, p. 63-69.

KOPERA, H. 1993. Anabolic-androgenic steroids towards the year 2000 / editor : Hans Kopera. Wien : Blackwell-MZV, 289 p.

KUTNEY, J. P., K. Piotrowsk, J. Somerville, S-P. Huang et S. Rettig. 1989. «The chemistry of thujone. XIII. Synthetic studies in the digitoxigenin series». Canadian Journal of Chemistry, vol. 67, p. 580-589.

LEDER, B. Z., C. Longcope, D. H. Catlin, B. Ahrens, D. A. Schoenfeld et J. S. Finkelstein. 2000. «Oral androstenedione administration and serum testosterone concentrations in young men». JAMA, vol. 283, no. 6, p. 779-782.

LÉVESQUE, J.-F. 1998. «L'importance clinique de l'excrétion urinaire des stéroïdes sulfoconjugués lors de contrôles antidopages». Mémoire de maîtrise, Montréal, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, 136 p.

LÉVESQUE, J.-F. et C. Ayotte. 1999-a. «Proposed criteria for the detection of androstenedione oral administration». Dans : W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke, Recent Advances In Doping Analysis (7) –Proceedings of the 17th Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 169-179.

LÉVESQUE, J.-F. et C. Ayotte. 1999-b. «The administration of oral DHEA : the efficiency of steroid profiling». Dans : W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke, Recent Advances In Doping Analysis (7) –Proceedings of the 17th Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 213-222.

LÉVESQUE, J.-F., D. Goudreault et C. Ayotte. 1999. «Détection des signes d'utilisation d'androstènedione comme agent dopant : Une nouvelle approche». Rapport interne de travaux.

LEUNISSEN, W. J. J. 1979. «Quantitative aspects of the determination of steroid profiles from urine by capillary gas chromatography». Thèse doctorale. Eindhoven, Pays-Bas, 161 p.

MAHESH, V. B. et R. B. Greenblatt. 1962. «The in vivo conversion of dehydrotestosterone and androstenedione to testosterone in human». Acta Endocrinologica, vol. 41, p. 400-406.

MALTAIS, R., V. Luu-The et D. Poirier. 2001. «Parallel solid-phase synthesis of 3 β -peptido-3 α -hydroxy-5 α -androstane-17-one derivatives for inhibition of type 3 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase». Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 12, p. 3101-3111.

MARIEB, E. 1999. Anatomie et physiologie humaines. 2^e édition. Saint-laurent, Québec : Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 1194 p. Version française de : Marieb, E. 1998. Human Anatomy and Physiology. 4^e édition. The Benjamin/Cummings Publishing Compagny, Inc.

MASSÉ, R., C. Ayotte et J. Dugal. 1989. «Studies on anabolic steroids. I. Integrated methodological approach to the gas chromatographic mass spectrometric analysis of anabolic steroid metabolites in urine». Journal of Chromatography, vol. 489, no. 1, p. 23-50.

MILEWICH, L., A. L. Winters, P. Stephens et P. C. MacDonald. 1977. «Metabolism of dehydroisoandrosterone and androstenedione by the human lung in vitro». Journal of Steroid Biochemistry, vol. 8, p. 277-284.

MITSunobu, O. 1981. «The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformiaon of natural products». Synthesis, p. 1-28.

NORET, A. 1990. Le dopage. 2^e édition. Paris : Éditions Vigot, 293 p.

NORMAN, A. W. et G. Litwack. 1997. Hormones. 2^e édition. San Diego, California : Academic Press, 558 p.

PEARLMAN, W. H. et M. R. J. Pearlman. 1961. «The metabolism in vivo of Δ^4 -androstene-3,17-dione-7- H^3 ; Its localization in the ventral prostate and other tissues of the rat». The Journal of Biological Chemistry, vol. 236, no. 5, p. 1321-1327.

POIRIER, D. Résultats non publiés.

RASMUSSEN, B. B., E. Volpi, D. C. Gore et R. R. Wolfe. 2000. «Androstenedione does not stimulate muscle protein anabolism in young healthy men». The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 85, no. 1, p. 55-59.

SCHÄNZER, W. 1996-a. «Metabolism of anabolic androgenic steroids». Clinical Chemistry, vol. 42, no. 7, p. 1001-1020.

SCHÄNZER, W. 1996-b. «Metabolism of anabolic androgenic steroids: 5 α - and 5 β -reduction of 3-keto-4-ene steroids». Dans : W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke, Recent Advances In Doping Analysis (4) –Proceedings of the 14th Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 185-201.

SCHÄNZER, W. et M. Donike. 1993. «Metabolism of anabolic steroids in man : synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites». Analytica Chimica Acta, vol. 275, p. 23-48.

SHEETS, J. J. et R. W. Estabrook. 1985. «Multiple sites of steroid hydroxylation by the liver microsomal cytochrome P-450 system : primary and secondary metabolism of androstenedione». Biochemistry, vol. 24, p. 6591-6597.

SLOAN, S., D. J. Harvey et P. Vouros. 1971. «Interaction and rearrangement of trimethylsilyloxy functional groups. The structural significance of the m/e 147 ion in the mass spectra of trimethylsilyl steroidal ethers». O.M.S. Organic Mass Spectrometry, vol. 5, p. 789-799.

SOLOMONS, T. W. G. 1996. Organic Chemistry. 6^e édition. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1218 p.

STANCZYK, F., R. K. Matteri, F. R. Kaufman, E. Gentzschlein et R. A. Lobo. 1990. «Androstenedione is an important precursor of dihydrotestosterone in the genital skin of women and is metabolized via 5 α -androstenedione». Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 37, no. 1, p. 129-132.

TAMM, J. et Z. Starcevic. 1966. «The urinary excretion of epitestosterone, testosterone and androstenedione following intravenous infusions of high doses of these steroids in human subjects». Steroids, vol. 8, no. 5, p. 659-669.

TRÄGER, L. 1977. Steroidhormone. Biosynthese Stoffwechsel Wirkung. Berlin : Springer-Verlag, p. 166-74.

TREMBLAY, M. R. et D. Poirier. 1996. «Synthesis of 16-[carbamoyl(bromomethyl)alkyl]estradiol : a potential dual-action inhibitor designed to blockade estrogen action and biosynthesis». Journal of the Chemical Society. Perkin transaction 1, p. 2765-2771.

TREMBLAY, M. R. et D. Poirier. 2000. «Solid-phase synthesis of phenolics steroids: from optimization studies to a convenient procedure for combinatorial synthesis of biologically relevant estradiol derivatives». Journal of Combinatorial Chemistry, vol. 2, p. 48-65.

URALETS, V. P., et P. A. Gillette. 1998. «Over-the-counter anabolic steroids 4-androsten-3,17-dione; 4-androsten-3 β ,17 β -diol, and 19-nor-4-androsten-3,17-dione : excretion studies in men». Dans : W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke, Recent Advances In Doping Analysis (6) –Proceedings of the 16th Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 147-169.

VAN EENOO, P., F. T. Delbeke et P. De Backer. 1998. «Excretion studies with 4-androstene-3,17-dione». Dans : W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke, Recent Advances In Doping Analysis (6) –Proceedings of the 16th Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln. Sport und Buch Strauß, p. 171-180.

WIEBE J. P., C. Deline et K. D. Buckingham. 1985. «Synthesis of allylic gonadal steroids, 3 α -hydroxy-4-pregnen-20-one and 3 α -hydroxy-4-androsten-17-one, and of 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one». Steroids, vol. 45, no. 1, p. 39-51.

WILSON, J. D. 1995. «Androgens». Dans J. G. Hardman, A. Goodman Gilman, L. E. Linbird, 9^e édition, Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutic, New-York : P.B. Molinoff & R.W. Ruddon editors, 1995, p. 1441-1457.

WOLFE, R., A. Fernando, M. Sheffield-Moore et R. Urban. 2000. «Testosterone and muscle protein metabolism». Mayo Clinic Proceedings, vol. 75, p. s55-s60.